



# Τ.Ε.Ι. ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας (Σ.ΤΕ.Γ)  
Τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (ΤΕ.ΓΕ.Π.)

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:  
ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ  
ΕΝΖΥΜΑ. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ



ΚΑΣΙΟΥΡΑ ΕΛΕΝΗ  
ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΞΑΠΛΑΝΤΕΡΗ ΜΑΡΙΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2009

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>1</b>
<b>A. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>2</b>
1.1. ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	2
1.1.1. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ	2
1.1.2. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΖΥΘΟΠΟΙΪΑ	5
1.1.3. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΪΑ	6
1.1.4. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ	10
1.1.5. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΦΡΟΥΤΩΝ	14
1.2. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ	15
1.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ	16
1.3.1. Χημικές τεχνικές ακινητοποίησης	17
1.3.2. ΦΥΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	32
<b>2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ</b>	<b>36</b>
2.1. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ	36
2.1.1. Ενζυμικός διαχωρισμός μίγματος D,L-αμινοξέων και παραγώγων τους	37
2.1.2. Ενζυμική Παρασκευή αμινοξέων	40
2.2. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ	44
<b>3. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ</b>	<b>45</b>
3.1. Διαμεσολαβητές μεταφοράς φορτίου (Mediators)	46
3.2. Ηλεκτρόδιο (βιοαισθητήρας) Οξυγόνου	47
3.3. Ηλεκτρόδιο (βιοαισθητήρας) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	48
3.4. Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός NADH (βιοαισθητήρες δεϋδρογονασών)	49
3.5. Προβλήματα κατά τη χρήση αμπερομετρικών βιοαισθητήρων	50
<b>B. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ</b>	<b>52</b>
1.1. ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ	52
1.2. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	55

<b>1.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ</b>	<b>56</b>
<b>2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ</b>	<b>60</b>
<b>2.1. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ</b>	<b>60</b>
<b>2.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΟΥ</b>	<b>63</b>
<b>2.3. ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ</b>	<b>64</b>
<b>Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>66</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>67</b>

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία γίνεται μια προσπάθεια για την περιγραφή των τεχνολογιών που αφορούν ακινητοποιημένα ένζυμα και κύτταρα μικροοργανισμών, λόγω της τεράστιας σημασίας τους σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές στη Βιομηχανία Τροφίμων.

Αρχικά δίνεται μια περιγραφή των ενζύμων γενικά στη Βιοτεχνολογία, και στη συνέχεια περιγράφονται τα χαρακτηριστικά των ακινητοποιημένων ενζύμων, καθώς και οι τεχνικές που εφαρμόζονται για την ακινητοποίησή τους. Στη συνέχεια, αναλύονται διάφορες εφαρμογές των ακινητοποιημένων ενζύμων στη Βιομηχανία Τροφίμων. Μετά περιγράφονται οι ιδιότητες των ακινητοποιημένων κυττάρων μικροοργανισμών, και αναλύεται η σημασία τους στη Βιοτεχνολογία. Ακολουθούν οι εφαρμοζόμενες τεχνικές ακινητοποίησης κυττάρων, καθώς και οι εφαρμογές τους στη Βιομηχανία Τροφίμων.

## Α. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

### 1.1 ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

**Βιοτεχνολογία** είναι η ελεγχόμενη χρήση κυττάρων ή κυτταρικών και υποκυτταρικών οργανιδίων (ένζυμα, αντισώματα) για την παραγωγή προϊόντων και την παροχή υπηρεσιών [1,2,4].

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στη Βιοτεχνολογία φαίνονται στον Πίνακα 1:

**Πίνακας 1.** Τάξεις ενζύμων στην Βιοτεχνολογία

Τάξη Ενζύμου	Καταλυόμενη αντίδραση
Οξειδοοξειδοκτάσες	Οξειδοαναγωγή
Τρανσφεράσες	Μεταφορά λειτουργικής ομάδας
Υδρολάσες	Υδρολύσεις
Λυάσες	Σχηματισμός διπλών δεσμών
Ισομεράσες	Ισομερειώσεις
Λιγάσες	Σχηματισμός δεσμών

#### 1.1.1 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΟΥ ΑΜΥΛΟΥ

Το *άμυλο (starch)* αποτελεί πηγή εφεδρείας υδατανθράκων και εντοπίζεται στους φυτικούς ιστούς υπό μορφή κόκκων (*granules*), τους αμυλοκόκκους.

Αποτελείται από δύο συστατικά, την *αμυλόζη (15-30%)* και την *αμυλοπηκτίνη (70-85%)*, οι οποίες έχουν ως δομικές μονάδες μόρια D-γλυκόζης [2,11,13]. Η αμυλόζη αποτελείται από μη διακλαδιζόμενες πολυσακχαρικές αλυσίδες, οι οποίες λαμβάνουν τη μορφή έλικας στον χώρο και είναι δομημένες από 250-300 μόρια γλυκόζης, ενωμένα με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4. Αντίθετα, η αμυλοπηκτίνη αποτελείται από διακλαδιζόμενες πολυσακχαρικές αλυσίδες, καθεμία αποτελούμενη από 1.000 περίπου μόρια γλυκόζης, ενωμένα σε όλα τα σημεία της με γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4. Εξάιρεση αποτελούν οι θέσεις διακλαδώσεως, οι οποίες βρίσκονται κάθε 30 περίπου μόρια γλυκόζης και σχηματίζονται από γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6.

Στη φύση, τα δύο ανωτέρω πολυμερή συστατικά σχηματίζουν σύμπλοκα με άλλες κυτταρικές ουσίες, π.χ. πρωτεΐνες, λίπη, φωσφολιπίδια και φωσφορικούς εστέρες.

Κατάλληλη σταδιακή ενζυμική επεξεργασία του αμύλου παρέχει προϊόντα γλυκιάς γεύσης, χρήσιμα στη βιομηχανία τροφίμων, κυριότερα από τα οποία είναι: το σιρόπι γλυκόζης ή δεξτρόζης (glucose ή dextrose syrup), τα σιρόπια μαλτόζης (maltose syrups) και το σιρόπι φρουκτόζης ή ισογλυκόζης (high fructose syrup, HFS).

Η ενζυμική μέθοδος επεξεργασίας του αμύλου αντικατέστησε την όξινη χημική μέθοδο, η οποία παρουσίαζε σαφή μειονεκτήματα, όπως χαμηλή απόδοση, σχηματισμό παραπροϊόντων λόγω των ακραίων συνθηκών, υποχρεωτική χρησιμοποίηση διατάξεων ικανών να ανθίστανται σε οξέα και σε υψηλή θερμοκρασία (140 -150°C).

Κατά την ολοκληρωμένη ενζυμική επεξεργασία του αμύλου διακρίνονται τρία γενικά στάδια Υδάτινο αιώρημα στερεού αμύλου (25-40% w/v) αρχικά υφίσταται *πηκτωματοποίηση (gelatinization)*, διαδικασία κατά την οποία οι αρχικά μη υδατοδιαλυτοί αμυλόκοκκοι εκτίθενται σε υψηλή θερμοκρασία (>60°C), διογκώνονται και ρήγνυνται.

Κατά το δεύτερο στάδιο επιτυγχάνεται *ρευστοποίηση και δεξτρίνοποίηση (liquefaction, thinning, dextrinization)* του πηκτωματοποιημένου αμύλου, το οποίο ρευστοποιείται και υδρολύεται προς μίγμα ολιγο-σακχαριτών (μαλτοδεξτρινών) μειωμένου ιξώδους και επιθυμητής περιεκτικότητας ισοδύναμων γλυκόζης (dextrose equivalent, DE). Εξ ορισμού, το άμυλο περιέχει 0% DE και η γλυκόζη 100% DE. Το τρίτο στάδιο, αυτό της *σακχαροποίησης (saccharification)*, περιλαμβάνει την τελική επεξεργασία του μίγματος μαλτοδεξτρινών, η οποία οδηγεί σε συγκεκριμένα προϊόντα γλυκιάς γεύσης. Προφανώς, ανάλογα με την ακολουθούμενη διαδικασία λαμβάνεται και διαφορετικό προϊόν.

### **Πηκτωματοποίηση, ρευστοποίηση και δεξτρίνοποίηση του αμύλου**

Αιώρημα αμύλου θερμαίνεται σε θερμοκρασία υψηλότερη από την απαιτούμενη προς πηκτωματοποίηση, ώστε να επιτευχθεί πληρέστερη ρήξη και διαλυτοποίηση των αμυλοκόκκων, το δε άμυλο, τελικώς, να μετατραπεί σε διαθέσιμο ενζυμικά η θερμοκρασία πηκτωματοποίησης. Το φαινόμενο της

διάσπασης των συμπλόκων είναι αναστρέψιμο αν μειωθεί η θερμοκρασία. Για να αποφευχθεί αυτό, θα πρέπει το πηκτωματοποιημένο άμυλο να υδρολυθεί (ρευστοποιηθεί), στάδιο το οποίο, συνεπώς, πραγματοποιείται επίσης σε υψηλή θερμοκρασία.

Μετά τη διαδικασία της πηκτωματοποίησης, το άμυλο καθίσταται διαθέσιμο ενζυμικό υπόστρωμα. Το επόμενο βήμα είναι η ρευστοποίηση/δεξτρίνοποίηση και η μετατροπή του σε μαλτοδεξτρίνες, δηλαδή σε μίγμα ολιγοσακχαριτών.

Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση θερμοανθεκτικής  $\alpha$ -αμυλάσης ( $\alpha$ -amylase) από τα βακτήρια *Bacillus licheniformis* και *B. stearothermophilus*, η οποία έχει την ιδιότητα να παραμένει δραστική για ικανό χρόνο, ακόμη και σε θερμοκρασίες 105-110°C ή και παραπάνω, για την περίπτωση του δεύτερου γένους.

Το εν λόγω ένζυμο είναι μία ενδο-αμυλάση, διότι υδρολύει εσωτερικούς γλυκοζιτικούς δεσμούς  $\alpha$ -1,4, όχι όμως και δεσμούς  $\alpha$ -1,6, οι οποίοι βρίσκονται στις θέσεις διακλαδώσεως της αμυλοπηκτίνης. Το παχύρρευστο πηκτωματοποιημένο άμυλο μετατρέπεται σε μίγμα ολιγοσακχαριτών μικρότερου ιξώδους. Ειδικότερα, η συγκεκριμένη  $\alpha$ -αμυλάση υδρολύει αρχικά την αμυλόζη προς μαλτοτριόζη και μαλτόζη, ενώ περαιτέρω υδρόλυση της μαλτοτριόζης προς μαλτόζη και γλυκόζη πραγματοποιείται με βραδύ ρυθμό. Ο αναγωγικός δισακχαρίτης  $\beta$ -μαλτόζη αποτελείται από δύο μόρια γλυκόζης συνδεδεμένα μέσω γλυκοζιτικού δεσμού  $\alpha$ -1,4, με ελεύθερο το ημιακεταλικό υδροξύλιο C-1 σε  $\beta$ -στερεοδιάταξη.

Επίσης, η αμυλοπηκτίνη υδρολύεται, τελικά, σε μαλτόζη και γλυκόζη, στο μίγμα των οποίων υπάρχουν και δεξτρίνες περιοριζόμενες στους γλυκοζιτικούς δεσμούς  $\alpha$ -1,6 των διακλαδώσεων της αρχικής δομής του πολυσακχαρίτη. Κύρια τελικά προϊόντα της δεξτρίνοποίησης πηκτωματοποιημένου αμύλου από την  $\alpha$ -αμυλάση του *B. licheniformis* είναι μαλτόζη, μαλτοτριόζη, διακλαδιζόμενη μαλτοπεντόζη και λίγη γλυκόζη. Αντίθετα, αν ως πηγή του ενζύμου χρησιμοποιηθεί το βακτήριο *B. amyloliquefaciens*, τότε η αντίστοιχη  $\alpha$ -αμυλάση οδηγεί σε μίγμα μαλτοδεξτρίνων, το οποίο περιέχει, επί πλέον, και μαλτοεξόζη.

### 1.1.2 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΖΥΘΟΠΟΪΑ

Η παρασκευή ζύθου (μπύρας - beer) αποτελεί μια από τις παλαιότερες εφαρμογές των ενζύμων. Τα χρησιμοποιούμενα υλικά είναι βύνη ζυθοποιίας (δηλαδή κριθάρι το οποίο άρχισε να φυτρώνει, germinating barley), νερό συγκεκριμένης ποιότητας, ζύμη (yeast) και φυτικά πρόσθετα γεύσεως και αρώματος, π.χ. λυκίσκος (hop) [2,11,13].

Συχνά, προστίθενται ένζυμα και φυτικά αμυλούχα πρόσθετα (γνωστά ως adjuncts), π.χ. κριθάρι, ρύζι, αραβόσιτος, βρώμη και σιτάλευρο. Χαρακτηριστικό της βύνης (malt) είναι ότι παρουσιάζει χαμηλή περιεκτικότητα συνολικής πρωτεΐνης (περίπου 1,5% άζωτο), αλλά ικανοποιητική συγκέντρωση αμυλασών και πρωτεασών.

Τα συστατικά του αρχικού καρπού, τα οποία θα αποτελέσουν την πηγή δημιουργίας υποστρωμάτων της ζύμης (π.χ. άμυλο και πρωτεΐνες), θα πρέπει να υδρολυθούν στην απαραίτητη αφομοιώσιμη μορφή. Αυτό επιτελείται ενζυμικά κατά το στάδιο σχηματισμού του βυνογλεύκου, οπότε και παράγονται αφομοιώσιμα συστατικά μικρότερου μοριακού μεγέθους [2,11,13].

Η διεργασία παρασκευής ζύθου αποτελείται τυπικά από τα εξής στάδια:

(α) της παρασκευής της βύνης (malting), στάδιο το οποίο περιλαμβάνει το φύτεμα του κριθαριού (germination), την αφύγρανση και την τροποποίηση της βύνης (dressing), (β) θρυμματισμός της βύνης με άλεση (malt milling), χυλό-ποίηση της θρυμματισμένης βύνης με παρουσία θερμού νερού και ενζύμων (malt mashing) για παρασκευή βυνογλεύκου (wort), (γ) βρασμός του βυνογλεύκου με παρουσία λυκίσκου (wort boiling) και απομάκρυνση καταλοίπων (trub removal), (δ) ζύμωση του βυνογλεύκου (wort fermentation) με επιλεγμένα στελέχη μυκήτων, (ε) ωρίμανση (maturation) και συσκευασία του ζύθου.

Σημαντικός παράγοντας στην εν λόγω διεργασία είναι η δράση συγκεκριμένων ενζύμων της βύνης, τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικές εξειδικεύσεις ως προς το υπόστρωμα και την άριστη θερμοκρασία λειτουργίας τους: α-αμυλάσης (68°C), β-αμυλάσης (64°C), β-γλυκανάσης (62°C) και καρβοξυπεπτιδάσης (58°C) [2,11,13].

Συχνά προβλέπεται εξωτερική προσθήκη τέτοιων ενζύμων, ώστε να υποβοηθηθούν οι ενδογενείς ενζυμικές διεργασίες. Η παρουσία υψηλής



συγκεντρώσεως μεγαλομοριακών υποστρωμάτων (28-35% w/v) υποβοηθεί τα ένζυμα να παραμείνουν σταθερά και δραστικά, παρά το γεγονός ότι κατά το στάδιο παρασκευής του βυνογλεύκου επικρατούν συνθήκες σχετικά υψηλής θερμοκρασίας.

Ως ζύμωση εννοείται η βιολογική διεργασία κατά την οποία τα ζυμώσιμα σάκχαρα του βυνογλεύκου (γλυκόζη και μαλτόζη) μεταβολίζονται τελικά προς αλκοόλη από κατάλληλο στέλεχος ζυμομύκητα, σε διάστημα ορισμένων ημερών.

Τα χρησιμοποιούμενα ειδικά στελέχη ζυμομυκήτων συνεισφέρουν στην τελική γεύση και στο άρωμα, μαζί δε με ορισμένες λεπτομέρειες της συνολικής διεργασίας αποτελούν το τεχνολογικό και καλά φυλασσόμενο μυστικό των διαφόρων βιομηχανιών παραγωγής ζύθου. Ακόμη και στο στάδιο της ζύμωσης, η χρησιμοποίηση εξωγενών ενζύμων ενδεχομένως να καταστεί απαραίτητη.

Σε περίπτωση κατά την οποία, για οποιονδήποτε λόγο, ο έλεγχος της θερμοκρασίας ήταν ανεπιτυχής στα προηγούμενα στάδια (απότομη αύξηση ή και υπέρβαση του προβλεπόμενου ορίου), τότε ένα μέρος των ενζύμων θα έχει καταστραφεί και, συνεπώς, οι μετατροπές των υποστρωμάτων παραμένουν ημιτελείς [2,11,13].

Αποτέλεσμα είναι το βυνογλεύκος να εμφανίζει υψηλή περιεκτικότητα σε μη ζυμώσιμες ανώτερες δεξτρίνες. Εξωτερική προσθήκη β-αμυλάσης του μύκητα *Aspergillus oryzae* οδηγεί τόσο προς ζυμώσιμη μαλτόζη όσο και προς μη ζυμώσιμες δεξτρίνες, περιορισμένες στους γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,6, απαραίτητες για τις οργανοληπτικές ιδιότητες του ζύθου.

### **1.1.3. ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΟΙΝΟΠΟΙΪΑ**

Η παρασκευή του οίνου αποτελεί ίσως την παλαιότερη, ακούσια, εφαρμογή της βιοτεχνολογίας, της οποίας οι ρίζες φθάνουν μέχρι την αρχαιότητα. Φυσική πηγή των σημαντικών ενζύμων για την οινοποίηση είναι το σταφύλι. Η πηγή αυτή παρουσιάζει όμως περιορισμένο ενδιαφέρον, διότι, κατά την παρασκευή του οίνου, οι μικρές ποσότητες των ενζύμων της σταφυλής συνήθως αδυνατούν να επιφέρουν το επιθυμητό αποτέλεσμα εντός του διαθέσιμου χρόνου [2,11,13].

Συνεπώς, απαιτείται εξωτερική προσθήκη κατάλληλων ενζύμων, με σκοπό την ενίσχυση και την συμπλήρωση της φυσικής ενζυμικής δραστηριότητας της σταφυλής. Το κυριότερο ένζυμο στην οينوποιία είναι η πολυγαλακτουρονάση ή πηκτινάση, η οποία, όπως είναι γνωστό, υδρολύει τον γλυκοζιπικό δεσμό α-1,4 μεταξύ μορίων α-D-γαλακτουρονικού οξέος των πηκτινικών ενώσεων. Αυτές αφ' ενός παίζουν σπουδαίο ρόλο στην διατήρηση της δομής του καρπού, αφ' ετέρου, εκχυλιζόμενες μερικώς κατά την επεξεργασία του καρπού, δημιουργούν προβλήματα θολώματος, προκαλούν αύξηση του ιξώδους και δυσκολεύουν την διήθηση.

Κατά την παραγωγή του οίνου, η εξωτερική ενζυμική παρέμβαση πραγματοποιείται σε διαφορετικά στάδια και για διαφορετικούς λόγους. Συγκεκριμένα:

(α) προσθήκη πηκτικών ενζύμων κατά την συμπίεση, την αποσάθρωση και την ζύμωση χωρίς ή με την παρουσία στεμφύλων (ερυθρά οينوποίηση), με σκοπό την αποτελεσματικότερη εκχύλιση των συστατικών (χρώματος, χυμού και αρώματος), (β) προσθήκη πηκτικών ενζύμων στον οίνο με σκοπό την διαύγαση, δηλαδή την υδρόλυση μεγαλομοριακών κολλοειδών ενώσεων (μεταξύ των οποίων και η πηκτίνη) οι οποίες δημιουργούν προβλήματα, σταθεροποιώντας το θόλωμα και δυσκολεύοντας την διήθηση του τελικού προϊόντος, και (γ) προσθήκη β-γλυκανάσης στον οίνο, με σκοπό τον περιορισμό των επίκτητων γλυκανών και την διευκόλυνση της διήθησης.

Δύο μέθοδοι παρασκευής οίνου είναι η παραδοσιακή ζύμωση με παρουσία στεμφύλων (*fermentation on skins*) για τους ερυθρούς οίνους και η θερμοοينوποίηση (*thermovinification*) [2,11,13].

Η εξωτερική προσθήκη πηκτινολυτικών ενζύμων έχει πλεονεκτήματα, π.χ. αποτελεσματικότερη συμπίεση κατά 10-30%, αύξηση του λαμβανόμενου χυμού κατά 10-30%, ταχύτερη και ηπιότερη ζύμωση, σχηματισμό λιγότερου αφρού, μείωση του θολώματος, γενικότερα δε βελτίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του προϊόντος, ως αποτέλεσμα της διευκόλυνσης ελευθέρωσης ουσιών, όπως ζυμώσιμων σακχάρων, ταννινών, ανθοκυανινών, πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών, οργανικών οξέων και μεταλλικών αλάτων. Ειδικότερα για τους ερυθρούς οίνους, η μείωση του χρόνου παραμονής των στεμφύλων στο γλεύκος (στάδιο αποσαθρώσεως και ζυμώσεως με παρουσία στεμφύλων), κατά 30-50%, αποτελεί το σημαντικότερο πλεονέκτημα. Εκτός από το

οικονομικό όφελος το οποίο προκύπτει από την αύξηση της παραγωγικής ικανότητας του οινοποιείου, η προσθήκη ενζύμων συντελεί και στην αποτελεσματικότερη εκχύλιση χρωστικών ουσιών.

Η δράση εξωγενών παρασκευασμάτων πηκτινικών ενζύμων, σε συνδυασμό με δευτερογενείς δραστηριότητες (π.χ. όξινων πρωτεασών), οδηγεί σε ελευθέρωση ανθοκυανινών και ταννινών, συνεπώς, σε βελτίωση του χρώματος και της γεύσης του τελικού προϊόντος, αντίστοιχα. Επίσης, ενίσχυση του αρώματος επιτυγχάνεται από την δράση εξωγενών α-L-ραμνοζιτάσης, α-L-αραβινοζιτάσης, β-D-απιοζιτάσης και β-D-γλυκοζιτάσης. Αυτές δρουν επί μη αρωματοποιών γλυκοζυλιωμένων τερπενολών, διαλυτών και σταθερών κατά την ζύμωση, από τις οποίες τελικά ελευθερώνονται σε δύο στάδια αρωματοποιές τερπενόλες [2,11,13].

Τα χρησιμοποιούμενα εμπορικά ενζυμικά παρασκευάσματα συνήθως περιέχουν περισσότερη πηκτινάση (μίγμα ενδο- και εξω-πολυγαλακτουρονάσης) και λιγότερη πηκτινεστεράση. Επειδή τυχόν αντίδραση πηκτινεστεράσης οδηγεί στην ελευθέρωση κυρίως μεθυλικής αλκοόλης, απαιτείται έλεγχος της συγκέντρωσης της τελευταίας.

Επίσης, το ενζυμικό παρασκεύασμα συχνά περιέχει και κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες και αραβινάσες, οι οποίες διευκολύνουν την αποσάθρωση του ιστού. Έχει παρατηρηθεί ότι η χρησιμοποίηση τέτοιου ενζυμικού παρασκευάσματος επηρεάζει θετικά την ποιότητα του οίνου, βελτιώνοντας τις οργανοληπτικές του ιδιότητες, ενώ συντομεύει τον χρόνο ωριμάνσεως. Καθυστέρηση στην απομάκρυνση των στεμφύλων ενδεχομένως οδηγεί σε γλεύκος υψηλής περιεκτικότητας σε ταννίνες, προσφέροντας παράλληλα χρόνο σε άλλες ανεπιθύμητες διεργασίες, λόγου χάριν, στην πιθανή μετατροπή της αιθυλικής αλκοόλης σε οξικό οξύ καθώς και οξικό αιθυλεστέρα (από οξοβακτήρια με παρουσία οξυγόνου), με αποτέλεσμα την αύξηση της πτητικής οξύτητας [2,11,13].

Η μέθοδος της **θερμοοινοποίησης** αποτελεί εναλλακτική μέθοδο της κλασικής ζύμωσης με παρουσία στεμφύλων, εφαρμόζεται δε κυρίως σε καρπούς προσβεβλημένους από μούχλα, οπότε απαιτείται ταχύτερη επεξεργασία υπό εντονότερες συνθήκες. Ο συντεθλιμμένος καρπός θερμαίνεται σε θερμοκρασία 70°C για λίγα λεπτά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πλασμόλυση και την μερική καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης,

γεγονός το οποίο συντελεί στην ταχεία έκλυση των κυτταρικών συστατικών τα οποία είναι σημαντικά στην διεργασία παρασκευής του οίνου (π.χ. σάκχαρα, οξέα, ταννίνες, χρωστικές και αρωματικές ενώσεις).

Η χρησιμοποίηση πηκτινάσης κατά την θερμοοινοποίηση, και αφού μειωθεί η θερμοκρασία στους 45°C, είναι απαραίτητη. Τούτο διότι, εκτός των ήδη αναφερθέντων πλεονεκτημάτων της, η πηκτινάση, κατά το επόμενο στάδιο, της συμπίεσης, οδηγεί σε αύξηση της ποσότητας του λαμβανόμενου γλεύκους κατά 20% περίπου.

Κατά την αλκοολική ζύμωση συνήθως προστίθεται ελεγχόμενη ποσότητα αερίου SO<sub>2</sub> (π.χ. 100 ppm). Το τελευταίο δρα αρνητικά επί των οξειδωτικών μικροοργανισμών (αγρίων ζυμομυκήτων, μυκήτων και βακτηρίων), βοηθώντας στην αύξηση των ευγενών ζυμομυκήτων. Επίσης, το εν λόγω χημικό πρόσθετο αδρανοποιεί και την ενδογενή φαινυλοξειδάση, η οποία είναι δυνατόν να απομακρυνθεί κατά την διαύγαση, και προκαλεί την επαγωγή του πολυμερισμού πολυφαινολών και τον σχηματισμό ιζήματος. Επίσης, μετά την υποβολή του γλεύκους στην διεργασία της ζύμωσης, ο παραγόμενος οίνος συνήθως εξακολουθεί να περιέχει αρκετή ποσότητα πηκτίνης και να είναι θολός [2,11,13].

Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι χημικά πρόσθετα (SO<sub>2</sub>) και ουσίες, όπως αλκοόλη και ταννίνες, αδρανοποιούν μερικώς την πηκτινάση, με αποτέλεσμα να παραμένει δραστική μικρή μόνον ποσότητα ενζύμου. Επιτυχής διαύγαση του οίνου απαιτεί εξωτερική προσθήκη πηκτινάσης, μάλιστα δε το συντομότερο δυνατόν, ακόμη και κατά την διάρκεια της ζύμωσης. Όταν ο οίνος είναι ακόμη θερμός από την ζύμωση, η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης είναι υψηλότερη και η διαύγαση αποτελεσματικότερη.

Μια άλλη αξιολογή εφαρμογή των ενζύμων στην οινοποίηση αφορά τους οίνους οι οποίοι προέρχονται από σταφύλια εκτεταμένως προσβεβλημένα από βοτρυτή (*Botrytis cinerea*). Αυτά είναι δυνατόν να εμφανίσουν προβλήματα διαυγάσεως και διηθήσεως, λόγω της παρουσίας διακλαδιζόμενης β-1,3-γλυκάνης [2,11,13].

Η γλυκάνη αυτή αποτελείται από κεντρικό σκελετό μονάδων γλυκόζης, συνδεδεμένων μέσω γλυκοζιτικών δεσμών β-1,3, ο οποίος φέρει διακλαδώσεις στις θέσεις των δεσμών Μ,6. Ο β-πολυσακχαρίτης βιοσυντίθεται από τον μικροοργανισμό *Botrytis cinerea* και, τελικά, εκχυλίζεται

στον οίνο, γεγονός ανεπιθύμητο αν παρατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό. Επίσης, σημειώνεται ότι, παράλληλα, ελευθερώνεται από τον βοτρυτή και μια πολύ δραστική πολυφαινυλοξυδάση, που προξενεί την απώλεια του χρώματος των ερυθρών οίνων και τη δημιουργία καστανής χροιάς, η οποία αδρανοποιείται με το SO<sub>2</sub>, ή με θέρμανση.

Ατυχώς, η εν λόγω β-γλυκάνη δεν προσβάλλεται από τις δεξτρανάσες και β-γλυκανάσες, οι οποίες, γενικώς, αποδομούν β-1,4-γλυκάνες. Το πρόβλημα επιλύεται αν χρησιμοποιηθεί μια ειδική β-1,3/β-1,6-γλυκανάση η οποία υδρολύει την β-γλυκάνη του βοτρυτή. Η δυνατότητα ελεγχόμενης ενζυμικής αποδόμησης του β-πολυσακχαρίτη οδηγεί στην προστασία του οίνου από τις συνέπειες της παρουσίας του βοτρυτή και άλλων μικροοργανισμών, επιτρέποντας ικανοποιητική διαύγαση του τελικού προϊόντος [2,11,13].

#### **1.1.4 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ**

##### **Παρασκευή τυριού**

Η διαδικασία παρασκευής τυριού, γενικώς, προβλέπει παστερίωση του γάλακτος και προσθήκη μικροοργανισμών, γνωστών ως εκκινητών ζυμώσεως (fermentation starters), κυρίως του γένους *Lactobacillus*, οι οποίοι, τελικά, οδηγούν σε παραγωγή γαλακτικού οξέος και ρύθμιση της οξύτητας προσθήκη άλλων μικροοργανισμών και ενζύμων με σκοπό την ανάπτυξη των επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων στο τελικό προϊόν, προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου, προσθήκη ενζυμικών παραγόντων (πυτιάς, ρεννίνης κ.ά.) για την πήξη (coagulation) του γάλακτος, κοπή του πήγματος και απομάκρυνση του τυρογάλακτος (whey), μορφοποίηση και συμπίεση, προσθήκη άλατος και άλλων φυσικών παραγόντων, με σκοπό την ανάπτυξη γεύσεως (εάν δεν έχει γίνει) και, τέλος, ωρίμανση του τυριού (ripening, maturation) [2,11,13].

Η πήξη του γάλακτος για την παρασκευή τυριού είναι διεργασία γνωστή από την αρχαιότητα, όταν χρησιμοποιούσαν ήνυστρα μόσχων και αμνοεριφίων στα οποία, όταν παρέμενε το γάλα, έπηζε. Αιτία αυτής της φυσικής μετατροπής είναι η παρουσία του όξινου πρωτεολυτικού ενζύμου ρεννίνη ή χυμοσίνη (*rennin* ή *chymosin*) στο ήνυστρο των ζώων που θηλάζουν και η δράση του επί της καζεΐνης.

Στα μικύλλια (micelles) της καζεΐνης του γάλακτος απαντούν οι μορφές αSI, β, γ και κ καζεΐνη, εκ των οποίων η τελευταία βρίσκεται εξωτερικά και τα σταθεροποιεί. Η ενζυμική πήξη του γάλακτος πραγματοποιείται σε δύο στάδια [2,11,13].

Κατά το πρώτο στάδιο, ο πρωτεολυτικός ενζυμικός παράγων πήξεως υδρολύει την κ-καζεΐνη επιλεκτικά στη θέση Phe105—Met106, οπότε σχηματίζονται παρα-κ-καζεΐνη και διαλυτά ολιγοπεπτίδια, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση των μικυλλίων. Άλλες πρωτεάσες, όπως η πεψίνη, η οποία απαντά με τη ρεννίνη σε αναλογία εξαρτώμενη από την ηλικία του ζώου, δεν εμφανίζουν τον ίδιο βαθμό εκλεκτικότητας στη δράση τους και, για τον λόγο αυτόν, θεωρούνται μη επιθυμητές. Κατά το δεύτερο στάδιο (pH 6,0-6,4), η παρουσία ασβεστίου στο γάλα οδηγεί τα αποσταθεροποιημένα μικύλλια στον σχηματισμό πρωτεϊνικού πήγματος, στο οποίο, εκτός από την διασβεστο-κ-καζεΐνη, εγκλωβίζονται λιπαρά συστατικά του γάλακτος, ένζυμα και μικροοργανισμοί. Η ρεννίνη βιοσυντίθεται ως προ-προρεννίνη, το υδρόφοβο άκρο της οποίας οδηγεί το μόριο δια μέσου των μεμβρανών του ενδοθηλιακού δικτύου.

Εκεί, το υδρόφοβο άκρο αποχωρίζεται από το υπόλοιπο μόριο, το οποίο και μετατρέπεται στο αδρανές ζυμογόνο προρεννίνη. Η προρεννίνη υφίσταται αυτοκαταλυτική ενεργοποίηση στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και μετατρέπεται σε ρεννίνη.

Η ρεννίνη έχει μοριακό βάρος 35 kDa, αποτελείται από 323 αμινοξέα και απαντά ως δύο ισοένζυμα Α και Β, τα οποία αμφότερα εμφανίζουν άριστο pH, περίπου 4,0. Η χαρακτηριστική ιδιότητα που καθιστά την ρεννίνη σημαντική στην τυροκομία είναι η εκλεκτική υδρολυτική δράση της επί της κ-καζεΐνης, γεγονός το οποίο, όπως είναι γνωστό, οδηγεί σε πήξη του γάλακτος [2,11,13].

Το ένζυμο εμφανίζει και σχετικά περιορισμένη πρωτεολυτική δραστηριότητα επί του σχηματιζόμενου πήγματος. Η ακολουθούσα δευτερογενής υδρολυτική δράση του παράγοντα πήξεως, κυρίως επί της αSI καζεΐνης, αποτελεί σημαντική λειτουργία κατά το στάδιο της ωρίμανσης του τυριού. Με την ενηλικίωση του ζώου, η ρεννίνη αντικαθίσταται σταδιακά από το πρωτεολυτικό ένζυμο *πεψίνη*, το οποίο δεν εμφανίζει την προαναφερθείσα χαρακτηριστική ιδιότητα της ρεννίνης. Η πεψίνη υδρολύει την καζεΐνη

ευρύτερα, με αποτέλεσμα την εξασθένηση της δομής του πήγματος, την μείωση της ποσότητας των λιπών και πρωτεϊνών στο πήγμα και την ελευθέρωση πεπτιδίων, τα οποία είναι δυνατόν να προσάψουν στο τυρί ανεπιθύμητη γεύση.

Η μεγάλη ζήτηση ρεννίνης και πτυιάς (φυσικού μίγματος ρεννίνης, πεψίνης, λιπάσης κ.ά.) από την τυροκομία είχε ως αποτέλεσμα την έρευνα για τον εντοπισμό άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων, υποκατάστατων της ρεννίνης, με παρόμοιες ιδιότητες. Φυτικής προελεύσεως πρωτεάσες (π.χ. παπαΐνη, φικίνη και βρωμελαΐνη) δεν χρησιμοποιούνται, διότι οδηγούν σε ανεπιθύμητη γεύση του τυριού λόγω της εκτεταμένης δράσης τους. Πρωτεολυτικά ένζυμα από μικροοργανισμούς εμφανίζουν, συνήθως, υψηλή δραστηριότητα και θερμοανθεκτικότητα και γενικώς θεωρούνται λιγότερο κατάλληλα για την πήξη του γάλακτος και την παρασκευή τυριού [2,11,13].

Ωστόσο, ορισμένοι μύκητες των γενών *Mucor* και *Endothia* παράγουν πρωτεάσες οι οποίες οδηγούν σε ικανοποιητική πήξη του γάλακτος και ποιότητα τυριών. Πρόσφατα, κατέστη διαθέσιμη μια ειδική πρωτεάση από *Rhizomucor iniehei*, εκφρασμένη σε *Aspergillus oryzae*, η οποία βρίσκεται εφαρμογή στην τυροκομία. Επίσης, η τεχνολογία ανασυνδυασμένου DNA οδήγησε και σε ρεννίνη εκφρασμένη σε *Aspergillus niger* var. *im-amori*, έτσι ώστε να μην υπάρχει πρόβλημα προσφοράς ζωικής ρεννίνης.

Το τελευταίο στάδιο παρασκευής του τυριού είναι η ωρίμανση. Κατά το εν λόγω στάδιο, εξελίσσεται βραδεία τροποποίηση των λιπών και των πρωτεϊνών από μικροοργανισμούς και ένζυμα, με αποτέλεσμα, τελικώς, την ανάπτυξη των επιθυμητών οργανοληπτικών ιδιοτήτων του προϊόντος. Η εξωτερική προσθήκη, αφ' ενός, και αφ' ετέρου η φυσική παρουσία κατάλληλων λιπασών και εστερασών, στην περίπτωση του αρχικώς μη παστεριωμένου γάλακτος, έχει ως αποτέλεσμα την υδρόλυση μέρους των τριγλυκεριδίων του πήγματος προς ελεύθερα λιπαρά οξέα [2,11,13].

Ειδικότερα, στην προγαστρική λιπάση των υπογλώσσιων αδένων των αιγοπροβάτων οφείλεται η ανάπτυξη «πικάντικης» γεύσης, όπως στα ιταλικά τυριά Pecorino, Provolone και Romano. Η πικάντικη γεύση οφείλεται κυρίως στα λιπαρά οξέα μικρού έως μεσαίου αριθμού ατόμων άνθρακος (βουτυρικό οξύ, καπρονικό οξύ, καπρυλικό οξύ, καπρινικό οξύ και λαυρικό οξύ).

Αντίθετα, λιπάσες από μικροοργανισμούς οδηγούν κυρίως σε λιπαρά οξέα με περισσότερα άτομα άνθρακα, τα οποία προσδίδουν στο τυρί γεύση ελαφρώς σαπουνώδη και λιπαρή. Επίσης, τα προϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων, με παρουσία και των μικροοργανισμών του τυριού, εκτίθενται σε σειρά βιοχημικών αντιδράσεων οι οποίες έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενώσεων μικρού μοριακού βάρους (π.χ. ακετοξικού οξέος, β -κετονοξέων, μεθυλοκετονών, λακτονών, εστέρων,κ.ά.), οι οποίες καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Οι λιπάσες, συνήθως, προστίθενται στο γάλα αρχικά και πριν από την εισαγωγή του πηκτικού παράγοντα, είναι δε αξιοσημείωτο ότι λιπάσες από διαφορετικές πηγές αναπτύσσουν και διαφορετικές οργανοληπτικές ιδιότητες στο τελικό προϊόν. Συνεπώς, η προσθήκη κατάλληλων λιπασών έχει εξαιρετική σημασία για την παραγωγή ορισμένων τύπων τυριών [2,11,13].

Ειδικότερα, όσον αφορά στο τυρί τύπου φέτας, είναι δυνατόν να παρασκευασθεί και από αγελαδινό γάλα με προσθήκη κατάλληλης λιπάσης, η οποία τελικά οδηγεί σε γεύση τυριού παρόμοια με εκείνη του γάλακτος αιγοπροβάτων.

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα επίσης μετέχουν στην διεργασία της ωρίμανσης του τυριού, η δε δράση τους έχει ιδιαίτερη σημασία. Κατάλληλα πρωτεολυτικά ένζυμα προέρχονται τόσο από την πτυιά όσο και από γαλακτοβακτήρια του γένους *Lactobadllus*, καθώς και από μύκητες του γένους *Penicillium* κ.ά. Επίσης, είναι δυνατή η ενζυμική επιτάχυνση της ωρίμανσης του τυριού (π.χ. με ενδοπεπτιδάση από το βακτήριο *Bacillus subtilis*, σε συνδυασμό με κυτταρικό εκχύλισμα οξυγαλακτικών βακτηρίων), η οποία υποβοηθείται με την αύξηση της θερμοκρασίας (π.χ. 37°C), προσφέροντας την δυνατότητα παραγωγής σε σύντομο χρόνο τυριών με έντονη γεύση.

Τέλος, σημειώνεται και μια άλλη ενζυμική εφαρμογή στην τυροκομία, αυτή της χρησιμοποίησης λυσοζύμης ως μέσου καταπολεμήσεως βακτηρίων. Το ένζυμο αυτό υδρολύει τους β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς μεταξύ N-ακετυλονευραμινικού οξέος και N-ακετυλογλυκοζαμίνης του κυτταρικού τοιχώματος, οδηγώντας τελικά τον μικροοργανισμό σε θάνατο. Επί παραδείγματι, με την μέθοδο αυτή καταπολεμείται η βουτυρική ζύμωση η οποία οφείλεται στην δράση του *Ciosiridium tyrobutyricum* [2,11,13].



### 1.1.5 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΦΡΟΥΤΩΝ

Οι πηκτινικές ενώσεις αποτελούν κύριο δομικό συστατικό του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος των φρούτων και των φυτικών ιστών γενικότερα. Μαζί με την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, επιτρέπουν την σταθερή σύνδεση μεταξύ των κυττάρων και τον σχηματισμό του ιστού. Οι μονάδες του α-D-γαλακτουρονικού οξέος της κεντρικής αλυσίδας του πολυμερούς είναι ενωμένες μέσω γλυκοζιτικού δεσμού α-1,4, τα δε καρβοξύλια των μονάδων είναι εστεροποιημένα, κυρίως με μεθυλομάδες και λιγότερο με ακετυλομάδες, σε διαφορετικό βαθμό (μεθυλεστεροποίηση 20-92%) [2,11,13].

Γενικά, το α-D-γαλακτουρονικό οξύ βρίσκεται σε ποσοστό 60-80%, ενώ συχνά απαντούν και άλλα σάκχαρα (π.χ. ραμνόζη, αραβινόζη, γαλακτόζη και ξυλόζη), γεγονός το οποίο οδηγεί σε διάφορους τύπους πηκτινικών ενώσεων. Λόγου χάριν, στην ραμνογαλακτουρονάνη, η οποία αποτελεί κύρια πηκτινική ένωση, σε κάθε 25-30 γαλακτουρονικές μονάδες απαντά μια μονάδα L-ραμνόζης, η οποία ενώνεται μέσω γλυκοζιτικών δεσμών β-1,1 και β-1,4 με τις D-γαλακτουρονικές μονάδες της κεντρικής και της πλευρικής αλυσίδας (η τελευταία αποτελείται από γαλακτουρονικό οξύ, αραβινόζη κ.ά.). Κατά την ωρίμανση των καρπών, η δομή τους μεταβάλλεται και κύριο ρόλο σε αυτό παίζουν τα πηκτικά ένζυμα. Αυτά τροποποιούν τις πηκτινικές ενώσεις, σε τρόπο ώστε να χαλαρώσει η συνεκτικότητα των κυττάρων των ιστών.

Τέσσερις κατηγορίες ενζύμων διαδραματίζουν κύριο ρόλο στην διεργασία παραγωγής φρουτοχυμών και άλλων προϊόντων φρούτων: *πηκτικά/πηκτινικά ένζυμα, αμυλάσες, ημικυτταρινάσες και κυτταρινάσες* [2,11,13].

Τα πηκτικά ένζυμα αποτελούν την κυριότερη κατηγορία και χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση των πηκτινικών ενώσεων κατά την παραγωγή φρουτοχυμών. Τα εν λόγω ένζυμα διακρίνονται σε (α) πηκτινεστεράσες (pectinesterases), οι οποίες υδρολύουν τους μεθυλο- και ακετυλο-εστέρες της πηκτίνης, (β) πολυγαλακτουρονάσες ή πηκτινάσες (polygalacturonases, pectinases), οι οποίες με παρουσία νερού υδρολύουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς α-1,4 μεταξύ των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος πηκτινικών ενώσεων χαμηλού βαθμού εστεροποίησης, και (γ) πηκτινολυάσες (pecticlyases), οι οποίες διασπούν τους γλυκοζιτικούς

δεσμούς α-1,4 μεταξύ των μονάδων γαλακτουρονικού οξέος πηκτινικών ενώσεων υψηλού βαθμού εστεροποίησης, με τον μηχανισμό της β-απόσπασης, δημιουργώντας διπλό δεσμό μεταξύ των θέσεων C-4 και C-5 του γαλακτουρονικού οξέος. Κατά το στάδιο επεξεργασίας του φρούτου, ένα μέρος των πηκτινικών ενώσεων διαλυτοποιείται στον εκλυόμενο χυμό, ένα άλλο μέρος εμφανίζεται στον χυμό ως αδιάλυτο συστατικό και ένα μέρος παραμένει στα κυτταρικά τοιχώματα. Αποτελέσματα της παρουσίας πηκτινικών ενώσεων είναι η δυσκολία επεξεργασίας τόσο του φρούτου για εύκολη και αποτελεσματική παραλαβή χυμού όσο και του χυμού για απαλλαγή από το υψηλό ιξώδες και από τον σχηματισμό θολώματος. Άλλη κατηγορία ενζύμων είναι οι αμυλάσες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση του υπολειπόμενου αμύλου, συνήθως από πρώιμα φρούτα. Το εν λόγω πρόβλημα εμφανίζεται κυρίως στις περιπτώσεις παρασκευής φρουτοχυμών από φρούτα προοριζόμενα αρχικά για νωπή κατανάλωση.

Η κατηγορία των φρούτων αυτών (π.χ. μήλων και αχλαδιών) αποτελείται από πρώιμους καρπούς, οι οποίοι αποθηκεύονται σε ψυγεία και ωριμάζουν βραδέως υπό ελεγχόμενες συνθήκες, περιέχουν δε αρκετή ποσότητα αμύλου. Κατά την επεξεργασία των καρπών, το άμυλο δημιουργεί προβλήματα στην διήθηση και σχηματίζει θόλωμα στον χυμό.

Οι κυτταρινάσες και οι ημικυτταρινάσες, συνήθως, χρησιμοποιούνται ως πρόσμιξη του εμπορικού παρασκευάσματος πηκτινασών και βοηθούν στην μείωση της συνεκτικότητας του ιστού. Η επεξεργασία του φρούτου πραγματοποιείται είτε με πλασμόλυση σε θερμοκρασία > 60°C είτε με προσθήκη ενζύμων σε θερμοκρασία < 50°C, διεργασία η οποία είναι ηπιότερη και αποτελεσματικότερη και προτιμάται [2,11,13].

## **1.2 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΕΝΖΥΜΑ**

### **Γενικά**

Ακίνητοποίηση ή καθήλωση βιοκαταλύτη (ενζύμου, πολυενζυμικού συστήματος ή και ολόκληρου κυττάρου) είναι ο περιορισμός του σε τεχνητή στερεά φάση, η οποία διακρίνεται από την κύρια υγρή φάση· με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ετερογενές σύστημα. Η στερεά φάση που φέρει τον βιοκαταλύτη, προφανώς, είναι καταλυτικά ενεργός και ονομάζεται

βιοκαταλυτική στερεά φάση, για να διακρίνεται από κάθε άλλη στερεά φάση χωρίς καταλυτικές ιδιότητες [3,4,15,16].

Η ακινητοποίηση (immobilization) γίνεται με τέτοιον τρόπο, ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά (π.χ. υποστρώματος, προϊόντος, οξυγόνου κ.λπ.) μεταξύ βιοκαταλυτικής στερεάς φάσης και κύριας υγρής φάσης. Τυπικά, στο σύστημα διακρίνεται και η στατική υγρή φάση που εντοπίζεται στο εσωτερικό της βιοκαταλυτικής στερεάς φάσης, της οποίας και αποτελεί μέρος.

Το ενδιαφέρον για τους ακινητοποιημένους βιοκαταλύτες πηγάζει από το γεγονός ότι η τεχνολογία αυτή, γενικά, προσφέρει ορισμένες δυνατότητες, όπως:

- (α) αύξηση της σταθερότητας του βιοκαταλύτη,
- (β) εύκολο και άμεσο έλεγχο της αντίδρασης, με απλή προσθήκη ή αφαίρεση βιοκαταλύτη,
- (γ) εύκολη και άμεση παραλαβή προϊόντος, εφόσον βιοκαταλύτης και προϊόν βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις
- (δ) οικονομία, διότι μετά το πέρας της αντίδρασης χρησιμοποιείται ο ίδιος βιο-καταλύτης πολλές φορές ακόμη, και
- (ε) συνεχής λειτουργία της βιοκαταλυτικής αντίδρασης [3,4,15,16].

Η τεχνολογία ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών παρουσιάζει σημαντικές δυνατότητες και καταξιωμένες βιομηχανικές εφαρμογές και αποκτά ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις ενζύμων που έχουν υψηλό κόστος.

### 1.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ENZYMΩΝ

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης βιοκαταλυτών διακρίνονται σε *χημικές* και *φυσικές*, οι οποίες περιλαμβάνουν διάφορες τεχνικές (Σχήμα1). Στις *χημικές τεχνικές* ακινητοποίησης δημιουργείται χημικός ομοιοπολικός δεσμός (covalent bond) είτε μεταξύ στερεάς φάσης (φορέα) και ενζύμου (α) είτε μεταξύ των ίδιων των μορίων του ενζύμου, τα οποία στην περίπτωση αυτή σχηματίζουν τη βιοκαταλυτική στερεά φάση (β). Στις *φυσικές τεχνικές* ακινητοποίησης ο βιοκαταλύτης είτε προσροφείται στον φορέα (γ) είτε περιορίζεται εντός τεχνητού μικροπεριβάλλοντος, π.χ. πλέγμα πολυμερούς (δ), μικροκαψύλλιο (ε) ή λιπόσωμα (λιπιδικό κυστίδιο) (στ) [18-38, 46, 47].

### 1.3.1 Χημικές τεχνικές ακινητοποιήσεως

Οι χημικές τεχνικές ακινητοποιήσεως αποτελούν την συνηθέστερη επιλογή, επειδή υπάρχουν πολλές οργανικές αντιδράσεις, από τις οποίες κάθε φορά εντοπίζονται μερικές που είναι ικανές να οδηγήσουν σε επιτυχή αποτελέσματα. Θετικό στοιχείο στην προτίμηση χημικών τεχνικών είναι ότι ο ομοιοπολικός δεσμός, γενικά, ακινητοποιεί το ένζυμο κατά τρόπο σταθερό. (Σχ.1) [2,18,19].

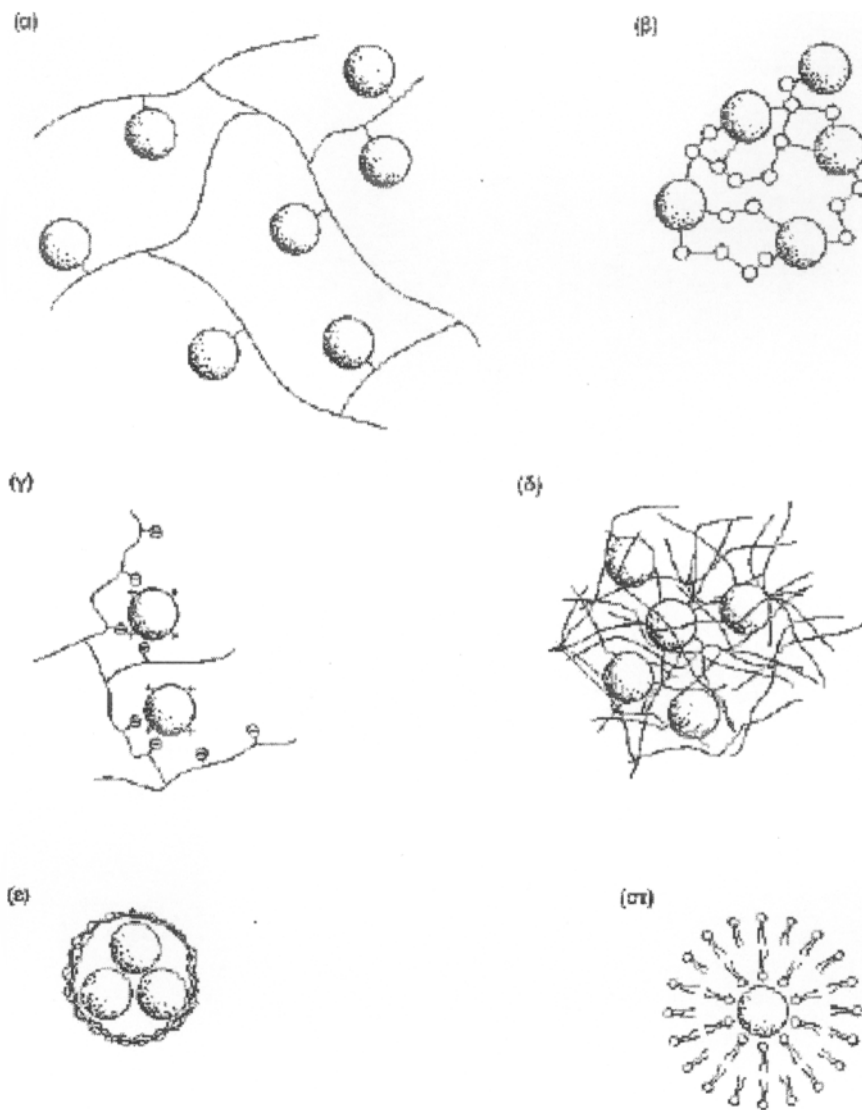
Αντίθετα, η υψηλή δραστικότητα και αποτελεσματικότητα πολλών χημικών αντιδραστηρίων, συχνά, οδηγεί και σε ανεπιθύμητες αντιδράσεις με τις πλευρικές ομάδες αμινοξέων απαραίτητων για την ενζυμική δραστικότητα.

