ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΑΣΗΣ ΑΠΟ ΑΠΟΒΛΗΤΑ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΝΟΥ”

Κουμπούνης Δημήτριος

Επιβλέπων: Δρ. Γκέκας Βασίλειος

Μέλη εξεταστικής επιτροπής: Δρ. Βασίλειος Γκέκας, Καθηγητής
Δρ. Δανάη Βενιέρη, Λέκτορας
Δρ. Νικόλαος Παρανυχιανάκης, Λέκτορας

Χανιά, Αύγουστος 2010

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή Δρ. Γκέκα Βασίλειο για την αμέριστη βοήθεια και εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την κατανόηση που έδειξε στις δύσκολες συνθήκες κάτω από τις οποίες κατάφερα να φέρω εις πέρας την ολοκλήρωση της διπλωματική μου αυτής εργασίας.

Επιπλέον ευχαριστώ τη Δρ. Βενιέρη Δανάη για τις κατευθυντήριες συμβουλές της όσον αφορά την αναζήτηση πηγών και ηλεκτρονικών πληροφοριών.

Επίσης θα ήθελα να αναφέρω τους νυν και τέως συμφοιτητές μου, Μουρτζανό Κωνσταντίνο, Νικολάου Άρη, Γαλάνη Δημήτριο και Χόρμπα Νέλλη, για την αμέριστη ηθική συμπαράστασή τους σε όλη αυτή την προσπάθειά μου.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου για όλα όσα μου έχουν προσφέρει μέχρι τώρα, αγαθά ανεκτίμητα τα οποία δεν δύνανται περιγραφής.

Περίληψη

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα ή πρωτεάσες είναι ένζυμα που κάτω από κατάλληλες συνθήκες υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών. Οι μέθοδοι ομαδοποίησης πεπτιδάσεων περιλαμβάνουν: το χημικό μηχανισμό της κατάλυσης, τις λεπτομέρειες της αντίδρασης που καταλύεται, και τη μοριακή δομή και την ομοιομορφία. Κρυσταλλογραφικές δομές τους, δείχνουν ότι η ενεργός θέση βρίσκεται συνήθως σε ένα ‘‘αυλάκι’’ στην επιφάνεια του μορίου. Η αναστολή τους γίνεται είτε με το μηχανισμό *Laskowski*, είτε με μια αντίδραση παγίδευσης. Εφαρμογές πρωτεολυτικών ενζύμων συναντάμε στα απορρυπαντικά, τη τυροκομία, κτλ. Μια νέο πρωτεάση, που ανήκει στις μεταλλοπρωτεάσες, απομονώνεται από τον *Bacillus cereus*.

Ο *Bacillus cereus* είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, η δομή του είναι παρόμοια με αυτή των άλλων βακίλων, παράγει σπόρια ανθεκτικά σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και οι θρεπτικές του απαιτήσεις είναι ελάχιστες και γι’ αυτό βρίσκεται σε χαμηλό ποσό στα απόβλητα. Παρουσιάζει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, και γενικά τα είδη αυτά εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα εξωενζύμων, μεταξύ των οποίων ουδέτερες μεταλλοπρωτεάσες. Μια τέτοια μεταλλοπρωτεάση με υψηλή ομολογία στην θερμολυσίνη είναι η καμελυσίνη (camelysin), η οποία παρουσιάζει μια μοναδικότητα στη Ν-τερματική αλληλουχία της. Στην ενεργή της θέση υπάρχει ένα μόριο Zn και η δραστηριότητά της αναστέλλεται από χηλικούς παράγοντες. Διάφορες επιδράσεις στη δραστηριότητά της έχουν μελετηθεί με διάφορα κλάσματα πρωτεϊνικών αποβλήτων τόνου, διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου και διάφορα επιφανειδραστικά. Η ουδέτερη περιοχή pH φαίνεται να είναι το βέλτιστο για μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα, ενώ η σταθερότητα του ενζύμου σε μεταβολές θερμοκρασίας το κάνει ιδιαίτερο. Η σύνθεση μεγάλης κλίμακας πεπτιδίων και η παραγωγή πρωτεϊνικών υδρολυμάτων τροφής είναι κάποιες από τις εφαρμογές της καμελυσίνης.

Με χρήση του προγράμματος SuperPro Designer μπορεί να γίνει μια ικανοποιητική προσομοίωση της απομόνωση της καμελυσίνης από υγρά απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου. Η προσομοίωση ανάκτησης του ενζύμου περιλαμβάνει τρεις τομείς επεξεργασίας: 1)τον τομέα της ζύμωσης, όπου τα μέσα ζύμωσης προετοιμάζονται σε μια δεξαμενή ανάμιξης και αποτελούν μαζί με την αμμωνία (σαν πηγή νιτρικών) και τον αποστειρωμένο αέρα την τροφοδοσία ενός συνεχούς αντιδραστήρα πλήρους ανάδευσης. 2)τον πρωταρχικό τομέα ανάκτησης, όπου η συγκομιδή κυττάρων με μείωση του όγκου της καλλιέργειας και απομάκρυνση των ακαθαρσιών, γίνεται χρησιμοποιώντας ένα φυγοκεντρωτή, δύο διαδοχικές μονάδες υπερδιήθησης και μια μονάδα κατά μετώπου διήθησης στην οποία απομακρύνονται τα εναπομείναντα κυτταρικά διαλυμένα μέρη, και 3)τον τομέα καθαρισμού, όπου μια στήλη χρωματογραφίας ιονανταλλαγής, μια μονάδα υπερδιήθησης και επακόλουθα μια μονάδα χρωματογραφίας gel και μια διεργασία διαδιήθησης στην οποία μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η συγκέντρωση των αλάτων του διαλύματος, προηγούνται της τελικής διεργασίας για τον καθαρισμό της καμελυσίης, την κρυοξήρανση. Η προσομοίωση αυτή δείχνει ότι είναι εφικτή η μαζικότερη εφαρμογή του ενζύμου με υψηλά ποιοτικά χαρακτηριστικά.

Τα αποτελέσματα της έρευνας είναι ενθαρρυντικά για την πιθανή χρήση όχι μόνο της καμελυσίνης, αλλά και άλλων ενζύμων, που μπορούν να ανακτηθούν με την ίδια μέθοδο, σε εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας όπως στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας με υψηλής ποιότητας τροφές, χαμηλό κόστος σε σχέση με το αποτέλεσμα και ταυτόχρονα αφθονία ενζυμικής πηγής με χαμηλή εμπορική αξία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 0: Εισαγωγή

Η βιολογική ποικιλομορφία των θαλάσσιων και αυτών που αποτίθενται σε εκβολή ειδών παρέχει μια ευρεία σειρά ενζύμων με μοναδικές ιδιότητες. Τα τελευταία χρόνια οι πρωτεάσες από τα εντόσθια των ψαριών λαμβάνουν μεγάλη προσοχή. Αυτό συνεισφέρει στην ανάπτυξη υψηλών προστιθέμενων εφαρμογών ή προϊόντων με τη χρησιμοποίηση πρωτεϊνών βοηθημένων ενζύμων χώνευσης από διάφορες πηγές όπως τα θαλάσσια ζώα.

Η επέκταση της βιοτεχνολογίας έχει δημιουργήσει μια αυξανόμενη ζήτηση για καινούργιες και χαμηλού κόστους πρωτεϊνικές πηγές. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υψηλής ποιότητας, τα ψάρια αντιπροσωπεύουν μία δυναμική πηγή βιομηχανικών πεπτονών για μια ευρεία κλίμακα εφαρμογών. Οι μονάδες πάχυνσης τόνου παράγουν αξιοσημείωτες ποσότητες βιο-προϊόντων σαν απόβλητα τα οποία έχουν συχνά υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, που μπορούν να επεξεργαστούν σε χρήσιμα προϊόντα.

Ένα σχετικά νέο ένζυμο που βρίσκεται στα εντερικά βακτηρίδια του τόνου είναι ένας άθικτος βιο-πόρος για ενζυμική παραγωγή. Η απομόνωση και παραγωγή μιας νέας αλοφιλικής και σταθερής σε μεταβολές θερμοκρασίας πρωτεάσης από το *Bacillus cereus,* η οποία ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των μεταλλοενδοπεπτιδάσεων, χωρίς να έχει μέχρι στιγμής προσδιοριστεί η πλήρης αλληλουχία αμινοξέων της, ερευνάται ως προς τις ιδιότητές της. Η σταθερότητα στη μεταβολή της θερμοκρασίας και η ανοχή της πρωτεάσης αυτής την κάνουν ικανή να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλούς βιομηχανικούς σκοπούς συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανίας απορρυπαντικών.

Η χρήση εξελιγμένων ηλεκτρονικών προγραμμάτων μπορεί να επιφέρει ικανοποιητικά αποτελέσματα στο σχεδιασμό μοντέλων, τα οποία θα προσομοιώνουν την απομόνωση και ανάκτηση ενζύμων από πρωτεϊνικές πηγές χαμηλού κόστους όπως τα υγρά απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου.

Συμπεριλαμβανομένων των ανωτέρω εν λόγω γεγονότων στην παρούσα εργασία θα ερευνηθούν οι ιδιότητες ενός νέου ενζύμου (καμελυσίνη), που απομονώνεται από τον *Bacillus cereus* στο έντερο του ψαριού τόνου και ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των μεταλλοενδοπρωτεασών. Με τη χρήση του προγράμματος SuperPro Designer προσομοιώνεται η ανάκτηση της καμελυσίνης από υγρά απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ένζυμα

1.1 Ορισμός

Τα ένζυμα είναι βιοκαταλύτες που επιταχύνουν το ρυθμό των χημικών αντιδράσεων. Το ένζυμο, που παραμένει ανέπαφο και μπορεί να συνεχίσει να λαμβάνει μέρος σε περαιτέρω αντιδράσεις, δρα σε ένα περιορισμένο αριθμό υποστρωμάτων και καταλύει ένα συγκεκριμένο τύπο αντίδρασης. Η εξειδίκευση και η καταλυτική ενεργότητα ενός ενζύμου εξαρτώνται από τη χημική του δομή και τη μοριακή κατασκευή του (Howell, 1996).

