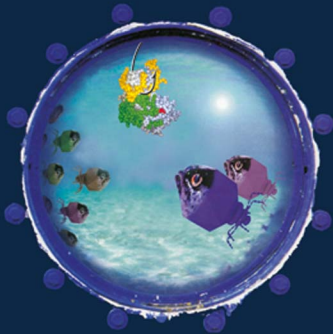


Δ. Α. ΚΥΡΙΑΚΙΔΗ  
Καθηγητή Βιοχημείας Α.Π.Θ.

# ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ



Κάθε γνήσιο αντίτυπο υπογράφεται από το συγγραφέα

ISBN 960-431-595-1

© Copyright: Δ. Α. Κυριακίδης, Εκδόσεις Ζήτη, Φεβρουάριος 2000,  
Β' έκδοση διορθωμένη: Νοέμβριος 2002, Θεσσαλονίκη

Η κατά οποιονδήποτε τρόπο και μέσο αναπαραγωγή, δημοσίευση ή χρησιμοποίηση όλου ή μερών του βιβλίου αυτού απαγορεύεται χωρίς την έγγραφη άδεια του συγγραφέα και εκδότη.



*Φωτοστοιχειοθεσία  
Εκτύπωση*

*Βιβλιοπωλείο*

**www.ziti.gr**

**Π. ΖΗΤΗ & Σια ΟΕ**

18ο χλμ Θεσ/νίκης-Περαίας

Τ.Θ. 171 • Νέοι Επιβάτες Θεσσαλονίκης • Τ.Κ. 570 19

Τηλ.: 23920 72.222 (5 γραμ.) - Fax: 23920 72.229

*e-mail: info@ziti.gr*

**ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΖΗΤΗ**

Αρμενοπούλου 27 • 546 35 Θεσσαλονίκη

Τηλ. 2310 203.720, Fax 2310 211.305

*e-mail: sales@ziti.gr*

## **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Πολλές σημαντικές ενζυμικές διεργασίες όπως η παραγωγή κρασιού, ξυδιού, ψωμιού, τυριού είναι γνωστές εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η εφαρμογή των ενζύμων καθημερινά αποκτά όλο και μεγαλύτερη σημασία, διότι παρέχει ένα νέο τρόπο κατάλυσης και πολλές φορές αντικαθιστά εξολοκλήρου την συνθετική χημεία. Η σημερινή ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής και η καλύτερη γνώση των βιολογικών συστημάτων βοηθούν στη μαζική παραγωγή χημικών ουσιών, φαρμάκων, τροφίμων κλπ.

Μετά την εξάντληση και της 2ης έκδοσης του βιβλίου μου με τίτλο Εφαρμοσμένη Ενζυμολογία, θεώρησα ότι η νέα έκδοση θα πρέπει να είναι πιο περιεκτική και επεξηγηματική, να έχει πλέον τον τίτλο Βιοτεχνολογία, που είναι άλλωστε και ο τίτλος του προσφερόμενου μαθήματος. Για το λόγο αυτό, στην παρούσα έκδοση ξαναγράφηκαν όλα τα κεφάλαια και ορισμένα αναλύθηκαν περισσότερο κάτω από το πρίσμα της φιλοσοφίας της Βιοτεχνολογίας.

Το κεφάλαιο των μικροοργανισμών επεκτάθηκε αρκετά δεδομένου ότι οι φοιτητές της Χημείας γνωρίζουν πολύ λίγα σχετικά με την ταξινόμηση, μορφολογία και μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Στο κεφάλαιο της Ενζυμολογίας προστέθηκαν νέες τεχνικές και εφαρμογές της. Στο κεφάλαιο των βιοαντιδραστήρων αναλύθηκαν όλων των τύπων οι βιοαντιδραστήρες. Τέλος, προστέθηκαν πολλές νέες εφαρμογές, προσπαθώντας να καλυφτεί όλο το φάσμα των εφαρμογών της Βιοτεχνολογίας. Το τελευταίο κεφάλαιο αναφέρεται στη βιοηθική, όπου καταγράφονται τα προβλήματα και οι ηθικές επιφυλάξεις που θα πρέπει να έχουν όσοι θα ασχοληθούν στο μέλλον με τον κλάδο αυτό της επιστήμης που παρουσιάζει εκρηκτική ανάπτυξη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον μαθητή μου Κωνσταντίνο Μιχαλοδημητράκη για τη σημαντική βοήθεια τόσο για την άρτια εμφάνιση των σχημάτων όσο και την εποικοδομητική κριτική για την οργάνωση της ύλης

του βιβλίου αυτού. Ευχαριστώ επίσης τις εκδόσεις Ζήτη, που με πολύ κέφι επιμελήθηκαν την έκδοση αυτή.

Κάθε κριτική ή υπόδειξη από τους φοιτητές μου, σχετικά με το περιεχόμενο του βιβλίου αυτού, είναι ευπρόσδεκτη.

Θεσσαλονίκη, Μάρτιος, 2000

Δ.Α. Κυριακίδης  
Καθηγητής Βιοχημείας

## **ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>9</b>
<b>2. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....</b>	<b>13</b>
2.1. Μικροοργανισμοί με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον .....	15
2.2. Τρόποι ανάπτυξης μικροοργανισμών.....	21
2.3. Μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια μικροοργανισμών.....	23
2.4. Κριτήρια βιοτεχνολογικών διεργασιών .....	25
2.5. Βελτίωση βιομηχανικών μικροοργανισμών .....	26
<b>3. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA.....</b>	<b>33</b>
3.1. Νουκλεάσες περιορισμού .....	33
3.2. Ανάλυση αλληλουχίας DNA.....	37
3.3. Υβριδισμός νουκλεϊνικών οξέων .....	46
3.4. Κλωνοποίηση του DNA .....	53
3.5. Μηχανική του DNA.....	80
<b>4. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ - ENZYMOMΗΧΑΝΙΚΗ.....</b>	<b>91</b>
4.1. Τι είναι η πρωτεϊνική μηχανική.....	91
4.2. Ενζυμομηχανική.....	92
4.3. Πρωτεΐνες σύντηξης (fusion proteins).....	95
4.4. Άλλες εφαρμογές της πρωτεϊνικής μηχανικής.....	97
<b>5. ΠΗΓΕΣ ENZYMΩΝ .....</b>	<b>99</b>
5.1. Ένζυμα ως βιοκαταλύτες .....	100
5.2. Πηγές καθαρισμού ενζύμων .....	100
5.3. Υποκυτταρική κατανομή των ενζύμων .....	101
5.4. Περιορισμοί της χρήσης των ενζύμων .....	102

<b>6. ΚΑΘΗΛΩΣΗ ENZYMΩΝ</b> .....	109
6.1. Μέθοδοι καθήλωσης ενζύμων.....	109
6.2. Ιδιότητες των καθηλωμένων ενζύμων .....	121
6.3. Καθήλωση συνενζύμων .....	125
6.4. Καθήλωση πολυενζυμικών συστημάτων .....	129
6.5. Καθήλωση κυττάρων .....	130
<b>7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ENZYMΩΝ</b> .....	133
7.1. Κάθετη επεξεργασία (Downstream processing).....	133
7.2. Λύση των κυττάρων .....	134
7.3. Μέθοδοι καθαρισμού διαλυτών ενζύμων .....	137
<b>8. ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ</b> .....	143
8.1. Τρόποι θανάτωσης.....	143
8.2. Μέτρηση της αποτελεσματικότητας φόνευσης.....	145
<b>9. ΒΙΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ</b> .....	147
9.1. Ο ρόλος του βιοαντιδραστήρα για παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογίας.....	147
9.2. Μορφές βιοαντιδραστήρων.....	148
9.3. Σχεδιασμός βιοαντιδραστήρων.....	157
<b>10. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΕΣ</b> .....	165
10.1. Βιομετατροπές .....	167
10.2. Μεταβολικά τελικά προϊόντα.....	172
10.3. Δευτερογενείς μεταβολίτες .....	174
<b>11. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΛΚΟΟΛΩΝ, ΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΩΝ</b> .....	177
11.1. Βιομηχανική παραγωγή αλκοόλης.....	177
11.2. Παραγωγή οργανικών οξέων, αμινοξέων και οργανικών διαλυτών.....	184
<b>12. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ ΕΜΒΟΛΙΩΝ</b> .....	195
12.1. Παραγωγή πρωτεϊνών μονοκυττάρων.....	195
12.2. Παραγωγή πρωτεϊνών με φαρμακολογικές ιδιότητες.....	199
12.3. Παραγωγή εμβολίων .....	201

<b>13. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ</b> .....	205
13.1. Παραγωγή βιταμινών, αλκαλοειδών, νουκλεοτιδίων και στεροειδών .....	208
<b>14. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΩΝ</b> .....	209
14.1. Ξανθάνη .....	211
14.2. Δεξτράνια .....	212
14.3. Πουλλουλάνη.....	213
14.4. Τρόποι βιομηχανικής παραγωγής των εξωπολυσακχαριτών.....	213
14.5. Παραγωγή αμυλοσιροπίων.....	215
<b>15. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ</b> .....	217
<b>16. ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ</b> .....	219
16.1. Τύποι ΡΗΑ .....	219
16.2. Σύνθεση του πολυμερούς .....	220
16.3. Βιοαποικοδόμηση του πολυμερούς.....	222
16.4. Εφαρμογές.....	222
<b>17. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ</b> .....	225
17.1. β-Γαλακτοσιδάση.....	225
17.2. Αμυλολυτικά ένζυμα.....	227
17.3. Ισομεράση της γλυκόζης .....	227
17.4. Παραγωγή χημικών ενώσεων από λιγνίτη.....	228
17.5. Αναερόβια παραγωγή μεθανίου .....	230
17.6. Πρωτεάσες .....	230
17.7. Μικροβιακή ανάκτηση μετάλλων.....	231
17.8. Βιοχημικά ηλεκτρόδια.....	231
17.9. Εφαρμογή μικροβιακών ενζύμων στην Κλινική Χημεία.....	232
<b>18. ΜΟΝΟΚΛΩΝΙΚΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ (ΜΑ)</b> .....	233
18.1. Μονοκλωνικά αντισώματα από όγκους υβριδομάτων .....	234
18.2. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων σε μεγάλη κλίμακα .....	238
18.3. Εφαρμογές των μονοκλωνικών αντισωμάτων .....	238
18.4. Γενετικές ποικιλίες των αντισωμάτων .....	242