Προφανώς, κατά την ακινητοποίηση, οι πλευρικές ομάδες της ενεργού περιοχής (active site), στις οποίες οφείλεται η ενζυμική δραστικότητα, πρέπει να παραμείνουν ανέπαφες, ώστε να διασφαλισθεί η καταλυτική ικανότητα του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη. Κάτι τέτοιο είναι δυνατόν να επιτευχθεί όταν ικανοποιηθεί μία από τις ακόλουθες συνθήκες:

(α) Παρουσία είτε ενζυμικού υποστρώματος είτε συναγωνιστικού αναστολέα. Και στις δύο περιπτώσεις, κατά την ακινητοποίηση, η ενεργός περιοχή του ενζύμου φέρει υπόστρωμα ή αναστολέα δεσμευμένο (Σχήμα2α). Συνεπώς, η περιοχή αυτή, άρα και η ενζυμική δραστικότητα, προστατεύονται από τα αντιδραστήρια ακινητοποιήσεως.

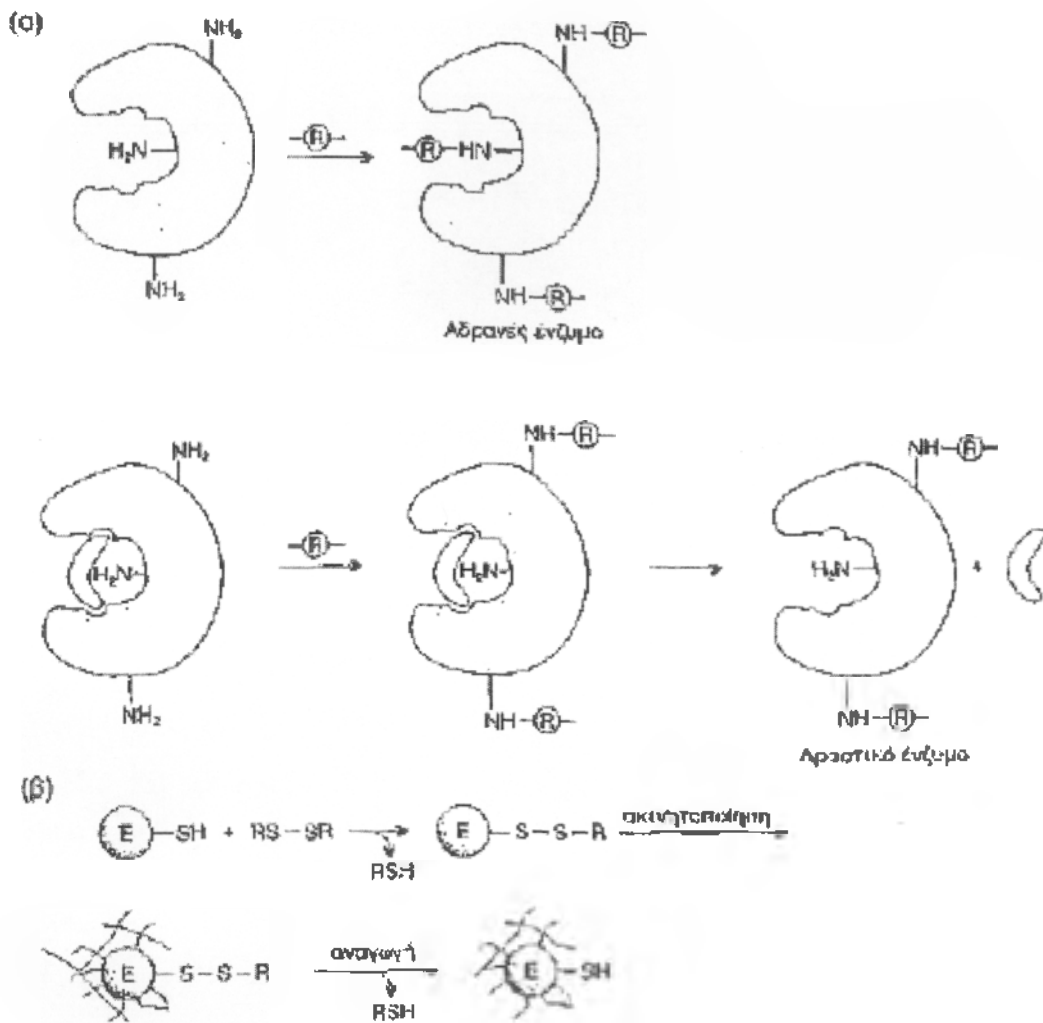
(β) Προσωρινός σχηματισμός αντιστρέψιμου συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα μέσω ομοιοπολικού δεσμού, ώστε να προστατευθεί η ενεργός περιοχή (Σχήμα 2β).

(γ) Στην περίπτωση κατά την οποία αυτό είναι εφικτό, χρησιμοποίηση πρόδρομης αδρανούς μορφής του προς ακινητοποίηση ενζύμου (π.χ. ζυμογόνα πρωτεασών) [2,18,19].



ΣΧΗΜΑ 1.

Σχηματική απόδοση της ακινητοποίησης βιοκαταλύτη με εφαρμογή χημικών (α)-(β) και φυσικών (γ)-(στ) τεχνικών, (α) ομοιοπολικός δεσμός, (β) διαμοριακό πλέγμα, (γ) προσρόφηση, (δ) εγκλωβισμός σε πολυμερές, (ε) εγκαψυλλίωση, (στ) εγκλωβισμός σε λίποςώματα. Ο βιοκαταλύτης παριστάνεται με σφαιρίδια.



ΣΧΗΜΑ 2

Τεχνικές προστασίας της ενζυμικής δραστηριότητας κατά την ακινητοποίηση, (α) Με παρουσία υποστρώματος ή αναστολέα, (β) Προσωρινός σχηματισμός συμπλόκου μεταξύ ενζύμου (E-SH) και αναστολέα (RS-SR), μέσω δισουλφιδικού δεσμού.

Ομάδες του βιοκαταλύτη που κυρίως χρησιμοποιούνται κατά την ακινητοποίηση είναι η ε-αμινομάδα της Lys και η α-αμινομάδα του N-τελικού άκρου του ενζυμικού μορίου. Η σουλφυδρυλομάδα της Cys είναι δραστικότερη από την αμινομάδα (π.χ., της Lys) και ακόμη δραστικότερη από την υδροξυλομάδα (π.χ. της Tyr, Ser, Thr), ωστόσο ο αντίστοιχα σχηματιζόμενος εστέρας είναι λιγότερο σταθερός από την υποκατεστημένη αμίνη ή από τον εστέρα. Εάν ληφθεί υπόψιν και η συχνότητα παρουσίας των

αμινοξέων στο ενζυμικό μόριο, η προτίμηση αμινοξέων ως θέσεων ακινητοποιήσεως μειώνεται, γενικώς, με την εξής σειρά: Lys (-NH<sub>2</sub>), Cys (-SH), Tyr (φαινολικό υδροξύλιο), His (ιμιδαζολομάδα), Asp (-COOH), Glu (-COOH), Arg (γουανιδινομάδα), Trp (ινδολομάδα), Ser (-CH<sub>2</sub>OH), Thr (-CH<sub>2</sub>OH), και Met (θειεστέρας, -S-CH<sub>3</sub>) [2,18,19].

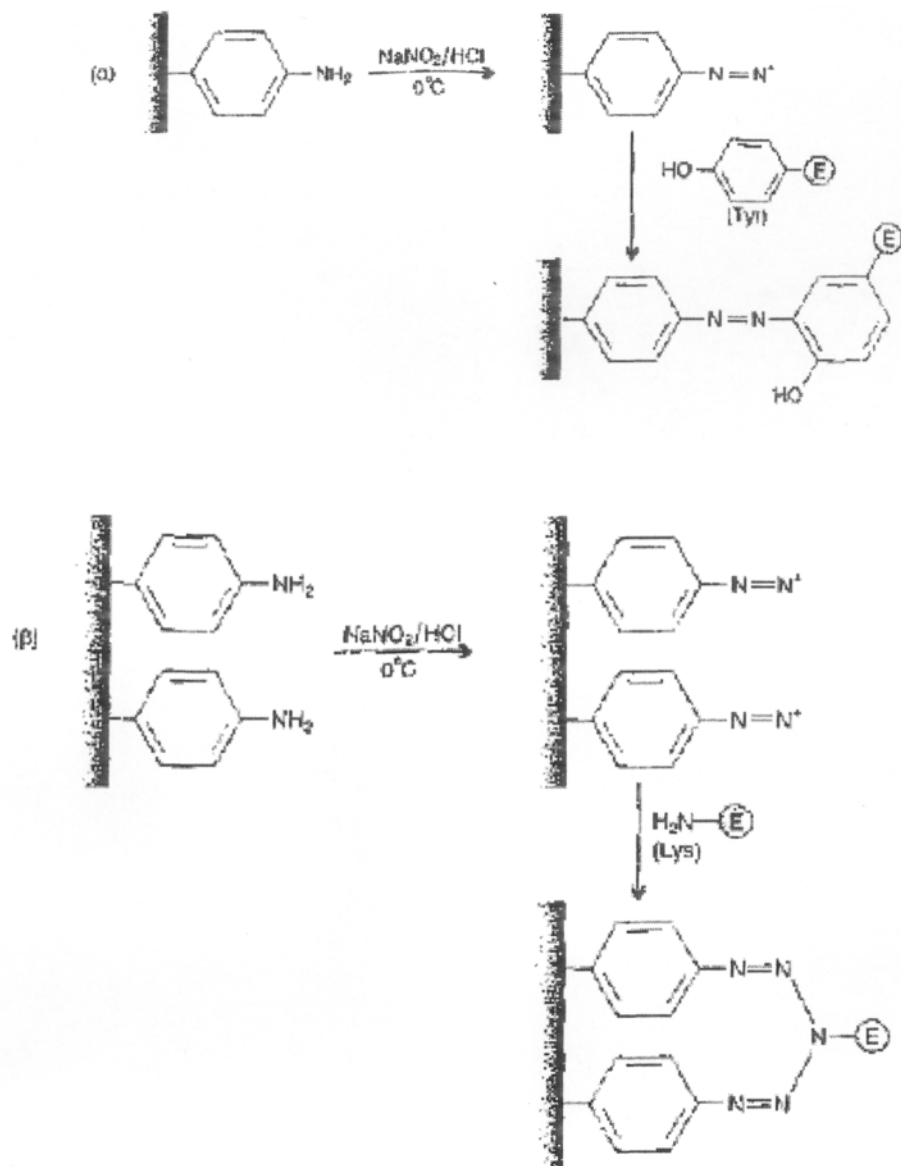
Η χημική σύσταση στερεών υλικών που χρησιμοποιούνται ως φορείς ακινητοποιημένων ενζύμων παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία. Στα περισσότερα υλικά υπάρχουν ελεύθερες ομάδες (π.χ. υδροξυλομάδες, αμινομάδες ή καρβοξυλομάδες), από τις οποίες είναι δυνατόν να ακινητοποιηθεί ο βιοκαταλύτης. Στην συνέχεια περιγράφονται οι κυριότερες αντιδράσεις ακινητοποιήσεως ενζύμων:

### **Διαζώτωση.**

Η τεχνική της διαζώτωσης (diazotization) στοχεύει στον σχηματισμό αζωδεσμών (—N=N—) προερχόμενων από αντίδραση ενζύμου και δραστικών ηλεκτρονιόφιλων αρυλοδιαζωνιακών ομάδων (AlN<sub>2</sub><sup>+</sup>) του φορέα. Ο φορέας πρέπει να έχει αρυλαμινομάδες, οι οποίες με παρουσία νιτρώδους νατρίου και υδροχλωρικού οξέος μετατρέπονται στις αντίστοιχες δραστικές αρυλοδιαζωνιακές ομάδες.

Οι τελευταίες, ακολούθως, αντιδρούν με πλευρικές φαινολικές ομάδες του ενζύμου (π.χ. της Tyr), σχηματίζοντας φαινολ-αζωπαράγωγα ακινητοποιημένου ενζύμου (Σχήμα 3α).

Επίσης, ελεύθερες ενζυμικές αμινομάδες (π.χ. της Lys και του N-τελικού άκρου) αντιδρούν με τις αρυλοδιαζωνιακές ομάδες του ενεργοποιημένου φορέα, παράγοντας δι-αζωπαράγωγα ακινητοποιημένου ενζύμου, στα οποία μία ενζυμική αμινομάδα δεσμεύεται σε δύο διαζωνιακές ομάδες του φορέα (Σχήμα 3β) [2,18,19].



ΣΧΗΜΑ 3

Χημική ακινητοποίηση ενζύμων με διαζώτωση, (α) σχηματισμός φαινολ-αζωπαραγώγων ακινητοποιημένου ενζύμου, (β) σχηματισμός δι-αζωπαραγώγων ακινητοποιημένου ενζύμου.

### Σχηματισμός αμιδικού δεσμού.

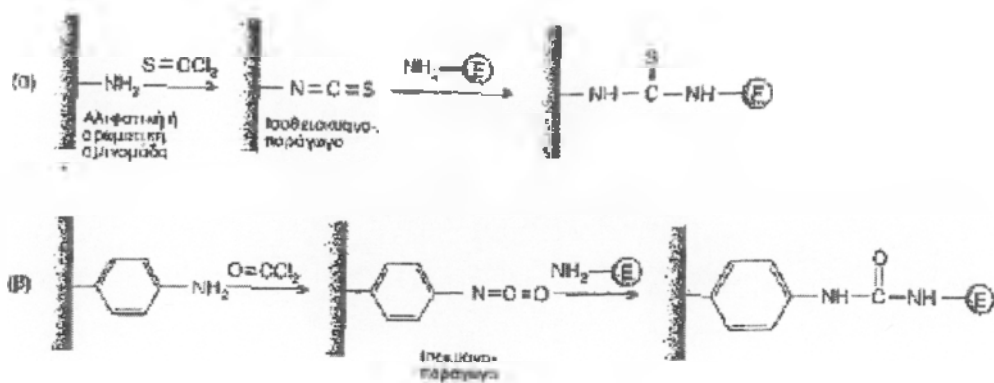
Στην τεχνολογία ακινητοποιήσεως ενζύμων χρησιμοποιούνται οι επόμενες τεχνικές σχηματισμού αμιδικού δεσμού μεταξύ ενζύμου και φορέα.



Φορέας με ελεύθερες αρωματικές ή αλειφατικές αμινομάδες ενεργοποιείται με παρουσία θειοφωσγενίου σε αλκαλικό περιβάλλον προς το αντίστοιχο δραστικό ισοθειοκυανο-παράγωγο (isothiocyanate) (Σχήμα 4α). Ακολούθως, πρωτοταγείς αμινομάδες του ενζύμου (π.χ. της Lys) αντιδρούν με τον ενεργοποιημένο φορέα, σχηματίζοντας θειοαμιδικούς δεσμούς. Ειδικά για φορέα που φέρει αρωματικές αμινομάδες, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί φωσγένιο (Σχήμα 4β) [2,18,19].

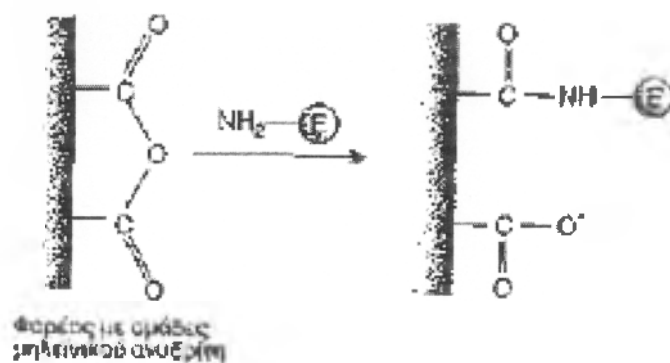
Τότε λαμβάνεται το αντίστοιχο δραστικό ισοκυανο-παράγωγο (isocyanate), το οποίο, με παρουσία πρωτοταγών αμινομάδων του ενζύμου, σχηματίζει αμιδικούς δεσμούς. Άλλες ενζυμικές πλευρικές ομάδες (π.χ. σουλφυδρυλομάδες, ιμιδαζολο-μάδες, φαινολομάδες και καρβοξύλια) αντιδρούν επίσης με δραστικά ισο-(θειο)κυανο-παράγωγα του φορέα. Αλλά οι λαμβανόμενες αντίστοιχες ενώσεις είναι ασταθείς σε ασθενώς αλκαλικό pH και αποδομούνται με παρουσία νουκλεόφιλων ομάδων.

Στο Σχήμα 5 απεικονίζεται η περίπτωση αντιδράσεως ενζύμου και ενεργοποιημένου φορέα ο οποίος αποτελεί το προϊόν συμπολυμερισμού μηλεϊνικού ανυδρίτη (maleic anhydride) και οργανικών μονομερών. Δραστικές ομάδες ανυδρίτη αντιδρούν με πλευρικές αμινομάδες του ενζύμου (π.χ. της Lys) και το ένζυμο ακινητοποιείται μέσω αμιδικών δεσμών. Παράλληλα, σχηματίζονται και μη δραστικές καρβοξυλομάδες, που προσδίδουν κατιοντικές ιδιότητες στον φορέα [2,18,19].



ΣΧΗΜΑ 4

Σχηματισμός αμιδικού δεσμού μεταξύ ενζύμου και φορέα, (α) φορέας με ελεύθερες αρωματικές ή αλειφατικές αμινομάδες ενεργοποιείται με παρουσία θειοφωσγενίου σε αλκαλικό περιβάλλον προς το αντίστοιχο δραστικό ισοθειοκυανο-παράγωγο, (β) πρωτοταγείς αμινομάδες του ενζύμου αντιδρούν με τον ενεργοποιημένο φορέα, σχηματίζοντας θειοαμιδικούς δεσμούς.

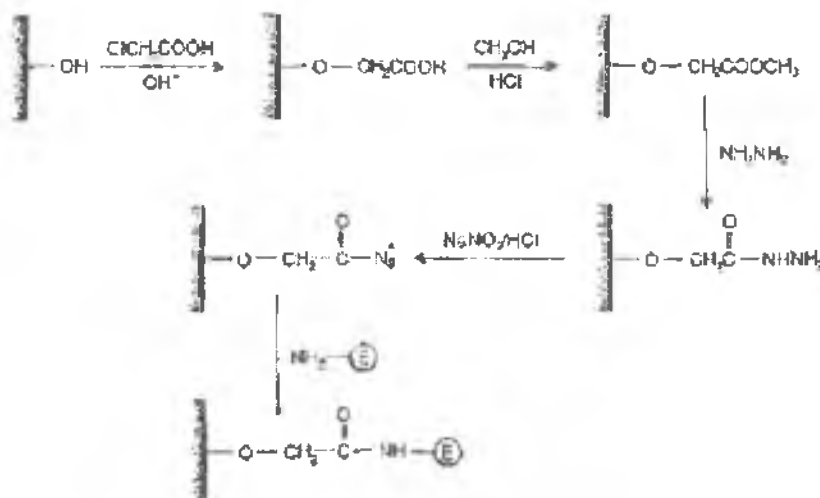


ΣΧΗΜΑ 5

Αντίδραση ενζύμου και ενεργοποιημένου φορέα που αποτελεί το προϊόν συμπολυμερισμού μηλαινικού ανυδρίτη. Δραστικές ομάδες ανυδρίτη αντιδρούν με πλευρικές αμινομάδες του ενζύμου και το ένζυμο ακινητοποιείται μέσω αμιδικών δεσμών.

Αποτελεσματική τεχνική ακινητοποιήσεως είναι και η αντίδραση που οδηγεί στον σχηματισμό ακυλαζιδο-παραγώγων (acylazide derivatives). Καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες του φορέα μετατρέπονται, τελικά, σε ακυλαζιδο-παραγώγα, τα οποία εμφανίζουν εξαιρετική δραστικότητα με πρωτοταγείς αμινομάδες του ενζύμου (π.χ. της Lys και του N-τελικού άκρου), καθώς και με θειολομάδες, φαινολομάδες και αλειφατικές υδροξυλομάδες. Αν ο φορέας αρχικά φέρει υδροξυλομάδες, αυτές, με παρουσία χλωροξικού οξέος, σε αλκαλικό περιβάλλον μετατρέπονται σε καρβοξυλομάδες και αυτές, τελικά, σε ακυλο- N<sup>3+</sup>-ομάδες, σύμφωνα με τη σειρά αντιδράσεων του Σχήματος 6 [2,18,19].

Αρχικά η καρβοξυλομάδα, με παρουσία μεθανόλης, δίδει τον αντίστοιχο μεθυλεστέρα ο οποίος, με παρουσία υδραζίνης, οδηγεί στο αντίστοιχο ακυλυδραζίδιο. Με παρουσία νιτρώδους οξέος μετατρέπεται σε δραστικό ακυλο-N<sup>3+</sup>-παραγώγο, το οποίο αντιδρά με τις ελεύθερες ενζυμικές ομάδες.

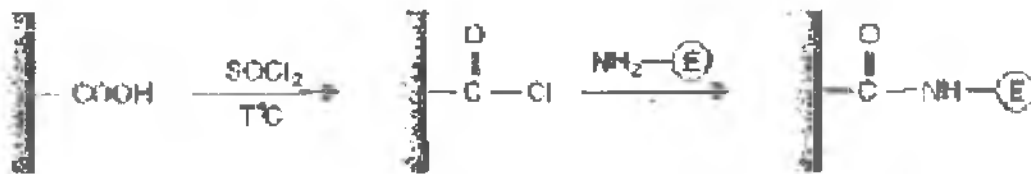


ΣΧΗΜΑ 6

Τεχνική ακινητοποιήσεως που οδηγεί στον σχηματισμό ακυλαζιδο-παραγώγων.

Εναλλακτικός τρόπος ενεργοποίησης των καρβοξυλομάδων του φορέα αποτελεί η αντίδραση υπό βρασμό με θειονυλο-χλωρίδιο (thionyl chloride), οπότε σχηματίζεται ο αντίστοιχος ακυλοχλωρο-υποκατεστημένος φορέας.

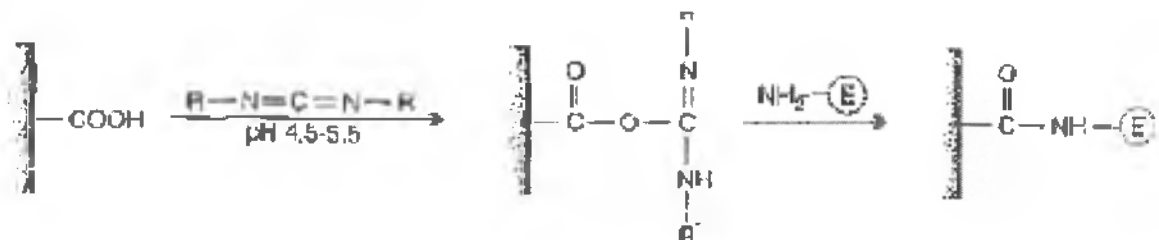
Οι ομάδες του τελευταίου αντιδρούν σε μειωμένη θερμοκρασία με ενζυμικές αμινομάδες σχηματίζοντας αμιδικούς δεσμούς (Σχήμα 7) [2,18,19].



ΣΧΗΜΑ 7

Σχηματισμός αμιδικού δεσμού με ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων του φορέα με βρασμό με θειονυλο-χλωρίδιο.

Πολύ συνηθισμένη αντίδραση καρβοξυλίου και αμινομάδας είναι αυτή που χρησιμοποιεί καρβοδιιμίδια (carbodiimides). Τα καρβοξύλια του φορέα, σε όξινο pH, ενεργοποιούνται με παρουσία καρβοδιιμιδίου προς τις αντίστοιχες δραστικές ακυλ-ισσοουρίες (εστέρες ισοουρίας), που ακολούθως αντιδρούν με πρωτοταγείς ομάδες του ενζύμου, κυρίως αμινομάδες, λιγότερο δε με υδροξυλομάδες ή σουλφυδρυλομάδες (Σχήμα 8).



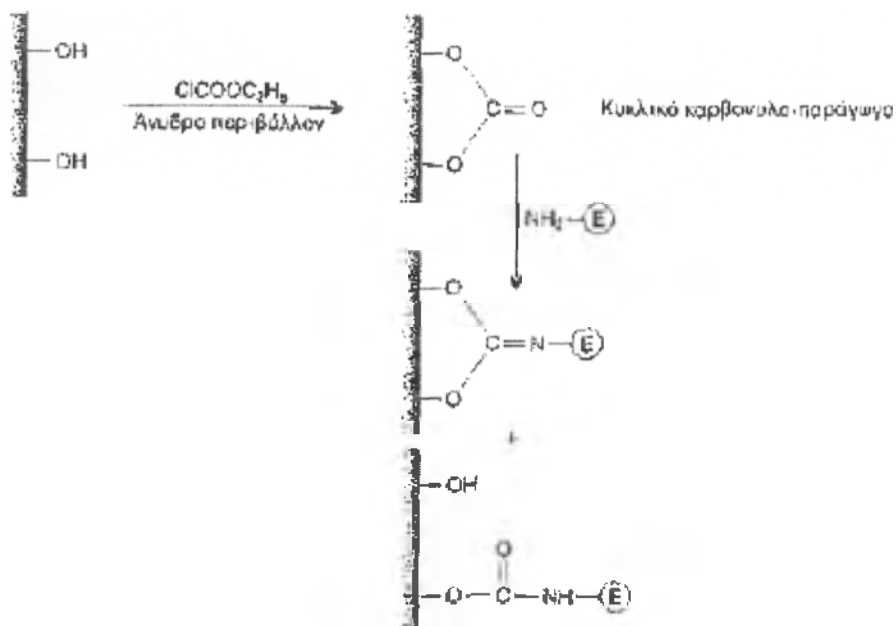
ΣΧΗΜΑ 8

Αντίδραση με χρήση καρβοδιιμιδίων.

Η τεχνική του δραστικού κυκλικού καρβοϊμιδίου (cyclic imidocarbamate) προϋποθέτει ότι ο φορέας έχει ελεύθερες υδροξυλομάδες. Σε ψυχρό αλκαλικό περιβάλλον, δύο υδροξύλια ενεργοποιούνται προς κυκλικό καρβοϊμιδο-παράγωγο, με παρουσία κυανοβρωμιδίου. Τελικά, οι δραστικές κυκλικές καρβοϊμιδομάδες του φορέα αντιδρούν με αμινομάδες του ενζύμου, οπότε το τελευταίο ακινητοποιείται μέσω δεσμών ισοουρίας.