Τα ένζυμα από χημική άποψη είναι πρωτεΐνες (Howell, 1996). Η μελέτη τους οδήγησε σε αυτή τη διαπίστωση γιατί: α) ένζυμα και πρωτεΐνες έχουν παραπλήσιες αναλογίες άνθρακα, υδρογόνου, οξυγόνου, θείου και φωσφόρου, β) η υδρόλυση των ενζύμων αποδίδει αμινοξέα, γ) πρωτεΐνες και ένζυμα εκδηλώνουν παρόμοια συμπεριφορά στις μεταβολές του pH και σε ηλεκτρικό πεδίο και δ) πρωτεΐνες και ένζυμα μετουσιώνονται με τους ίδιους παράγοντες (Κατσίκας, 1996).

Ως προς τη δομή τους τα ένζυμα είναι σφαιρικές πρωτεΐνες με πολύ διαφορετικά μεγέθη μορίων. Η πρωτεϊνική δομή καθορίζεται από την αλληλουχία αμινοξέων και από τη δευτεροταγή και τριτοταγή διαμόρφωσή της. Τα μεγαλύτερα ενζυμικά μόρια αποτελούνται συχνά από δύο ή περισσότερες πεπτιδικές αλυσίδες που διευθετούνται σε μια συγκεκριμένη τεταρτοταγή δομή. Η τρισδιάστατη δομή του ενζυμικού μορίου ευθύνεται για την εξειδίκευσή του και τον αποτελεσματικό ρόλο του ως καταλύτη. Η πρωτεϊνική φύση του ενζύμου περιορίζει τη δραστικότητά του σε μια μικρή σχετικά περιοχή του pH και η θερμική επεξεργασία οδηγεί εύκολα σε απώλεια δραστικότητας λόγω μετουσίωσης.

1.2 Ταξινόμηση ενζύμων

Η Επιτροπή Ονοματολογίας της ‘‘Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας’’(IUBMB), θέσπισε κανόνες που για τη συστηματική ταξινόμηση και προσδιορισμό των ενζύμων με βάση την εξειδίκευση της αντίδρασης. Όλα τα ένζυμα ταξινομούνται σε έξι σημαντικές κατηγορίες σύμφωνα με τη φύση της χημικής αντίδρασης που καταλύεται.

Κάθε κατηγορία υποδιαιρείται έπειτα σε υποκατηγορίες που δείχνουν πιο συγκεκριμένα τον τύπο αντίδρασης και κάθε υποκατηγορία διαιρείται περαιτέρω σε υπο-υποκατηγορίες. Παραδείγματος χάριν, οι υπο-υποκατηγορίες των οξειδορεδουκτασών επισημαίνονται με την ονομασία του δέκτη που δέχεται το ηλεκτρόνιο από τον αντίστοιχο δότη του.

Οι έξι σημαντικότερες κατηγορίες διακρίνονται με τον ακόλουθο τρόπο:

- ***Οξειδορεδουκτάσες***

Καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής. Η συστηματική ονομασία τους έχει τη μορφή "δότης:δέκτης οξειδορεδουκτάση", όπου ο δότης είναι το μόριο που οξειδώνεται (δίνοντας ένα μόριο υδρογόνου ή ένα ηλεκτρόνιο). Η συνιστώμενη κοινή τους ονομασία έχει τη μορφή "δότης δεϋδρογενάση", εκτός αν O_2 είναι ο δέκτης, οπότε επιτρέπεται ο όρος "δότης οξειδάση". Η υποκατηγορία περιγράφει την χημική ομάδα στο δότη που οξειδώνεται πραγματικά (π.χ. μία αλκοολ-, κετο- ή αλδο-ομάδα). Οι υπο-υποκατηγορίες συνήθως, αλλά όχι πάντα, διαχωρίζουν τους δέκτες.

- ***Τρανσφεράσες***

Καταλύουν τη μεταφορά ομάδων από το ένα μόριο στο άλλο. Η συστηματική τους ονομασία έχει τη μορφή "δότης: δέκτης ομαδοτρανσφεράση". Τα συνιστώμενα κοινά ονόματα είναι "δότης ομαδοτρανσφεράση" ή "δέκτης ομαδοτρανσφεράση". Οι υποκατηγορίες διαχωρίζουν με ένα γενικό τρόπο τις διάφορες ομάδες που μεταφέρονται και οι υπο-υποκατηγορίες διαχωρίζουν με περισσότερη λεπτομέρεια τις μεταφερόμενες ομάδες.

- ***Υδρολάσες***

Καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση των δεσμών C-C, C-N, C-O ή O-P. Στην ουσία είναι αντιδράσεις μεταφοράς ομάδων αλλά ο δέκτης είναι πάντα το νερό. Γι' αυτό το λόγο, και πιθανότατα εξ' αιτίας της συχνής εμφάνισης και της σημασίας τον υδρολασών, απαιτείται να βρίσκονται σε δική τους κατηγορία. Επειδή οι αντιδράσεις είναι σχετικά απλές (δύο υποστρώματα, ένα εκ των οποίων είναι πάντα το νερό) η συστηματική ονομασία τους είναι εξίσου απλή: "υποστωμαϋδρολάση". Η υποκατηγορία δείχνει την ανάγκη για τον καθορισμό του δεσμού που υδρολύεται και η υπο-υποκατηγορία καθορίζει τη φύση του υποστρώματος.

- ***Λυάσες***

Καταλύουν αντιδράσεις αποκλεισμού που καταλήγουν στη διάσπαση δεσμών C-C, C-O, C-N ή μερικών άλλων δεσμών, ή στην προσθήκη που ισοδυναμεί με την αντιστροφή αυτών των αντιδράσεων. Τα συστηματικά ονόματα γράφονται ως "υπόστρωμα ομαδολυάση". Οι υποκατηγορίες περιλαμβάνουν ένζυμα που καταλύουν διαφορετικούς δεσμούς και οι υπο-υποκατηγορίες διαχωρίζουν τα ένζυμα βάση της ταυτότητας της ομάδας που αποκλείεται.

- ***Ισομεράσες***

Καταλύουν δομικές αναδιαμορφώσεις. Τα ονόματά τους ανταποκρίνονται στο είδος των ισομερισμών που γίνονται από τα μέλη των διαφορετικών υποκατηγοριών. Οι υπο-υποκατηγορίες βασίζονται στη φύση του υποστρώματος.

- ***Λιγάσες***

Καταλύουν τη δημιουργία δεσμών που συνδυάζεται με την υδρόλυση ενός υψηλής ενέργειας φωσφορικού δεσμού. Τα συστηματικά ονόματα γράφονται "A:B λιγάση". Οι υποκατηγορίες δημιουργούνται βάση του δεσμού που σχηματίζεται και οι υπο-υποκατηγορίες υπάρχουν μόνο για τις C-N λιγάσες (Smith, 1995).

Στον παρακάτω πίνακα δίνονται οι σημαντικότερες κατηγορίες ενζύμων κατά (IUBMB), ο αριθμός της κατηγορίας (EC No) και η αντίδραση που η κάθε κατηγορία καταλύει.

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση ενζύμων κατά IUBMB.

Αριθμός κύριας κατηγορίας (EC No)	**Κατηγορία**	**Αντίδραση που καταλύεται**
1	Οξειδορεδουκτάσες	οξειδοαναγωγή
2	Τρανσφεράσες	μεταφορά ομάδας
3	Υδρολάσες	υδρόλυση
4	Λυάσες	διασπούν C-C, C-O, C-N και άλλες ομάδες με αποβολή, αφήνοντας διπλούς δεσμούς, ή αντιθέτως προσθέτοντας ομάδες σε διπλούς δεσμούς
5	Ισομεράσες	που περιλαμβάνονται στην κατάλυση ισομεριώσεων μέσα σε ένα μόριο
6	Λιγάσες	που περιλαμβάνονται στη βιοσύνθεση μιας ένωσης με ταυτόχρονη υδρόλυση ενός πυροφωσφορικού δεσμού ATP ή ενός παρόμοιου τριφωσφορικού

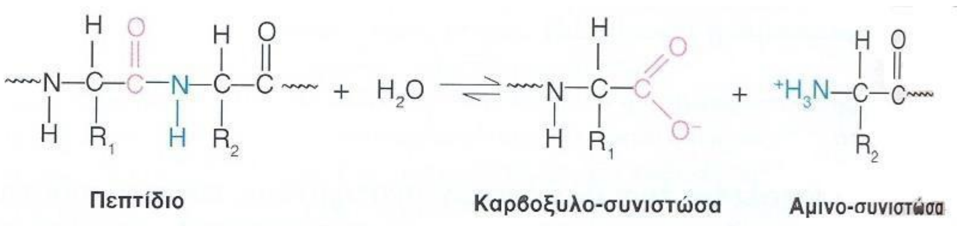
Πηγή: H.-D. Belitz, "Χημεία Τροφίμων", 2006.

1.3 Πρωτεολυτικά ένζυμα

1.3.1 Εισαγωγή

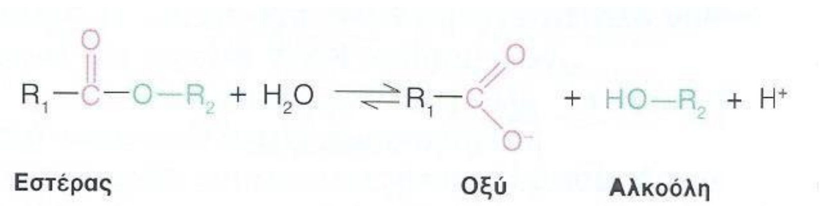
Τα πρωτεολυτικά ένζυμα ή πεπτιδάσες (στην καθομιλουμένη είναι γνωστά σαν πρωτεάσες ή πρωτεϊνάσες) είναι ένζυμα που κάτω από κατάλληλες συνθήκες υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών, ανήκουν δηλαδή στην κατηγορία *των* υδρολασών. Είναι απαραίτητα για την επιβίωση όλων των ζωντανών πλασμάτων και κωδικοποιούνται από περίπου 2% των γονιδίων σε όλα τα είδη οργανισμών. Έχει υπολογιστεί ότι 14% των πεντακοσίων ανθρώπινων πεπτιδάσεων είναι υπό έρευνα σαν στόχοι φαρμάκων (Southan, 2001).