<b>19. ΦΥΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, ΙΣΤΟΙ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ</b>	
<b>ΦΥΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ</b> .....	247
19.1. Ανάπτυξη φυτών .....	247
19.2. Καλλιέργεια φυτικών ιστών.....	249
19.3. Καλλιέργεια φυτικών κυττάρων.....	251
19.4. Καλλιέργεια φυτικών οργάνων.....	253
19.5. Αναγέννηση των φυτών.....	254
<b>20. ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΩΝ</b> .....	257
20.1. Μη ανασυνδυασμένη προσέγγιση .....	257
20.2. Ανασυνδυασμένη προσέγγιση.....	259
20.3. Τι έχει επιτευχθεί .....	260
<b>21. ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΑ ΖΩΑ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΜΕ ΓΟΝΙΔΙΑ</b> .....	263
21.1. Τεχνικές μεταφοράς γονιδίων.....	264
21.2. Παραγωγή διαγονιδιακών ποντικών.....	264
21.3. Μεταγονιδίωση σε μεγάλα θηλαστικά .....	269
21.4. Στόχευση γονιδίων.....	270
21.5. Μεταγονιδίωση και στον άνθρωπο; .....	272
21.6. Γονιδιακή θεραπεία σε ανθρώπους.....	273
<b>22. ΚΟΙΝΩΝΙΚΕΣ ΚΑΙ ΗΘΙΚΕΣ ΑΠΟΨΕΙΣ</b>	
<b>ΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ</b> .....	277
22.1. Βιοτεχνολογία και νόμοι πατεντών .....	277
22.2. Νομικές εφαρμογές των DNA “δακτυλικών αποτυπωμάτων” (DNA fingerprinting) .....	280
22.3. Γενετικά τροποποιημένοι μικροοργανισμοί.....	281
22.4. Γονιδιακή θεραπεία .....	284
22.5. Βιολογικός πόλεμος.....	285
22.6. Βιοτεχνολογία και Τρίτος Κόσμος .....	286
<i>Βιβλιογραφία</i> .....	287
<i>Ευρετήριο όρων</i> .....	289



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

**Με** τον όρο βιοτεχνολογία εννοούμε την εφαρμογή διαφόρων βιολογικών λειτουργιών σε τεχνολογικό επίπεδο με στόχο τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων. Συνεπώς η βιοτεχνολογία είναι μια εφαρμοσμένη επιστήμη που βασίζεται στη βιοχημεία και στη μικροβιολογία και υποστηρίζεται από την βιομηχανική χημεία και χημική μηχανική. Στη βιοτεχνολογία οι αντιδράσεις γίνονται σε ζωντανά βακτήρια, φυτικά ή ζωικά κύτταρα, ή με ένζυμα που προέρχονται από τα προαναφερθέντα κύτταρα. Επίσης η παραγωγή βιομάζας από διάφορους μικροοργανισμούς αποτελεί τμήμα της επιστήμης αυτής.

Με βάση τον παραπάνω ορισμό, η βιοτεχνολογία μπορεί να θεωρηθεί ένα πολύ παλιό επιστημονικό πεδίο. Από τους προϊστορικούς χρόνους η αιθανόλη παράγεται βιοτεχνολογικά με τον τρόπο που σήμερα ονομάζουμε αλκοολική ζύμωση. Άλλες γνωστές βιοτεχνολογικές διεργασίες πριν από το 3000 π.Χ. είναι η παραγωγή ψωμιού, ξιδιού και μπύρας. Είναι σίγουρο ότι οι αρχαίοι Σουμέριοι ήξεραν να παρασκευάζουν μπύρα, διαδικασία που την μετέφεραν στους Ρωμαίους. Αναφορές στο κρασί και στο ξύδι βρίσκουμε στη Βίβλο. Στη Γένεση Κεφ.9, στίχος 20 περιγράφεται πως «ο Νώε φύτευσε ένα αμπέλι... και αφού ήπια κρασί, μέθυσε και περιφέρονταν έξω από την τέντα του». Επίσης στο κατά Ματθαίον Ευαγγέλιο Κεφ. 27 περιγράφεται «πότισαν με όξος τον Κύριον...».

Περίπου έναν αιώνα πριν είχε αρχίσει να αναγνωρίζεται ότι οι μικροοργανισμοί είναι αυτοί που συμμετέχουν στη παραγωγή αλκοόλης και κρασιού. Η ανακάλυψη έγινε όταν μια ομάδα υπό Γάλλους εμπόρους κρασιού, αναζήτησε μια μέθοδο που θα παρεμπόδιζε το ξίνισμα του κρασιού κατά την μεταφορά του σε μεγάλες αποστάσεις. Οι έμποροι αυτοί ζήτησαν την βοήθεια του Louis Pasteur. Την εποχή εκείνη πολλοί επιστήμονες πίστευαν ότι ο αέρας επιδρά στα σάκχαρα στο υγρό αυτό και το μετατρέπει σε αλκοόλη. Αντίθετα, ο Pasteur

βρήκε πως η ζύμη είναι αυτή που μετατρέπει τα σάκχαρα σε αλκοόλη απουσία αέρα. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή σήμερα ως ζύμωση. Το ξίνισμα του κρασιού ξέρουμε σήμερα ότι οφείλεται στη δράση των ακετοβακτηρίων που μετατρέπουν την αλκοόλη σε ξίδι (οξικό οξύ). Η λύση του Pasteur ήταν να θερμάνει την αλκοόλη τόσο ώστε να σκοτωθούν οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που ήταν παρόντες, διαδικασία που δεν επηρεάζει πολύ το άρωμα του κρασιού ή της μύρας. Η διαδικασία αυτή είναι σήμερα γνωστή ως παστερίωση, αν και γνωρίζουμε ότι μια παρόμοια τεχνική χρησιμοποιούνταν για την παραγωγή του sake (εθνικό ποτό των Γιαπωνέζων που παρασκευάζεται από εκχυλίσματα ρυζιού) στην Ανατολή 300 χρόνια ενωρίτερα.

Μικρές αλλαγές έγιναν από την προχριστιανική εποχή μέχρι το Α Παγκόσμιο Πόλεμο. Κατά το πόλεμο αυτόν οι Βρετανοί εμπόδισαν τους Γερμανούς να εισαγάγουν το εκχύλισμα φυτών από το οποίο εκχύλιζαν την γλυκερόλη που χρησιμοποιούνταν από τις βιομηχανίες εκρηκτικών. Οι Γερμανοί για να ξεπεράσουν τη δυσκολία αυτή άρχισαν να παρασκευάζουν γλυκερόλη από τη ζύμη και σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα άρχισαν να παράγουν γλυκερόλη περισσότερο από 1000 τόνους το μήνα καθώς επίσης και ποσότητες ακετόνης και βουτανόλης. Οι Βρετανοί πολύ αργότερα ανέπτυξαν την μέθοδο παρασκευής ακετόνης-βουτανόλης από τον μικροοργανισμό *Clostridium acetobutylicum*. Η μέθοδος αυτή δεν κράτησε πολύ και κατά τον Β Παγκόσμιο Πόλεμο μια νέα μέθοδος ημισυνεχούς ζύμωσης καθιερώθηκε.

Η βιομηχανική παραγωγή κιτρικού οξέος επίσης έχει την προέλευσή της στον Α Παγκόσμιο Πόλεμο. Μέχρι τότε το κιτρικό οξύ εκχυλιζονταν από φρούτα. Ο μικροοργανισμός που παράγει το κιτρικό οξύ, ο *Aspergillus niger*, είναι αερόβιος και απαιτεί για την ανάπτυξή του οξυγόνο.

Η πενικιλίνη πήρε το όνομά της από τον Fleming ως το αντιβιοτικό που παράγεται από τον μικροοργανισμό *Penicillium notatum*. Το 1940, όταν η πρώτη καθαρή παρασκευή του αντιβιοτικού αυτού ήταν διαθέσιμη, η θεραπευτική του ιδιότητα ήταν προφανής. Η ανακάλυψη όμως αυτή δεν χάθηκε μέσα στα χρόνια του πολέμου. Η ανάγκη να κρατούνται συνθήκες αποστειρωτικές ήταν το έναυσμα να αναπτυχθούν οι βιοαντιδραστήρες ανάδευσης, οι οποίοι σήμερα είναι η πλέον ευρέως επιλεγόμενη μέθοδος για καλλιέργειες μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα.

Με την ανάπτυξη των καλλιεργειών των μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα άρχισε η ιδέα να επεκτείνεται και να παρασκευάζονται και άλλα χρήσιμα προϊόντα όπως οργανικά οξέα, πολυσακχαρίτες, ένζυμα, εμβόλια, ορμόνες κλπ.

Οι μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες κυττάρων από το 1960 επεκτάθηκαν και σε φυτικά κύτταρα με αποτέλεσμα να παρασκευαστούν ιικά εμβόλια. Τα τε-

λευταία χρόνια έχουν παρασκευαστεί μονοκλωνικά αντισώματα από υβριδώματα (κύτταρα υβριδώματα μεταξύ λεμφοκυττάρων και καρκινικών κυττάρων σπλήνας). Τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να καθαριστούν πολύ εύκολα και βρίσκουν πολλές εφαρμογές σε πολλούς διαφορετικούς τομείς, από διαγνωστικά kits στη χημειοθεραπεία του καρκίνου μέχρι και τον καθαρισμό των πρωτεϊνών.

Μετά το 1980 η βιοτεχνολογία έγινε ένας ταχέως αναπτυσσόμενος επιστημονικός τομέας. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA που άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως έδωσε στις διάφορες επιστημονικές περιοχές καταπληκτικές εφαρμογές. Για παράδειγμα βακτηρίδια μπορούσαν να παράγουν ανθρώπινες ορμόνες. Η τεχνολογία αυτή δεν περιορίζεται μόνον στα βακτήρια. Φυτικά και ζωικά κύτταρα μπορούν επίσης να τροποποιηθούν.