Κατάλληλη ενεργοποίηση υδροξυλομάδων οποιουδήποτε φορέα είναι δυνατόν να οδηγήσει σε δραστικά κυκλικά καρβονυλο-παράγωγα (cyclic carbonate derivatives). Ως αντιδραστήριο ενεργοποίησης χρησιμοποιείται ο αιθυλεστέρας του χλωρομυρμηκικού οξέος (ethyl chloroformate) σε άνυδρο οργανικό περί-βάλλον (π.χ. διμεθυλσουλφοξείδιο, με παρουσία διοξανίου και τριαιθυλαμίνης) [2,18,19].

Τα σχηματιζόμενα δραστικά κυκλικά καρβονυλο-παράγωγα αντιδρούν με πρωτοταγείς αμινομάδες του ενζύμου για να δώσουν ακινητοποιημένο βιοκαταλύτη (Σχήμα 9).



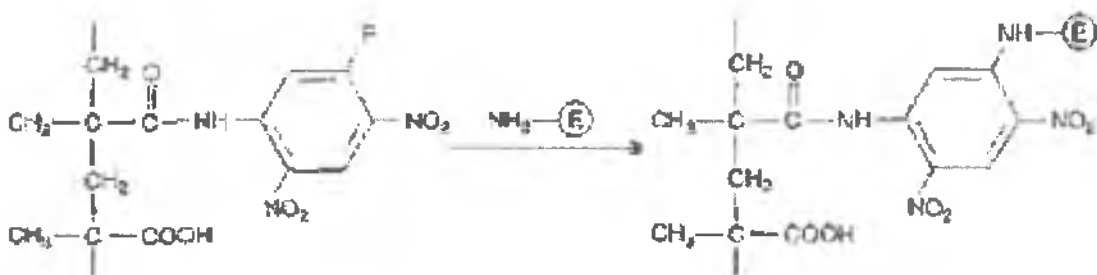
ΣΧΗΜΑ 9

Η τεχνική του δραστικού κυκλικού καρβοϊμιδίου.

### Αντιδράσεις αρυλιώσεως και αλκυλιώσεως.

Περιγράφονται γενικές αντιδράσεις ομάδων του ενζυμικού μορίου (π.χ. αμινομάδων, σουλφυδρυλομάδων και φαινολικών ομάδων) με δραστικές ομάδες ενεργοποιημένου φορέα (π.χ. αλογόνα,εποξειδία, βινυλο-σουλφόνη κ.ά.).

Πρώτη αντίδραση στην οποία μετέχει αλογόνο ως δραστική ομάδα του φορέα αποτελεί η απευθείας ακινητοποίηση ενζύμου σε δραστικό συνθετικό ακρυλο-φθοριούχο πολυμερές. Τέτοιο υλικό είναι αυτό που παράγεται από τον συμπολυμερισμό μεθακρυλικού οξέος και 5-φθορο-2,4-δινιτρο-ανιλινο-μεθακρυλικού οξέος. Μέρος της δομής του δραστικού πολυμερούς, καθώς και η αντίστοιχη νουκλεόφιλη αντίδραση ακινητοποιήσεως του ενζύμου παριστάνονται στο Σχήμα 10 [2,18,19].



ΣΧΗΜΑ 10

Απευθείας ακινητοποίηση ενζύμου σε δραστικό συνθετικό ακρυλο-φθοριούχο πολυμερές.

### Σχηματισμός βάσεως Schiff.

Η περίπτωση αυτή προβλέπει δε την αντίδραση μεταξύ αλδεϋδομάδων που υπάρχουν ή δημιουργούνται στον φορέα και αμινομάδων του ενζύμου, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δεσμών αλδιμίνης, γνωστών και ως δεσμών βάσεως Schiff. Κατάλληλα ενεργοποιημένοι φορείς θεωρούνται αυτοί που φέρουν αλδεϋδομάδες, όπως είναι ορισμένα ειδικά συνθετικά πολυμερή (π.χ. ακεταλδεϋδο-πολυακρυλαμίδιο) και φυσικοί πολυσακχαρίτες με γειτονικές υδροξυλομάδες (τύπου *cis*-διόλης) οι οποίες έχουν οξειδωθεί με παρουσία υπεριωδικού νατρίου (NaIO<sub>4</sub>) προς τις αντίστοιχες αλδεϋδομάδες.

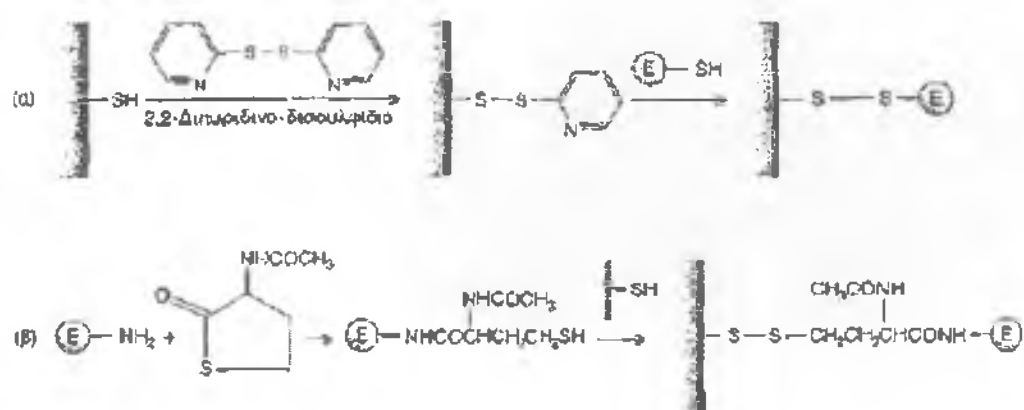
Ακολουθως, η αντίδραση ενζυμικών αμινομάδων με αλδεύδομάδες του φορέα είναι σχετικά εύκολη. Όσον αφορά στην διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας, ως αρνητικά σημεία θεωρούνται τα κατωτέρω δύο. Σε ορισμένους φορείς πολυσακχαριτικής φύσεως, οι δημιουργούμενες αλδεύδομάδες είναι γειτονικές, οπότε τυχόν αντίδραση του ενζύμου με αμφότερες ενδέχεται να το οδηγήσει σε ακατάλληλη στερεοδιάταξη και, συνεπώς, σε αδρανοποίηση. Επί πλέον, οι σχηματιζόμενοι δεσμοί αλδιμίνης είναι ασταθείς, ιδίως σε όξινο pH, οπότε συνήθως απαιτείται αναγωγή τους με παρουσία πολύ δραστικού βοροϋδριδίου του νατρίου ( $\text{NaBH}_4$ ) [2,18,19].

### **Ανταλλαγή θειολο-δισουλφιδικών δεσμών.**

Στο Σχήμα 11 παριστάνονται δύο αντιδράσεις που οδηγούν σε αντιστρέψιμη ακινητοποίηση του ενζύμου μέσω σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού. Ο δεσμός αυτός σχηματίζεται είτε μεταξύ ενζύμου και φορέα είτε μεταξύ συμπλόκου ενζύμου-βραχίονα και φορέα. Στην πρώτη περίπτωση (Σχήμα 11α), οι θειολομάδες (σουλφυδρυλομάδες) κατάλληλου φορέα ενεργοποιούνται με 2,2'-διπυριδινο-δισουλφίδιο και ο σχηματιζόμενος δραστικός φορέας ανταλλάσσει πυριδινο-σουλφιδομάδες με θειολομάδες του ενζύμου, οδηγώντας το τελευταίο σε ακινητοποίηση.

Στη δεύτερη περίπτωση (Σχήμα 11β), ουσιαστικά εισάγεται μόριο-βραχίονας μεταξύ φορέα και ακινητοποιημένου ενζύμου. Το χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο είναι η N-ακετυλ-ομοκυστείνο-θειολακτόνη, το οποίο αφ' ενός προσφέρει την απαραίτητη θειολομάδα, αφ' ετέρου παίζει τον ρόλο βραχίονα. Αρχικά η θειολακτόνη αντιδρά με αμινομάδες του ενζύμου, οπότε ο δακτύλιος ανοίγει και σχηματίζεται ομοιοπολικό σύμπλοκο ενζύμου-βραχίονα μέσω αμιδικού δεσμού. Ακολουθως, στην αντίδραση προστίθεται ο φορέας που φέρει θειολομάδες, οπότε και σχηματίζονται δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ φορέα και συμπλόκου βραχίονα-ενζύμου [2,18,19].

Λόγω της παρουσίας δισουλφιδικών δεσμών στο ακινητοποιημένο σύμπλοκο, η αναγέννηση του βιοκαταλυτικού φορέα με νέα ποσότητα δραστικού ενζύμου, όταν αυτό καταστεί αναγκαίο, πραγματοποιείται με παρουσία αναγωγικών αντιδραστηρίων.



ΣΧΗΜΑ 11

Δύο αντιδράσεις που οδηγούν σε αντιστρέψιμη ακινητοποίηση του ενζύμου μέσω σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού, (α) οι θειολομάδες (σουλφυδρυλομάδες) κατάλληλου φορέα ενεργοποιούνται με 2,2'-διπυριδινοδισουλφίδιο και ο σχηματιζόμενος δραστικός φορέας ανταλλάσσει πυριδινοσουλφιδιομάδες με θειολομάδες του ενζύμου, οδηγώντας το τελευταίο σε ακινητοποίηση, (β) ουσιαστικά εισάγεται μόριο-βραχίονας μεταξύ φορέα και ακινητοποιημένου ενζύμου.

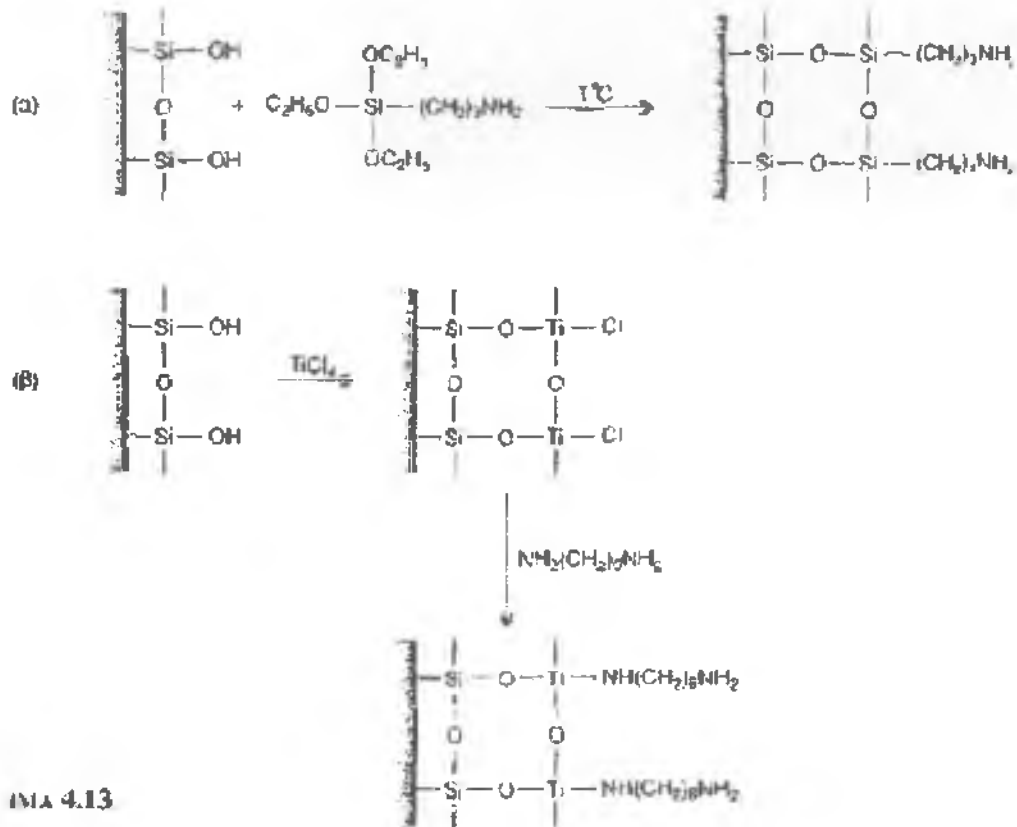
### Ακινητοποίηση σε ανόργανα υλικά.

Δεδομένου ότι η λειτουργικότητα των ανόργανων υλικών για χημική ακινητοποίηση ενζύμων είναι περιορισμένη, οι αντίστοιχοι φορείς πρέπει πρώτα να υποστούν επεξεργασία με κατάλληλα κατά περίπτωση τριμεθοξυ-οργανοπυριτικά. Η χρήση τέτοιων αντιδραστηρίων σκοπό έχει την επικάλυψη της ανόργανης επιφάνειας του φορέα με στιβάδες οργανικής συστάσεως που φέρουν οργανικές λειτουργικές ομάδες (αλειφατικές ή αρωματικές αμινομάδες, αλογόνα, αλδεύδομάδες, κ.ά.) [2,18,19].

Ακολούθως, το ένζυμο ακινητοποιείται μέσω των λειτουργικών αυτών ομάδων, σύμφωνα με τις προηγούμενες αντιδράσεις. Η διαδικασία επικάλυψης χρησιμοποιεί ως συνηθέστερο αντιδραστήριο το πυριτικό παράγωγο 3-αμινοπροπυλο-τριμεθοξυ-πυρίτιο. Σύμφωνα με το Σχήμα 12α, υδροξυλομάδες του φορέα, πολυ-οξειδίου του πυριτίου, υποκαθίστανται από τριμεθοξυ-ομάδες του αντιδραστηρίου, με αποτέλεσμα την παρουσία



λειτουργικής νέας επιφάνειας επί της ανόργανης, στην προκειμένη περίπτωση με ελεύθερες αμινομάδες.



### ΣΧΗΜΑ 12

Ακινητοποίηση σε ανόργανα υλικά, (α) υδροξυλομάδες του φορέα, πολυ-οξειδίου του πυριτίου, υποκαθίστανται από τριμεθοξυ-ομάδες, (β) βελτιωμένη μορφή ανόργανου φορέα είναι και το προϊόν το οποίο παρασκευάζεται κατόπιν επεξεργασίας με τετραχλωρο-τιτάνιο.

Προφανώς, χρησιμοποίηση διαφορετικών παραγώγων του πυριτίου οδηγεί σε αντίστοιχες οργανικές επιφάνειες με διαφορετικές ελεύθερες λειτουργικές ομάδες. Κύριο μειονέκτημα του εν λόγω ανόργανου φορέα είναι η περιορισμένη σταθερότητα της, ακόμη και σε ήπιες αλκαλικές συνθήκες. Επεξεργασία του φορέα με άλατα ζirkονίου υπό κενό έχει ως αποτέλεσμα την

εναπόθεση επικαλύμματος οξειδίου του ζirkονίου, οπότε και βελτιώνεται η ανθεκτικότητα σε αλκαλικό περιβάλλον [2,18,19].

Βελτιωμένη μορφή ανόργανου φορέα είναι και το προϊόν το οποίο παρασκευάζεται κατόπιν επεξεργασίας με τετραχλωρο-τιτάνιο (Σχήμα 12β). Στην προκειμένη περίπτωση, η νέα επιφάνεια προσφέρει αφ' ενός δραστικές χλωρομάδες για περαιτέρω αντιδράσεις τροποποιήσεως (π.χ. με διαμινοαλκάνια), αφ' ετέρου αυξημένη χημική σταθερότητα, λόγω της ύπαρξης στιβάδας τιτανίου.

### **Δημιουργία πλέγματος.**

Η τεχνική της δημιουργίας πλέγματος (διαμοριακής συνδέσεως) βασίζεται στον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ μορίων του ίδιου του ενζύμου, με την χρησιμοποίηση προς τούτο διδραστικών αντιδραστηρίων (π.χ. γλουταρικής αλδεΐδης).

Με τον τρόπο αυτό, τελικά, σχηματίζεται πολυμερές τρισδιάστατο πλέγμα, του οποίου δομικές μονάδες είναι τα μόρια του ακινητοποιημένου ενζύμου. Για να είναι εφικτή η δημιουργία τέτοιου πλέγματος, η ποσότητα του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, συνήθως, είναι μεγάλη (τυπικά 50-200 mg πρωτεΐνης ανά mL διαλύματος), γεγονός που θεωρείται ότι αποτελεί μειονέκτημα της μεθόδου. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο, πρέπει να προσδιορίζεται και η εκάστοτε βέλτιστη απαιτούμενη ποσότητα, η οποία συχνά φθάνει (π.χ. για τη γλουταρική αλδεΐδη) στο 10% του ενζύμου [2,18,19].

Κατά τη διαμοριακή σύνδεση, μεγάλο μέρος της ενζυμικής δραστηριότητας χάνεται λόγω αντιδράσεως των απαραίτητων ομάδων της ενεργού περιοχής με διδραστικό αντιδραστήριο. Κάτι τέτοιο είναι δυνατόν να περιορισθεί με την παρουσία υποστρώματος ή αναστολέα. Γενικά, η τεχνική θεωρείται κατάλληλη για πολυενζυμικά συστήματα, κύτταρα και δομές μεγάλου μεγέθους και μάλλον όχι τόσο εφαρμόσιμη σε ενζυμικά μόρια.

### **Δημιουργία διαμοριακώς συνδεδεμένων ενζυμικών κρυστάλλων.**

Γενικά, ένα σύστημα ακινητοποιημένου ενζύμου αποτελείται από 90-95% στερεό φορέα και πολύ λίγο ένζυμο, γεγονός το οποίο περιορίζει την παραγωγικότητα του. Αποτελεσματικότερη μορφή αδιαλυτοποιημένου

ενζύμου ενδεχομένως να αποδειχθεί αυτή η οποία λαμβάνεται μετά από ομοιοπολική διαμοριακή σύνδεση ενζυμικών κρυστάλλων, γνωστών διεθνώς ως cross-linked enzyme crystals (CLECs). Η μορφή αυτή είναι αδιάλυτη, αποτελείται δε μόνον από κρυστάλλους του ενζύμου, σταθεροποιημένους με κατάλληλο διδραστικό αντιδραστήριο (π.χ. γλουταρική αλδεϋδη). Τα CLECs υπερέχουν των ελεύθερων ενζύμων σε θερμοανθεκτικότητα και ανεκτικότητα έναντι υδατοσυμβατών οργανικών διαλυτών, τέτοια δε προϊόντα είναι ήδη εμπορικά διαθέσιμα: μεταξύ αυτών είναι η ακυλάση της πενικιλίνης, η λιπάση από *Candida cylindracea* και η θερμολυσίνη. Λόγω της υψηλής σταθερότητας και της κατ' όγκο δραστικότητας, τα CLECs ενδεχομένως να αποσβαίνουν την υψηλή τιμή τους [2,18,19].

### 1.3.2. ΦΥΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΕΩΣ

#### Προσρόφηση.

Η ακινητοποίηση βιοκαταλύτη μέσω προσροφήσεως σε κατάλληλο φορέα αποτελεί την παλαιότερη τεχνική (Σχήμα 1γ). Ανάλογα με τον χρησιμοποιούμενο φορέα, οι δυνάμεις που οδηγούν το ένζυμο σε προσρόφηση είναι είτε ηλεκτροστατικές είτε υδρόφοβες [2,21-25]. Η πρώτη και ευρύτερη βιομηχανική εφαρμογή ακινητοποιημένων ενζύμων αφορούσε την παραγωγή L-αμινοξέων με παρουσία ακυλάσης L-αμινοξέων, προσροφημένης σε ανιοντοανταλλάκτη δεξτράνης (DEAE-Sephadex). Κύριο μειονέκτημα της τεχνικής προσροφήσεως μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων θεωρείται η ευκολία με την οποία το ένζυμο διαφεύγει από τον φορέα. Αυτό συμβαίνει σε περιπτώσεις μεταβολής του pH ή και της ιοντικής ισχύος της υγρής φάσης ή ακόμη και με την παρουσία υποστρώματος, κυρίως όταν τούτο έχει το ίδιο συνολικό φορτίο με το ακινητοποιημένο ένζυμο. Το ανωτέρω μειονέκτημα, θεωρούμενο από διαφορετική οπτική γωνία, ενδεχομένως, αποτελεί πλεονέκτημα της τεχνικής, διότι η αναγέννηση του βιοκαταλυτικού φορέα (απομάκρυνση αδρανούς βιοκαταλύτη και φόρτιση με νέα ποσότητα δραστικού ενζύμου) καθίσταται ευκολότατη και οικονομική.

Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιοκαταλύτη και φορέα είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση του βιοκαταλύτη με προσρόφηση. Στην προκειμένη περίπτωση, το ένζυμο τροποποιείται με την

εισαγωγή κατάλληλων υδρόφοβων μορίων (ουρών), μέσω σταθερών ομοιοπολικών δεσμών. Ακολούθως επιλέγεται φορέας με ανάλογα υδρόφοβα χαρακτηριστικά, οπότε, όταν το τροποποιημένο ένζυμο και ο υδρόφοβος φορέας βρεθούν σε υδάτινο περιβάλλον αλληλεπιδρούν με υδρόφοβες δυνάμεις και το ένζυμο προσροφείται. Η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών έχει συνήθως ως αποτέλεσμα την αντιστροφή του φαινομένου και την επαναδιαλυτοποίηση του ενζύμου [2,21-25].

### **Εγκλωβισμός.**

Με τον όρο εγκλωβισμό (entrapment) εννοούμε τον περιορισμό του ενζύμου στο εσωτερικό της δομής πολυμερούς υλικού (πλέγματος) που αποτελεί τον φορέα (Σχήμα 1δ). Προφανώς, προϋπόθεση της επιτυχίας εγκλωβισμού του βιοκαταλύτη είναι να έχει μέγεθος μεγαλύτερο από το μέγεθος των πόρων του φορέα.

Κάτι τέτοιο δεν είναι πάντοτε εφικτό, αφού κατά την σύνθεση του πλέγματος είναι σχετικά δύσκολο να ελεγχθεί και να καθορισθεί το μέγεθος των πόρων. Γενικά, με την τεχνική αυτή υπάρχει μεγάλη πιθανότητα διαφυγής ενζύμου από το πλέγμα, πρόβλημα το οποίο συχνά αντιμετωπίζεται με χημική σταθεροποίηση του βιοκαταλυτικού φορέα από διδραστικά αντιδραστήρια. Από την άλλη πλευρά, οι πόροι του φορέα θα πρέπει να έχουν τέτοιο μέγεθος, οόστε να αμβλύνουν πιθανά φαινόμενα περιορισμού της μεταφοράς ουσιών λόγω του μοριακού τους μεγέθους. Γενικά, ο εγκλωβισμός θεωρείται ως η καταλληλότερη τεχνική για την ακινητοποίηση κυττάρων και μεγαλομοριακών συστημάτων [2,21-25].

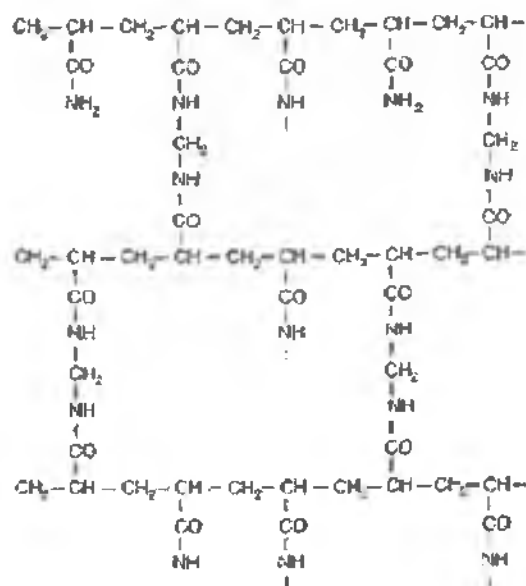
Δύο τύποι πολυμερών υλικών που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή είναι το πολυακρυλαμίδιο και τα διάφορα φυσικά πολυμερή, πολυσακχαριδικής κυρίως συστάσεως, με δυνατότητα σχηματισμού πηκτωμάτων. Ο βιοκαταλύτης αναμιγνύεται με αρχικά μονομερή τα οποία τελικώς πολυμερίζονται, εγκλωβίζοντας τον βιοκαταλύτη. Το πολυακρυλαμίδιο (Σχήμα 13) σχηματίζεται από μονομερή συστατικά ακρυλαμιδίου και Ν,Ν'-μεθυλενοδισ-ακρυλαμιδίου· το τελευταίο χρησιμοποιείται ως αντιδραστήριο διαμοριακής συνδέσεως. Η αντίδραση αρχίζει με παρουσία  $K_2S_2O_5$  και μειωμένης

συγκεντρώσεως οξυγόνου, ενώ ως καταλύτης χρησιμοποιείται N,N,N',N'-τετραμεθυλ-αιθυλενο-διαμίνη (TEMED).

Κύριο πρόβλημα είναι η τοξικότητα των μονομερών και, ως εκ τούτου, η τεχνική αποφεύγεται σε ευαίσθητα βιολογικά συστήματα (π.χ. κύτταρα). Αντίθετα, τα φυσικά πολυμερή δεν παρουσιάζουν προβλήματα τοξικότητας, η δομή τους είναι όμως λιγότερο σταθερή συγκριτικά με το πολυακρυλαμίδιο. Άγαρ, κ-καρραγενάνη (κ-carrageenan) και αλγινικό ασβέστιο (calcium alginate) πηκτωματοποιούνται εγκλωβίζοντας βιοκαταλύτες, ανάλογα με το μοριακό τους μέγεθος. Άγαρ και κ-καρραγενάνη σχηματίζουν πηκτώματα με μεγάλους πόρους και διαλυτοποιούνται με αύξηση της θερμοκρασίας, συνεπώς θεωρούνται ως υλικά μετρίως κατάλληλα για ενζυμικό εγκλωβισμό. Διαλυτοποίηση του πολυμερούς παρατηρείται από τους 40°C περίπου και άνω, άρα προϋπόθεση εφαρμογής της τεχνικής είναι η σταθερότητα του βιοκαταλύτη στην ανωτέρω θερμοκρασία, τουλάχιστον, ώστε το πολυμερές να είναι διαλυτοποιημένο κατά την έναρξη του εγκλωβισμού [2,21-25].