Η αντίδραση που καταλύεται από αυτά τα ένζυμα φαίνεται στη παρακάτω εικόνα.



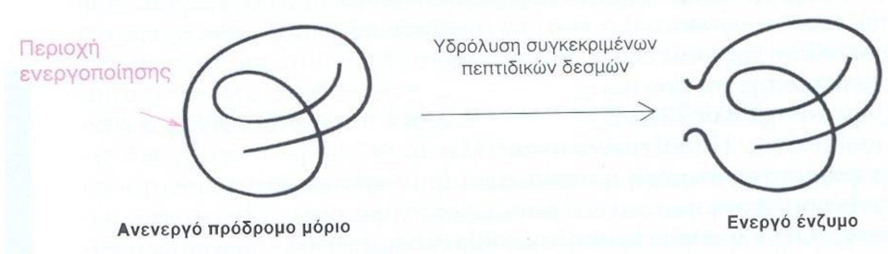
Εικόνα 1.1: Γενική αντίδραση υδρόλυσης πεπτιδικού δεσμού από πρωτεολυτικό ένζυμο.
Πηγή: Lubert Stryer, Βιοχημεία..

Επίσης τα περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα καταλύουν την υδρόλυση ενός εστερικού δεσμού, που είναι μια διαφορετική αλλά σχετική αντίδραση.



Εικόνα 1.2: Υδρόλυση εστερικού δεσμού.
Πηγή: Lubert Stryer, Βιοχημεία.

Τα ενζυμικών ανενεργά πρόδρομα μόρια των πρωτεολυτικών ενζύμων ονομάζονται ζυμογόνα (zymogens). Η ενεργοποίηση του ζυμογόνου γίνεται με υδρόλυση συγκεκριμένων πεπτιδικών δεσμών.



Εικόνα 1.3: Ενεργοποίηση ζυμογόνου από ανενεργό πρόδρομο μόριο.
Πηγή: Lubert Stryer, Βιοχημεία.

Όλα τα πρωτεολυτικά ένζυμα έχουν χαρακτηριστικές ιδιότητες σε σχέση με το pH και τη θερμοκρασία, τις απαιτήσεις σε ιόντα, την εξειδίκευση, τη δραστικότητα και τη σταθερότητα. Η εξειδίκευση εξαρτάται από τα αμινοξέα που σχηματίζουν τον πεπτιδικό δεσμό που θα υδρολυθεί. Αυτές οι βιοχημικοί παράμετροι καθορίζουν τη χρήση μίας πρωτεάσης. Πάντως η δυνατότητα εμπορικής εκμετάλλευσης μιας πρωτεάσης εξαρτάται επίσης από το κόστος ανάπτυξης και παραγωγής του ενζύμου και τις ανάγκες της αγοράς (Poldermans, 1990).

1.3.2 Ιδιότητες

1.3.2.1 Καταλυτικός τύπος

Ο *καταλυτικός τύπος* μιας πεπτιδάσης σχετίζεται με τις χημικές ομάδες που είναι υπεύθυνες για την κατάλυσή τους από υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού. Οι έξι συγκεκριμένοι καταλυτικοί τύποι που είναι αναγνωρισμένοι είναι οι πεπτιδάσες της σερίνης, θρεονίνης, κυστεΐνης, ασπαραγίνης, γλουταμίνης και μεταλλοπεπτιδάσες.

Στις πεπτιδάσες τους είδους σερίνης, θρεονίνης και κυστεΐνης, το καταλυτικό υλικό δότης ηλεκτρονίων είναι η δραστική ομάδα μιας πλευρικής αλυσίδας αμινοξέος, είτε μια ομάδα υδροξυλίου (πεπτιδάσες σερίνης και θρεονίνης) είτε μιας σουλφυδρυλ-ομάδας (πεπτιδάση της κυστεΐνης).

Στις ασπαρτικές και μεταλλοπεπτιδάσες, το υλικό δότης ηλεκτρονίων είναι συνήθως ένα ενεργοποιημένο μόριο νερού. Στις πεπτιδάσες του ασπαραγινικού οξέος, το μόριο νερού είναι άμεσα συνδεδεμένο με τις πλευρικές αλυσίδες των υπολειμμάτων ασπαραγινικού οξέος.

Στις μεταλλοπεπτιδάσες, ένα ή δύο δισθενή ιόντα μετάλλων κρατούν το μόριο του νερού σε ισχύ και οι φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες αμινοξέος είναι δεσμευτές για τα ιόντα μετάλλων. Το μέταλλο είναι συνηθέστερα ψευδάργυρος, αλλά μπορεί επίσης να είναι κοβάλτιο, μαγγάνιο ή χαλκός. Οι πεπτιδάσες της γλουταμίνης (όλες στη μικρή οικογένεια Gl) αναγνωρίστηκαν το 2005 (Kataoka *et al.*, 2005) και αρκετά πράγματα απομένουν να μαθευτούν σχετικά με τους καταλυτικούς μηχανισμούς τους, αλλά φαίνονται να υιοθετούν μια Glu/Gln καταλυτική δυάδα. Μόνο λίγες πεπτιδάσες είναι ακόμα άγνωστου καταλυτικού τύπου.

1.3.2.2 Ενεργό κέντρο

Ένα ενζυμικό μόριο όταν συγκρίνεται με το υπόστρωμά του, είναι συχνά μεγαλύτερο από στο μέγεθος κατά ένα παράγοντα πολλών τάξεων μεγέθους. Αυτό υποδηλώνει έντονα ότι στην κατάλυση μόνο ένας μικρός τόπος του ενεργού κέντρου έχει άμεση επαφή με το υπόστρωμα. Συγκεκριμένα μέρη της πρωτεϊνικής δομής συμμετέχουν στην καταλυτική διαδικασία από τη δέσμευση του υποστρώματος έως την απελευθέρωση προϊόντων από το αποκαλούμενο ενεργό κέντρο. Αυτά τα μέρη είναι μόρια αμινοξέος που δεσμεύουν υπόστρωμα και ,αν είναι απαραίτητο, και συμπαράγοντες και βοηθούν στη μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν.

Κρυσταλλογραφικές δομές των πεπτιδάσεων δείχνουν ότι η ενεργός θέση βρίσκεται συνήθως σε ένα ‘‘αυλάκι’’ στην επιφάνεια του μορίου μεταξύ παρακείμενων δομικών περιοχών και η ιδιομορφία υποστρωμάτων είναι διατεταγμένη ανάλογα με τις ιδιότητες των περιοχών συνδέσεων τακτοποιημένες κατά μήκος του αυλακιού στη μία ή και στις δύο θέσεις από την καταλυτική περιοχή που είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση του δεσμού που διασπάται εύκολα (the **scissile bond).** Εκτός από το νουκλεόφιλο (υλικό δότης ηλεκτρονίων), άλλα υπολείμματα είναι σημαντικά για την κατάλυση και τη διατήρηση της δομής της ενεργού θέσης. Τα υπολείμματα της ενεργής θέσης είναι πολύ καλά διατηρημένα μεταξύ όλων των ενεργών πεπτιδάσεων μέσα σε μια οικογένεια.

Γενικά, η αποκοπή ενός πεπτιδικού δεσμού έχει περιγραφεί ως παράδειγμα μιας όξινης / βασικής αντίδρασης, στην οποία το δεσμευμένο νουκλεόφιλο είναι ο δότης πρωτονίων και ένα υπόλειμμα γνωστό σαν η γενική βάση είναι δέκτης πρωτονίων. Στις πεπτιδάσες σερίνης και κυστεΐνης η γενική βάση είναι συνήθως μια ιστιδίνη, αλλά μπορεί να είναι μια λυσίνη *(π.χ.* πεπτιδάση I, S26.001 και ενδοπεπτιδάση La, S 16.001). Όταν η γενική βάση είναι μια ιστιδίνη, συνήθως ένα τρίτο υπόλειμμα προσανατολίζει τον ιμιδαζολιούχο δακτύλιο της ιστιδίνης και βοηθά στη δέσμευση ενός από τα άτομα αζώτου του δακτυλίου. Σε πολλές πεπτιδάσες της σερίνης αυτό το τρίτο μέλος της **καταλυτικής τριάδας** είναι ένα ασπαραγινικό οξύ, για παράδειγμα στη χυμοθρυψίνη (S01.001), σουμπτιλυσίνη (S08.001) και καρβοξυπεπτιδάση Y (S10.001). Στις πεπτιδάσες της κυστεΐνης το τρίτο μέλος της τριάδας μπορεί να είναι ασπαραγίνη *(π.χ. παπαΐνη*, C01.001), ασπαραγινικό οξύ ή γλουταμινικό οξύ (*π.χ.* ενδοπεπτιδάση αδενοϊού, C05.001). Υπάρχουν πολλές πεπτιδάσες της κυστεΐνης οι οποίες έχουν ωστόσο μόνο μια δυάδα Cys/His.

Στις πεπτιδάσες της σερίνης και της κυστεΐνης, ένα τέταρτο υπόλειμμα είναι συχνά σημαντικό επειδή βοηθά να σταθεροποιήσει το μεταβατικό ακυλ-ενδιάμεσο που διαμορφώνεται μεταξύ πεπτιδάσης και υποστρώματος σαν ένα πρώτο στάδιο κατάλυσης. Ένα υπόλειμμα διαμορφώνει έναν δεσμό υδρογόνου με το αρνητικά δεσμευμένο άτομο οξυγόνου και αυτή η καταλυτική υπο- περιοχή είναι γνωστή σαν οξιανιόν τρύπα (**oxyanion hole).** Στη χυμοθρυψίνη αυτό το τέταρτο σημαντικό υπόλειμμα είναι γλυκίνη, στη σουμπτιλυσίνη είναι ασπαραγίνη και στη παπαΐνη είναι γλουταμίνη.

Μερικές πεπτιδάσες φαίνεται να έχουν μόνο ένα καταλυτικό υπόλειμμα, το οποίο είναι ένα N-τερματικό υπόλειμμα (**N-terminal nucleophile (Ntn) hydrolases**). Όλες οι γνωστές πεπτιδάσες της θρεονίνης είναι Ntn-υδρολάσες, αλλά υπάρχουν επίσης μερικές πεπτιδάσες της σερίνης και πεπτιδάσες της κυστεΐνης, που είναι αυτολυτικές πεπτιδάσες. Στις Ntn-υδρολάσες, η N-τερματική αμινομάδα θεωρείται ότι λειτουργήσει ως γενική βάση.