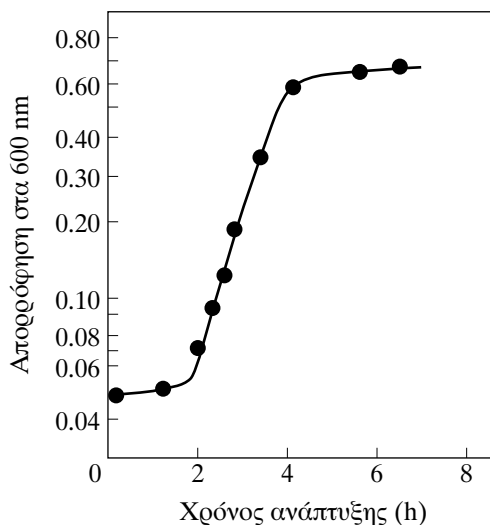
Τα πρώτα πειράματα με την τεχνολογία του ανασυνδυαζόμενου DNA επικεντρώθηκαν στην παραγωγή πρωτεϊνών. Με την τεχνολογία αυτή όχι μόνον παρασκευάστηκαν πολλές θεραπευτικές πρωτεΐνες αλλά παρασκευάστηκαν πρωτεΐνες ως άμεσα προϊόντα συγκεκριμένων γονιδίων. Π.χ. όλα τα γονίδια που κωδικοποιούν τα 29 στάδια της ερυθρομυκίνης κλωνοποιήθηκαν σε ένα απλό DNA κομμάτι.

Η βιοτεχνολογία, όπως εφαρμόζεται σήμερα, δεν περιορίζεται μόνο στην τεχνολογία του ανασυνδυαζόμενου DNA. Περιλαμβάνει την τεχνολογία των υβριδωμάτων, την χρησιμοποίηση των καθλωμένων κυττάρων ή ενζύμων σε αδιάλυτους φορείς και την δυνατότητα παραγωγής φυτών ή οργανισμών από απλά απομονωμένα κύτταρα.

## ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

**Οι** μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν κάτω από κανονικές συνθήκες εάν χορηγηθούν όλες οι απαραίτητες ουσίες.

Σε υγρές καλλιέργειες, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται ως ένα κλειστό σύστημα μέχρις ότου είτε να εξαφανιστούν μερικοί παράγοντες, είτε να παραχθούν μερικά προϊόντα σε τέτοια συγκέντρωση που να παρεμποδίζουν την περαιτέρω ανάπτυξη, είτε να φθάνει ο αριθμός των κυττάρων το σημείο που δεν υπάρχει πλέον διαθέσιμος χώρος για να καταληφθεί από τα νέα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των κυττάρων, τα διάφορα συστατικά του κυττάρου μεταβάλλονται ποικιλοτρόπως και τα κύτταρα αλλάζουν σε μέγεθος πριν από τη διαίρεσή τους. Στη λογαριθμική φάση ανάπτυξης των κυττάρων, όπου τα κύτταρα αυξάνονται με τη μέγιστη ταχύτητα, αυξάνει πολύ γρήγορα τόσο η συγκέντρωση του RNA, όσο και ο ρυθμός της πρωτεϊνικής σύνθεσης (σχήμα 2.1).



Σχ. 2.1. Καμπύλη ανάπτυξης βακτηρίων *E. coli*.

Η ταχύτητα με την οποία ένας μικροοργανισμός πολλαπλασιάζεται εκφράζεται είτε με το χρόνο διπλασιασμού ( $t_d$ , doubling time), είτε με τη ταχύτητα ανάπτυξης ( $\mu$ , growth rate) που είναι η ταχύτητα σύνθεσης των νεοσυντιθεμένων ουσιών εκφρασμένη ανά μονάδα βάρους των υπαρχουσών κυτταρικών ουσιών. Οι δυο αυτοί παράμετροι σχετίζονται με τις παρακάτω εξισώσεις:

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{d(\ln x)}{dt} = \frac{\ln 2}{t_d} \Rightarrow \mu = \frac{0,69}{t_d}$$

(όπου  $x$  = ο αριθμός των κυττάρων,  $t$  = ο χρόνος)

Στις καλλιέργειες η τιμή του  $\mu$  ποικίλλει διότι μεταβάλλεται η συγκέντρωση των συστατικών του υγρού ανάπτυξης. Σε πολλές περιπτώσεις αερόβιων μικροοργανισμών η ταχύτητα παροχής του  $O_2$  κατευθύνει την ταχύτητα ανάπτυξης. Μόνο σε συνεχείς καλλιέργειες μπορεί η ταχύτητα ανάπτυξης να παραμείνει σταθερή με συνεχή παροχή νέου υγρού καλλιέργειας. Οι παράγοντες που καθορίζουν τη μέγιστη ταχύτητα ανάπτυξης ενός οργανισμού, ποικίλουν από οργανισμό σε οργανισμό, και στις περισσότερες των περιπτώσεων είναι άγνωστοι. Ενδέχεται να είναι η ταχύτητα σύνθεσης του DNA, η ταχύτητα με την οποία κάποια ουσία εισέρχεται μέσα στα κύτταρα, ή η ταχύτητα βιοσύνθεσης και οργάνωσης μερικών στοιχείων του κυττάρου, όπως π.χ. το κυτταρικό τοίχωμα. Ο χρόνος διπλασιασμού μπορεί να ποικίλλει από 10 λεπτά μέχρι πολλές ώρες, ανάλογα με τη σύσταση του θρεπτικού υγρού. Τα περισσότερα των βακτηρίων έχουν χρόνο διπλασιασμού 30 λεπτά ή περισσότερο, ενώ λίγα αρακετές ημέρες.

Εμπειρικά ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες:

- 1) από τη φύση της πηγής του άνθρακα
- 2) από την πορεία καταβολισμού του θρεπτικού υποστρώματος
- 3) από την απαίτηση σε ενέργεια για τη διαμετακίνηση άλλων θρεπτικών συστατικών, ειδικά του Na
- 4) από την ικανότητα αναπαραγωγής του ATP
- 5) από παρεμποδιστές, αλλαγή της ισορροπίας ιόντων ή άλλων ουσιών του θρεπτικού υγρού με αποτέλεσμα τη μεταβολή των συστημάτων μεταφοράς ουσιών μέσα στα κύτταρα
- 6) από την φυσιολογική κατάσταση του μικροοργανισμού
- 7) από τη φύση του θρεπτικού υποστρώματος που βρίσκεται σε οριακές συγκεντρώσεις
- 8) από την επιτρεπόμενη ταχύτητα ανάπτυξης
- 9) από το μικροοργανισμό αυτό καθαυτό και
- 10) την ικανότητα του ερευνητή.

## 2.1. Μικροοργανισμοί με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον

Στο κεφάλαιο αυτό δίδονται περιληπτικά πληροφορίες για τους μικροοργανισμούς που συνήθως χρησιμοποιούνται σε βιοτεχνολογικές διεργασίες. Οι κυριότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές των μικροοργανισμών φαίνονται στον πίνακα 2.1 και κάποια συγκεκριμένα παραδείγματα στον πίνακα 2.2.

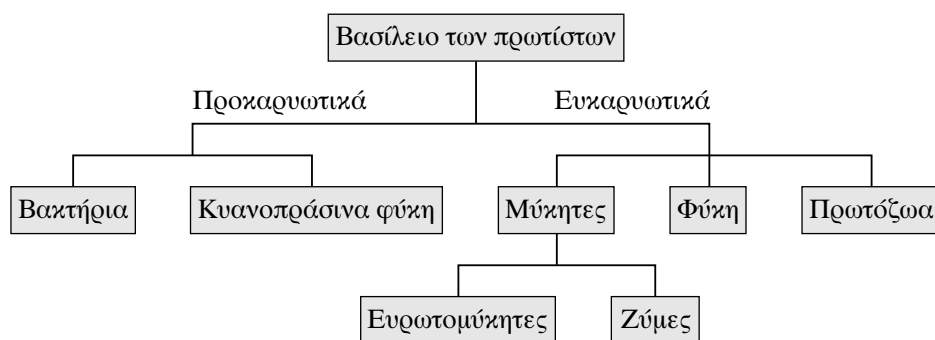
**Πίνακας 2.1.** Διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές των μικροοργανισμών.

1) Παραγωγή κυττάρων
2) Παραγωγή ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους α) παραγωγή πρωτευνόντων μεταβολιτών β) παραγωγή δευτερευόντων μεταβολιτών γ) μετατροπή οργανικών ενώσεων από μη-πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα
3) Παραγωγή ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους α) πολυσακχαρίτες β) λιπίδια γ) πρωτεΐνες
4) Διαδικασίες εξαρτώμενες από τον γενικό μεταβολισμό του μικροοργανισμού α) βιοαποικοδόμηση/οξειδωση αποβλήτων και απορριμμάτων β) εκχύλιση μετάλλων

**Πίνακας 2.2.** Παραδείγματα εφαρμογών των μικροοργανισμών.

Οργανισμός	Εφαρμογή
<i>Bacillus thuringiensis</i> και σχετικοί μικροοργανισμοί	Μικροβιακά εντομοκτόνα
<i>Lactobacillus sp.</i> <i>Streptococcus cremoris</i> και σχετικά είδη	Αρχικές καλλιέργειες για την βιομηχανοποίηση γαλακτοκομικών προϊόντων π.χ. γιαούρτι, τυρί
<i>Penicillium roqueforti</i>	Εμβολιάσματα για την παραγωγή τυριών και σχετικοί μικροοργανισμοί
<i>Rhizobium sp.</i>	Εμβολιάσματα που προάγουν την καθήλωση του αζώτου
<i>Pseudomonas syringae</i> (Ina Z γονίδιο)	Δημιουργία τεχνητού χιονιού. Μεταλλάγματα που δεν έχουν το γονίδιο ώστε να προστατεύουν τα φυτά από παγετούς
Πολλοί διαφορετικοί μικροοργανισμοί	Παραγωγή πρωτεϊνών μονοκυττάρων

Οι μικροοργανισμοί της τάξης των πρωτίστων, που είναι οι περισσότεροι απλούστεροι οργανισμοί συγκρινόμενοι με τα φυτικά ή ζωικά κύτταρα, είναι μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί του ίδιου τύπου κυττάρων. Το σχήμα 2.2 δείχνει την υποδιαίρεση των πρωτίστων σε ομάδες. Η υποδιαίρεση αυτή δείχνει διαφορές σε πολλά χαρακτηριστικά όπως: ενέργεια, απαιτήσεις σε τροφή, ανάπτυξη, προϊόντα που απελευθερώνονται, μέθοδο αναπαραγωγής και ικανότητα και τρόπος κίνησης. Οι παράγοντες αυτοί είναι μεγάλης σημασίας κυρίως για τις πρακτικές εφαρμογές που παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί αυτοί.