Ακολούθως, προστίθεται βιοκαταλύτης και το θερμό διάλυμα (ή εναιώρημα, αν πρόκειται για κύτταρα) πολυμερούς και βιοκαταλύτη πηκτωματοποιεί είτε σε μη υδατοσυμβατό υγρό, π.χ. λάδι ή βουτανόλη (περίπτωση ζελατίνης και άγαρ), είτε σε διάλυμα χλωριούχου καλίου (περίπτωση κ-καρραγενάνης). Το αλγινικό οξύ προέρχεται από κυανοφύκη και έχει ως δομικές μονάδες β-ο-μαννοπυρανοζυλο-ουρονικό οξύ και α-L-γλυκοπυρανοζυλο-ουρονικό οξύ. Αρχικά διαλυτοποιείται ο πολυσακχαρίτης, προστίθεται βιοκαταλύτης, ενώ το υδατινό διάλυμα (ή εναιώρημα) εισάγεται στάγδην σε διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου, οπότε και πηκτωματοποιείται αμέσως.

Ο φορέας αλγινικού ασβεστίου έχει σχετικά σταθερή δομή, όμως η παρουσία φωσφορικών και κιτρικών ανιόντων θα πρέπει να αποφεύγεται, αφού τα ανιόντα αυτά έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν σύμπλοκα με τα κατιόντα ασβεστίου, οδηγώντας, τελικά, το πήκτωμα σε διαλυτοποίηση [2,21-25].



ΣΧΗΜΑ 13

Τμήμα της δομής του πολυακρυλαμιδίου

### Εγκαψυλλίωση.

Σύμφωνα με τη τεχνική της εγκαψυλλίωσης (encapsulation), γνωστής και ως μικροεγκαψυλλίωση, το ένζυμο βρίσκεται ελεύθερο και διαλυμένο σε εξαιρετικά μικρό όγκο υγρού, το οποίο περιορίζεται στο εσωτερικό ημιπερατής μεμβράνης που λαμβάνει τη μορφή μικροσφαιριδίου ή μικροκαψυλλίου (Σχήμα 1ε).

Συνεπώς, ο βιοκαταλυτικός φορέας αποτελείται από πληθυσμό ημιπερατών καψυλλίων, τα οποία στο εσωτερικό τους φέρουν ενζυμικό διάλυμα [2,21-25].

Προϋπόθεση επιτυχίας της τεχνικής είναι η σταθερότητα του ενζύμου υπό μορφή διαλύματος. Τα καψύλλια έχουν διάμετρο 1-100 μm, ανάλογα δε με το μέγεθος των πόρων τους επιτρέπουν την διέλευση μορίων μικρότερου μεγέθους (π.χ. υποστρώματος, προϊόντος, αλάτων κ.ά.) όχι όμως και ενζύμου. Τέτοια συστήματα ακινητοποιημένων ενζύμων χαρακτηρίζονται από: (α) μεγάλη ειδική επιφάνεια, (β) υψηλή ταχύτητα μεταφοράς μάζας, (γ) υψηλό βαθμό συγκράτησης ενζύμου, και (δ) δυνατότητα ταυτόχρονης ακινητοποίησης περισσότερων από ένα ένζυμα.

Κύρια μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η μειωμένη μηχανική σταθερότητα των καψυλλίων και η μεγάλη απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας

λόγω επαφής του βιοκαταλύτη με οργανικούς διαλύτες, χημικά μονομερή και λοιπά αντιδραστήρια κατά την εγκαψυλλίωση. Για τον λόγο αυτό, είναι σκόπιμο να προστεθεί κατάλληλη σταθεροποιητική ουσία στο αρχικό ενζυμικό διάλυμα πριν από την έναρξη της διεργασίας (π.χ. αλβουμίνη, πολυαιθυλενογλυκόλη, πολυβινυλο-αλκοόλη, δεξτράνη, ή θειική ηπαρίνη) [2,21-25].

Η εγκαψυλλίωση ενζύμου επιτυγχάνεται με διάφορες τεχνικές. Μία απλή τεχνική είναι η τεχνική του *διαχωρισμού φάσκων (phase separation)*, σύμφωνα με την οποία υδατικό διάλυμα, ενζύμου αναδεύεται έντονα με μη υδατοσυμβατό οργανικό διαλύτη που περιέχει διαλυμένο πολυμερές. Το σχηματιζόμενο αιώρημα(γαλάκτωμα) αποτελείται από μικροσταγόνες που περιέχουν διαλυμένο ένζυμο.

Ακολουθως, το γαλάκτωμα εισάγεται υπό έντονη ανάδευση σε διαφορετικό, κατάλληλο, μη υδατοσυμβατό οργανικό διαλύτη, όπου το πολυμερές είναι αδιάλυτο. Αποτέλεσμα είναι το τελευταίο να συγκεντρωθεί γύρω από τις μικροσταγόνες του ενζυμικού διαλύματος, σχηματίζοντας μικροκαψύλλια ημιπερατής μεμβράνης. Περίπτωση εγκαψυλλιώσεως είναι και αυτή που προβλέπει το ένζυμοελεύθερο στο εσωτερικό ημιπερατών μεμβρανών, π.χ. κοίλων ινών. Προφανώς, η μεμβράνη οφείλει να έχει οπές τέτοιου μεγέθους, ώστε να είναι διαπερατή από μικρομοριακές ουσίες, όχι όμως και από τον βιοκαταλύτη [2,21-25].

## **2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

### **2.1 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ**

Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται για την παρασκευή αμινοξέων τα οποία βρίσκουν εφαρμογή ως πρόσθετα τροφίμων, ως ουσίες για ιατρική χρήση και ως ενδιάμεσα μόρια κατά την σύνθεση άλλων ενώσεων. Η τεχνολογική σημασία των ενζύμων εστιάζεται κυρίως στο γεγονός ότι ορισμένα από αυτά αναγνωρίζουν ένα από τα δύο ισομερή των αμινοξέων και των παραγώγων τους. Αντίθετα, οι μέθοδοι χημικής συνθέσεως αδυνατούν να εξασφαλίσουν ανάλογη εκλεκτικότητα [2,18].

Δύο γενικές περιπτώσεις της εφαρμογής βιοκαταλυτών στην βιομηχανία παραγωγής αμινοξέων είναι οι εξής: διαχωρισμός μίγματος D,L-

αμινοξέων ή παραγώγων τους, και παρασκευή συγκεκριμένων αμινοξέων από άλλες ενώσεις ή από άλλα αμινοξέα.

### 2.1.1 Ενζυμικός διαχωρισμός μίγματος D,L-αμινοξέων και παραγόντων τους

Το ένζυμο αμινοακυλάση ή ακυλάση L-αμινοξέων έχει την πολύτιμη ιδιότητα να υδρολύει εκλεκτικά το L-ισομερές μίγματος ακετυλο-D,L-αμινοξέων προς το αντίστοιχο ελεύθερο L-αμινοξύ, αφήνοντας ανέπαφο το ακετυλο-D-αμινοξύ.

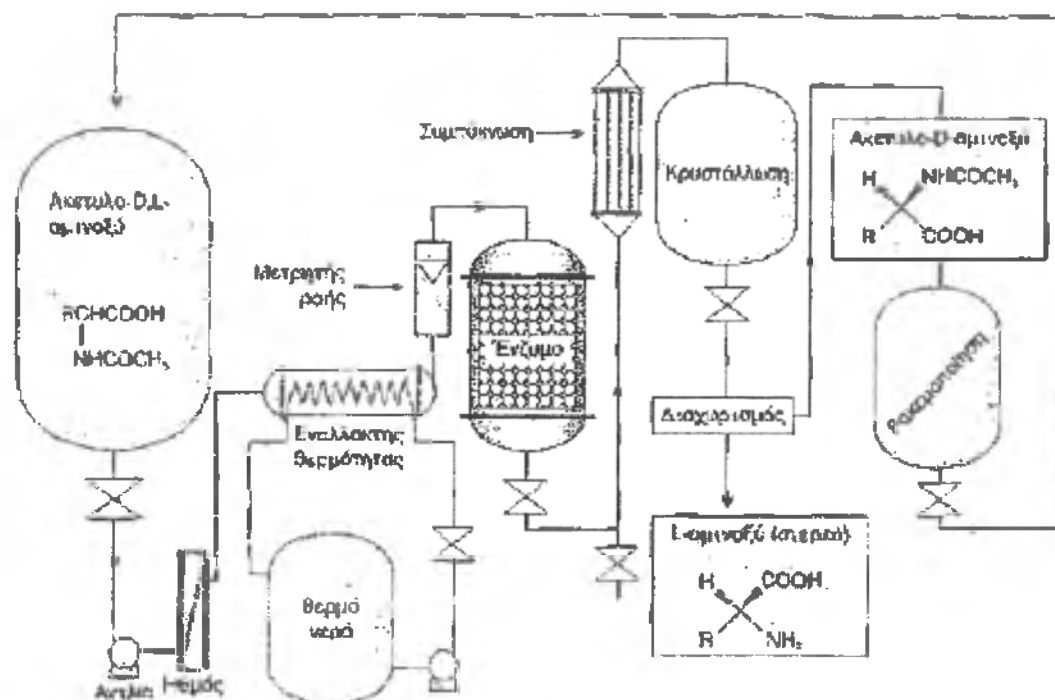
Η ιδιότητα αυτή αποτέλεσε την αφορμή της πρώτης ενζυμικής εφαρμογής στην βιομηχανία αμινοξέων (Iαπωνία, 1976), όπου ως αρχική ένωση (υπόστρωμα) χρησιμοποιείται ρακεμικό μίγμα, χημικής προελεύσεως, του αντίστοιχου αμινοξέος. Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην παραγωγή L-μεθειονίνης, η οποία λαμβάνεται δύσκολα μέσω μικροβιακών καλλιεργειών, ενώ αναφέρεται εφαρμογή της και στα αμινοξέα Phe, Ala, Trp και Val [2,18].

Το ένζυμο αμινοακυλάση του μύκητα *Aspergillus oryzae* ακινητοποιείται με την τεχνική της προσρόφησης σε ανιοντοανταλλάκτη πολυσακχαριτικής φύσεως (DEAE-Sephadex®). Η επιλογή της συγκεκριμένης τεχνικής ακινητοποίησης έγινε μεταξύ πολλών άλλων που δοκιμάστηκαν (περί τις σαράντα). Ως καταλληλότερη κρίθηκε η ανωτέρω, διότι, συγκριτικά με άλλες, αφ' ενός το ακινητοποιημένο ένζυμο διατηρεί τη δραστηριότητα του σε υψηλή θερμοκρασία (70°C), αφ' ετέρου ο βιοαντιδραστήρας στήλης αναγεννάται και επαναφορτίζεται εύκολα *in situ* με νέα ποσότητα δραστικού βιοκαταλύτη.

Αυτό καθίσταται δυνατό λόγω των αναπτυσσόμενων μη χημικών ιοντικών δυνάμεων μεταξύ φορέα και βιοκαταλύτη. Ο παράγοντας αυτός είναι σημαντικός, αφού η συνεχής χρήση του συστήματος επί δύο περίπου μήνες (50°C) οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου κατά 50%, οπότε και επιβάλλεται η αναγέννηση του. Στην πράξη, η στήλη συνήθως αναγεννάται μετά από παρέλευση μηνός. Αντίθετα, η σταθερότητα του πολυμερούς φορέα, από πλευράς ικανότητας προσροφήσεως ενζύμου και φυσικών ιδιοτήτων, παραμένει εξαιρετική επί μακρό χρονικό διάστημα (περί τα 5έτη λειτουργίας). Σύμφωνα με τη μέθοδο (Σχήμα 14), το αρχικό ρακεμικό μίγμα αμινοξέων μετατρέπεται χημικώς σε ρακεμικό μίγμα N-



ακετυλο-αμινοξέων βιοαντιδραστήρα στήλης ο οποίος φέρει ακινητοποιημένη την αμινοακυλάση [2,18].



ΣΧΗΜΑ 14

Διάγραμμα ροής των παραπάνω διαδικασιών διαχωρισμού αμινοξέων

Από τον βιοαντιδραστήρα λαμβάνεται μίγμα L-αμινοξέος και ακετυλο-D-αμινοξέος, το οποίο συμπυκνώνεται με εξάτμιση. Το L-αμινοξύ κατακρημνίζεται και παραλαμβάνεται, ενώ το ακετυλο-D-αμινοξύ ρακεμοποιείται χημικώς και ανακυκλώνεται στον βιοαντιδραστήρα (απόδοση μεθόδου μέχρι και 90%). Εναλλακτική ενζυμική κατάλυση προβλέπει την χρησιμοποίηση οξειδάσης των D-αμινοξέων, η οποία τα μετατρέπει σε ακετονοξέα, και αμιδάσης των α-αμινοξέων, η οποία δρα σε αμίδια D,L-αμινοξέων, δίδοντας μίγμα L-α-αμινοξέος και αμιδίου D-α-αμινοξέος.

Αξιόλογη ενζυμική εφαρμογή στην τεχνολογία διαχωρισμού και παραγωγής παραγώγων αμινοξέων αποτελεί και η εκλεκτική υδρόλυση του L-ισομερούς μίγματος D,L-φαινυλογλυκιναμιδίου προς L-φαινυλογλυκίνη και

αμμωνία από αμινοπεπτιδάση του βακτηρίου *Pseudomonas putida*, διεργασία η οποία αφήνει ανέπαφο το D-ισομερές [2,18].

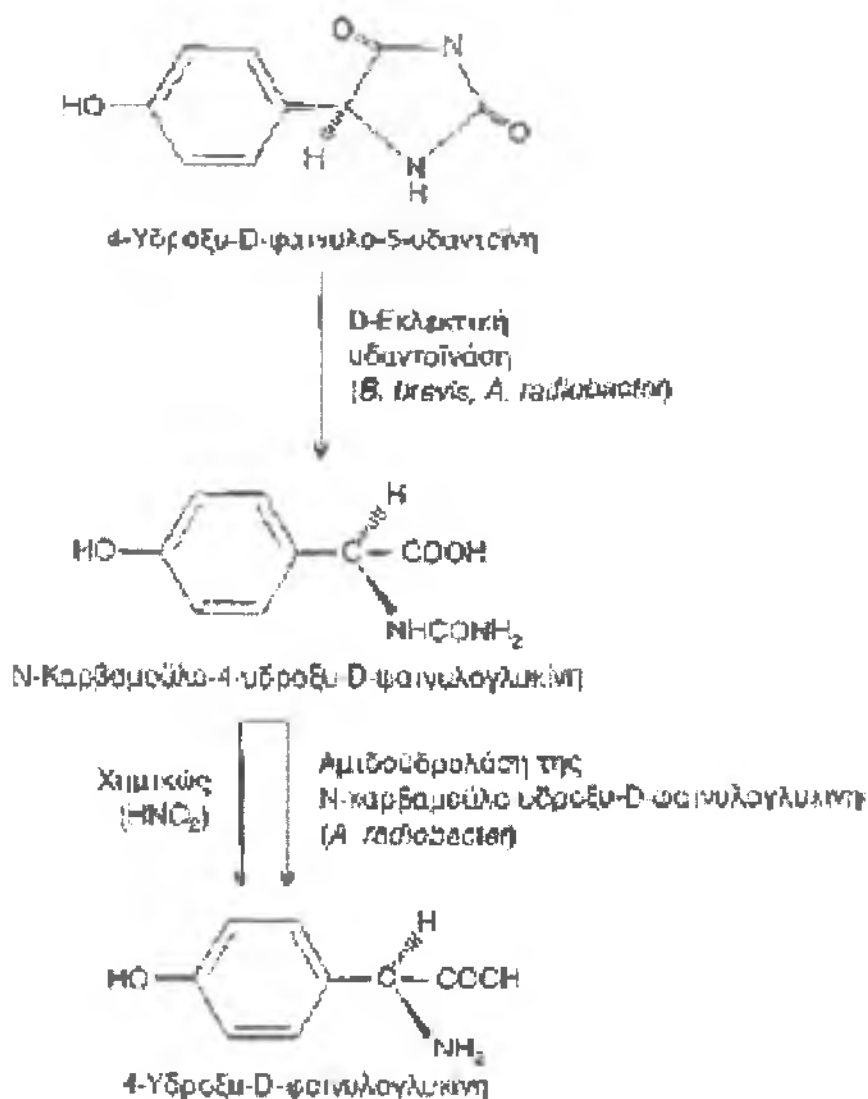
Η L-φαινυλο-Gly έχει μικρή διαλυτότητα και απομακρύνεται ως ίζημα, ενώ το D-φαινυλογλυκιναμίδιο συλλέγεται (καθαρότητα 99,99%) και υδρολύεται προς D-φαινυλο-Gly (Benz-CH(NH<sub>2</sub>)COOH, Benz = βενζολικός δακτύλιος), ένωση η οποία, ως μεθυλεστέρας, χρησιμοποιείται μαζί με το 6-αμινοπενικιλανικό οξύ (6-APA) στην χημική σύνθεση μιας σημαντικής ημισυνθετικής πενικιλίνης, της αμπικιλίνης.

Με ανάλογο τρόπο συντίθεται και η αμοξικιλίνη, με χρήση ως υποκατάστατη του 6-APA, της 4-υδροξυ-D-φαινυλογλυκίνη. Η τελευταία παρασκευάζεται σύμφωνα με το σχήμα 15 [2,18].

Ως αρχική ένωση χρησιμοποιείται ρακεμικό μίγμα 5-υποκατεστημένης υδαντοΐνης (hydantoin), επί του οποίου δρα το ένζυμο D-εκλεκτική υδαντοΐνάση από *Bacillus brevis*, εκλεκτικά μόνον επί του D-ισομερούς, οπότε λαμβάνεται N-καρβαμούλο-4-υδροξυ-D-φαινυλογλυκίνη (Σχήμα 15).

Η ένωση αυτή, τελικά, μετατρέπεται σε 4-υδροξυ-D-φαινυλογλυκίνη, έπειτα από επεξεργασία με νιτρώδες οξύ. Σημειώνεται ότι το L-ισομερές του αρχικού υποστρώματος ρακεμοποιείται υπό ήπιες αλκαλικές συνθήκες και ανακυκλώνεται, οπότε η απόδοση της μετατροπής υπερβαίνει το 50%.

Το τελευταίο στάδιο, εκείνο της χημικής επεξεργασίας, είναι δυνατόν να αποφευχθεί εάν χρησιμοποιηθεί ο μικροοργανισμός *Agrobacterium radiobacter*, ο οποίος, εκτός της D-εκλεκτικής υδαντοΐνάσης, περιέχει το ένζυμο αμιδοϋδρολάση της N-καρβαμούλο-υδροξυ-D-φαινυλογλυκίνης, το οποίο και καταλύει την τελευταία αντίδραση του Σχήματος 15 [2,18].



ΣΧΗΜΑ 15

Στάδια ενζυμικής παρασκευής 4-υδροξυ-D-φαιnyλογλυκίνης

### 2.1.2. Ενζυμική παρασκευή αμινοξέων

Σημαντικές εφαρμογές αποτελούν οι περιπτώσεις των αμινοξέων L-Asp και L-Ala. Το L-Asp χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα και σε τροφές, όπως και η L-Ala, καθώς και στην σύνθεση του γλυκαντικού διπεπτιδίου *ασπαρτάμη*. Για την βιοτεχνολογική παρασκευή του L-Asp (Σχήμα

15α) χρησιμοποιούνται ως βιοκαταλύτης ολόκληρα κύτταρα *Escherichia coli* με δραστικότητα αμμωνιολυάσης του L-Asp [2,18].

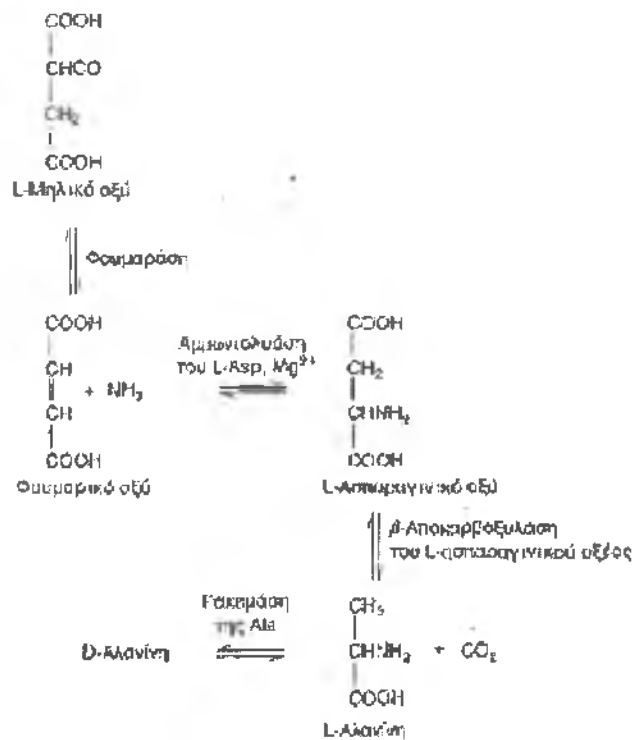
Τα κύτταρα ακινητοποιούνται στον φυσικό πολυσακχαρίτη κ-καρραγενάνη (κ-carrageenan) με τεχνική εγκλωβισμού, ακολούθως δε σταθεροποιούνται στο πολυμερές μέσω ομοιοπολικών (χημικών) δεσμών με παρουσία γλουταρικής αλδεΐδης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται φουμαρικό αμμώνιο, το οποίο, με παρουσία  $Mg^{2+}$  (ενεργοποιητή του ενζύμου), μετατρέπεται σε L-Asp. Εναλλακτικά, είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί απομονωμένο ένζυμο και ακινητοποιημένο στον ίδιο πολυμερή φορέα (απόδοση 95%, pH 8,5, 37°C,  $t_{1/2}$  βιοκαταλύτη 4 μήνες).

Η ανωτέρω μέθοδος παραγωγής L-Asp θεωρείται, συνολικά, κατά 60% οικονομικότερη από εκείνες που προβλέπουν παραγωγή αμινοξέος με ελεύθερο ένζυμο και από καλλιέργεια κυττάρων και τούτο λόγω ακριβώς της χρησιμοποίησης ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη.

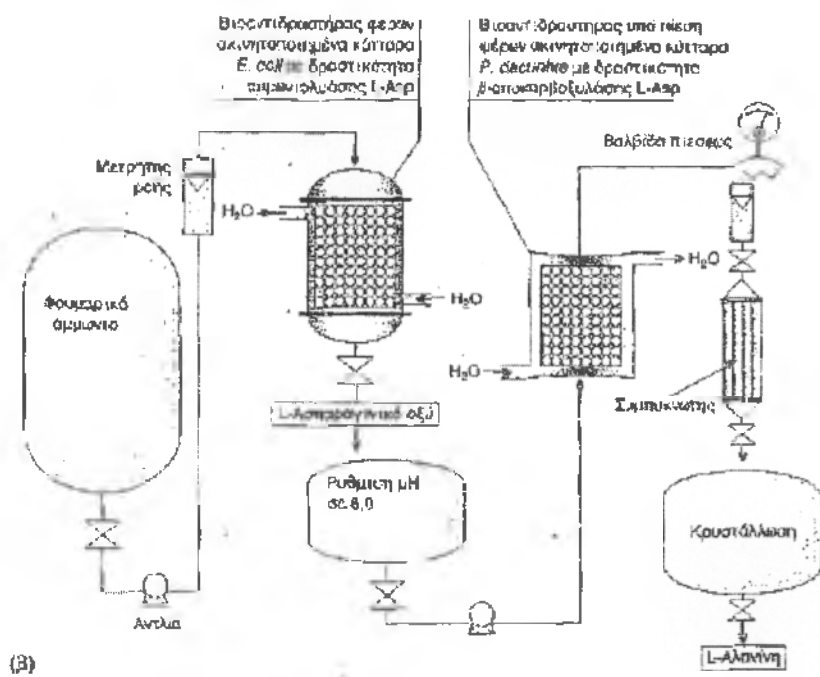
Οι αρχές της ανωτέρω μεθόδου εφαρμόζονται και στην παραγωγή L-Ala από L-Asp, το οποίο λαμβάνεται από φουμαρικό οξύ (Σχήμα 16α), διεργασία η οποία προβλέπει την χρησιμοποίηση δύο βιοαντιδραστήρων στήλης συνδεδεμένων εν σειρά (Σχήμα 16β) [2,18].

Ο πρώτος φέρει ακινητοποιημένα κύτταρα *E. coli* με δραστικότητα αμμωνιολυάσης του L-Asp, τα οποία μετατρέπουν το φουμαρικό οξύ σε ασπαραγινικό ως ανωτέρω (pH λειτουργίας 8,5). Ακολούθως, το pH του διαλύματος L-Asp το οποίο λαμβάνεται από τον πρώτο βιοαντιδραστήρα ρυθμίζεται στο 6,0, προ της εισαγωγής του διαλύματος στον δεύτερο βιοαντιδραστήρα. Αυτός φέρει ακινητοποιημένα κύτταρα *Pseudomonas dacunhoe*, με δραστικότητα β-αποκαρβοξυλάσης του L-ασπαραγινικού οξέος (L-aspartate- β-decarboxylase), οπότε το L-Asp μετατρέπεται στο προϊόν L-Ala και  $CO_2$ .

Η στήλη λειτουργεί υπό πίεση, ώστε το παραγόμενο αέριο να παραμένει σε διάλυμα στην υγρή φάση και να μην παρεμποδίζει την ομαλή ροή των συστατικών στον βιοαντιδραστήρα [2,18].



(α)



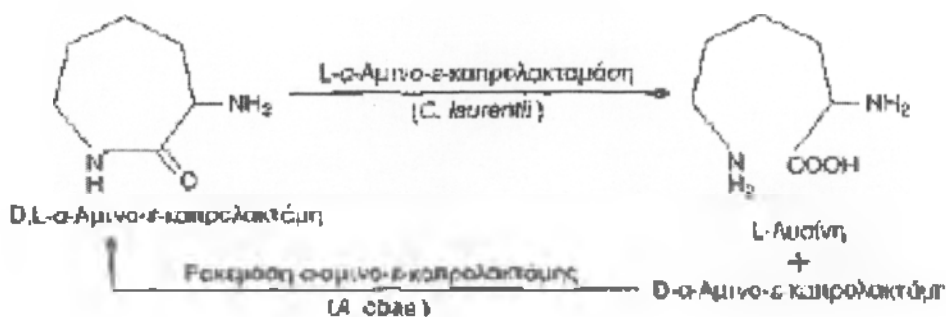
ΣΧΗΜΑ 16. Βιοκαταλυτική παρασκευή των αμινοξέων L-ασπαραγινικού οξέος και L-αλανίνης. (α) Αντιδράσεις (β) Διάγραμμα ροής διεργασιών

Παράλληλα με τις δύο ανωτέρω κύριες αντιδράσεις, συντελούνται και δύο ανεπιθύμητες αντιδράσεις σχηματισμού παραπροϊόντων, ως αποτέλεσμα της πα- ρουσίας και της δράσης δύο ενζύμων στο εσωτερικό των κυττάρων. Συγκεκριμένα, στον πρώτο βιοαντιδραστήρα το ένζυμο *φουμαράση* αναλώνει μέρος του αρχικού υποστρώματος προς L-μηλικό οξύ, ενώ στον δεύτερο βιοαντιδραστήρα το ένζυμο *ρακεμάση της αλανίνης* μετατρέπει το τελικό προϊόν L-Ala σε D-Ala [2,18].