Πλήρεις περιγραφές των καταλυτικών μηχανισμών των πεπτιδάσεων της σερίνης, κυστεΐνης και θρεονίνης έχουν οριστεί από τον Polgar (2004).

Κανένα υπόλειμμα εκτός από τα ασπαραγινικά οξέα, είναι γνωστά να εμπλέκονται στην κατάλυση από τις πεπτιδάσες του ασπαραγινικού (James, 2004). Στις μεταλλοπεπτιδάσες άλλα υπολείμματα έχουν παρουσιαστεί από τις μελέτες μεταλλαγής να είναι ουσιαστικά, αλλά ακριβώς ποιοι μπορούν να είναι οι ρόλοι τους είναι αποσαφηνισμένο (Auld, 2004).

Στις μεταλλοπεπτιδάσες που έχουν δύο καταλυτικά μεταλλικά ιόντα, δύο υπολείμματα είναι ουσιαστικά, συχνά ένα γλουταμινικό οξύ και ένα ασπαραγινικό οξύ *(π.χ.* καρβοξυπεπτιδάση του γλουταμινικού οξέως, M20.001).

1.3.2.3 Ορολογία της Ιδιομορφίας Πεπτιδάσεων: Schechter και Berger Ονοματολογία

Η ιδιομορφία των πεπτιδάσεων περιγράφεται χρησιμοποιώντας ένα θεμελιώδες μοντέλο στο οποίο κάθε ξεχωριστή υπο-περιοχή είναι ικανή να προσαρμόσει την πλευρική αλυσίδα ενός απλού υπολείμματος αμινοξέος. Οι περιοχές είναι αριθμημένες από την καταλυτική περιοχή, S1, S2...Sn προς N-τερματικό του υποστρώματος και S1', S2'...Sn' προς C-τερματικό. Τα υπολείμματα που προσαρμόζουν είναι αριθμημένα P1, P2... Pn, και P1', P2... Pn', αντίστοιχα, ως εξής;

Υπόστρωμα: - P3 - P2 - P1+ P1' - P2' - P3' -
Ένζυμο: - S3 - S2 - S1 * S1' - S2' - S3' –

Σε αυτήν την αντιπροσώπευση η καταλυτική περιοχή του ενζύμου είναι χαρακτηρισμένη (*) και ο εύκολα διασπάσιμος δεσμός υποδεικνύεται από το σύμβολο +. Αυτό το σύστημα είναι βασισμένο σε ένα άλλο που χρησιμοποιήθηκε αρχικά από τους Schechter και Berger σε σχέση με την παπαΐνη (Schechter και Berger, 1967).

1.3.3 Ταξινόμηση πρωτεολυτικών ενζύμων

Γενικά τρεις χρήσιμες μέθοδοι ομαδοποίησης πεπτιδάσεων είναι αυτήν την περίοδο σε χρήση: 1) από το χημικό μηχανισμό της κατάλυσης, 2) από τις λεπτομέρειες της αντίδρασης που καταλύεται, 3) από τη μοριακή δομή και την ομοιομορφία. Περαιτέρω υποδιαίρεση είναι δυνατή, παραδείγματος χάριν, λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία ενός δεδομένου μορίου αμινοξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι σημαντικότεροι τύποι πρωτεολυτικών ενζύμων παρουσιάζονται στις επόμενες ενότητες.

1.3.3.1 Ταξινόμηση πεπτιδάσεων με βάση την αντίδραση που καταλύεται

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα υποδιαιρούνται, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.2, σε δύο υποομάδες, τις πεπτιδάσες (ή εξωπεπτιδάσες), που διασπούν τα αμινοξέα ή τα διπεπτίδια σταδιακά ξεκινώντας από τα τερματικά άκρα των πρωτεϊνών και τις πρωτεάσες (ή ενδοπεπτιδάσες), που υδρολύουν τους δεσμούς μέσα στην πεπτιδική αλυσίδα, χωρίς να προσβάλλουν τους τερματικούς πεπτιδικούς δεσμούς (Belitz, 2006).

Πίνακας 1.2: Ταξινόμηση πρωτεολυτικών ενζύμων.

EC-No[1]	**Ομάδα ενζύμων**	**Σχόλια**	**Παραδείγματα**
	Εξωπεπτιδάσες	Διασπούν πρωτεΐνες /πεπτίδια σταδιακά από αμινο- ή καρβοξυ- τερματικά	
3.4.11	Αμινοπεπτιδάσες	Διασπούν αμινοξέα από αμινο- τερματικά	Διάφορες αμινοπεπτιδάσες
3.4.13	Διπεπτιδάσες	Διασπούν διπεπτίδια	Διάφορες διπεπτιδάσες (καρνοσινάση, ανσερινάση)
3.4.14	Διπεπτυλο- και τριπεπτιδυλο-πεπτιδάσες	Διασπούν δι- και τριπεπτίδια από αμινο-τερματικά	Καθεψίνη C
3.4.15	Πεπτιδυλο-διπεπτιδάσες	Διασπούν διπεπτίδια από καρβοξυ- τερματικά	Καρβοξυκαθεψίνη
3.4.16	Καρβοξυπεπτιδάσες της σερίνης	Διασπούν αμινοξέα από καρβοξυτερματικά, η σερίνη είναι το ενεργό κέντρο	Καθεψίνη A
3.4.17	Μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσες	Διασπούν αμινοξέα από καρβοξυτερματικά, στο ενεργό κέντρο υπάρχουν Zn^{2+} ή Co^{2+}	Καρβοξυπεπτιδάσες A και B
3.4.18	Καρβοξυπεπτιδάσες της κυστεΐνης	Διασπούν αμινοξέα από καρβοξυτερματικά, η κυστεΐνη αποτελεί το ενεργό κέντρο	Λυσσοσομαλο καρβοξυπεπτιδάση B
	Ενδοπεπτιδάσες	Διασπούν πρωτεϊνικούς /πεπτιδικούς δεσμούς άλλους από τους τερματικούς	
3.4.21	Ενδοπεπτιδάση της σερίνης	Η σερίνη είναι το ενεργό κέντρο	Χυμοθρυψίνες A, B και C, α- και β-θρυψίνη, μικροβιακές αλκαλικές πρωτεάσες
3.4.22	Ενδοπεπτιδάση της κυστεΐνης	Κυστεΐνη υπάρχει στο ενεργό κέντρο	Παπαΐνη, φισίνη, καθεψίνη B, Βρομελαΐνη
3.4.23	Ενδοπεπτιδάση της ασπαραγίνης	Ασπαραγινικό οξύ (2 μόρια) υπάρχει στο ενεργό κέντρο	Πεψίνη, Καθεψίνη D, ρεννίνη (χυμοσίνη)
3.4.24	Μεταλλοενδοπεπτιδάση	Ιόντα μετάλλων υπάρχουν στο ενεργό κέντρο	Κολλαγονάση, μικροβιακές ουδέτερες πρωτεάσες

[1]Enzyme Commission Nomeculture (Belitz, 2006)

1.3.3.1.1 Ενδοπεπτιδάσες

Οι ενδοπεπτιδάσες υδρολύουν εσωτερικούς, α-πεπτιδικούς δεσμούς σε μια πολυπεπτιδική αλυσίδα, με την τάση να δρουν μακριά από το N-τερματικό ή το C-τερματικό. Μερικές ενδοπεπτιδάσες δρουν μόνο σε υποστρώματα μικρότερα από πρωτεΐνες, και αυτές καλούνται **ολιγοπεπτιδάσες.** Ένα παράδειγμα μιας ολιγοπεπτιδάσης είναι η thimet oligopeptidase (M03.001; (Barrett *et al.*, 2004)). Οι ενδοπεπτιδάσες εξελίσσουν πρωτεΐνες με περιορισμένη πρωτεόλυση. Παραδείγματα είναι η αφαίρεση των signal πεπτιδίων από τις εκκρινόμενες πρωτεΐνες και η ωρίμανση των πρωτεϊνών προδρόμων *(π.χ.* εντεροπεπτιδάση, S01.156, (Sadler, 2004).

Πολύ λίγες ενδοπεπτιδάσες δρουν σε μια σταθερή απόσταση από το τερματικό του υποστρώματος, ένα παράδειγμα είναι η μιτοχονδριακή ενδιάμεση πεπτιδάση (M03.006; (Isaya, 2004)), η οποία υδρολύει ένα N-τερματικό οκταπεπτίδιο. Στην Επιτροπή Ονοματολογίας της ''Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας'' (NC-IUBMB) οι ενδοπεπτιδάσες χωρίζονται σε υπο-υποκατηγορίες EC 3.4.21, EC 3.4.22, EC 3.4.23, EC 3.4.24 και EC 3.4.25 για τους τύπους ενδοπεπτιδάσεων σερίνης-, κυστεΐνης-, ασπαραγίνης-, μεταλλο- και θρεονίνης-, αντίστοιχα (NC-IUBMB, 1992).

1.3.3.1.1.1 Ενδοπεπτιδάσες σερίνης

Τα ένζυμα αυτής της ομάδας, στην οποία η δραστηριότητα περιορίζεται στην περιοχή pH 7-11, ορίζονται ως αλκαλικές πρωτεάσες. Χαρακτηριστική εκπρόσωποι από ζωικές πηγές είναι η θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ελαστάση, πλασμίνη και θρομβίνη. Οι πρωτεάσες της σερίνης παράγονται από ένα μεγάλο αριθμό βακτηρίων και μυκήτων, π.χ. *Bacillus cereus, B.firmus, B.licheniformis, B.megaterium, B.subtilis, Serratia marcesces, Streptomyces fradiae, S.griseus, Trititrachium album, Aspergillus flavus, A.oryzae* και *A.sojae*.