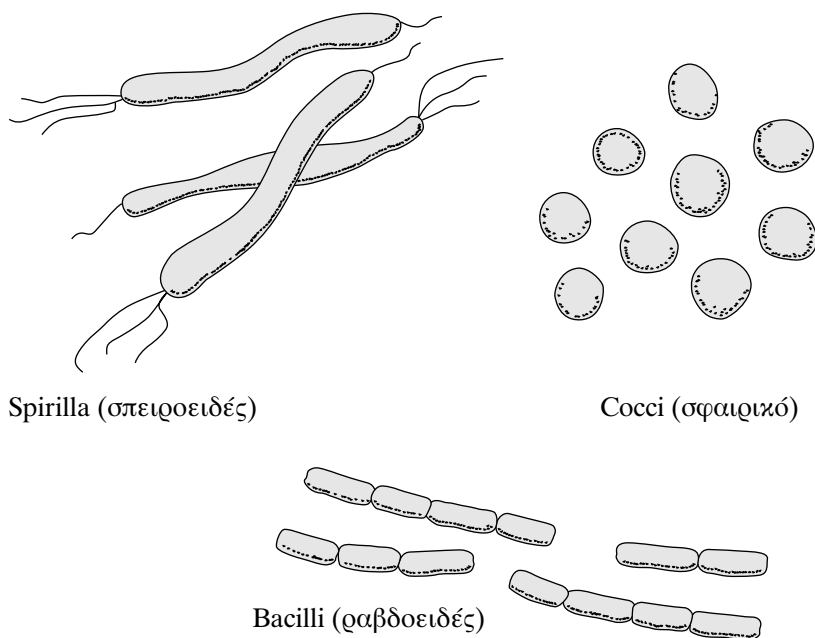
Σχ. 2.2: Ταξινόμηση μικροοργανισμών που ανήκουν στο βασίλειο των πρωτίστων.

Η βασική μονάδα σε αυτή την ταξινόμηση είναι τα είδη. Σε κάθε είδος ανήκουν μικροοργανισμοί με υψηλό βαθμό ομοιότητας στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες των οργανισμών που σχετίζονται. Τα βιολογικά είδη παριστάνονται με δυο λέξεις με λατινικό όνομα, από τις οποίες η πρώτη λέξη με κεφαλαίο παριστάνει το γένος ή το γενετικό όνομα, ενώ η δεύτερη λέξη το ειδικό όνομα, είναι ο περιγραφικός όρος του μικροοργανισμού. Το πολύ γνωστό π.χ. βακτήριο που βρίσκεται στο έντερο του ανθρώπου έχει το όνομα *Escherichia* (γενετικό όνομα) *coli* (ειδικό ή περιγραφικό όνομα). Συντομογραφικά απαντάται συνήθως ως *E.coli*.

### 2.1.1. Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί και απαντώνται σε τρεις βασικούς μορφολογικούς σχηματισμούς (σχήμα 2.3).

Υπάρχουν πολλές υποδιαιρέσεις βακτηρίων. Η ταξινόμηση που ακολουθείται στηρίζεται στο αν βάφονται ή όχι με χρώση κατά Gram (θετικά ή αρνητικά βακτήρια κατά Gram), στον τρόπο διαβίωσής τους (αυτότροφα ή ετερότροφα)



Σχ. 2.3. Μορφολογικοί σχηματισμοί βακτηρίων.

και στο αν σχηματίζουν ή όχι σπόρια. Τα βακτήρια βάφονται πρώτα με την χρωστική κρυσταλλικών ιώδες, κατεργάζονται στη συνέχεια με διάλυμα ιωδίου και ξεπλένονται με αλκοόλη. Βακτήρια που κρατούν το ιώδες - κυανούν χρώμα της χρωστικής μετά από αυτήν την κατεργασία ονομάζονται θετικά κατά Gram. Τα βακτήρια που ύστερα από αυτή την κατεργασία χάνουν το χρώμα της χρωστικής χαρακτηρίζονται ως αρνητικά κατά Gram. Η διαφορά των βακτηρίων στη χρωστική αυτή οφείλεται στη διαφορά της χημικής σύστασης των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων.

Το γενετικό υλικό των βακτηρίων δεν είναι οργανωμένο σε χρωμοσώματα, αλλά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, συνήθως ως δίκλωνο κυκλικό DNA. Τα βακτήρια δεν έχουν τα τυπικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων όπως μιτοχόνδρια ή πλαστίδια (σχήμα 2.4). Επίσης δεν έχουν διαμερισματοποιημένους τους πρωτοπλάστες από το ενδοπλασματικό δίκτυο.

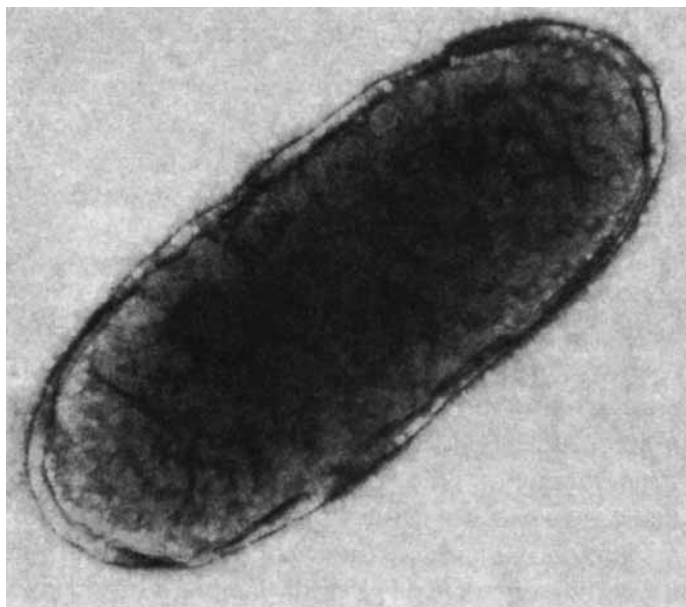
Τα βακτήρια είναι κυρίως ετερότροφα (αξιοποιούν ενέργεια από οργανικές ενώσεις) και ζουν παντού ως σαπρόφυτα (τρέφονται από νεκρά οργανικά υλικά), ή παράσιτα (τρέφονται με ζώντα υλικά του ξενιστή κυττάρου) ή ζουν ως συμβιωτικοί οργανισμοί.

Ένας καθοριστικός παράγοντας για όλες τις βιοτεχνολογικές διεργασίες είναι η ανάγκη των χρησιμοποιούμενων βακτηρίων, και γενικότερα όλων των μι-



κροοργανισμών, για οξυγόνο. Σε αερόβιους μικροοργανισμούς (π.χ. για την παραγωγή ξιδιού ή αντιβιοτικών) παρέχεται οξυγόνο συνήθως διαβιβάζοντας αέρα της ατμόσφαιρας. Σε περιπτώσεις παραγωγής αλκοόλης ή πέψης οργανικών αποβλήτων, οι μικροοργανισμοί λειτουργούν χωρίς οξυγόνο σε αναερόβιες συνθήκες.

Τα βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες έχουν μεγάλη σημασία στη βιοτεχνολογία. Τα σπόρια είναι εφησυχασμένοι σχηματισμοί μικροοργανισμών, που ανθίστανται σε αυξημένες θερμοκρασίες, δηλητηριώδη χημικά ή ραδιενέργεια. Όταν τα σπόρια επιστρέψουν σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν κανονικά και λειτουργικά κύτταρα. Αυτή η ενεργός βιολογική κατάσταση των κυττάρων ονομάζεται βλαστική κατάσταση (vegetative state). Υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες βακτηρίων που σχηματίζουν σπόρια. Στην πρώτη ανήκουν τα αεροβικά είδη του *Bacillus* που είναι πολύ διαδεδομένα και παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό προσαρμογής στο περιβάλλον τους. Στη δεύτερη ανήκουν πολλά είδη του *Clostridium* που κανονικά αναπτύσσονται κάτω από αναερόβιες συνθήκες και πεθαίνουν παρουσία οξυγόνου, αλλά μπορούν και σχηματίζουν σπόρια χωρίς να επηρεάζονται από το οξυγόνο.



Σχ. 2.4. Το Βακτήριο *Methylophilus methylophilus*.

Μερικά βακτήρια των οποίων η βλαστική κατάσταση καταστρέφεται στην θερμοκρασία των 45°C μπορούν και σχηματίζουν σπόρια που επιζούν σε βραστό νερό για πολλές ώρες. Συνεπώς, οι προσπάθειες για καταστροφή των βακτηρίων με θέρμανση απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες, που τυπικά κατορθώνονται με βράσιμο υπό πίεση σε κλίβανο, όπου επιτυγχάνεται θερμοκρασία μεγαλύτερη των 120°C (heat sterilization).

### 2.1.2. Μύκητες

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί ετερότροφοι οργανισμοί (σχήμα 2.5). Διακρίνονται από μια χαρακτηριστική βλαστική μορφή που είναι γνωστή ως μυκήλιο. Το μυκήλιο αποτελείται από μια πολυπυρηνική μάζα κυτταροπλάσματος που εμπεριέχεται σε ένα σύστημα διακλαδιζόμενων σωληναρίων, κατασκευής ανάλογης του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Οι πιο πολλοί μύκητες ζουν ελεύθερα στο



Σχ. 2.5. Σχηματική απεικόνιση ενός μύκητα.