Απαλλαγή των μεθόδων παραγωγής L-ασπαραγινικού οξέος και L-αλανίνης από τα δύο ανωτέρω παραπροϊόντα επιτυγχάνεται μετά από έκθεση των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών, πριν από την χρησιμοποίηση τους στις ανωτέρω διεργασίες, σε κατάλληλες συνθήκες pH και θερμοκρασίας, ώστε να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα *φουμαράση* και *ρακεμάση της αλανίνης* (pH 5,0, 45°C, 1 h και pH 4,7, 30°C, 1 h, αντίστοιχα).

Η L-Lys αποτελεί σημαντικό φυσικό αμινοξύ και χρησιμοποιείται σαν πρόσθετο σε τροφές. Εκτός από την δυνατότητα παραγωγής της μέσω μικροβιακών καλλιεργειών, είναι δυνατόν να παραχθεί από την συνθετική ένωση D,L-α-αμινο-ε-καπρολακτάμη, έπειτα από εκλεκτική υδρόλυση της τελευταίας προς μίγμα D-α-αμινο-ε-καπρολακτάμης και L-λυσίνης, με παρουσία ακινητοποιημένων κυττάρων *Cryptococcus lawentii* με δραστικότητα L-α-αμινο-ε-καπρολακταμάσης (Σχήμα 17) [2,18].

Ρακεμοποίηση του D-ισομερούς, ώστε να αυξηθεί η απόδοση της κύριας αντίδρασης, επιτυγχάνεται όταν στο σύστημα συνδυασθούν και ακινητοποιημένα κύτταρα *Achromobacter obae* με δραστικότητα ρακεμάσης α-αμινο-ε-καπρολακτάμης. Σημειώνεται ότι και τα δύο ένζυμα απαιτούν το ίδιο pH, οπότε είναι εφικτό να συνυπάρχουν στον βιοαντιδραστήρα.



ΣΧΗΜΑ 17

Ενζυμική παρασκευή L-λυσίνης.

## 2.2 ΤΑ ΕΝΖΥΜΑ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΑΚΧΑΡΩΝ

Σε αντίθεση με τις χημικές μεθόδους συνθέσεως, η χρησιμοποίηση ενζύμων ως καταλυτών για τη σύνθεση ολιγοσακχαριτών και παραγώγων τους εξασφαλίζει εκλεκτικότητα ως προς την θέση και την στερεοδιάταξη των υποστρωμάτων κατά την αντίδραση [2,18,19].

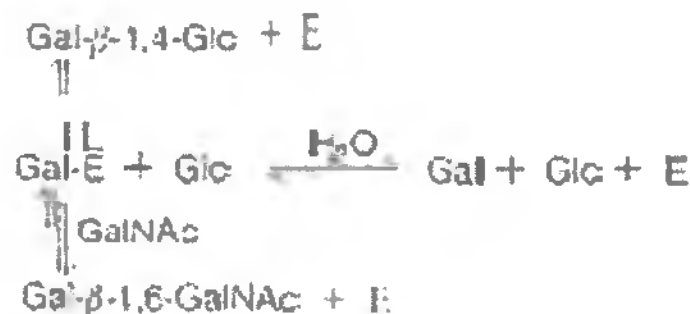
Οι γλυκοζιτάσες (glycosidases) και οι γλυκοζυλομεταφοράσες (glycosyltransferases) αποτελούν σημαντικές οικογένειες ενζύμων για τον σκοπό αυτό.

Οι γλυκοζιτάσες καταλύουν την αντιστρέψιμη υδρόλυση γλυκοζιτικών δεσμών, καθώς και την ανταλλαγή τελικού σακχάρου με άλλο, μέσω αντιδράσεως μεταγλυκοζυλιώσεως. Οι γλυκοζυλομεταφοράσες καταλύουν την μεταφορά σακχάρου από κάποιο μόριο-δότη (συνήθως διφωσφορουνουκλεοζιτικό σάκχαρο) προς κάποιο μόριο-δέκτη.

β-Γαλακτοζιτάση, ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια αγαρόζης μέσω ομοιοπολικού δεσμού (τεχνική ενεργοποίησης με τρεσυλο-χλωρίδιο), καταλύει την σύνθεση του δισακχαρίτη γαλακτοζυλο-N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, Gal-β-1,6-GalNAc, μέσω αντιδράσεως μεταγαλακτοζυλιώσεως, με χρησιμοποίηση ως υποστρωμάτων της N-ακετυλογαλακτοζαμίνης και του δισακχαρίτη λακτόζη, Gal-β-1,4-Glc (Σχήμα 18).

Αρχικά, σχηματίζεται ως ενδιάμεσο το ενζυμικό παράγωγο γαλακτοζυλο-γαλακτοζιτάση, ενώ ελευθερώνεται και γλυκόζη. Ακολούθως, το σάκχαρο του ενδιάμεσου Gal-E δίδεται στο υπόστρωμα N-

ακετυλογαλακτοζαμίνη, σχηματίζοντας τον δισακχαρίτη γαλακτοζυλο-N-ακετυλογαλακτοζαμίνη μέσω αντιδράσεως μεταγαλακτοζυλιώσεως. Σε κατάσταση ισορροπίας, η αντίδραση ευνοεί την υδρόλυση του ενδιάμεσου Gal-E προς γαλακτόζη· ωστόσο, επειδή η αντίδραση μεταγαλακτοζυλιώσεως είναι ταχεία, επιτυγχάνεται απόδοση σε δισακχαρίτη περίπου 25%. Για να επιτευχθεί αντιστροφή της υδρολυτικής αντίδρασης θα πρέπει ο διαλύτης να αντικατασταθεί μερικώς από οργανικό σύστημα [2,18,19].



ΣΧΗΜΑ 18

β-Γαλακτοζιτάση, ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια αγαρόζης μέσω ομοιοπολικού δεσμού καταλύει την σύνθεση του δισακχαρίτη γαλακτοζυλο-N-ακετυλογαλακτοζαμίνη, Gal-β-1,6-GalNAc, μέσω αντιδράσεως μεταγαλακτοζυλιώσεως.

### 3 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

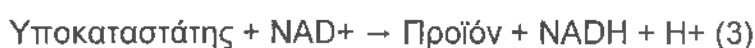
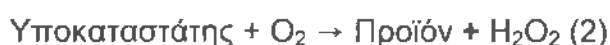
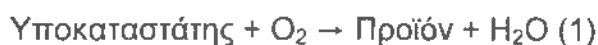
Σύμφωνα με ένα γενικά αποδεκτό ορισμό, "**Βιοαισθητήρας** ονομάζεται το σύστημα δύο μεταλλακτών, ενός χημικού και ενός φυσικού, οι οποίοι βρίσκονται σε επαφή και μετατρέπουν τη συγκέντρωση του αναλύτη σε μετρούμενο σήμα" [41-45]. Ο χημικός μεταλλάκτης μπορεί να είναι ένζυμο, αντιγόνο/αντίσωμα, λιπόσωμα, βακτήριο, μύκητας ή ολόκληρος ιστός. Ο φυσικός μεταλλάκτης συνήθως είναι ηλεκτρόδιο στερεάς κατάστασης (λευκόχρυσος, υαλώδης άνθρακας, γραφίτης), ηλεκτρόδιο O<sub>2</sub>, εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων, ηλεκτρόδια αερίων, οπτικές ίνες, πιεζοηλεκτρικοί κρύσταλλοι ή θερμίστορες. Στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες ο μεταλλάκτης του συστήματος είναι ένα ηλεκτρόδιο το οποίο υπό μια σταθερά εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού μετρά το ρεύμα, που παράγεται κατά τη



διάρκεια μίας οξειδοαναγωγικής αντίδρασης. Για τον ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη έχουν χρησιμοποιηθεί ηλεκτρόδια  $O_2$ , διάφοροι τύποι ηλεκτροδίων μετάλλων, άνθρακα, οξειδίων μετάλλων, ηλεκτρόδια αγώγιμων αλάτων ενώ συνεχώς κερδίζουν έδαφος τα “εκτυπωμένα ηλεκτρόδια” (screen printed electrodes).

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε ένζυμα, τα οποία χρησιμοποιούν οξυγόνο (οξειδάσες, υδρολάσες), παράγουν  $H_2O_2$  (οξειδάσες),  $NAD^+$  ή  $NADP^+$  (δεϋδρογονάσες), κατά την (εξειδικευμένη) δράση τους πάνω στον κατάλληλο υποκαταστάτη. Δυστυχώς, η υψηλή εκλεκτικότητα των ενζύμων συνήθως περιορίζεται από αυτήν του μεταλλάκτη [43-44].

Ο γενικός τύπος των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στους περισσότερους βιοαισθητήρες είναι:



Στις παραπάνω αντιδράσεις η μεταβολή της συγκέντρωσης των ηλεκτρενεργών στοιχείων (έντονη γραφή) μπορεί να γίνει αμπερομετρικά σε κάποια σταθερά εφαρμοζόμενη τάση. Στο δυναμικό αυτό μπορούν να οξειδωθούν και άλλα στοιχεία εκτός από το μετρούμενο, συνεισφέροντας θετικά στο σφάλμα των αναλύσεων. Οι πιο σημαντικές παρεμποδίζουσες ουσίες στην αμπερομετρία είναι το ασκορβικό, και το ουρικό οξύ τα οποία οξειδώνονται στο συμβατικό δυναμικό οξειδωσης (+0,65 V) του  $H_2O_2$  και του  $NADH$  [43-44].

### 3.1. Διαμεσολαβητές μεταφοράς φορτίου (Mediators)

Το δυναμικό οξειδωσης των παραπάνω ουσιών μπορεί να μειωθεί με τη χρησιμοποίηση ηλεκτρενεργών ουσιών, που είναι γνωστές ως Mediators (διαμεσολαβητές μεταφοράς φορτίου). Οι mediators είναι οξειδοαναγωγικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους και χρησιμοποιούνται σε διαλυτή ή ακινητοποιημένη μορφή

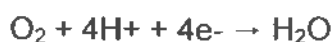




Όπως φαίνεται από τις παραπάνω αντιδράσεις, αντί των NADH και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οξειδώνεται ή ανάγεται η αντίστοιχη μορφή του mediator, της οποίας το δυναμικόοξειδοαναγωγής είναι σαφώς μικρότερο. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί μείωση του δυναμικού της ηλεκτροχημικής αντίδρασης από 200-600 mV, περιορίζοντας την παρεμποδιστική δράση ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών [46-47].

### 3.2. Ηλεκτρόδιο (βιοαισθητήρας) Οξυγόνου

Το ηλεκτρόδιο τύπου Clark είναι η πρώτη μορφή χημικού βιοαισθητήρα. Το οξυγόνο μετρείται ηλεκτροχημικά με ηλεκτρόδιο λευκόχρυσου (κάθοδος) ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl (άνοδος), σε (ημι)κορεσμένο διάλυμα KCl. Ο ηλεκτρολύτης βρίσκεται σε επαφή με το εξεταζόμενο διάλυμα μέσω πολυμερικής μεμβράνης μικρού πορώδους (Teflon, πολυαιθυλενίου) από την οποία μπορούν να διέλθουν μόνο τα μόρια του O<sub>2</sub>, μηδενίζοντας την παρεμποδιστική δράση διαφόρων ηλεκτροχημικών ουσιών. Στα ηλεκτρόδια εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 0,6-0,9 V, ικανή να προκαλέσει την καθοδική αναγωγή του O<sub>2</sub>, προς H<sub>2</sub>O, βάση της αντίδρασης



Στην κλασική μορφή του αισθητήρα οξυγόνου η μεμβράνη οξυγόνου συνδυάζεται με μια ενζυμική (πολυμερική μεμβράνη πάνω στην οποία έχει ακινητοποιηθεί το ένζυμο) και μια τρίτη μεμβράνη, η οποία προστατεύει την ενζυμική από μικροβιακή μόλυνση και αποτρέπει την διαρροή (leaking) του ενζύμου. Σημαντικό πρόβλημα στη χρήση ηλεκτροδίων είναι η επαναπρόσληψη οξυγόνου από την ατμόσφαιρα κατά τη διάρκεια της μέτρησης [43-44].

Το πρόβλημα αυτό είναι λιγότερο έντονο στην περίπτωση συστημάτων συνεχούς ροής, ενώ για την αντιμετώπιση του σε στατικά (batch) πειράματα έχουν προταθεί διάφορες λύσεις, όπως η συνεχής παροχή αέρα και η παραγωγή του σήματος. Κατά την παραγωγή του σήματος (εύρεση 1ης παραγώγου) το σημείο μέγιστης κλίσης στην καμπύλη εξαφάνισης του O<sub>2</sub>

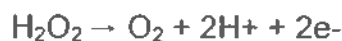
εμφανίζεται ως κορυφή, το ύψος της οποίας είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση του μετρούμενου αναλύτη.

Το ηλεκτρόδιο  $O_2$  έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την κατασκευή μικροβιακών βιοαισθητήρων (microbial biosensors), όπου στην ενζυμική μεμβράνη αντί του ενζύμου ακινητοποιείται ένας μικροοργανισμός. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο βιοαισθητήρας BOD (Biochemical Oxygen Demand), ο οποίος είναι εμπορικά διαθέσιμος στην Ιαπωνία και βασίζεται στην ακινητοποίηση του οργανισμού *Trichosporon cutaneum*, που χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία για την επεξεργασία των βιομηχανικών αποβλήτων [43-447].

Βιοαισθητήρες οξειγόνου έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού αναλυτών, όπως γλυκόζη, σαλικυλικό οξύ, θειώδη, αμινοξέα κ.α., ενώ διατίθενται στο εμπόριο από διάφορους οίκους, όπως Universal Sensors (USA) και Yellow Springs International (USA).

### 3.3. Ηλεκτρόδιο (βιοαισθητήρας) $H_2O_2$

Οι βιοαισθητήρες αυτού του τύπου στηρίζονται στην ηλεκτροχημική οξειδωση του  $H_2O_2$ , που παράγεται και την ενζυμική δράση των οξειδασών (εξ.2). Η εξίσωση που περιγράφει την ηλεκτροχημική οξειδωση του  $H_2O_2$  είναι:



Η ανοδική οξειδωση του  $H_2O_2$  πραγματοποιείται στην επιφάνεια διαφόρων στερεών ηλεκτροδίων (Pt, υαλώδους άνθρακα κ.τ.λ) με την εφαρμογή δυναμικού ίσου με 0,65 V ως προς ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl. Το  $H_2O_2$  μπορεί επίσης να αναχθεί ηλεκτροχημικά, αλλά σε αυτήν την περίπτωση η μέτρηση παρεμποδίζεται από την ταυτόχρονη αναγωγή του οξειγόνου. Σε περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται mediator, η αναγωγή του  $H_2O_2$  πραγματοποιείται σε χαμηλές τιμές δυναμικού παρουσία του ενζύμου υπεροξειδάση (PO), όπου δεν γίνεται η αναγωγή του οξειγόνου. Η εξίσωση που περιγράφει την ηλεκτροχημική αναγωγή του  $H_2O_2$  (παρουσία mediator) είναι :

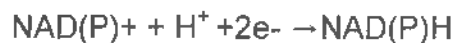


Σε όλες τις περιπτώσεις το παραγόμενο ρεύμα είναι κατ' ευθείαν ανάλογο της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας. Οι βιοαισθητήρες  $H_2O_2$  είναι η πιο διαδεδομένη μορφή βιοαισθητήρων και μέχρι τώρα έχει δημοσιευθεί ένας μεγάλος αριθμός εργασιών για τον προσδιορισμό αναλυτών όπως γλυκόζη, χοληστερόλη, αμινοξέα, αιθανόλη. Διατίθενται στο εμπόριο από διάφορους οίκους όπως και Yellow Springs International (USA), Ependorf (Germany), Fuji Electric (Japan), Tacussel (France), Radelkis (Hungary), La Roche (Switzerland), ExAn (πρώην Σοβιετική Ένωση) [46-47].

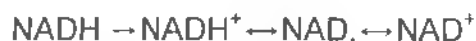
### 3.4. Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός NADH (βιοαισθητήρες δεϋδρογονασών)

Η μεγαλύτερη ομάδα των μέχρι τώρα γνωστών οξειδοαναγωγικών ενζύμων, είναι οι δεϋδρογονάσες, των οποίων η ενζυμική δράση απαιτεί το συνένζυμο  $NAD^+$  (περίπου 250 ένζυμα) ή  $NADP^+$  (περίπου 150 ένζυμα).

Κατά την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταφέρονται συνολικά δύο ηλεκτρόνια και ένα πρωτόνιο και μπορεί να περιγραφεί με το γενικό σχήμα



Ο μηχανισμός της οξείδωσης του  $NADH$  δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αν δηλαδή η μεταφορά των δύο ηλεκτρονίων γίνεται σε ένα ή σε δύο στάδια, όπου στο καθένα μεταφέρεται ένα ηλεκτρόνιο. Διαγνωστικά πειράματα σε ένα ευρύ διάστημα συγκεντρώσεων έδειξαν, ότι ο μηχανισμός δύο σταδίων είναι πιο πιθανός σε υψηλές συγκεντρώσεις  $NADH$ , ενώ σε πιο υψηλές συγκεντρώσεις, είναι πιθανή μια δευτέρας τάξεως χημική αντίδραση εξαρτώμενης από το pH και γι' αυτό προτάθηκε το ακόλουθο σχήμα το οποίο περιλαμβάνει και τον σχηματισμό ενδιάμεσων ελευθέρων ριζών [43-44].



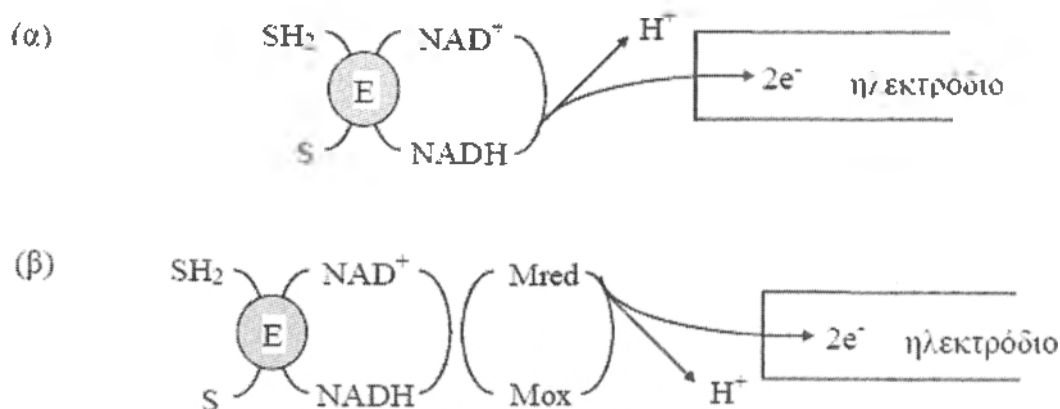
Οι πλευρικές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών είναι λιγότερο πιθανές σε μικρές συγκεντρώσεις  $NADH$ , όπου επίσης παρατηρείται ποσοτική ανάκτηση του ενζυματικά ενεργού  $NAD^+$ .

Κατά τον αμπερομετρικό προσδιορισμό του  $NADH$  πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις προκειμένου να αποφευχθούν ή να περιοριστούν φαινόμενα παλαιώσης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, τα οποία παρατηρούνται κατά την παρατεταμένη χρήση και είναι

πιο έντονα, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του NADH. Η παλαίωση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου έχει ως αποτέλεσμα τη μη ποσοτική ανάκτηση του NAD<sup>+</sup> (σταδιακή μείωση του παραγόμενου ρεύματος) και την μείωση του χρόνου ζωής του ηλεκτροδίου εργασίας. Παρατηρείται για συγκεντρώσεις NADH μεγαλύτερες από 0,5 mM. Τα φαινόμενα παλαίωσης εξαρτώνται από το υλικό και την κατάσταση του ηλεκτροδίου και αυξάνουν κατά την αύξηση της συγκέντρωσης του μετρούμενου μορίου και του δυναμικού εργασίας [43-44].

Ένας τρόπος για να αυξηθεί η ταχύτητα μεταφοράς των ηλεκτρονίων και να μειωθεί το υπερδυναμικό που απαιτείται (600-1100 mV) για την οξείδωση του NADH είναι η χρησιμοποίηση mediator σε διαλυτή ή ακινητοποιημένη μορφή. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο mediator πρέπει να αντιδρά γρήγορα με το NADH και να οξειδώνεται ηλεκτροχημικά σε τιμές δυναμικού σαφώς μικρότερες από αυτές που απαιτούνται για την άμεση οξείδωση του NADH.

Ο άμεσος (α) και ο έμμεσος (β) προσδιορισμός του NADH περιγράφεται με το ακόλουθο σχήμα, όπου S το υπόστρωμα [43-44].



### 3.5. Προβλήματα κατά τη χρήση αμπερομετρικών βιοαισθητήρων

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η υψηλή εκλεκτικότητα των ενζύμων σε ένα βιοαισθητήρα περιορίζεται τις περισσότερες φορές από την εκλεκτικότητα του ηλεκτροδίου. Ουσίες όπως το ασκορβικό και το ουρικό οξύ οξειδώνονται

στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων συνεισφέροντας θετικά στο μετρούμενο σήμα.

Σημαντικό επίσης πρόβλημα είναι η παλαίωση της επιφάνειας των ηλεκτροδίων που προκαλείται κατά την προσρόφηση διαφόρων ουσιών στην επιφάνεια τους. Από τις ηλεκτρενεργές ουσίες το πιο σημαντικό πρόβλημα παρουσιάζεται από το NADH, τις κινόνες και γενικά τους περισσότερους από τους δυσδιάλυτους οργανικούς mediators. Παλαίωση της επιφάνειας των ηλεκτροδίων μπορεί να προκληθεί επίσης και από ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι πρωτεΐνες, μειώνοντας την απόκριση του ηλεκτροδίου με το χρόνο. Το πρόβλημα αυτό είναι έντονο σε δείγματα όπως ο ορός αίματος [43-44].

Η έκταση των παραπάνω προβλημάτων είναι συνάρτηση της αραίωσης που υφίσταται το δείγμα και της ίδιας της φύσης του δείγματος. Τα ηλεκτρόδια μπορούν να προφυλαχθούν με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανόμενων χημικών μεθόδων απομάκρυνσης των παρεμποδιζόντων ή με την χρήση πολυμερικών μεμβρανών, οι οποίες λειτουργούν ως μοριακά φράγματα (φίλτρα). Οι παρεμποδίζουσες ουσίες πολλές φορές αντιμετωπίζονται με την χρήση κατάλληλων ενζύμων σε συνδυασμό με τα ένζυμα που απαιτούνται για την ανίχνευση του αναλύτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η ασκορβική οξειδάση η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για την καταστροφή του ασκορβικού οξέος.

Στις οξειδάσες ευνοείται η χρήση πολυμερικών μεμβρανών, διότι το μετρούμενο μόριο ( $O_2, H_2O_2$ ) έχει μικρό μοριακό βάρος (μικρό όγκο) και μπορεί να διαχέεται ικανοποιητικά μέσα από αυτές, σε αντίθεση με τα παρεμποδίζοντα ή ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους (size exclusion). Εναλλακτικά με τα μοριακά φράγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν αρνητικά φορτισμένες μεμβράνες (Nafion) οι οποίες απωθούν από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου τα ανιόντα των αντίστοιχων οξέων. Στην περίπτωση αυτή το μετρούμενο μόριο πρέπει να είναι ηλεκτρικά ουδέτερο, π.χ. γλυκόζη [43-44].

Στους βιοαισθητήρες δευδρογονασών η χρήση μοριακών φραγμάτων δεν ενδείκνυται διότι το μετρούμενο μόριο (NADH ή ανηγμένη μορφή ενός mediator) έχει μοριακό βάρος μεγαλύτερο από αυτό των παρεμποδίζουσών ουσιών.

## **B. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

### **1.1 ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**

Οι οργανισμοί, οι οποίοι χρησιμοποιούνται στη Βιοτεχνολογία, ανήκουν σε 5 είδη : τα πρωτόζωα, τα φύκη, τους μύκητες, τα βακτήρια, και τις ζύμες [1,2].

#### Περιγραφή και ταξινόμηση των μικροοργανισμών

Όπως όλοι οι ζωντανοί οργανισμοί, έτσι και οι μικροοργανισμοί, με εξαίρεση τους ιούς, έχουν κυτταρική οργάνωση. Το κύτταρο αποτελείται από πρωτόπλασμα, το οποίο περιβάλλεται από την κυτταρική μεμβράνη και, με εξαίρεση κυρίως τα πρωτόζωα, από κυτταρικό τοίχωμα. Υπάρχουν δύο τύποι κυττάρων :

α) Τα προκαρυωτικά (κάρυο = πυρήνας), τα οποία δεν έχουν οργανωμένο πυρήνα με πυρηνική μεμβράνη, που να περιβάλλει τα χρωμοσώματα, αλλά το γενετικό υλικό είναι ένα κυκλικό μόριο DNA, ελεύθερο μέσα στο πρωτόπλασμα. Τέτοια είναι τα κύτταρα των βακτηρίων, τα οποία και θεωρούνται αρχέγονα (στερούνται επί πλέον και μιτοχονδρίων) [1,2].