Αυτά τα ένζυμα έχουν ως κοινό χαρακτηριστικό την παρουσία ενός μορίου σερίνης και ενός ιστιδίνης στα ενεργά κέντρα τους. Αδρανοποίηση αυτών των ενζύμων είναι δυνατή με αντιδραστήρια όπως τα διισοπροπυλοφθοροφωσφορικό (DIFP) ή φαινυλομεθανοσουλφονυλοφθορίδιο (PMSF). Τα αντιδραστήρια αυτά ακυλιώνουν μη αντιστρέψιμα το μόριο σερίνης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μη αντιστρέψιμη αναστολή μπορεί επίσης να συμβεί παρουσία αλογονομένων μεθυλικών κετόνων που αλκυλιώνουν το ενεργό μόριο ιστιδίνης, ή ως αποτέλεσμα της δράσης αναστολέων της πρωτεάσης, που είναι επίσης πρωτεΐνες, από την αλληλεπίδραση με το ένζυμο για να σχηματίσουν με ενεργά σύμπλοκα. Αυτοί οι φυσικοί αναστολείς βρίσκονται στα όργανα των ζώων και των φυτών (πάγκρεας, πρωτόγαλα-πύαρ, ασπράδι του αυγού, κόνδυλο πατάτας και σπόρους πολλών οσπρίων. Η εξειδίκευση της ενδοπεπτιδάσης της σερίνης ποικίλλει πολύ. Η θρυψίνη διασπά αποκλειστικά τους δεσμούς αμινοξέων με μια βασική πλευρική αλυσίδα (δεσμοί με λυσίνη ή αργινίνη) και η χυμοθρυψίνη διασπά εκλεκτικά τους δεσμούς των αμινοξέων με αρωματικές πλευρικές αλυσίδες (δεσμοί με φαινυλαλανίνη, τυροσίνη ή θρυπτοφάνη). Τα ένζυμα μικροβιακής προέλευσης έχουν συχνά μικρότερη εξειδίκευση.

1.3.3.1.1.2 Ενδοπεπτιδάσες της κυστεΐνης (ή θιολ-πρωτεϊνάσες)

Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτής της ομάδας ενζύμων είναι : η παπαΐνη (από τον οπό ενός τροπικού, οπωροφόρου δέντρου τα φρούτα του οποίου μοιάζουν με πεπόνια, *carica papaya*), η βρομελαΐνη (από τον οπό και τον μίσχο ανανά, *Ananas comosus*), η φισίνη (από το *Ficus latex* και άλλα είδη *Ficus ssp.*) και μια πρωτεάση στρεπτόκοκκου. Το φάσμα της δραστηριότητας αυτών των ενζύμων είναι πολύ ευρύ και, ανάλογα με το υπόστρωμα, κυμαίνεται σε τιμές pH 4,5-10, με μέγιστο σε pH 6-7,5.

Ο μηχανισμός της ενζυμικής δραστηριότητας φαίνεται να είναι παρόμοιος με αυτών της ενδοπεπτιδάσης της σερίνης. Ένα μόριο κυστεΐνης βρίσκεται στο ενεργό κέντρο. Σχηματίζεται ένας θειοεστέρας ως ομοιοπολικό ενδιάμεσο προϊόν. Τα ένζυμα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στα οξειδωτικά μέσα. Επομένως, κατά κανόνα, χρησιμοποιούνται παρουσία ενός αναγωγικού σώματος (π.χ. κυστεΐνη) και ενός που σχηματίζει χηλική ένωση (π.χ.EDTA).

Αδρανοποίηση των ενζύμων είναι δυνατή με οξειδωτικά σώματα, μεταλλικά ιόντα ή αντιδραστήρια αλκυλίωσης. Γενικά αυτά τα ένζυμα δεν έχουν μεγάλη εξειδίκευση.

1.3.3.1.1.3 Μεταλλοενδοπεπτιδάσες

Η ομάδα αυτή περιλαμβάνει ενδοπεπτιδάσες από βακτήρια και μύκητες, όπως *Bacillus cereus, B.megaterium, B.subtilis, B.thermoproteolyticus* (θερμολυσίνη), *Streptomyces griseus* και *Aspergillus oryzae*.

Τα περισσότερα από τα ένζυμα αυτά περιέχουν ένα mole Zn^{2+} ανά mole πρωτεΐνης. Εντούτοις, σε μερικά ένζυμα αυτή η λειτουργία αναλαμβάνεται από το μαγγάνιο, το κοβάλτιο, το νικέλιο ή ακόμα και ιόντα χαλκού. Σε μερικές μεταλλοπρωτεάσες δύο μεταλλικά ιόντα δρουν συγκαταλυτικά. Το ιόν μετάλλου συντίθεται από τρία συντηρημένα υπολείμματα αμινοξέως που μπορεί να είναι His, Asp, Glu ή Lys.

Σύμφωνα με την ταξινόμηση των πρωτεάσεων βασισμένων στην πρωτεϊνική δομή και ομοιομορφία εφαρμοσμένο στη βάση δεδομένων της MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk), οι μεταλλοπρωτεάσες βρίσκονται σε 14 διαφορετικά γένη. Επιπλέον, το γένος M- περιέχει οικογένειες μεταλλοπρωτεάσης που δεν είναι ακόμα ορισμένες σε κάποιο γένος. Πρωτεάσες από τα γένη MA, MC, MD, ME, MJ, MK, MM, MO και MP απαιτούν μόνο ένα καταλυτικό ιόν μετάλλου, στις περισσότερες περιπτώσεις ιόν ψευδαργύρου, ενώ τα γένη MF, MG, MH, MN και MQ περιέχουν δύο ιόντα μετάλλων που δρουν ομο-καταλυτικά στο υπόστρωμα (M συμβολισμός για μεταλλοπρωτεάσες).

Τα ένζυμα είναι ενεργά στην περιοχή του pH 6-9 και η εξειδίκευσή τους είναι γενικά χαμηλή ενώ αναστολή αυτών των ενζύμων επιτυγχάνεται με χηλικές ενώσεις (π.χ.EDTA) ή θειικό δωδεκάκυλο νάτριο.

1.3.3.1.1.4 Ενδοπεπτιδάσες του ασπαραγινικού

Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι ένζυμα ζωικής προέλευσης, όπως η πεψίνη και η ρεννίνη (αποκαλούμενα εργαστηριακά-ένζυμα στην Ευρώπη), ενεργά στην περιοχή pH 2-4, και η καθεψίνη D, η οποία έχει βέλτιστο pH μεταξύ 3 και 5 ανάλογα με το υπόστρωμα και την πηγή του ενζύμου. Σε pH 6-7 η ρεννίνη διασπά ένα δεσμό της κ-καζεΐνης με μεγάλη εξειδίκευση, προκαλώντας την πήξη του γάλακτος.

Οι ασπαραγινικές πρωτεάσες μικροβιακής προέλευσης μπορούν να ταξινομηθούν σε ένζυμα που προσομοιάζουν την πεψίνη και ένζυμα που προσομοιάζουν τη ρεννίνη. Τα τελευταία είναι σε θέση να πήξουν το γάλα. Τα ένζυμα που προσομοιάζουν την πεψίνη παράγονται, παραδείγματος χάριν, από *Aspergillus awamori, A.Niger, A.oryzae, Penicillium ssp*. και *Trametes-sanguinea*. Τα ένζυμα που προσομοιάζουν τη ρεννίνη παράγονται, παραδείγματος χάριν, από *Aspergillus usamii* και *Mucor ssp,* όπως το *M.pusillus*.

Υπάρχουν δύο καρβονυλικές ομάδες, η μία εκ των οποίων σε αδιάστατη μορφή, στο ενεργό κέντρο των ασπαραγινικών πρωτεάσεων. Η πυρηνόφιλη προσβολή ενός μορίου νερού στο καρβονυλικό άτομο άνθρακα του πεπτιδικού δεσμού καταλύεται από τις πλευρικές αλυσίδες Asp-32 (βασικός καταλύτης) και Asp-215 (όξινος καταλύτης). Η αρίθμηση των μορίων αμινοξέος στο ενεργό κέντρο στην ασπαραγινική πρωτεάση από *Rhizopus chinensis*.

Αναστολή αυτών των ενζύμων επιτυγχάνεται με διάφορους εστέρες του διαζωακετυλαμινικού οξέος, οι οποίοι αντιδρούν προφανώς με τις καρβοξυλικές ομάδες στο ενεργό κέντρο, και με πεσταμίνη. Η τελευταία απομονώνεται από διάφορους *streptomycetes* ως μίγμα πεπτιδίων με το γενικό τύπο (R:ισοβαλερικό ή n-καπροϊκό οξύ. Η εξειδίκευση των ασπαραγινικών ενδοπεπτιδάσεων ποικίλει.

1.3.3.1.2 Ωμέγα πεπτιδάσες

Οι *ωμέγα – πεπτιδάσες* από τη δεύτερη ομάδα πεπτιδάσεων που δεν έχουν καμία απαίτηση για ένα ελεύθερο N-τερματικό ή C- τερματικό στο υπόστρωμα. Παρά την έλλειψη απαίτησής τους για μια δεσμευμένη τερματική ομάδα, ενεργούν συχνά κοντά σε κάποιο τερματικό, και είναι έτσι συνολικά ευδιάκριτες από τις ενδοπεπτιδάσες. Μερικές υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς που δεν είναι α-δεσμοί. Αυτό συμβαίνει γιατί αυτοί είναι ισοπεπτιδικοί δεσμοί, στους οποίους μία ή και οι δύο από τις αμινο και καρβοξυλικές ομάδες δεν είναι άμεσα συνδεδεμένες στον α-άνθρακα του γόνου αμινοξέως. Οι ωμέγα – πεπτιδάσες είναι μια ποικίλη κατάταξη των ενζύμων, συμπεριλαμβάνοντας πυρογλουταμυλ πεπτιδάσες (C15.010, (Dando, 2004); M01.008, (Bauer, 2004)) και γ-γλουταμυλ υδρολάσες (C26.001; (Chave *et al.*, 2004)). Οι ωμέγα – πεπτιδάσες τοποθετούνται στην υπο-υποκατηγορία EC 3.4.19 από την NC-IUBMB.