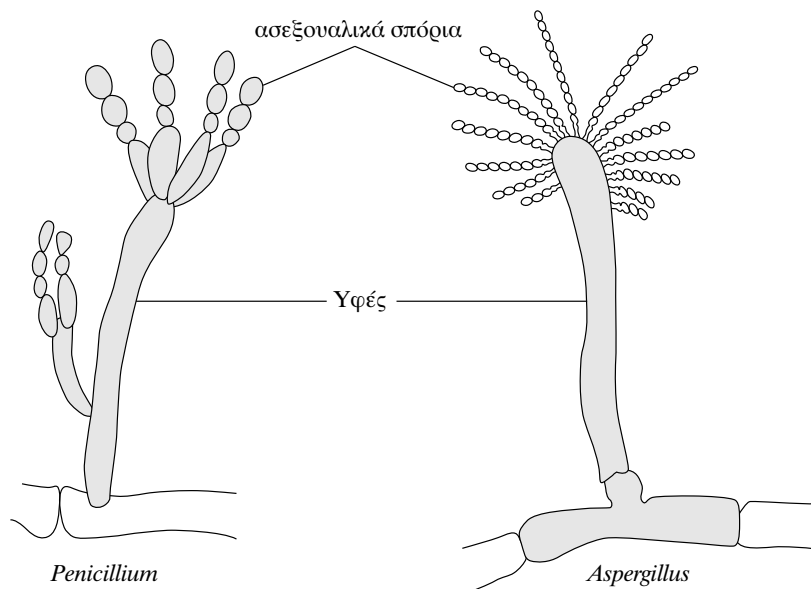
έδαφος ή σε νερά και παίρνουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον τους. Λίγα είδη μυκήτων είναι παράσιτα άλλων οργανισμών. Διακρίνονται στους φυκομύκητες, ασκομύκητες και βασιδιομύκητες. Τέλος υπάρχει και μια τέταρτη ομάδα, οι ατελείς μύκητες, των οποίων η ταξινόμηση δεν είναι απόλυτα οριστική.

Τα μυκήλια ανάλογα με το σχήμα είναι περισσότερα του ενός τύπου. Τα μακριά λεπτά σωληνάκια των κυττάρων αυτών μέσα στο μυκήλιο ονομάζονται υφές (hyphae) (σχήμα 2.6). Σε μερικές περιπτώσεις το μυκήλιο μπορεί να έχει μεγάλη πυκνότητα.

Αυτή η ιδιότητα, μαζί με την απαίτηση των μυκήτων σε οξυγόνο για συγκριμένες λειτουργίες, προκαλεί δυσκολίες στην ανάπτυξή τους, διότι τα μυκήλια παρουσιάζουν σημαντική αντίσταση στη μεταφορά μάζας.

Οι μύκητες δεν περιέχουν χλωροφύλλες και γενικώς δεν κινούνται. Η αναπαραγωγή τους μπορεί να είναι σεξουαλική ή ασεξουαλική και επιτυγχάνεται τυπικά με τα σπόρια.

Οι περισσότερες σημαντικές τάξεις βιομηχανικών μυκήτων είναι ο *Aspergillus* και το *Penicillium* (σχήμα 2.6). Πολλά είναι τα σημαντικά προϊόντα αυτών των μικροοργανισμών, όπως αντιβιοτικά, οργανικά οξέα, ένζυμα κ.α.

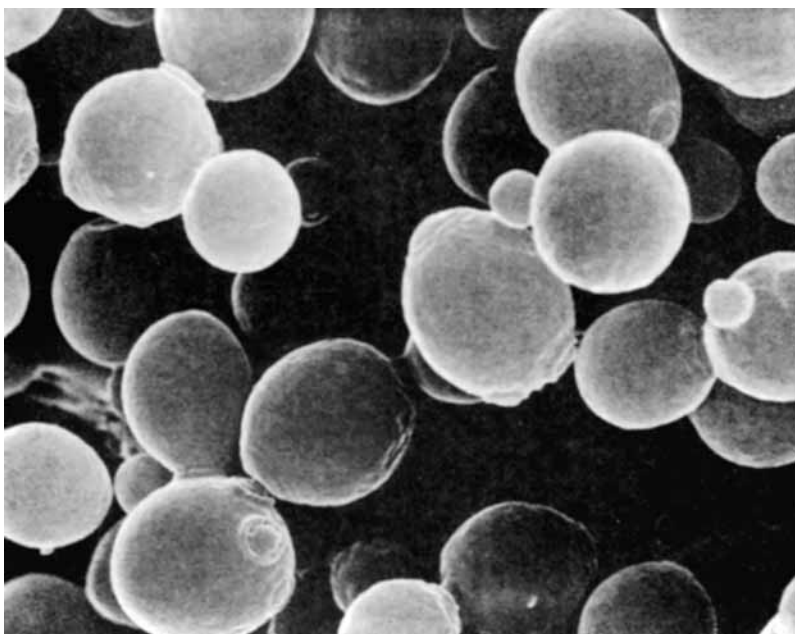


**Σχ. 2.6.** Οι υφές του *Aspergillus* και *Penicillium* δυο από τους πιο σημαντικούς βιομηχανικά μύκητες.

Ο μικροοργανισμός *Aspergillus niger* παράγει οξαλικό οξύ. Όταν δεν προστεθούν στο υγρό ανάπτυξης φωσφορικά και μερικά μέταλλα, όπως π.χ. χαλκός, σίδηρος και μαγνήσιο, ενισχύεται η παραγωγή του κιτρικού οξέως. Στην πιο πάνω αρχή στηρίζεται και η βιομηχανική παραγωγή του κιτρικού οξέος. Συνεπώς, ο μικροοργανισμός *Aspergillus niger* αποτελεί μοντέλο για την σχεδίαση βιοαντιδραστήρων με διάφορες χρήσεις.

### 2.1.3. Ζύμες

Μερικοί μύκητες έχουν χάσει το μυκηλιακό τρόπο ανάπτυξής τους και έχουν μετατραπεί σε μονοκύτταρους οργανισμούς. Οι οργανισμοί αυτοί είναι γνωστοί ως ζύμες. Η ζύμη αποτελείται από μικρά σε σχήμα αβγού κύτταρα που πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Τα εκβλαστήματα μεγαθύνονται μέχρι να φτάσουν το μέγεθος του μητρικού κυττάρου και στη συνέχεια γίνεται η διαίρεση του πυρήνα και μετά η διαίρεση του κυτταροπλάσματος. Οι ζύμες όπως ο *Saccharomyces cerevisiae* (σχήμα 2.7) είναι υπεύθυνος για την αλκοολική ζύμωση των σακχάρων. Οι ζύμες, εκτός από την χρήση στην παραγωγή μύρας και κρασιού, χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γλυκερόλης, στην αρτοποιία και στην παραγωγή πρωτεϊνών ως πρόσθετο των τροφών.



Σχ. 2.7. Ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2.2. Τρόποι ανάπτυξης μικροοργανισμών

Επειδή υπάρχει μεγάλος συναγωνισμός στο χώρο της βιομηχανίας ο τρόπος ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα δεν είναι λεπτομερώς γνωστός. Παρ' όλες τις παραλλαγές που υπάρχουν, χρησιμοποιούνται δύο βασικές μέθοδοι. Η μέθοδος ανάπτυξης σε στερεά φάση (solid-state) και η μέθοδος καταβύθισης (sub-merged). Τα περισσότερα βιομηχανικά ένζυμα, όπως οι πρωτεάσες και οι πηκτινάσες, παράγονται με την πρώτη μέθοδο.

Η μέθοδος ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε στερεά φάση αναφέρεται στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε στερεά υλικά με υγρασία μεταξύ των πόρων του στερεού υλικού αλλά χωρίς την παρουσία ελεύθερης υγρής φάσης. Το στερεό υλικό είναι τοποθετημένο σε μεγάλους δίσκους που μπορούν να αερίζονται διαβιβάζοντας αποστειρωμένο τον υγρό αέρα. Τα όλο σύστημα περιστρέφεται ώστε να επιτυγχάνεται η ανάμιξη του αέρα ανάμεσα στους δίσκους και έλεγχος της θερμοκρασίας. Ο εμβολιασμός της καλλιέργειας, η ανάπτυξη και η συλλογή γίνονται αυτόματα.

Η μέθοδος καταβύθισης περιλαμβάνει δοχεία καλλιέργειας (ζυμωτήρες) χωρητικότητας από 5 έως 200 m<sup>3</sup> με αναδευτήρες στο κέντρο του δοχείου και

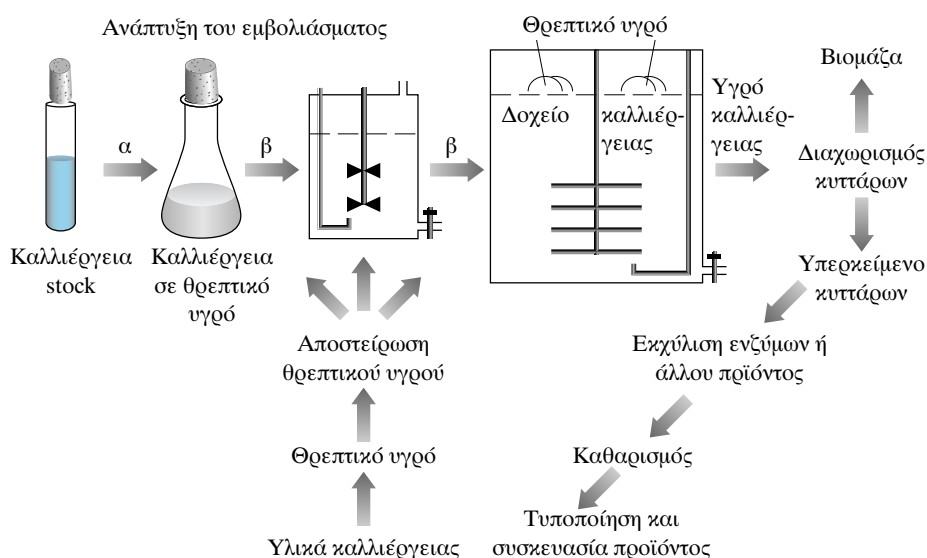
μικροσωληνώσεις που εισάγουν αποστειρωμένο αέρα και το υγρό ανάπτυξης (σχήμα 2.8). Τα κύτταρα αναπτύσσονται σε κωνική φιάλη από την αρχική (stock) καλλιέργεια. Με το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης στη συνέχεια εμβολιάζεται μικρό δοχείο με αποστειρωμένο θρεπτικό υγρό. Στο δοχείο αυτό διαβιβάζεται οξυγόνο και γίνεται ανάδευση μέχρι να αναπτυχθούν τα κύτταρα στο επιθυμητό επίπεδο, οπότε και προσθέτονται στο μεγάλο δοχείο καλλιέργειας. Συνεχής ανάδευση, παροχή οξυγόνου και έλεγχος του pH και της θερμοκρασίας γίνονται στις διάφορες φάσεις της καλλιέργειας. Δείγματα από την καλλιέργεια λαμβάνονται περιοδικά, κατά την πορεία ανάπτυξης των μικροοργανισμών, για να γίνει ο έλεγχος της σύστασης του υγρού καλλιέργειας, καθώς και ο τύπος των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται.