β) Τα ευκαρυωτικά, τα οποία έχουν πυρήνα περιβαλλόμενο από πυρηνική μεμβράνη, μέσα στον οποίο, περικλείονται τα χρωμοσώματα (υπάρχουν επίσης μιτοχόνδρια και στα φωτοσυνθέτοντα, χλωροπλάστες). Τέτοια είναι τα κύτταρα των υπόλοιπων μικροοργανισμών, καθώς και των ανώτερων οργανισμών. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι. Στους πολυκύτταρους, ποτέ δε συναντιέται η απόλυτη εξειδίκευση των κυττάρων, η οποία παρατηρείται στα ανώτερα φυτά και ζώα. Κάθε κύτταρο διατηρεί την ικανότητα να επιτελεί όλες τις λειτουργίες, που απαιτούνται για να ζεί, ακόμη και αυτή της αναπαραγωγής ολόκληρου του οργανισμού. Σε μερικές περιπτώσεις, πολυκύτταρα φύκη και μύκητες (π.χ. ορισμένα θαλάσσια φύκη ή τα μανιτάρια), σε κάποια τουλάχιστον φάση του βιολογικού τους κύκλου, αποκτούν μακροσκοπικές διαστάσεις και φαίνονται να έχουν οργάνωση, ανάλογη με αυτή των ανώτερων φυτών από ιστούς. Επειδή όμως τα κύτταρα δεν διαφοροποιούνται ιδιαίτερα μορφολογικά και διατηρούν την αυτονομία τους και όλες τις λειτουργίες τους, δεν θεωρείται ότι σχηματίζονται πραγματικοί ιστοί, αλλά ψευδοίστοι. Τελικά στους

πολυκύτταρους μικροοργανισμούς, η απλότητα της οργάνωσης και η πλήρης λειτουργικότητα των κυττάρων, παρά το μέγεθος [1,2].

### Τα πρωτόζωα

Ως πρωτόζωα χαρακτηρίζονται συνήθως πρώτιστα μονοκύτταρα, ευκαρυωτικά, χωρίς κυτταρικό τοίχωμα, με αυτόνομη κίνηση. Μερικά, όπως οι αμοιβάδες, δεν έχουν συγκεκριμένο σχήμα και μέγεθος. Τα διάφορα είδη παρουσιάζουν τεράστια ποικιλία μεγέθους : από λίγα μm μέχρι 200 μm, ενώ υπάρχουν και μερικά μακροσκοπικά (αν και μονοκύτταρα). Το πρωτοζωϊκό κύτταρο περιβάλλεται από μία μεμβράνη, τον περιπλάστη, ο οποίος είναι λεπτός και ευλύγιστος στις αμοιβάδες, αλλά πιο χοντρός και άκαμπτος στα άλλα πρωτόζωα, όπου παίζει ρόλο αντίστοιχο με το κυτταρικό τοίχωμα. Η κίνηση εξασφαλίζεται με ψευδοπόδια (αμοιβάδες), με βλεφαρίδες και μαστίγια (στα υπόλοιπα). Αξιοσημείωτο είναι ότι μερικά είδη έχουν δύο, διαφορετικού τύπου, πυρήνες.

Τα περισσότερα είναι ετερότροφα και έχουν δύο τρόπους θρέψης : ο ολοζωϊκός, όπου τεμάχια τροφής, ακόμη και ολόκληρα κύτταρα π.χ. βακτηρίων, εγκολπώνονται και αφομοιώνονται (φαγοκύτωση) και ο σαπρωζωϊκός, κατά τον οποίο εισέρχονται στο κύτταρο απλές οργανικές ενώσεις [1,2].

### Τα φύκη

Είναι ένα άθροισμα με μεγάλη ποικιλομορφία, όπου περιλαμβάνονται είδη ευκαρυωτικά, με κυτταρικό τοίχωμα, από μονοκύτταρα μέχρι πολλών δεκάδων μέτρων. Ζουν στα νερά ή σε άλλα περιβάλλοντα (έδαφος, επιφάνειες φυτών, βράχων κλπ, όταν εξασφαλίζεται η απαιτούμενη υγρασία). Είναι φωτοσυνθέτοντα (οι κύριοι παραγωγείς οξυγόνου στο πλανήτη) και συνεπώς φωτοαυτότροφα, αλλά μερικά είδη μπορούν, απουσία φωτός, να ζουν και ως ετερότροφα.

Από άποψη δομής και οργάνωσης, τα φύκη παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία : μονοκύτταρα, διαθέτοντα αυτόνομη κίνηση (με τη βοήθεια μαστιγίων) ή όχι, νηματόμορφα, αποικιομόρφα (συνάθροιση κυττάρων σε ζελατινώδη μάζα), κοινοβιακά (κύτταρα στενά συνδεδεμένα), πολυκύτταρα με σύνθετη οργάνωση [1,2].



### Οι μύκητες

Είναι ευκαρυωτικοί, μη φωτοσυνθέτοντες μικροοργανισμοί, των οποίων τα κύτταρα περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα (με εξαίρεση την ομάδα των μυξομυκήτων) και οι οποίοι αναπαράγονται με ειδικές αναπαραγωγικές μονάδες, τα σπόρια, τα οποία σχηματίζονται στις καρποφορίες τους.

Οι μύκητες, με βάση τη μορφολογία του σώματός τους, διακρίνονται σε μονοκύτταρους (τις γνωστές ζύμες), και σε μυκηλιακούς. Οι ζύμες έχουν σχήμα σφαιρικό, ελλειψοειδές, λεμονοειδές, κυλινδρικό και πολλαπλασιάζονται με διχοτόμηση, με εκβλάστηση και με σπόρια. Το σώμα των μυκηλιακών μυκήτων ονομάζεται μυκήλιο και αποτελείται από ένα δίκτυο διακλαδιζόμενων νηματιδίων μικροσκοπικής διαμέτρου, αλλά μεγάλου μήκους, τις υφές, οι οποίες αυξάνονται επάκρια. Υπάρχουν δύο τύπων υφές : οι πολυκύτταρες υφές, οι οποίες φέρουν, κατά διαστήματα, εγκάρσια διαφράγματα και οι κοινοκύτταρες υφές, οι οποίες στερούνται εγκαρσίων διαφραγμάτων. Στη πραγματικότητα, οι πολυκύτταρες υφές δεν χωρίζονται σε ανεξάρτητα κύτταρα, γιατί τα διαφράγματα έχουν μικροσκοπικά ανοίγματα μέσα από τα οποία επικοινωνεί το πρωτόπλασμα και μεταναστεύουν οργανίδια και πυρήνες. Ορισμένοι μύκητες με πολυκύτταρες υφές σχηματίζουν, με πολύ πυκνή συνύφανση, ψευδοϊστούς και από αυτούς, όργανα μακροσκοπικών διαστάσεων (όπως τα μανιτάρια) [1,2].

### Τα βακτήρια

Είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί με κυτταρικό τοίχωμα, φωτοσυνθέτοντες (τα κυανοβακτήρια) ή μη (τα υπόλοιπα βακτήρια). Είναι μονοκύτταρα, με εξαίρεση την ομάδα των ακτινομυκήτων, οι οποίοι σχηματίζουν υφές παρόμοιες με εκείνες των μυκήτων, αλλά προκαρυωτικές φυσικά και πολύ μικρότερης διαμέτρου. Τα μονοκύτταρα βακτήρια πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Μερικά είδη περιβάλλονται από ένα στρώμα πολυσακχαριδίων, το έλυτρο.

Διακρίνονται τρεις βασικοί τύποι βακτηρίων: οι κόκκοι (σφαιρικού σχήματος), οι βάκιλλοι (ραβδοειδή βακτήρια), και τα σπειρίλλια (ελικοειδούς μορφής). Οι κόκκοι και οι βάκιλλοι μπορούν να διαιρούνται προς ένα ή περισσότερα επίπεδα και τα σχηματιζόμενα κύτταρα, μη αποχωριζόμενα, να

σχηματίζουν διάφορες διατάξεις (π.χ. στρεπτόκοκκοι και στρεπτοβάκιλλοι, σταφυλόκοκκοι, φακελόκοκκοι κ.ά.). Πολλά βακτήρια φέρουν μαστίγια ή / και βλεφαρίδες, με τη βοήθεια των οποίων, μπορούν να κολυμπούν μετακινούμενα σε υγρό μέσο. Μερικά είδη βακτηρίων έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν μέσα στα κύτταρά τους ενδοσπόρια. Τα ενδοσπόρια είναι μεταβολικά ανενεργές, αλλά εξαιρετικά ανθεκτικές μορφές, χάρη στις οποίες, τα είδη αυτά μπορούν να επιβιώνουν σε πολύ δυσμενείς συνθήκες (π.χ. έντονη ξηρασία ή πολύ ψηλές θερμοκρασίες) [1,2].

## 1.2. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ακίνητοποιημένα κύτταρα είναι κύτταρα μικροοργανισμών (προικαρυωτικοί οργανισμοί, ζύμες, μύκητες) που χρησιμοποιούνται σαν εναλλακτική λύση αντι για τα ακίνητοποιημένα ένζυμα που περιγράφηκαν παραπάνω, και έχουν παρόμοιες εφαρμογές μ'αυτά [47-58].

Αντίθετα όμως με ότι συμβαίνει στην ακίνητοποίηση ενζύμων, όπου το ένζυμο προσκολλάται σε ένα υπόστρωμα, στα συστήματα ακίνητοποιημένων κυττάρων, ακίνητοποιείται το κύτταρο-στόχος.

Τέτοιες μέθοδοι θα πρέπει να εφαρμόζονται όταν τα απαιτούμενα ένζυμα είναι δύσκολο ή κοστίζει πολύ να απομονωθούν, όπως π.χ. τα εσωκυτταρικά ένζυμα.

Επίσης, όταν απαιτείται μια σειρά από ένζυμα για την υλοποίηση μιας διαδικασίας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ακίνητοποίηση κυττάρων, οπότε η διαδικασία γίνεται ευκολότερα.

Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται συστήματα που υπάρχουν έτοιμα στο εμπόριο, αφού η απόκτηση των προϊόντων είναι απόλυτα δικαιολογημένη.

Οι εξελίξεις στη χρήση των τεχνικών ακίνητοποίησης των κυττάρων ζυμών ή άλλων μικροοργανισμών σε στερεά υποστρώματα προσφέρουν θαυμάσιες εναλλακτικές λύσεις στις παραδοσιακές μεθόδους ζύμωσης [47].

Η εφαρμογή των ακίνητοποιημένων κυττάρων ζύμης σε αντιδραστήρες με κλίση πληρωτικού υλικού για τη συνεχή βιομετατροπή

σακχάρων σε αιθανόλη, απέκτησε σημασία λόγω των πλεονεκτημάτων των συνεχών διαδικασιών έναντι των ασυνεχών [47-53].

Έχουν μελετηθεί αντιδραστήρες διαφόρων τύπων και τα αποτελέσματα των αποδόσεων και των παραγόντων που επηρεάζουν την αλκοολική ζύμωση έχουν ανακοινωθεί [47].

Ωστόσο, οι μελέτες πάνω σε ακινητοποιημένα κύτταρα μικροοργανισμών δεν είναι πολλές, συγκριτικά μ'αυτές των ακινητοποιημένων ενζύμων. Οι Tyagi και Ghose [50] και Gamarra [51] ανέπτυξαν κινητικά μοντέλα, που όμως βασίζονται σε διαδικασίες χωρίς την δράση των κυττάρων.

Οι Gupta και Chand [52], καθώς και οι Tyagi et al [53], έχουν μελετήσει την αλκοολική ζύμωση σε αντιδραστήρες συνεχούς λειτουργίας με στήλη πληρωτικού υλικού, χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένα κύτταρα του μικροοργανισμού *Saccharomyces cerevisiae*.

Οι εξελίξεις στον τομέα αυτό είναι καθημερινές, με αύξηση των αποδόσεων του προϊόντος σε ποσότητα, αλλά και βελτιστοποιήσεις στην ποιότητα [47-54].

### 1.3 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι διάφορες τεχνικές ακινητοποίησης κυττάρων, έχουν τα εξής πλεονεκτήματα [47-63]:

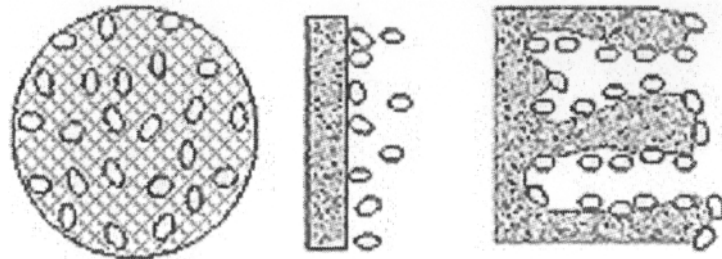
- Με την ακινητοποίηση αποφεύγεται η απώλεια βιομάζας
- Με την ακινητοποίηση επιτυγχάνεται η αύξηση της πυκνότητας βιομάζας στον αντιδραστήρα, με αποτέλεσμα την επιτάχυνση των αντιδράσεων
- Υπάρχει δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της βιομάζας
- Βελτιωμένη χρήση των ενζυμικών υποστρωμάτων
- Καλύτερος σχεδιασμός διαδικασίας
- Αποτελεσματικότερη προστασία των κυττάρων από ακραίες συνθήκες pH θερμοκρασίας και τοξικών μεταβολιτών των ζυμώσεων

#### Τεχνικές ακινητοποίησης :

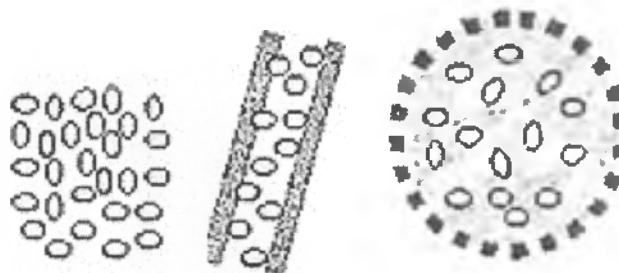
- Παγίδευση μέσα σε πορώδες πλέγμα

- Προσκόλληση ή προσρόφηση σε ειδικό φορέα
- Αυτό-συσσωμάτωση με κροκίδωση(φυσική) ή με παράγοντες διασταύρωσης(τεχνητή)
- Εγκαψυλλίωση

Σχηματικά, φαίνονται στο παρακάτω σχήμα 19 :



ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ-ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗ



ΑΥΤΟΣΥΣΣΩΜΑΤΩΣΗ ΕΓΚΑΨΥΛΛΙΩΣΗ

ΣΧΗΜΑ 19

Διάφορες τεχνικές ακινητοποίησης κυττάρων

### Παγίδευση

Τα κύτταρα είναι περιορισμένα μέσα σε ένα τριδιάστατο πλέγμα, αλλά κινούνται ελεύθερα μέσα στα τμήματα ή τους πόρους του υλικού. Τόσο το υπόστρωμα, όσο και τα προϊόντα διαχέονται προς και από τα κύτταρα.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την παγίδευση των κυττάρων είναι μήτρες μεμβρανών και διάφορα πολυμερή, όπως αλγινικά άλατα, κ-καρραγενάνη, άγαρ/αγαρόζη, κυτταρίνη, κολλαγόνο, πολυακρυλαμίδιο, αφρός πολυουρεθάνης [54].

Υπάρχουν περιορισμοί στις μεθόδους παγίδευσης. Αυτοί αφορούν το μοριακό μέγεθος του υποστρώματος και του προϊόντος, και την χωρητικότητα του πλέγματος [55].

Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να υπάρξει εκτεταμένος θάνατος κυττάρων με απώλεια βιομάζας, όπως π.χ. στην παγίδευση με ακρυλαμίδιο ή πολυουρεθάνη όπου θα πρέπει να ξεκινά με υπερθειικά ιόντα ή με υπεριώδες φώς [56].

### **Προσκόλληση ή προσρόφηση**

Η προσρόφηση είναι μια πολύ ήπια μέθοδος ακινητοποίησης και έτσι χρησιμοποιείται ευρέως. Μερικές από τις τεχνικές παγίδευσης απαιτούν και μια διαδικασία προσρόφησης.

Οι περιορισμοί στην προσρόφηση περιλαμβάνουν την αντιστρεπτή φύση της σύνδεσης κυττάρου – φορέα, π.χ. μπορεί να συμβεί εκρόφηση των κυττάρων από τον φορέα, λόγω αλλαγών στο pH του διαλύματος.

Όπως και στην παγίδευση, η χωρητικότητα του φορέα είναι περιορισμένη και σε περίπτωση υπερανάπτυξης των κυττάρων, έχουμε απώλεια βιομάζας προς το περιβάλλον του υλικού.

Το σημαντικότερο εδώ είναι η σταθερότητα σύνδεσης κυττάρου-φορέα. Αν αυτή είναι χαλαρή, τότε οι μικροοργανισμοί διαχέονται εύκολα από τον φορέα στο περιβάλλον [54].

### **Αυτοσυσσωμάτωση**

Μερικοί μικροοργανισμοί έχουν την τάση συσσωρευονται και να σχηματίζουν κροκίδες. Εδώ είναι σημαντική η παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (ΕΠΟ) από κάποιους μικροοργανισμούς, που διευκολύνει την αυτοσυσσωμάτωση, διότι έτσι δημιουργείται ένα μικροπεριβάλλον για τα κύτταρα που ελέγχεται ευκολότερα.

Η τεχνολογία σχηματισμού ομοιοπολικής σύνδεσης χρησιμοποιείται για την αυτοσυσσωμάτωση των κυττάρων [57].

Η αυτοσυσσωμάτωση και η διασταυρούμενη σύνδεση έχουν μερικούς από τους περιορισμούς που ήδη έχουν περιγραφεί. Η χημεία του υδατικού περιβάλλοντος μπορεί να διαλύσει τις κροκίδες και τις ομοιοπολικές συνδέσεις και να ελευθερωθούν κύτταρα στο περιβάλλον.

Επίσης, και η χωρητικότητα είναι περιορισμένη στην διασταυρούμενη σύνδεση, ώστε να υπάρχουν όρια στην κυτταρική ανάπτυξη [57].

### Εγκαψυλλίωση

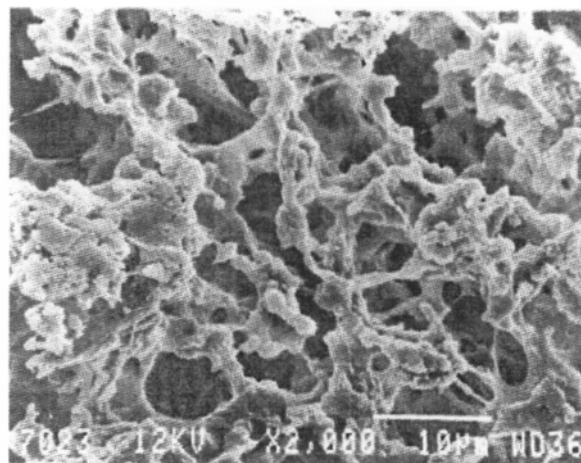
Αντίθετα με τις άλλες τεχνικές ακινητοποίησης, η εγκαψυλλίωση μάλλον διατηρεί το χημικό περιβάλλον του διαλύματος γύρω από τα κύτταρα, παρά τις φυσικές/χημικές δυνάμεις που απαιτούνται για την ακινητοποίηση [58].

Η εγκαψυλλίωση ξεπερνά τα περισσότερα προβλήματα που συνδέονται με τις προηγούμενες μεθόδους. Στην συμβατική μέθοδο του σχηματισμού σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου, ένα μικτό διάλυμα από κύτταρα και χλωριούχο ασβέστιο προστίθεται σε σταγόνες σε ένα διάλυμα αλγινικού νατρίου με καλή ανάμιξη. Σχηματίζεται άμεσα μια ημιπερατή μεμβράνη αλγινικού ασβεστίου στην επιφάνεια του υγρού λόγω ιονικών δράσεων [59].

Τα χαρακτηριστικά της κάψουλας που σχηματίζεται, όπως πάχος τοιχώματος, μέγεθος πόρων, επιφανειακό φορτίο, και μηχανική αντοχή μπορούν να ρυθμίζονται με χρήση αντιδραστηρίων σε διάφορες συγκεντρώσεις [60].

Ο υγρός πυρήνας της κάψουλας έχει κάποια πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές. Το μικροπεριβάλλον του επιτρέπει την άνετη διακίνηση βιομάζας μέσα στην κάψουλα, και επίσης προστατεύει τα κύτταρα από τις χημικές επιδράσεις του άμεσου περιβάλλοντος [60].

Στην φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (SEM), φαίνονται βακτηρίδια που ανάγουνθειικά ιόντα να είναι ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου.



## **2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

### **2.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΠΥΡΑΣ**

Εδώ και 30 χρόνια, η τεχνολογία ακινητοποιημένων κυττάρων (ΤΑΚ) έχει διερευνηθεί διεξοδικά και έχουν σημειωθεί σημαντικές εξελίξεις [54, 56].

Τα κύρια πλεονεκτήματα της εφαρμογής ακινητοποιημένων κυττάρων ζύμης στην παραγωγή της μπύρας είναι :

- Αυξημένη αποδοτικότητα ζύμωσης, λόγω μεγάλης πυκνότητας βιομάζας
- Βελτιωμένη σταθερότητα των κυττάρων
- Ευκολότερη υλοποίηση συνεχών διεργασιών
- Βελτιωμένος λειτουργικός έλεγχος και ευελιξία χειρισμών
- Εύκολη ανάκτηση/επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων
- Εύκολη επεξεργασία των αποβλήτων

Παράμετροι-κλειδιά για την ΤΑΚ είναι η **επιλογή του υλικού του φορέα** και η **μέθοδος ακινητοποίησης**, όπως και ο **σχεδιασμός του αντιδραστήρα**.

Ο προσδιορισμός των παραμέτρων αυτών υπαγορεύεται από τις συνθήκες λειτουργίας, όπως θερμοκρασία, pH, σύσταση υποστρώματος, ρευστοδυναμική, όπου θα πρέπει να προσέχει κανείς ιδιαίτερα τις ιδιότητες μεταφοράς μάζας. Αυτό επειδή αν η παροχή των θρεπτικών υλικών είναι περιορισμένη, αυτό θα έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο μεταβολισμό της ζύμης με αποτέλεσμα την χειροτέρευση της γεύσης του τελικού προϊόντος.

#### **Επιλογή του υλικού του φορέα**

Στη βιομηχανία τροφίμων/ποτών γενικά, θα πρέπει να προσέχεται ιδιαίτερα η επιλογή των υλικών των φορέων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η διαρροή/διάχυση ανεπιθύμητων ουσιών στα ποτά/τρόφιμα.

Για τον λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί με την πάροδο του χρόνου πολλά τέτοια κατάλληλα υλικά (food grade) [61].

Η ακινητοποίηση κυττάρων ζύμης με προσρόφηση είναι η πιο διαδεδομένη, επειδή είναι απλή, γρήγορη και φθηνή. Διάφορα υλικά φορέα έχουν χρησιμοποιηθεί, με αποτελεσματικότερο την DEAE-κυτταρίνη,

ιδίως σε αντιδραστήρες με πληρωτικό υλικό για την παραγωγή μπίρας χωρίς αλκοόλ.

Έχει ένα πλέγμα κυτταρίνης άκαμπτο, μη διαλυόμενο, με μη ομοιόμορφους κόκκους [61].

Η παγίδευση σε πορώδη πλέγματα παρουσιάζει τις γνωστές δυσκολίες και περιορισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω. Τα τελευταία 30 χρόνια γίνεται έντονη έρευνα πάνω στην παγίδευση σε ζελέ. Τέτοια υλικά είναι πολυσακχαρίτες(αλγινικά, κ-καραγενάνη, χιτοζάνη, πηκτινικά) συνθετικά πολυμερή(π.χ. πολύ-βινυλοαλκοόλη, PVA) και πρωτεΐνες(ζελατίνη, κολλαγόνο) που προστίθενται με μορφή ζελέ σε υδρόφιλα πλέγματα σε ήπιες συνθήκες.

Τα ζελέ χρησιμοποιούνται στη μορφή των σφαιριδίων(χάντρες), με διαμέτρους από 0,3-5 mm. Έχουν όμως το μειονέκτημα της περιορισμένης μηχανικής αντοχής. Παρόλα αυτά, έχουν βρεθεί σήμερα ουσίες, που αυξάνουν την μηχανική αντοχή ικανοποιητικά, ιδίως των ζελέ αλγινικού ασβεστίου [62].

Η εγκαψυλλίωση είναι πολύ ακριβή μέθοδος ώστε να εφαρμοσθεί στην παραγωγή της μπίρας, ενώ η αυτοσυσσωμάτωση χρησιμοποιείται σε περιορισμένη κλίμακα.

### **Σχεδιασμός του αντιδραστήρα**

Οι βιοαντιδραστήρες της TAK ταξινομούνται σε 3 κατηγορίες, με βάση την τοποθέτηση των κυττάρων :

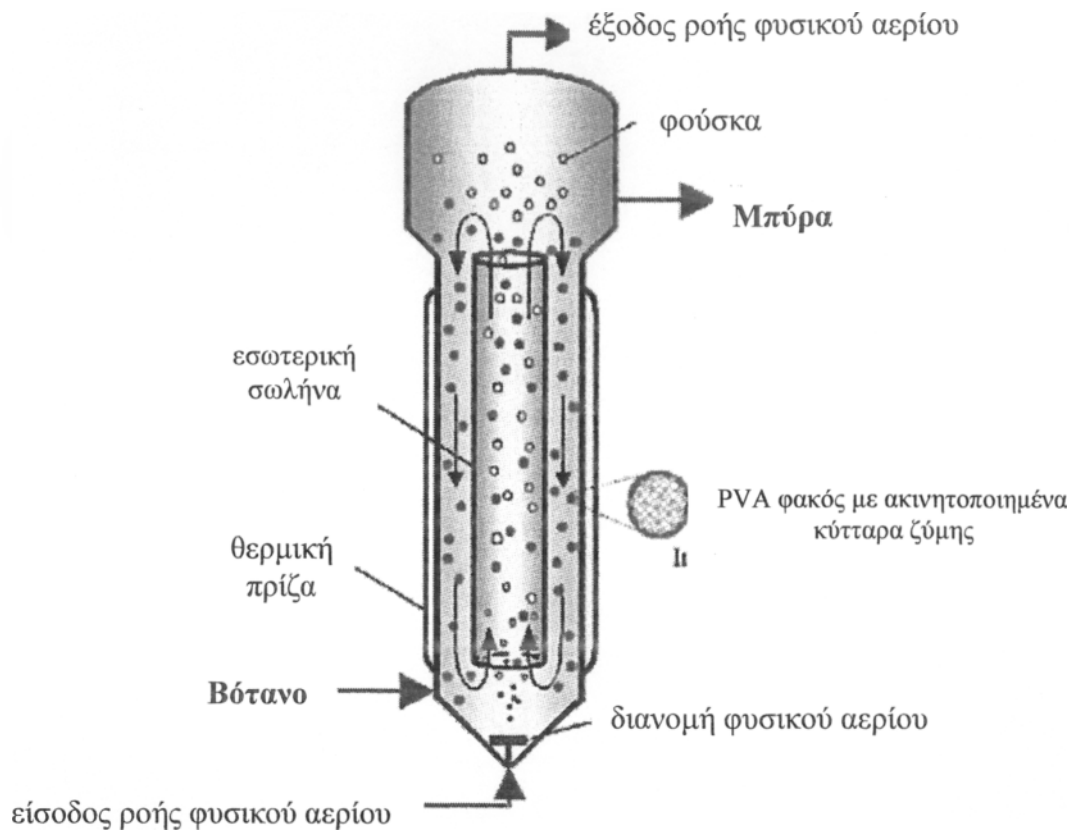
1. Σε ανάμιξη με φορείς σε αιώρηση
2. Σταθεροποιημένα σωματίδια φορέων/μεγάλες επιφάνειες
3. Κινητές επιφάνειες φορέων

Γενικά για την βιομηχανία ποτών, χρησιμοποιούνται συνήθως οι αντιδραστήρες των κατηγοριών 1 και 2. Επίσης, χρησιμοποιούνται αντιδραστήρες διαφόρων τύπων, όπως συνεχούς ανάδευσης, πληρωτικού υλικού, ρευστοποιημένης κλίνης, ανύψωσης αερίου και αντιδραστήρες με κλίνη μεμβράνης [61].