1.3.3.1.3 Εξωπεπτιδάσες

Οι εξωπεπτιδάσες απαιτούν μια ελεύθερη N-τερματική αμινομάδα, C-τερματική καρβοξυλομάδα ή και τα δύο, και υδρολύουν ένα δεσμό όχι περισσότερο από τρία υπολείμματα από το τερματικό. Οι εξωπεπτιδάσες είναι περαιτέρω διαιρεμένες σε αμινοπεπτιδάσες, καρβοξυπεπτιδάσες, διπεπτυλο-πεπτιδάσες, πεπτιδυλο-διπεπτιδάσες, τριπεπτυλο-πεπτιδάσες και διπεπτιδάσες. Υπάρχουν άγνωστες εξωπεπτιδάσες που είναι πεπτιδάσες ασπαραγινικές ή γλουταμινικές.

1.3.3.1.3.1 Αμινοπεπτιδάσες

Μια αμινοπεπτιδάση ελευθερώνει ένα απλό υπόλειμμα αμινοξέος από το απελευθερωμένο Ν-τερματικό του υποστρώματός της. Οι αμινοπεπτιδάσες και εντάσσονται στην υπο-υποκατηγορία EC 3.4.11 κατά NC-IUBMB.

1.3.3.1.3.2 Διπεπτιδάσες

Μια διπεπτιδάση υδρολύει ένα διπεπτίδιο και εντάσσονται στην υπο-υποκατηγορία EC 3.4.13 κατά NC-IUBMB.

1.3.3.1.3.3 Διπεπτυλο-πεπτιδάσες

Μια διπεπτυλο-πεπτιδάση ονομάζεται έτσι διότι υδρολύει ένα διπεπτυλ δεσμό και εντάσσονται στην υπο-υποκατηγορία EC 3.4.14 κατά NC-IUBMB.

1.3.3.1.3.4 Τριπεπτυλο-πεπτιδάσες

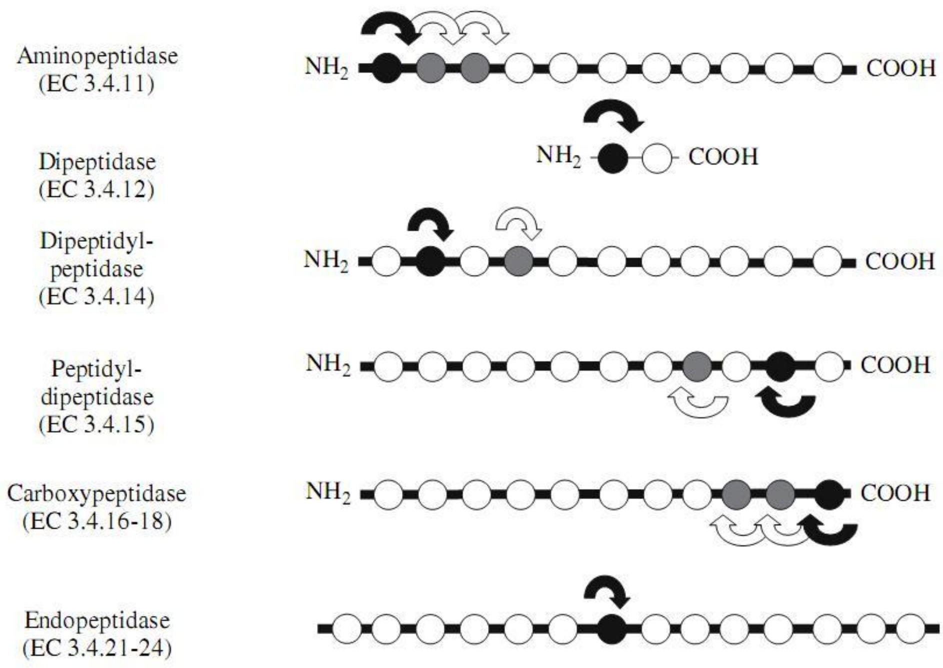
Μια τριπεπτυλο πεπτιδάση υδρολύει ένα τριπεπτιλ δεσμό ελευθερώνοντας ένα τριπεπτίδιο από το Ν-τερματικό του υποστρώματός της και εντάσσονται στην υπο-υποκατηγορία EC 3.4.14 μαζί με τα διπεπτυλο-πεπτιδάσες κατά NC-IUBMB.

1.3.3.1.3.5 Πεπτιδυλο-διπεπτιδάσες

Μια πεπτιδυλο-διπεπτιδάση υδρολύει ένα διπεπτίδιο από καρβοξυτερματικά του υποστρώματός της και εντάσσονται στην υπο-υποκατηγορία EC 3.4.15 κατά NC-IUBMB.

1.3.3.1.3.6 Καρβοξυπεπτιδάσες

Μια καρβοξυπεπτιδάση υδρολύει ένα απλό υπόλειμμα από το απελευθερωμένο C-τερματικό του υποστρώματός της. Η κατηγορία αυτή περιλαμβάνει τις καρβοξυπεπτιδάσες της σερίνης (EC 3.4.16) , μεταλλοκαρβοξυπεπτιδάσες (EC 3.4.17) και καρβοξυπεπτιδάσες της κυστεΐνης (EC 3.4.18) ταξινομημένες ανάλογα με τον καταλυτικό τους τύπο.



Εικόνα 1.4: **Ταξινόμηση των πεπτιδάσεων με βάση την αντίδραση που καταλύεται.** Τα πεπτίδια αναπαρίστανται από χάντρες σε μια σειρά, με την κάθε σειρά χάντρας να αναπαριστά ένα αμινοξύ και η σειρά αναπαριστά τους δεσμούς πεπτιδίων. Τα N- ("NH_2") και C- ("COOH") τερματικά φαίνονται. Τα μαύρα βέλη παρουσιάζουν την πρώτη διάσπαση και τα άσπρα βέλη παρουσιάζουν επόμενες διασπάσεις. Για την πρώτη διάσπαση, το αμινοξύ (-έα) του οποίου η ακρίβεια είναι κυρίως κατευθυνόμενη φαίνεται μαύρο και για τις επόμενες διασπάσεις γκρι.

1.3.3.2 Ομαδοποίηση πεπτιδάσεων από τη μοριακή δομή και την ομοιομορφία

Η ταξινόμηση των πεπτιδάσεων από τη μοριακή δομή και την ομοιομορφία είναι η πιο καινούργια από τις τρεις μεθόδους, επειδή εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα των στοιχείων για αλληλουχίες αμινοξέων και τρισδιάστατες δομές σε ποσότητες που πραγματοποιήθηκαν μόνο στις αρχές στις αρχές του 1990. Το 1993, οι Rawlings και Barrett περιέγραψαν ένα σύστημα στο οποίο μεμονωμένες πεπτιδάσες ορίστηκαν σε οικογένειες και οι οικογένειες ομαδοποιήθηκαν σε κατηγορίες (Rawlings *et al.,* 1993). Αυτό το σχέδιο αναπτύχθηκε για να παρέχει τη δομή της βάσης δεδομένων της *MEROPS*, και έχει επεκταθεί για να περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που αναστέλλουν πεπτιδάσες (Rawlings *et al.,* 2004).

1.3.3.2.1 Μεμονωμένες πεπτιδάσες

Οποιαδήποτε πεπτιδάση αναμένεται να εμφανίζεται σε πολλά είδη οργανισμών και αυτά είναι γνωστά σα **διάφορα-μεταβλητά είδη.** Τα κριτήρια που χρησιμοποιούμε για να αναγνωρίσουμε διαφορές ειδών μιας απλής πεπτιδάσης είναι όπως ακολουθούν:

I. Έχουν παρόμοιες ιδιότητες ως ένζυμα, που παρουσιάζουν τους ίδιους τύπους και ιδιομορφίες της καταλυτικής δραστηριότητας, βέλτιστο pH και ευαισθησία στους ανασταλτικούς παράγοντες. Όπου βιοχημικά δεδομένα είναι μη διαθέσιμα, δεν υπάρχουν διαφορές στις πρωτεϊνικές ακολουθίες που θα προβλέπονταν για να καταλήξουν στις διαφορές στην ιδιομορφία.

II. Έχουν παρόμοιες ακολουθίες αμινοξέων σ' όλο το μήκος του κωδικοποιημένου πολυπεπτιδίου από το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης.

III. Ένα εξελικτικό δέντρο για τις μονάδες πεπτιδάσεων δείχνει ότι η πρωτεϊνική ακολουθία έχει αποκλειστεί την ίδια στιγμή όπως και οι οργανισμού στους οποίους εμφανίζονται. Μια προηγούμενη απόκλιση θα υπονοούσε ότι είναι χωριστά ένζυμα και όχι ορθολογικά.

Υπάρχουν μερικές πεπτιδάσες που πρέπει να τις μεταχειριστούμε σαν **ανακόλουθες πεπτιδάσες** επειδή τα διαθέσιμα στοιχεία ακολουθίας αμινοξέος είναι (ενδεχομένως) ανεπαρκή ώστε να μας επιτρέψουν να ορίσουμε τη πεπτιδάση σε μια οικογένεια. Προκειμένου να είναι σε θέση να παρουσιάσει τα στοιχεία για αυτές τις πεπτιδάσες έχει δημιουργηθεί μια σειρά από ιδιαίτερα προσδιοριστικά της *MEROPS* (http://merops.sanger.ac.uk) στα οποία το μέρος επωνύμου του προσδιοριστικού αντικαθίσταται από έναν κώδικα που δείχνει μόνο τον καταλυτικό τύπο και το είδος της δραστηριότητας της πεπτιδάσης. Ο πρώτος χαρακτήρας αυτού παρουσιάζει καταλυτικό τύπο όπως σε ένα οικογενειακό προσδιοριστικό, ο δεύτερος χαρακτήρας είναι πάντα 9, και το τρίτο είναι ένα γράμμα που δείχνει το είδος της δραστηριότητας της πεπτιδάσης; 'A' για αμινοπεπτιδάση, 'B' για διπεπτιδάση, 'C για διπεπτυλ-πεπτιδάση, 'D' για πετπιδυλ-διπεπτιδάση, 'E' για καρβοξυπεπτιδάση, 'F' για ωμέγα πεπτιδάση και 'G' για ενδοπεπτιδάση.

1.3.3.2.2 Αναστολείς πεπτιδάσης

Οι αναστολείς πεπτιδάσεων αναφέρθηκαν αρχικά από τους Rawlings *et al.,* 2004. Πολλοί αναστολείς δεσμεύονται στην πεπτιδάση σαν υπόστρωμα κατά κάποιο τρόπο, εκτός από αυτό το σύμπλοκο είναι σταθερό ακόμα και αν λαμβάνει χώρα υδρόλυση.

Αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός σαν *μηχανισμός Laskowski* (**Laskowski mechanism**) εξαιτίας του επιστήμονα που τον χαρακτήρισε (παρ' όλο που είναι γνωστός σαν *στάνταρ μηχανισμός* (**standard mechanism**) (Laskowski *et al.,* 2000)). Το υπόλειμμα που αλληλεπιδρά με του νουκλεόφιλο της πεπτιδάσης είναι γνωστό σαν υπόλειμμα ενεργούς θέσης.

Ένας δεύτερος μηχανισμός είναι γνωστός σαν μια *αντίδραση παγίδευσης*. Αυτό το είδος αντίδρασης είναι συγκεκριμένο για τις ενδοπεπτιδάσες διότι εξαρτάται από τη διάσπαση ενός εσωτερικού δεσμού στον αναστολέα που ερεθίζει μια αλλαγή διαμόρφωσης πρωτεϊνικών μορίων όπου είτε παγιδεύει το ένζυμο, είτε διαλύει το ενεργό κέντρο της πεπτιδάσης. Η α_2-μακρογλοβύνη είναι ικανή να αναστείλει μια ευρεία σειρά από ενδοπεπτιδάσες από κάθε καταλυτικό τύπο επειδή περιέχει ένα μακρύ βρόχος που συγκρατεί δεσμούς ευαίσθητους στην πρωτεόλυση γνωστό σαν *περιοχή δολώματος*.

Γενικά, οι αναστολείς ταξινομούνται με ένα παρόμοιο τρόπο σαν αυτό των πεπτιδάσεων και η ταξινόμηση είναι μια από τις **μονάδες ανασταλτικών παραγόντων,** μια μονάδα ανασταλτικών παραγόντων είναι εκείνο το τμήμα της ακολουθίας που περιέχει μια ενιαία αντιδραστική περιοχή (ή την περιοχή δολώματος). Υπάρχει μια παρόμοια ιεραρχική ταξινόμηση γένους, οικογένειας και ανασταλτικού παράγοντα.

1.3.4 Πηγές

Πηγές εμπορικά σημαντικών πρωτεολυτικών ενζύμων αναφέρονται ενδεικτικά στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 1.3: Πηγές εμπορικά σημαντικών πρωτεολυτικών ενζύμων.

Ένζυμο	**EC αριθμός**	**Πηγή**
Βακτηριακές πρωτεάσες	3.4.24.4	*Bacillus subtilis*
Βρομελαΐνη	3.4.22.4	Χυμός ανανά
Χυμοθρυψίνη	3.4.21.1	Πάγκρεας βοοειδών, πάγκρεας χοίρων
Κολλαγονάση	3.4.24.3	*Clostridium histolyticum*
Ελαστάση	3.4.21.11	Πάγκρεας βοοειδών, πάγκρεας χοίρων
Φισίνη	3.4.22.3	Χυμός δέντρων σύκων
Μυκητιακές πρωτεάσες	3.4.24.3	*Aspergillus oryzae*
Παπαΐνη	3.4.22.2	*Papaya latex*
Πεψίνη	3.4.23.1	Στομάχι βοοειδών, στομάχι κοτόπουλου
Ρεννίνη	3.4.23.4	Είδη *Mucor*
Στρεπτοκινάση	3.4.21.7	Είδη *Streptococcus*
Θρυψίνη	3.4.21.4	Πάγκρεας βοοειδών, πάγκρεας χοίρων
Βαριδάση	3.4.-.-	Είδη *Streptococcus*

Πηγή: B. Atkinson, F. Mavituna, "Biochemical engineering and biotechnology handbook", 1983.

1.3.5 Εφαρμογές πρωτεολυτικών ενζύμων

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι σημαντικά για πολλές βιολογικές διαδικασίες συμπεριλαμβανομένου την πέψη των πρωτεϊνών τροφίμων, την ανακύκλωση των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, τη διαδοχική θρόμβωση το αίματος, την εμφάνιση αντιγόνου και ενεργοποίηση ποικίλων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων, ορμόνες πεπτιδίων και νευροδιαβιβαστές.

Υπάρχουν πολλές βιομηχανικές χρήσεις για τις πεπτιδάσες, αν και συχνά χρησιμοποιούνται τα μίγματα παρά τα καθαρισμένα ένζυμα. Μερικές από τις σημαντικότερες εφαρμογές πρωτεολυτικών ενζύμων φαίνονται στο παρακάτω πίνακα. Εκτενέστερη αναφορά γίνεται στις ακόλουθες ενότητες.

Πίνακας 1.4: Εφαρμογές πρωτεολυτικών ενζύμων.

Αγορά	**Ένζυμο**	**Εφαρμογή**
Απορρυπαντικά	Αλκαλικές πρωτεάσες	Εκτεταμένη χρήση σε απορρυπαντικά πλυσίματος για απομάκρυνση πρωτεϊνικών λεκέδων
Τυροκομία	Πυτιά βοοειδών	Πήξη πρωτεϊνών γάλακτος (παραγωγή τυριού)
	Πρωτεάσες μυκήτων	Αντικατάσταση πυτιάς βοοειδών

	Χυμοσίνη	Ενεργό συστατικό της πυτιάς βοοειδών, ανάπτυξη της παραγωγής της από γενετικώς τροποποιημένους μικροοργανισμούς
	Πρωτεάσες	Παραγωγή ενζυμικά τροποποιημένου τυριού, επεξεργασία πρωτεϊνών ορού γάλακτος
Επεξεργασία δερμάτων	Θρυψίνη	Bating δέρματος
	Άλλες πρωτεάσες	Απομάκρυνση τριχών και μαλλιού δέρματος
Αναψυκτικά	Παπαΐνη	Απομάκρυνση θολερότητας από τα αναψυκτικά
Αρτοποιία	Ουδέτερη πρωτεάση	Conditioner μαγιάς
Κρέας και ψάρια	Παπαΐνη	Ωρίμανση του κρέατος
	Διάφορες πρωτεάσες	Ανάκτηση πρωτεϊνών από κόκαλα και απόβλητα ψαριών, παρασκευή διαλυμάτων ψαριού
Επεξεργασία τροφίμων	Διάφορες πρωτεάσες	Τροποποίηση υλικών πλούσιων σε πρωτεΐνη π.χ. πρωτεΐνη σόγιας ή γλουτένη σίτου
Γλυκαντικές ύλες	Θερμολυσίνη	Αναστροφή υδρόλυσης στη σύνθεση της ασπαρτάμης
Ιατρική	Θρυψίνη	Απομάκρυνση νεκρών ιστών και διάλυση πηγμάτων αίματος
	Χυμοπαπαΐνη	Αντιμετώπιση συγκεκριμένων τύπων ρήξεως κοιλίας
Ινσουλίνη	Καρβοξυπεπτιδάση Θρυψίνη	Μετατροπή της ινσουλίνης των χοίρων σε ανθρώπινη ινσουλίνη

Πηγή: H.-D. Belitz, “Χημεία Τροφίμων”, 2006.

1.3.5.1 Μεταλλοπρωτεάσες

1.3.5.1.1 Σύνθεση των πεπτιδίων

Η σύνθεση μεγάλης κλίμακας των πεπτιδίων έχει γίνει όλο και περισσότερο σημαντική για τα τρόφιμα και τις φαρμακευτικές βιομηχανίες κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Η κύρια εφαρμογή των πεπτιδίων είναι η χρήση τους ως λίγων θερμίδων γλυκαντικές ουσίες. Επιπλέον, διάφορα βιολογικά ενεργά πεπτίδια έχουν βρει ενδιαφέρον ως φάρμακα για τη θεραπεία των ασθενειών.

1.3.5.1.2 Παραγωγή πρωτεϊνικών υδρολυμάτων

Μια άλλη πολύ σημαντική βιομηχανική εφαρμογή των μεταλλοπρωτεάσεων (συνήθως σε συνδυασμό με άλλες πρωτεάσες) είναι η παραγωγή υδρολυμάτων πρωτεϊνών τροφής και πεπτιδίων ενίσχυσης της γεύσης. Υδρολύματα σόγιας και σίτου χρησιμοποιούνται στην ενίσχυση της γεύσης στις σούπες και στις σάλτσες, και πρωτεϊνικά υδρολύματα γάλακτος προτιμώνται για τον καθαρισμό των προϊόντων τυριών. Τα υδρολύματα κρέατος βρίσκουν εφαρμογή στην ενίσχυση της γεύσης των προϊόντων κρέατος, στις σούπες, σάλτσες και άλλα στιγμιαία προϊόντα. Υδρολύματα από πρωτεΐνες κρέατος και ψαριού ή η ζελατίνη αναπτύσσουν λιγότερη πικρή γεύση απ' ότι υδρολύματα από πρωτεΐνες αραβόσιτου, καζεΐνη ή ομογλοβίνη. Η ανάπτυξη της γεύσης από ένα κοκτέιλ πρωτεάσεων, συμπεριλαμβάνοντας Neutrase® έχει χρησιμοποιηθεί στο να επιταχύνει την ωρίμανση των ξηρών βρασμένων λουκάνικων (Fernandez *et al.,* 2000) . Μια άλλη ευεργετική επίδραση των πρωτεϊνικών υδρολυμάτων στην υγεία ίσως να είναι τα αντιοξειδωτικά αποτελέσματά τους (Hernandez-Ledesma *et al.,* 2005) και η αναστολή τους από μεταλλαγμένα ένζυμα (Vercruysse *et al.,* 2005).

1.3.5.1.3 Άλλες εφαρμογές

Περαιτέρω εμπορικές εφαρμογές των μεταλλοπρωτεάσεων μπορούν να βρεθούν στη βιομηχανία μπύρας (βελτιωμένη διήθηση της μπύρας, μειωμένο περιεχόμενο σε θερμίδες), στη βιομηχανία δέρματος (bating και αφαίρεση τρίχας και μαλλιού), στη επεξεργασία των αποβλήτων σφαγής, στη βελτίωση των χαρακτηριστικών ψησίματος του αλευριού, και στη βιομηχανία ταινιών (απομάκρυνση της ζελατίνης από φωτογραφικά φιλμ και ανάκτηση ασημιού).