Η μέθοδος καταβύθισης μπορεί να γίνει με ανάπτυξη των καλλιερειών σταδιακά σε διάφορες περιόδους ή με συνεχή καλλιέργεια. Μειονεκτήματα της σταδιακής καλλιέργειας είναι ότι μπορεί να γίνουν αλλαγές του pH ή οξυγόνωσης του υγρού καλλιέργειας. Από την άλλη πλευρά η μέθοδος έχει ένα σοβαρό μειονέκτημα ότι η καλλιέργεια μπορεί να μολυνθεί με ξένο οργανισμό.

Για την καλύτερη απόδοση παραγωγής βιομάζας ή ενζύμων από τα εκχυλίσματα κυττάρων απαραίτητο είναι:

Να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες καλλιέργειας του μικροοργανισμού ή των κυττάρων.

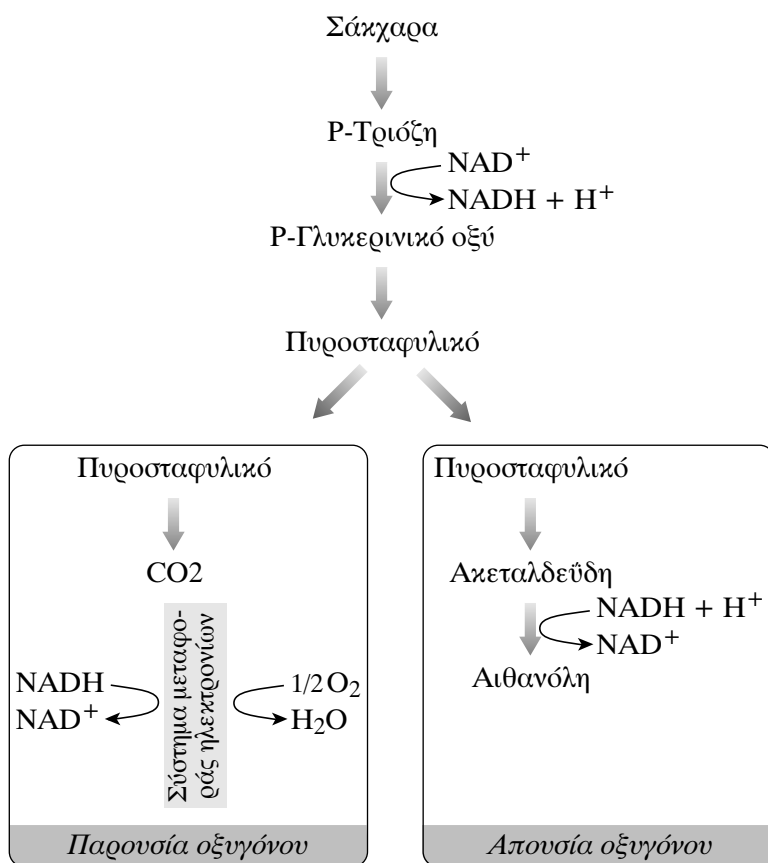
Να γίνεται έλεγχος παραγωγής των ενζύμων ή άλλων βιοτεχνολογικών προϊόντων στο γονιδιακό επίπεδο.



Σχ. 2.8. Διάταξη δοχείου καλλιέργειας α=αναβίωση, β=ανασπορά.

### 2.3. Μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια μικροοργανισμών

Ένα μεγάλο μέρος της Βιοτεχνολογίας επικεντρώνεται γύρω από την καλλιέργεια των μικροοργανισμών σε μεγάλη κλίμακα (10-500.000 λίτρα) για παραγωγή των κυττάρων αυτών καθαυτών π.χ. βιομάζα, ή για την παραγωγή μεταβολιτών ή πρωτεϊνών. Τέτοιου είδους μεγάλες καλλιέργειες συχνά αναφέρονται ως βιομηχανικές ζυμώσεις. Στην ουσία ζύμωση είναι μια βιολογική διεργασία που γίνεται απουσία αέρα (οξυγόνου). Η πρώτη μεγάλης κλίμακας διεργασία με μικροοργανισμούς ήταν η παραγωγή αλκοόλης ή ακετόνης-βουτανόλης. Η αιθανόλη παρασκευάζεται από την ζύμη αναγεννώντας οξειδωμένα νικοτιναμιδο-συνένζυμα απουσία οξυγόνου (σχήμα 2.9). Η ακετόνη και βουτα-



Σχ. 2.9. Αναγέννηση των πυριδινονουκλεοτιδίων στη ζύμη παρουσία ή απουσία οξυγόνου.

νόλη σχηματίζονται για τον ίδιο λόγο, αλλά στη περίπτωση αυτή ο οργανισμός που τα παράγει είναι απόλυτα αναερόβιος. Πάντως ο όρος «βιομηχανική ζύμωση» εφαρμόζεται σήμερα σε όλες της μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες μικροοργανισμών αν και οι περισσότερες απ' αυτές είναι αερόβιες. Αυτό είναι ειρωνικό γιατί η παροχή του οξυγόνου είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που περιορίζει την ομαλή λειτουργία των αεροβικών διεργασιών και ο σχεδιασμός μοντέρνων ζυμωτήρων επικεντρώνεται στην παροχή της απαραίτητης ποσότητας οξυγόνου. Αερόβιοι μικροοργανισμοί απαιτούν οξυγόνο για την ανάπτυξή τους. Περιορισμός της παροχής οξυγόνου οδηγεί στον περιορισμό της ανάπτυξής τους. Δυναμικοί αερόβιοι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτύσσονται απουσία οξυγόνου, αλλά οι ρυθμοί ανάπτυξης είναι χαμηλότεροι, οδηγώντας σε μεγαλύτερους χρόνους της βιοτεχνολογικής διεργασίας και η απόδοση σε κύτταρα ελαττώνεται αισθητά με την ταυτόχρονη ελάττωση των επιπέδων των προϊόντων.

### **2.3.1. Το πρόβλημα του οξυγόνου**

Μια ταχέως αυξανόμενη καλλιέργεια έχει πολύ μεγάλη απαίτηση για οξυγόνο. Υπάρχει δηλαδή μεγαλύτερη απαίτηση για διαλυμένο οξυγόνο. Το αέριο οξυγόνο θα πρέπει να διαλύεται στο υγρό καλλιέργειας έτσι ώστε να αλληλεπιδρά με το μεμβρανικό σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων και να επηρεάζει την οξειδωση των ανηγμένων συνενζύμων (σχήμα 2.9). Το πρωταρχικό πρόβλημα για την παροχή του οξυγόνου είναι ότι το οξυγόνο είναι πολύ αδιάλυτο σε υδατικά συστήματα. Θα πρέπει να σημειωθεί επίσης ότι καθώς η θερμοκρασία αυξάνει, η διαλυτότητα του οξυγόνου ελαττώνεται. Η διαλυτότητα του οξυγόνου επίσης ελαττώνεται καθώς η συγκέντρωση των διαφόρων διαλυμένων μεταβολιτών αυξάνει. Πάντως, η διαλυτότητα του οξυγόνου στο υγρό καλλιέργειας μπορεί να αυξηθεί, αυξάνοντας την πίεσή του στην αέριο φάση. Ένα δεύτερο πρόβλημα είναι ότι σε πολλές ζυμώσεις, ειδικά σε αυτές που περιλαμβάνουν καλλιέργειες νημαποειδών μικροοργανισμών όπως οι μύκητες ή οι ακτινομύκητες, το υγρό ανάπτυξης γίνεται αρκετά ιξώδες, οπότε ο παράγοντας που ελέγχει την διαδικασία είναι η μεταφορά του διαλυμένου οξυγόνου από το υγρό στα κύτταρα και όχι η μεταφορά του οξυγόνου από την αέριο στην υγρή φάση.

Για μικρές καλλιέργειες, π.χ. λιγότερο από ένα λίτρο, είναι δυνατόν να χορηγηθούν ικανοποιητικά ποσά οξυγόνου αναπτύσσοντας τους μικροοργανισμούς σε φιάλες με συνεχή ανακίνηση. Για μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με υψηλή απόδοση σε κύτταρα, η απαίτηση σε οξυγόνο μπορεί να καλυφθεί μόνο με διαβίβαση οξυγόνου μέσω του υγρού καλλιέργειας. Η αποτελεσματικότητα με την οποία οξυγόνο μεταφέρεται από τις φυσαλίδες αέρος στην υγρή φάση



εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής και το μέγεθος των φυσαλίδων στο υγρό ανάπτυξης και από τον τρόπο που αναπτύσσεται η καλλιέργεια π.χ. σε ζυμωτήρα ή όχι.

### 2.3.2. Βασικός σχεδιασμός ζυμωτήρα

Από τα παραπάνω φαίνεται πως ο βασικός σχεδιασμός ενός βιοαντιδραστήρα απαιτεί ένα μεγάλο κλειστό δοχείο με κατάλληλο σύστημα παροχής οξυγόνου και σύστημα ανάδευσης. Παρόλα αυτά, πολλοί άλλοι παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη όπως:

**Προσθήκη σωλήνων για τη δημιουργία φυσαλίδων** στα τοιχώματα του ζυμωτήρα μπορεί να κάνει αποτελεσματικότερη την μεταφορά οξυγόνου, καθώς αυξάνει τις αναταράξεις στο υγρό ανάδευσης.

**Είναι αναγκαίος ο έλεγχος αφρισμού** δεδομένου ότι σε υψηλές κυτταρικές αποδόσεις παρατηρείται έντονος αφρισμός της καλλιέργειας. Ο έντονος αφρισμός της καλλιέργειας είναι ανεπιθύμητος γιατί υγραίνεται το βαμβάκι του στομίου της φυάλης και προκαλούνται μολύνσεις. Συνεπώς, η προσθήκη αντιαφριστικού επιβάλλεται.

**Έλεγχος του pH.** Ο μεταβολισμός των περισσότερων μικροοργανισμών οδηγεί στην αλλαγή του pH της καλλιέργειας με ανάλογη αλλαγή της φυσιολογίας του μικροοργανισμού. Συνηθίζεται να γίνεται συνεχώς η ρύθμιση του pH με την προσθήκη οξέος ή αλκάλειος.