Στο παρακάτω σχήμα 20, παριστάνεται ένας βιοαντιδραστήρας ανύψωσης αερίου(GLB). Λέγεται έτσι, επειδή η ζυμούμενη μάζα (wort) ανυψώνεται με τη βοήθεια του αερίου που εισάγεται από τη βάση του



αντιδραστήρα. Τα κύτταρα της ζύμης ακινητοποιούνται πάνω σε μικροσφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου ή PVA.



ΣΧΗΜΑ 20

Βιοαντιδραστήρας GLB για την παραγωγή της μπύρας

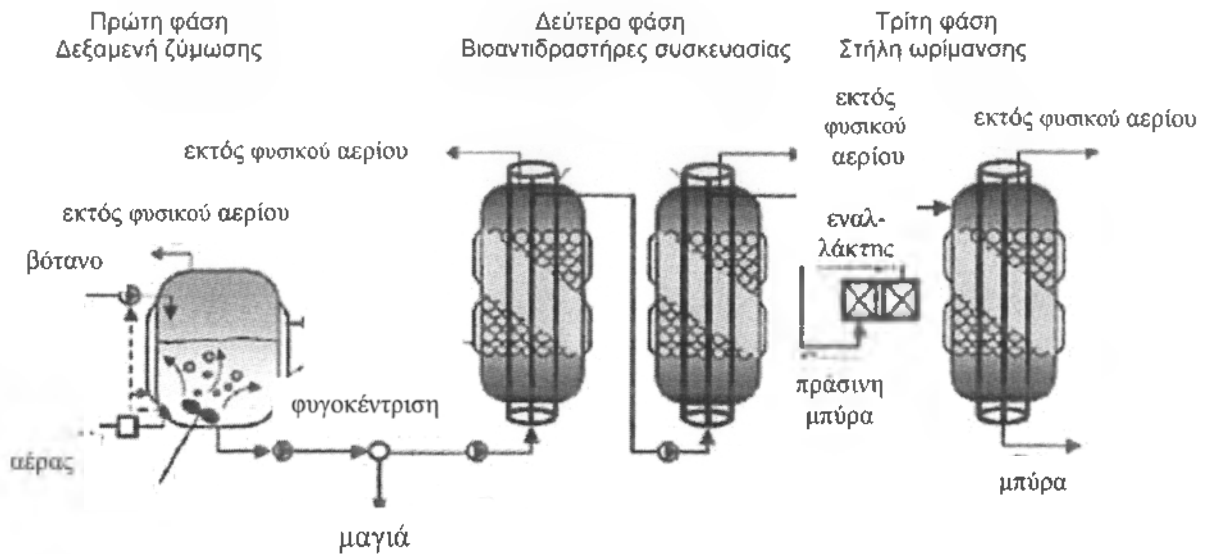
Στο σχήμα 21 φαίνεται η συστοιχία αντιδραστήρων που χρησιμοποιούνται από την Ιαπωνική εταιρία Kirin [61].

Το πρώτο στάδιο είναι ένας αντιδραστήρας συνεχούς ανάμιξης για την ανάπτυξη της ζύμης. Στη συνέχεια υπάρχουν δύο ζυμωτές με πληρωτικό υλικό από πορώδες πλέγμα.

Μετά την έξοδό της από τον δεύτερο ζυμωτή, η μπύρα είναι μη-ώριμη (green). Για το λόγο αυτό, οδηγείται στο τελευταίο στάδιο για ωρίμανση σε ένα αντιδραστήρα με πληρωτικό υλικό αδρανές.

Το υλικό του πλέγματος ακινητοποίησης ήταν αρχικά αλγινικό ασβέστιο, ενώ αργότερα αντικαταστάθηκε από σφαιρίδια κεραμικών (βιοκεραμικά).

Ο χρόνος παραγωγής της μπύρας είναι συνολικά 3-5 ημέρες.



ΣΧΗΜΑ 21

Σειρά αντιδραστήρων συνεχούς λειτουργίας

## 2.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΟΙΝΟΥ

Η εφαρμογή των ακινητοποιημένων κυττάρων στην οινοπαραγωγή για την αλκοολική ζύμωση :



Γίνεται με χρήση κυττάρων του μικροοργανισμού *Saccaromyces cerevisiae*. Τόσο τα πλεονεκτήματα της χρήσης των ακινητοποιημένων κυττάρων της ζύμης, όσο και οι παράμετροι-κλειδιά για την τεχνολογία ΤΑΚ είναι τα ίδια με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω στην παραγωγή της μπύρας [57].

Στην περίπτωση της οινοποίησης, έχουν χρησιμοποιηθεί σαν υλικά του φορέα ακινητοποίησης με προσρόφηση, με αρκετή επιτυχία, φλούδες μήλων, κίσηρις, γ-αλουμίνα [63], αποξηραμένοι μίσχοι καλαμποκιού [56].

Πρόκειται για μια τεχνολογία που διαρκώς εξελίσσεται, και που έχει φυσικά μεγάλη σημασία για τη χώρα μας, που είναι κατ'εξοχήν οινοπαραγωγική.

### 2.3 ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑ

Τα διάφορα βακτηρίδια του γαλακτικού οξέος (ΒΓΟ), δηλ., τα *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, και *Bifidobacterium longum* χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, γιαουρτιού, τυριού και κρέμας, λόγω των θρεπτικών, βιολογικών και τεχνολογικών τους ιδιοτήτων [55].

Η μετατροπή της λακτόζης με καλλιέργειες των παραπάνω μικροοργανισμών βελτιώνει την πεπτικότητα των τροφίμων και οι διάφορες μεταβολικές και ενζυμικές δραστηριότητες των ΒΓΟ οδηγούν στην παραγωγή πτητικών ουσιών, που συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της γεύσης, του αρώματος και της σύστασης των γαλακτοκομικών προϊόντων.

**Προβιοτικά** είναι τα μικροβιακά κύτταρα που με την είσοδό τους στο γαστρεντερικό σύστημα, βελτιώνουν ή την υγεία του καταναλωτή [58].

Τα ΒΓΟ χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων, τα οποία έτσι μετατρέπονται σε **λειτουργικά τρόφιμα**.

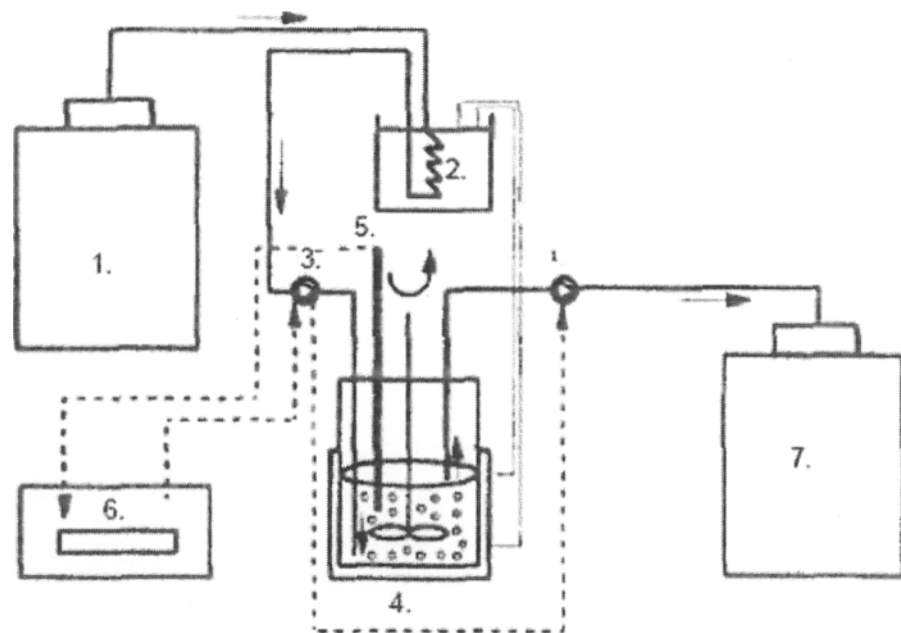
Τα **λειτουργικά τρόφιμα** γενικά έχουν αρχίσει να εισέρχονται στην αγορά καλύπτοντας σύγχρονες ανάγκες των καταναλωτών. Με την ιδιότητά τους να προσφέρουν συγκεκριμένα υγιεινά οφέλη, πέραν του διαθρεπτικού περιεχομένου τους, τα λειτουργικά τρόφιμα αποτελούν τον κύριο τομέα ανάπτυξης της βιομηχανίας τροφίμων. Η εμφάνιση των νεοφανών αυτών τροφίμων είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιων ερευνητικών μελετών και της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας που επέτρεψαν την επιτυχή αντιμετώπιση συγκεκριμένων τεχνολογικών προβλημάτων που πιθανόν προκύπτουν.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης εδώ της ΤΑΚ είναι παρόμοια με αυτά που ήδη έχουν αναφερθεί προηγουμένως, δηλ. μεγάλη πυκνότητα κυττάρων, μεγάλη αποδοτικότητα ζυμώσεων, δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης βιοκαταλυτών, υψηλή βιολογική και φυσική σταθερότητα διαδικασιών για μεγάλες περιόδους ζυμώσεων, διατήρηση των κυττάρων που φέρουν πλασμίδια, βελτιωμένη αντίσταση στη μόλυνση, διαχωρισμός βιομάζας/μεταβολιτών.

Γενικά στην Βιομηχανία Τροφίμων και ειδικότερα στην Γαλακτοκομία, η τεχνική ακινητοποίησης που εφαρμόζεται σε ευρεία κλίμακα είναι η παγίδευση των κυττάρων σε ειδικών προδιαγραφών (food grade) πορώδη πλέγματα.

Η παραγωγή ζελέ γίνεται είτε θερμικά (κ-καρραγενάνη, ζελατίνη, αγαρόζη), ή ιονοτροπικά( χιτοζάνη, αλγινικά), ώστε να παραχθούν σφαιρικοί βιοκαταλύτες, πάνω στους οποίους ακινητοποιούνται οι μικροοργανισμοί ΒΓΟ.

Στο παρακάτω σχήμα 22 παρουσιάζεται το διάγραμμα ροής για τη ζύμωση του γάλακτος με ΒΓΟ και με την τεχνολογία ΤΑΚ.



ΣΧΗΜΑ 22

Διάγραμμα ροής παραγωγής γιαούρτης με ΤΑΚ

1=Δεξαμενή αποθήκευσης ψυγμένου γάλακτος, 2= Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο, 3= Περισταλτική αντλία, 4= Βιοαντιδραστήρας συνεχούς ανάδευσης με ακινητοποιημένα κύτταρα ΒΓΟ σε ζελέ,

5= Αυτόματο pH-μετρο, 6=Ρυθμιστής του pH 7= Δεξαμενή οξιθέντος και εμβολιασμένου γάλακτος

## Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από όσα εξετάθησαν παραπάνω, φάνηκε ότι τόσο η εφαρμογή ακινητοποιημένων κυττάρων (ΤΑΚ), όσο και ακινητοποιημένων ενζύμων (ΤΑΕ) είναι τεραστίου τεχνολογικού ενδιαφέροντος, ειδικά για τη Δημόσια Υγεία.

Η χρήση της ΤΑΚ ή της ΤΑΕ τόσο στη Βιομηχανία Τροφίμων έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή τροφίμων ασφαλών για την υγεία του καταναλωτή.

Ακόμη, η πρόσφατη τεχνολογία ανάπτυξης των **λειτουργικών τροφίμων** με συγκεκριμένες ιδιότητες και σύσταση έχει ουσιώδη σημασία στην Εξέλιξη της Τεχνολογίας Τροφίμων και σίγουρα θα περιμένουμε πολλά στο μέλλον από τα προϊόντα αυτά, των οποίων η σημασία μόλις τώρα αρχίζει να γίνεται κατανοητή.

Επίσης, η εφαρμογή των ΤΑΚ και ΤΑΕ σε σύγχρονα συστήματα της Βιοτεχνολογίας και της Γενωμικής, δείχνει ότι οι εξελίξεις στον τομέα της Βιοϊατρικής έρευνας είναι σημαντικότερες και το μέλλον τους ανήκει, για το καλό της Δημόσιας Υγείας.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kato, M.; Sakai-Kato, K.; Jin, K.; Kubota, M.; Toyo'oka, T.; Dulay, M.T.; Zare, R.N. "Integration of On-line Protein Digestion, Peptide Separation and Protein Identification Using Pepsin-Coated Photopolymerized Sol-gel Columns and Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry" *Anal. Chem.* 2004, 76(7), pp.1896-1902.
2. Sakai-Kato, K.; Kato, M.; Toyo'oka, T. "On-line Trypsin Encapsulated Enzyme Reactor by the Sol-gel Method Integrated Into Capillary Electrophoresis" *Anal. Chem.* 2002, 74, pp. 2943-2949.
3. Kato, M.; Inuzuka, K.; Sakai-Kato, K.; Toyo'oka, T. "Monolithic Bioreactor Immobilizing Trypsin For High-Throughput Analysis. *Anal. Chem.* 2005, 77(6), pp. 1813-1818.
4. Dulay, M.T.; Baca, Q.J.; Zare, R.N. " Enhanced Proteolytic Activity of Covalently Bound Enzymes in Photopolymerized Sol-Gel" *Anal. Chem.* 2005, 77, pp. 4604-4610.
5. H.Graebner, U.Georgi, R.Huttl, G.Wolf, "Schulze B, Wubbolts MG: "Biocatalysis for industrial production of fine chemical". *Curr Opin Biotechnol* 1999, 10, pp. 609–615
6. Martinek K, Mozhaev VV:"Immobilization of enzymes: an approach to fundamental studies in biochemistry " *Adv Enzymol.*1985, 57,pp.179–249
7. Gerbsch N, Buchholz R: " New processes and actual trends in biotechnology." *FEMS Microbiol Rev* 1995, 16, pp. 259–269
8. Brandenberg H: "Methods for linking enzymes to insoluble carriers." *Angew Chem* 1955, 67, pp. 661–661
9. Braun S, Rappoport S, Zusman R, Avnir D, Ottolenghi M: "Biochemically active sol–gel glasses for the trapping of enzymes." *Mater Lett* 1990, 10, pp. 1–5
10. Brown HD, Patel AB, Chattopadhyay SK "Enzyme entrapment within hydrophobic and hydrophilic matrices" *J.Biomed Mater Res* 1968, 2, pp. 231–235

11. Mosbach K, Mosbach R: "Entrapment of enzymes and microorganisms in synthetic cross-linked polymers and their applications in column techniques" *Acta Chem Scand* 1966, 20, pp. 2807–2810
12. Reetz MT, Wenkel R, Avnir D: Entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials: efficient heterogeneous biocatalysts in aqueous medium. *Synthesis* 2000, 6, pp. 781–783
13. Reetz MT, Tielman P, Wiesenhoefer W, Koenen W, Zonta A "Second generation sol-gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalyst" *Adv Synth Catal* 2003, 345, pp. 717–728
14. Axen R, Porath J, Ernback S: "Chemical coupling of peptides and proteins to poly-saccharides by means of cyanogens halides " *Nature*,1967, 214, pp.1302–1304
15. Jagendorf AT, Patchornik A and Sela M: "Use of antibody bound to modified cellulose as an immunospecific adsorbent of antigen" *Biochim Biophys Acta* 1963, 78 pp. 516–528
16. Tosa T, Mori T, Chibata I: "Studies on continuous enzyme reactions Part VI. Enzymatic properties of DEAE-Sephadex–aminoacylase complex " *Agric Biol Chem* 1969, 33, pp. 1053–1059
17. Weliky N, Brown FS, Dale EC: "Carrierbound proteins: properties of peroxidase bound to insoluble carboxymethylcellulos particles" *Arch Biochem Biophys* 1969, 131, pp. 1–8
18. Barker SA, Somers PJ, Epton R: "Preparation and properties of  $\alpha$ -amylase chemically coupled to microcrystalline cellulose" *Carbohydr Res* 1968, 8, pp. 491–497
19. Crook EM: Enzymes on solid matrixes. In: Sols A (Ed.) *Metab Regul Enzyme Action*, Fed Eur Biochem Soc, Meet, 6th, 1969, 1970, pp.297–308
20. Torchilin VP, Tishchenko EG, Smirnov VN: " Covalent immobilization of enzymes on ionogenic carriers. Effect of electrostatic complex formation prior to immobilization " *J Solid-Phase Biochem* 1977, 2: pp.19–29
21. Bachler MJ, Strandberg GW, Smiley KL: "Starch conversion by immobilisedglucoamylase." *Biotechnol Bioeng* 1970, 12, pp. 85–92
22. Vretblad P: " Immobilisation of ligands for biospecific affinity chromatography via their hydroxyl groups. The cyclohexaamylose- $\alpha$ -amylase system" *FEBS Lett* 1974, 47 pp. 86–89

23. Royer GP, Ikeda S, Aso K: "Crosslinking of reversibly Immobilised enzymes".FEBS Lett 1977, 80, pp. 89–94
24. Martinek K, Klibanov AM, Coldmacker VS, Berezin LV: "The principles of enzyme stabilisation" Biochim Biophys Acta 1977, 485, pp. 1–12
25. Messing RA, Filbert AM: Immobilized glucose isomerase for the continuous conversion of glucose to fructose. J Agric Food Chem 1975, 23, pp. 920–923
26. Wykes JR, Dunnill P, Lilly MD: "Immobilisation of  $\alpha$ -amylase by attachment to soluble support materials." BiochimBiophys Acta 1971, 250, pp. 522–529
27. Goldstein L, Manecke G: The chemistry of enzyme immobilization. In Wingard LB Jr, Katchalski-Katzir E, Goldstein L (Eds) Applied Biochemistry and Bioengineering, Academic Press, NewYork, 1976, p.23
28. Teuber, M., "Genetic engineering techniques in food microbiology and enzymology", Food Reviews International, Vol.9,1993, pp. 389-409.
29. Tucker, G.A. and Woods, L. (Eds), " Enzymes in Food Processing", 2nd ed., Chapman & Hall, London, 1995.
30. Fischer, R.L. and Bennett, A.B., "Role of cell wall hydrolases in fruit ripening", Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology, Vol.42,1991,pp.675-703.
31. Sheehy, R.E., Kramer, M. and Hiatt, W.R., "Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, Vol. 85,1985, pp. 8805-9.
32. Tucker, G.A., "Fruit ripening", in Seymour, G.B., Taylor, J.E. and Tucker, G.A. (Eds), The Biochemistry of Fruit Ripening, Chapman &Hall, London, 1993, pp. 1-51.
33. Tucker G.A., "Biotechnology and enzymes in the food industry" British Food Journal 98/4,5 [1996] pp. 14–19
34. G A.Guillen, J.Riu,\* A. Duzgun, and F. Rius, "Immediate Detection of Living Bacteria at Ultralow Concentrations Using a Carbon Nanotube Based Potentiometric Aptasensor" Angew. Chem. Int. Ed. 2009, 48, pp. 1-4



35. Ι. Λιτός, «Ανάπτυξη μεθόδου ταυτόχρονης ανίχνευσης δύο μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών με μία ταινία ξηρών αντιδραστηρίων», Αθήνα, 2009.
36. M.P.Coughlan, M.Kierstan, P.Border, A.Turner "Analytical applications of immobilized proteins and cells", *Journal of Microbiol. Meth.*,8,1988, pp. 1-50.
37. D. Sanyahumbi " Capsular immobilization of sulphate-reducing bacteria and application in disarticulated systems", PhD Thesis, Rhodes University, 2003
38. Henry Y.. Wang and David J. Hettwer, "Cell Immobilization in K-Carrageenan with Tricalcium Phosphate", *Biotechnology & Bioengineering*, 24, 1982, pp. 1827-1838
39. D. M. R. Mateus, S. S. Alves, M. M. R. da Fonseca, "Diffusion in Cell-Free and Cell Immobilising k-Carrageenan Gel Beads with and without Chemical Reaction", *Biotechnology & Bioengineering*, 63, 5, 1999, pp. 625-631
40. Thomas Senac and BLbel Hahn-Hagerdal, "Concentrations of Intermediary metabolites in free and Calcium alginate- immobilized cells of D-glycose fermenting *Saccharomyces cerevisiae*" *Biotechnology Techniques* 5, 1991, pp. 63-68
41. Gherardini Lisa; Radel Stefan; Devcic-Kuhar Branka, Benes Ewald, "A new ultrasound-based cell immobilisation technique", *Proc. Forum Acusticum 2002 Sevilla, Spain, Special Session PHA-01: Acoustics of Dispersed Particulate Matter*, Gherardini et al, 16-20.09.2002, Invited Paper
42. M. Fidaleo, S. Charaniya, C. Solheid, U. Diel, M. Laudon, H. Ge., E. Scriven, M.C. Flickinger, "A Model System for Increasing the Intensity of Whole-Cell Biocatalysis: Investigation of the Rate of Oxidation of D-Sorbitol to L-Sorbose by Thin Bi-Layer Latex Coatings Non-Growing *Gluconobacter oxydans*", *Biotechnology & Bioengineering*, 95,3, 2006, pp. 446-458
43. Lorena Wilson, Andres Illanes, Benevides C. C. Pessela, Olga Abian, Roberto Fernandez-Lafuente, Jose' M. Guisa "Encapsulation of Crosslinked Penicillin G Acylase Aggregates in Lentikats: Evaluation of a

- Novel Biocatalyst in Organic Media "Biotechnology & Bioengineering, 86,5,2004,pp.558-562
44. V. Nedovic, R.Villaert, I.L.Cucalovic, B.Obradovic, B.Bugarski, " Beer Production using immobilized cells", V. Nedovic and R. Willaert (eds.), Applications of Cell Immobilisation Biotechnology, 259-273.© 2005 Springer. Printed in the Netherlands.
  45. Y.Doleyres,Christophe Lacroix, " Cell Immobilization for the Dairy Industry", www pdf document
  - 46.V.M. Vuuroviā, R.Razmovski, D. Popov " Ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in corn stem ground tissue", ", www pdf document
  47. Y Kourkoutas, M.Kanellaki, A.A.Koutinas, C.Tzia, "Effect of storage of immobilized cells at ambient temperature on volatile byproducts during wine-making" Journal of Food Engineering74, 2006,pp. 217–223
  - 48.Pieter J. Verbelen Z David P. De Schutter ZFilip Delvaux Z Kevin J. Verstrepen ZFreddy R. Delvaux, " Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications" Biotechnology Letters, 28, 2006, pp. 1515-1525
  49. S. Nath, S. Chand "Mass Transfer and Biochemical Reaction inImmobilized Cell Packed Bed Reactors :Correlation of Experiment with Theory "J. Chem. Tech. Biotechnol.,66, 1996, pp. 286-292
  - 50.Tyagi, R. D. & Ghose, T. K., " Studies on immobilized *Saccharomycescerevisiae* 1. Analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor" Biotechnol.Bioeng. 24 (1982) pp. 781-95.
  51. Gamarra, J. A., "A theoretical model for catalyst-fluid flow reactors with immobilized cells." J.Chem. Tech. Biotechnol.,35B (1985)pp 239-52.
  - 52.Gupta, S. K. & Chand, S.," Bioconversion of sugars to ethanol in a chemostat employing *S. cerevisiae-dynamic* response to perturbations in process parameters" Process Biochem., 29 (1994) pp. 343-54.
  - 53.Tyagi, R. D., Gupta, S. K. & Chand, S.," Process engineering studies on continuous ethanol production by immobilized *S. cerevisiae*" Process Biochem., 27 (1992)pp. 23-32.
  54. Scott, C.D. " Immobilised cells: a review of recent literature"

- Enzyme Microbiology and Technology, 9,1987 pp. 66-73.
55. Kuhn, S.P. and Pfister R.M. "Adsorption of mixed metals and cadmium by calcium-alginate immobilised *Zoogloea ramigera*". Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 1989, pp.613-618.
  56. Mattiasson, B. "Immobilised viable cells".\_In: "Immobilised cells and organelles."Volume II. Mattiasson (Ed.),1983,. CRC Press Inc., Florida. pp 23-37.
  57. Brodelius, P. "Immobilised plant cells. Preparation and\_biosynthetic capacity"\_In: "Immobilized cells and enzymes – A practical approach" Woodward,J.(Ed.),1985,IRL Press Ltd,Oxford,UK pp127-137.
  58. Klei, H.E. Sundstrom, D.W. and Shim, D. "Immobilisation of\_enzymes by microencapsulation"\_In: "Immobilized cells and enzymes – A practical approach." Woodward, J. (Ed.),1985, IRL Press Ltd, Oxford, UK.pp 49.
  59. Klein, J., Stock, J. and Vorlop, K.D. " Pore size and properties of\_spherical Ca-alginate biocatalysts"European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 18,1983,pp86-91.
  60. Park, J.K. and Chang, H.N. Microencapsulation of microbial cells. Biotechnology Advances, 18 (4), 2000, pp.303-319.
  61. Lommi, H. "Immobilized yeast for maturation and alcohol-free beer", Brew. Dist. Int. 5, 1990, pp. 22-23.
  62. Willaert, R. and Baron, G.V." Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles" Rev. Chem. Eng. 12, 1996, pp.1-205.
  63. Kourkoutas, Y., Komaitis, M., Koutinas, A. A., Kaliafas, A.,Kanellaki, M., Marchant, R., et al. "Wine production using yeast immobilized on quince biocatalyst at temperatures between 30 and 0 °C." Food Chemistry, 82, 2003, pp.353–360.