**Έλεγχος της θερμοκρασίας.** Οι μικροοργανισμοί παράγουν θερμότητα καθώς μεταβολίζουν τα διάφορα υποστρώματα. Για να διατηρηθεί η θερμοκρασία σταθερή τοποθετούνται εναλλάκτες θερμότητας με κρύο νερό γύρω από τον ζυμωτήρα.

**Επιπλέον προσθήκες.** Πρόβλεψη πρέπει να γίνει για να προστίθεται το ενοφθάλμισμα (αρχική μικρή καλλιέργεια) και το απαραίτητο υγρό καλλιέργειας.

## 2.4. Κριτήρια βιοτεχνολογικών διεργασιών

Τα κριτήρια στα οποία πρέπει να βασίζεται οποιαδήποτε βιοτεχνολογική διεργασία είναι τα εξής:

**Επιλογή της καλλιέργειας.** Πριν από την έναρξη μιας διεργασίας, η επιλογή του καταλληλότερου μικροοργανισμού από ένα τεράστιο πλήθος μικροοο-



γανισμών και η γενετική βελτίωσή του παρουσιάζουν τεράστιο ενδιαφέρον. Στη φάση αυτή απαιτούνται γνώσεις μικροβιολογίας, φυσιολογίας κυττάρου καθώς και γνώσεις κλασσικής ή μοριακής γενετικής.

**Μαζική καλλιέργεια** Για τις βιοτεχνολογικές διεργασίες πρέπει ο μικροοργανισμός που θα επιλεγεί να πολλαπλασιάζεται γρήγορα και σε μεγάλες ποσότητες. Η βιομάζα χρειάζεται να είναι σε μεγάλες ποσότητες είτε για τις πρωτεΐνες, είτε για την απομόνωση κάποιου ενζύμου, είτε ακόμη για τις ουσίες που παράγονται μέσα ή έξω από τα κύτταρα π.χ. αμινοξέα, αντιβιοτικά κ.α.

**Ανταπόκριση των κυττάρων κάτω από ειδικές συνθήκες.** Σε πολλές περιπτώσεις συγκεκριμένα προϊόντα λαμβάνονται μόνο κάτω από ειδικές συνθήκες που συνήθως διαφέρουν από εκείνες που απαιτούνται για την καλύτερη παραγωγή βιομάζας. Αλλαγές των συνθηκών καλλιέργειας ή παρεμβολή στις αντιδράσεις μεταβολισμού με υποστρώματα ή ανάλογα, μπορούν να οδηγήσουν σε συγκεκριμένα κατευθυνόμενη σύνθεση προϊόντων.

**Πορεία της διεργασίας.** Όπως είναι φανερό οι βιοτεχνολογικές διεργασίες δεν μπορούν να περιορισθούν σε ένα απλό στάδιο. Η ικανοποιητική εκτέλεση των διαδοχικών σταδίων, με ιδανικές συνθήκες λειτουργίας, ασφαλείας, ελέγχου και επαναληψιμότητας όλων των σταδίων είναι αυτό που πρέπει να προσχεδιαστεί με το σκεπτικό ότι είναι κατανοητοί οι βιολογικοί, βιοχημικοί και οικονομικοί παράγοντες που συμμετέχουν στη διεργασία αυτή.

**Απόδοση της παραγωγής του προϊόντος.** Κάθε παραγωγική διεργασία θεωρείται πλήρης εάν η απόδοση σε προϊόν είναι συμφέρουσα. Ο οφθαλμοφανής αυτός παράγων συνήθως δε λαμβάνεται υπόψη από τους ερευνητές των εργαστηρίων. Το πρόβλημα είναι πολύ οξύ στις βιοτεχνολογικές διεργασίες, γιατί εμφανίζονται πολλά προϊόντα με διαφορετικό κόστος ανάλογα με τη μέθοδο που ακολουθείται και τα υποπροϊόντα που παράγονται.

## 2.5. Βελτίωση βιομηχανικών μικροοργανισμών

Η αναζήτηση μικροοργανισμών που πιθανόν να χρησιμοποιηθεί από μια βιομηχανία γίνεται από την φύση και τότε μιλάμε για τα άγρια στελέχη ή τις υπάρχουσες τράπεζες μικροοργανισμών όπως το ίδρυμα American Type Culture Collection (ΗΠΑ), ή το ίδρυμα National Collection of Industrial Bacteria (Amberdeen, Σκωτία). Τα είδη αυτά των μικροοργανισμών που υπάρχουν στις τράπεζες έχουν ταξινομηθεί ανάλογα με την φυσιολογία και γενετική τους.

Στη βιοτεχνολογία, όταν βρεθεί ένας μικροοργανισμός που παράγει χρήσιμα προϊόντα, αρχίζει η προσπάθεια ώστε να γίνει βελτίωση του στελέχους αυτού με αποτέλεσμα την καλύτερη απόδοση του αναμενόμενου προϊόντος. Αυτό γίνεται με την αλλαγή των συνθηκών ανάπτυξης του μικροοργανισμού ή με γενετικούς χειρισμούς.

### 2.5.1. Επιλογή στελεχών

Είναι η παλαιότερη και απλούστερη μέθοδος αύξησης της παραγωγής και χρησιμοποιείται από τότε που ξεκίνησε η τεχνολογία ανάπτυξης των φυτών και ζώων. Η μέθοδος επιλογής (screening) εφαρμόζεται ακόμη και σήμερα για οποιαδήποτε βελτίωση στελέχους. Η επιλογή στελεχών με μεταλλάξεις άρχισε να εφαρμόζεται αφού έγινε γνωστό ότι χημικές ενώσεις προκαλούν μεταλλάξεις, δηλαδή δομικές αλλαγές στο γονιδίωμα ενός οργανισμού. Με τη μέθοδο αυτή τα τελευταία χρόνια έγινε σημαντική βελτίωση της παραγωγής πολλών προϊόντων.

### 2.5.2. Τύποι μεταλλάξεων

Οι μεταλλάξεις διακρίνονται σε:

1. **Γενομικές** μεταλλάξεις που αφορούν αλλαγές στον αριθμό των χρωμοσωμάτων.
2. **Χρωμοσωμικές** μεταλλάξεις που αφορούν τις αλλαγές που υφίστανται τα γονίδια μέσα στο χρωμόσωμα. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να προκύψουν με έλλειμμα, αναστροφή, μετατόπιση ή διπλασιασμό ενός τμήματος του γενετικού υλικού.
3. **Γονιδιακές** μεταλλάξεις ή μεταλλάξεις σημείου που αφορούν στις αλλαγές των βάσεων των νουκλεοτιδίων ενός γονιδίου.
4. **Μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου** που προκύπτει όταν προστεθεί ή αφαιρεθεί ένα νουκλεοτίδιο στην αλληλουχία που υπάρχει, με αποτέλεσμα την αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης (βλέπε ενότητα 3.2) κατά την μεταγραφή και μετάφραση. Αποτέλεσμα αυτής της μετατόπισης είναι, η πρωτεΐνη που προκύπτει να έχει εντελώς διαφορετική σειρά αμινοξέων.

### 2.5.3. Τρόποι μετάλλαξης

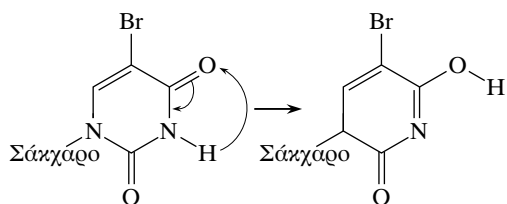
**A Χημική μετάλλαξη** Χημικές μεταλλάξεις έχουμε όταν γίνει τροποποίηση, αντικατάσταση ή απομάκρυνση των βάσεων του DNA μετά την επίδραση κάποιου χημικού αντιδραστήριου. Η δράση του χημικού αντιδραστήριου έγκειται στην τροποποίηση των βάσεων, η οποία προκαλεί τη μεταβολή της συ-

μπληρωματικότητάς τους, με τελικό αποτέλεσμα μια από τις μεταβολές της δομής του DNA που προαναφέρθηκαν. Π.χ. το νιτρώδες οξύ ( $\text{HNO}_2$ ) απαμινώνει την αδενίνη (A) σε υποξανθίνη, την κυτοσίνη (C) σε ουρακίλη (U) και την γουανίνη (G) σε ξανθίνη με αποτέλεσμα να αλλάξει η συμπληρωματικότητα και να προκαλούνται αλλαγές στα ζεύγη των βάσεων της μορφής  $\text{AT} \leftrightarrow \text{GC}$ . Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες είναι επίσης δραστικά μεταλλαξιογόνα. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων παραγόντων είναι το αιθυλομεθανοσουλφονικό (EMS), το μεθυλομεθανοσουλφονικό (MMS), το διαιθυλοσουλφονικό (DES), το διεποξυβουτάνιο (DEB), το διεποξυοκτάνιο (DEO) και η μεθυλο-νιτροσογουανιδίνη (NTG). Οι αλκυλιωτικοί παράγοντες προκαλούν αλκυλίωσεις βάσεων εκ των οποίων οι  $\text{O}_4$ -αλκυλοθυμίνη και  $\text{O}_6$ -αλκυλογουανίνη έχουν ως αποτέλεσμα αντικαταστάσεις ζευγών βάσεων. Το NTG είναι η ουσία που χρησιμοποιείται σήμερα περισσότερο, αλλά είναι ισχυρά καρκινογόνος.

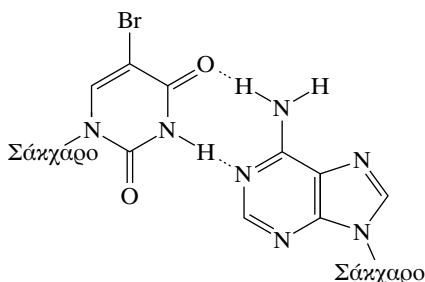
Χημικά ανάλογα των βάσεων του DNA μπορούν να ενσωματωθούν κατά την αντιγραφή του DNA λόγω της ομοιότητάς τους με τις βάσεις των πουρινών και πυριμιδινών, όπως π.χ. η 5-βρωμοουρακίλη (BU) και η 2-αμινοπουρίνη. Η BU, που είναι ανάλογο της θυμίνης (T), συναντάται σε δυο ταυτομερείς μορφές την κετο και την ενολική. Η κετο μορφή, σε αντιστοιχία με την T, σχηματίζει ζεύγος με την A, ενώ η ενολική με την G. Η ισορροπία κετο μορφής και ενολικής είναι μετατοπισμένη προς την ενολική μορφή, εξαιτίας της παρουσίας του Br στη θέση 5 (σχήμα 2.10), όπου αντίστοιχα στη T υπάρχει η μεθυλική ομάδα. Έτσι εάν η BU ενσωματωθεί στο DNA κατά τη διάρκεια του αναδιπλασιασμού του στη θέση της T, θα υβριδίζεται με μια G αντί με A, με μια συγκεκριμένη συχνότητα σε κάθε γενιά. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η αντικατάσταση των A-T ζευγών από G-C ζεύγη. Με παρόμοιο τρόπο η 2-αμινοπουρίνη, που είναι ανάλογο της A, οδηγεί στην αντικατάσταση της T από C και τελικά στην αντικατάσταση πάλι των ζευγών A-T από G-C.

Τα ανάλογα βάσεων δεν χρησιμοποιούνται για βιομηχανικό σκοπό γιατί είναι πολύ δύσκολο να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες μεταλλαξιογένεσης των μικροοργανισμών, των οποίων η γενετική τους είναι επίσης λίγο γνωστή.

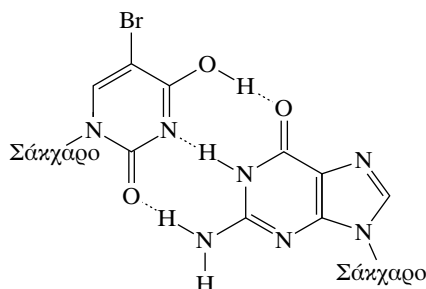
Το αποτέλεσμα των μεταλλαξιογόνων είναι δύσκολο να προβλεφθεί και εξαρτάται κυρίως από τις συνθήκες υπό τις οποίες γίνεται η μεταλλαξιογένεση. Αυτές είναι το pH, η συγκέντρωση της χημικής ένωσης, το ρυθμιστικό διάλυμα και η φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται ο μικροοργανισμός. Σε ένα γονίδιο υπάρχουν περιοχές που μεταλλάσσονται με μεγαλύτερη συχνότητα. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται **καυτά σημεία** (hot spots). Πρέπει να σημειωθεί ότι η μεταλλαξιογόνος ένωση μπορεί να προκαλέσει τέτοιες αλλαγές στο DNA, που να έχουν ως αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου. Είναι φανερό ότι μικρό



Κετο – Ενολική μετατόπιση



(Κετο) BrdU – Α ζεύγος βάσεων



(Ενολική) BrdU – G ζεύγος βάσεων

**Σχ. 2.10.** Η ισορροπία κετο-ενολικής μορφής είναι μετατοπισμένη προς την ενολική, εξαιτίας του Br στην 5 θέση. Η κετο μορφή υβριδίζεται με την Α, ενώ η ενολική με την G.

ποσοστό επιζώντων κυττάρων υποδηλώνει πολλές σημαντικές μεταβολές στο DNA των μη επιζώντων, δηλαδή παρατεταμένη επίδραση του μεταλλαξιόγνου. Επομένως όσο μικρότερο είναι το ποσοστό των επιζώντων κυττάρων, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των μεταλλάξεων. Τελικά, τα μεταλλαγμένα στελέχη επιλέγονται από τα κύτταρα που επιζούν ύστερα από την έκθεση στην μεταλλαξιγόνο ένωση.

### **B Φυσική μετάλλαξη**

Ακτίνες πλούσιες σε ενέργεια διαφορετικής προέλευσης χρησιμοποιούνται σαν φυσικά μεταλλαξιγόνα. Οι ακτίνες X χρησιμοποιήθηκαν εδώ και πολλά χρόνια σε τεχνικές μεταλλάξεων. Οι ακτίνες X όμως παρουσιάζουν κοψίματα στο γενετικό υλικό, αφαιρούν ολόκληρα κομμάτια κλπ. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί σημειακές μεταλλάξεις όπως, διμερισμό μεταξύ των βάσεων της θυμίνης. Οι μεταλλάξεις υπεριώδους μπορούν να διορθωθούν από τους διορθωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Η υπεριώδης ακτινοβολία μεγάλου μήκους κύματος (300-400 nm) δεν είναι μεταλλαξιγόνας, εκτός αν η αντίδραση γίνει παρουσία διαφόρων χρωστικών, όπως τα παράγωγα του ψοραλενί-

ου. Τα παράγωγα αυτά μπαίνουν ανάμεσα στα ζεύγη των βάσεων της διπλής έλικας του DNA και σχηματίζουν σύμπλοκα με πυριμιδίνες, καταστέλλοντας τις συμπληρωματικές αλληλεπιδράσεις των βάσεων. Τελευταία, για την έναρξη μεταλλάξεων χρησιμοποιούνται διάφορα ισότοπα.

**Γ Μετάλλαξη με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA** Σε αντίθεση με τις τεχνικές που περιγράφηκαν πιο πάνω κατά τις οποίες έχουμε τυχαίες μεταλλάξεις ή λάθη, η τεχνική του ανασυνδυασμένου DNA δίνει επιθυμητά αποτελέσματα με συγκεκριμένες γενετικές αλλαγές. Σήμερα η τεχνική αυτή έχει αναπτυχθεί πάρα πολύ και έχει βοηθήσει πολλές επιστήμες. Λεπτομερής περιγραφή της γίνεται στο επόμενο κεφάλαιο.

#### 2.5.4. Απομόνωση των μεταλλαγμένων στελεχών

Για την απομόνωση οποιουδήποτε μεταλλαγμένου στελέχους από ένα συγκεκριμένο πληθυσμό που έχει υποστεί φυσική ή χημική μετάλλαξη απαιτείται ένα σύστημα επιλογής του μεταλλαγμένου στελέχους. Χρησιμοποιούνται συνήθως μηχανισμοί επιλογής μεταλλαγμένων στελεχών που βασίζονται είτε στην απαίτηση των μεταλλαγμένων στελεχών για συγκεκριμένες ουσίες του υγρού καλλιέργειας, είτε στην αντίστασή τους σε συγκεκριμένες ενώσεις, είτε στην ευαισθησία τους σε διάφορες θερμοκρασίες. Η καθιέρωση ενός συστήματος επιλογής μεταλλαγμένων στελεχών για την αύξηση κάποιου πρωτεύοντα ή δευτερεύοντα μεταβολίτη ή κάποιου ενζύμου είναι πολύ πιο πολύπλοκη διαδικασία. Υπάρχουν σήμερα πολλά παραδείγματα απομόνωσης μεταλλαγμένων στελεχών. Ένα κλασικό παράδειγμα είναι η επιλογή του στελέχους *P. chrysogenum* το οποίο παράγει πενικιλίνη σε υψηλά επίπεδα. Στην περίπτωση του μικροοργανισμού *Streptomyces griseus*, που παράγει το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη, το αρχικό στέλεχος συνέθετε μικρά ποσά στρεπτομυκίνης και σε μεγάλα ποσά μια συγγενική ένωση τη μαννοσιδοστρεπτομυκίνη (στρεπτομυκίνη Β). Τελικά απομονώθηκε ένα στέλεχος που παρήγαγε ελάχιστα ποσά της μη επιθυμητής στρεπτομυκίνης Β και τεράστια ποσά του επιθυμητού αντιβιοτικού.

Η πιθανότητα απομόνωσης του κατάλληλου μεταλλαγμένου στελέχους μπορεί να βελτιωθεί αυξάνοντας τη συχνότητα των μεταλλάξεων. Μια εξίσου καρποφόρος μέθοδος είναι να σχεδιαστεί ένα πρωτόκολλο με βάση το οποίο τα μεταλλαγμένα στελέχη να αναπτύσσονται σε πλούσιο θρεπτικό υλικό πολύ περισσότερο από ότι το αρχικό στέλεχος. Μέθοδοι επιλογής με έγχρωμες αντιδράσεις για την ταυτοποίηση των αποικιών των μεταλλαγμένων στελεχών είναι πολύ χρήσιμες.

Επίσης η ανθεκτικότητα έναντι αντιβιοτικών ή άλλων τοξικών ουσιών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιλεκτική απομόνωση μεταλλάξεων: συνήθως

κύτταρα καλύπτουν την επιφάνεια του άγαρ ενός τριβλίου που περιέχει το αντιβιοτικό ή την τοξική ουσία, οπότε θα αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα που είναι ανθεκτικά στην αντίστοιχη ένωση. Τα μεταλλαγμένα κύτταρα που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά έχουν μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον, γιατί η παρουσία ενός αντιβιοτικού στον βιοαντιδραστήρα ελαττώνει την πιθανότητα μόλυνσης της καλλιέργειας από άλλους μικροοργανισμούς. Μεταλλάξεις ανθεκτικές σε αντιμεταβολίτες (τοξικά χημικά ανάλογα μεταβολιτών) έχουν επίσης σήμερα πολλές εφαρμογές. Οι αντιμεταβολίτες λόγω της ομοιότητάς τους με τα φυσιολογικά μόρια προκαλούν ανάστροφη παρεμπόδιση πολλών βιολογικών δρόμων με αποτέλεσμα να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων ή να προκαλούν ακόμα και το θάνατό τους.

Τέλος η μεταφορά γονιδίων με σχηματισμό υβριδίων με πρωτοπλάστες παρουσιάζει μια νέα προσέγγιση στο πρόβλημα. Οι πρωτοπλάστες παρασκευάζονται ύστερα από κατεργασία των κυττάρων με διάφορα υδρολυτικά ένζυμα και τα προκύπτοντα στελέχη σχηματίζουν ανασυνδυασμένους κλώνους. Υβρίδια πρωτοπλαστών έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία π.χ. στο μικροοργανισμό *C. acronotium* στον οποίο γνωστοί γενετικοί χειρισμοί δεν ήταν δυνατόν να γίνουν. Βρέθηκαν ανασυνδυασμένα στελέχη που παράγουν πολύ περισσότερη κεφαλοσπορίνη C από ότι ο πατρικός κλώνος και στελέχη που παράγουν κεφαλοσπορίνες επιτυχώς από ανόργανο θείο.