Μια ενδιαφέρων εφαρμογή της ακινητοποιημένης θερμολυσίνης είναι η απομάκρυνση των πρωτεϊνικών επιστρωμάτων από την επιφάνεια των παλαιών εγγράφων και έργα τέχνης (Moeschel *et al.,* 2003). Χρησιμοποιείται επίσης για να αναλύσει τις περιορισμένες τοπικές διακυμάνσεις και τα σφαιρικά εξελισσόμενα γεγονότα στις πρωτεΐνες και για να καθορίσει τις σταθερότητές τους (Arnold *et al.,* 2005; Park και Marqusee, 2005), ή να απομονώσει πρωτεϊνικά κλάσματα που μπορούν να διπλωθούν αυτόνομα και επομένως να θεωρηθούν σαν περιοχές οι οποίες μπορεί να είναι χρήσιμες στην κρυστάλλωση και σε υψηλής παραγωγής εφαρμογές (Gao *et al.,* 2005).

Ανασταλτικοί παράγοντες των μεταλλοπρωτεάσεων που εμπλέκονται στις ασθένειες είναι υπό πιθανές θεραπευτικές χρήσεις. Από αυτή την άποψη, η θερμολυσίνη έχει χρησιμοποιηθεί σαν ένα πρότυπο για την αντίδραση των ομοιόμορφων μοντέλων των ενεργών θέσεων των ιατρικά σχετικά μαστοφόρων μεταλλοπρωτεάσεων (Barrett *et al.* 2004). Οι ενδιαφέροντες στόχοι είναι: 1) ιδιαίτερα ισχυρές νευροτοξίνες όπως bontoxilysin και tentoxilysin από είδη *Clostridium* τα οποία εμποδίζουν την απελευθέρωση ακετυλοχολίνης στις νευρομυϊκές συνδέσεις και προκαλούν μηχανική παράλυση στον τέτανο και την αλλαντίαση, 2) θανατηφόρος παράγοντας ανθράκων, ο οποίος δρα προκαλώντας μίτωση και πολλαπλά αιμορραγικά τραύματα, 3) μεταλλοπρωτεάσες μήτρας ή μητρικίνες (όπως κολλαγονάση, ελαστάση, στρομελυσίνη, ματρυλυσίνη, ζελατινάση) οι οποίες εμπλέκονται στην υποβάθμιση των εξωκυτταρικών μητρικών πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένου του κολλαγόνου και απαιτούνται για επισκευή ιστού και αναδιαμόρφωση αλλά εμπλέκονται επίσης σε διάφορες παθολογικές διαδικασίες (αρθρίτιδα, αθηροσκλήρωση, αύξηση όγκων και μετάσταση).

1.3.5.2 Αμινοπεπτιδάσες

1.3.5.2.1 Φαρμακευτική βιομηχανία

Οι αμινοπεπτιδάσες παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στις διάφορες κυτταρικές διαδικασίες. Κατά συνέπεια, οι φαρμακευτικές εφαρμογές προσανατολίζονται στον έλεγχο της δραστηριότητας των αμινοπεπτιδάσεων στη διαδικασία παθοφυσιολογίας καθώς και στην ανάπτυξη των μεθόδων διάγνωσης σαν δείκτες φυσιολογικών διαβάσεων (Brown, 2005). Οι περισσότερες από τις εφαρμογές είναι προσανατολισμένες στο σχεδιασμό ανασταλτικών παραγόντων για συγκεκριμένες αμινοπεπτιδάσες. Εκλεκτικοί ανασταλτικοί παράγοντες της γλουταμυλ-αμινοπεπτιδάσης (αμινοπεπτιδάση Α) αποτελεί πιθανό αντι-υπερτασικό παράγοντα λόγω του ρόλου αυτού του ενζύμου στη μετατροπή της αγγειοτενσίνης II σε αγγειοτενσίνη III, η οποία παίζει ένα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αρτηριακής πίεσης του αίματος (Cogolludo *et al.,* 2005; Inguimbert *et al.,* 2005). Ο σχεδιασμός των ανασταλτικών παραγόντων των αμινοπεπτιδάσεων μεθειονίνης θεωρείται επίσης ότι έχει θεραπευτική δυνατότητα λόγω του ρόλου αυτών των ενζύμων στην αγγειογένεια και στην ανάπτυξη όγκου (Selvakumar *et al.,* 2005; Zhong και Bowen, 2006). Ανασταλτικοί παράγοντες της έκφρασης αλανυλ- αμινοπεπτιδάση (αμινοπεπτιδάση Ν), οι οποίοι απελευθερώνονται στις φλεγμονώδεις ασθένειες, καρκίνο, λευχαιμία, διαβητική νεφροπάθεια και ρευματοειδή αρθρίτιδα, επίσης αναπτύσσονται με σκοπό να ελέγξουν αυτές τις ταραχές (Bauvois και Dauzonne, 2006; Ansorge *et al.,* 2006).

1.3.5.2.2 Βιοτεχνολογικές και βιομηχανικές εφαρμογές τροφίμων

Μια από τις πιο σημαντικές βιομηχανικές εφαρμογές των αμινοπεπτιδάσεων είναι η κατασκευή πρωτεϊνικών υδρολυμάτων και ο πρωτεϊνικός εμπλουτισμός προϊόντων ζύμωσης προερχόμενα από τη σόγια, το κρέας, το γάλα, τα δημητριακά, κτλ. (Meyer-Barton *et al.,* 1994; Suchiibun *et al.,* 1993; Chevalet *et al.,* 2001; Scharf *et al.,* 2006).

Τα πρωτεϊνικά υδρολύματα τροφών κατασκευάζονται για διάφορους σκοπούς όπως η οχύρωση των τροφών και των ποτών, η επεξεργασία προ - αφομοιωμένων συστατικών για εντερική / παρεντερική διατροφή και η παραγωγή των βιοενεργών πεπτιδίων και προϊόντων υγειονομικής περίθαλψης (FitzGerald και O'Cuinn, 2006). Η χρήση των αμινοπεπτιδάσεων σε αυτές τις βιομηχανικές διαδικασίες όχι μόνο συμβάλλει στη βελτίωση της θρεπτικής αξίας αλλά και στη γεύση του τελικού προϊόντος. Η εφαρμογή αυτών των στρατηγικών στην ωρίμανση του τυριού έχει ερευνηθεί λεπτομερώς λόγω της υψηλής περιεκτικότητας υδροφοβικών υπολειμμάτων αμινοξέος (*π.χ.* προλίνη) που είναι παρόν στην καζεΐνη γάλακτος (Meyer-Barton *et al.,* 1994; Savijoki *et al.,* 2006). Μερικές από τις εμπορικές αμινοπεπτιδάσες που χρησιμοποιούνται για να μειώσουν την πικρή γεύση στα τρόφιμα είναι οι LAPs από βακτήρια γαλακτικού οξέος, *Rhizopus oryzae, Aspergillus oryze* και *Aspergillus sojae* (Nampoothiri *et at.,* 2005). Η χρήση βακτηρίων γαλακτικού οξέος εκφράζει συγκεκριμένες δραστηριότητες πεπτιδάσης κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής επεξεργασίας τροφίμων, ερευνάται επίσης για τη μείωση των επιπέδων τοξικών και αλλεργιογόνων ουσιών που βρίσκονται στο γάλα και στις πρωτεΐνες δημητριακών (Di Cagno *et al.,* 2004).

Η εφαρμογή συνδυασμού πεπτιδάσεων για να την υδρόλυση του κολλαγόνου των καλλυντικών έχει αναπτυχθεί επίσης (Shigeri *et al.,* 2005). Επιπλέον, θερμοσταθερές υψηλής δραστηριότητας αμινοπεπτιδάσες αποτελούν τις εναλλακτικές λύσεις για τις βιοτεχνολογικές εφαρμογές όπως η επεξεργασία ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Gilboa *et al.*. 2001).

1.3.5.3 Πεπτιδάσες της κυστεΐνης

Οι πρωτεάσες, που διατηρούν σταθερά την πρώτη θέση στην αγορά παγκόσμιων ενζύμων, διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη βιοτεχνολογία. Οι πρωτεάσες κυστεΐνης των φυτικών και ζωικών καθεψίνων είναι ιδιαίτερης εμπορικής σπουδαιότητας λόγω της ισχυρούς τους πρωτεολυτικής δραστηριότητας ενάντια σε μια ευρεία σειρά πρωτεϊνικών υποστρωμάτων.

1.3.5.3.1 Παραγωγή μπύρας και οινοπνεύματος

Οι ελαφριές και καθαρές μπύρες προτιμώνται από τους καταναλωτές. Τα διαφορετικά συστατικά που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια παρασκευής της μπύρας ενσωματώνουν πρωτεΐνες οι οποίες διαμορφώνουν αδιάλυτα σύμπλοκα που εμφανίζονται σαν μια μόνιμη θολούρα. Όταν η μπύρα καταψύχεται αδιάλυτα αυξάνεται και παράγεται μια εντονότερη ελαφριά θολούρα, γνωστή ως ψυχρός-ελαφριά ομίχλη. Επεξεργασία με ένα πρωτεολυτικό ένζυμο (συνήθως ακατέργαστη παπαΐνη ή βρομελαΐνη) επιφέρει αποτέλεσμα στην μπύρα ούτως ώστε να παραμένει καθαρή και φωτεινή όταν καταψύχεται. Ενζυμικός ορός είναι επίσης εξαιρετικός σαν καθαριστής μπύρα πριν το βρασμό (Esnault, 1995; Jones, 2005).

1.3.5.3.2 Βιομηχανία αρτοποιίας

Οι πρωτεάσες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία αρτοποιίας επειδή η ζύμη μπορεί να προετοιμαστεί γρηγορότερα εάν η γλουτένη που περιέχει έχει υδρολυθεί μερικώς. Όταν χρησιμοποιούνται ποικιλίες υψηλής-γλουτένης σίτου, η γλουτένη πρέπει να υποβιβαστεί εκτενώς για την κατασκευή των μπισκότων ή την παρεμπόδιση της διακένωσης της εμπορικής ζύμης πιτών. Η βρομελαΐνη έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία αρτοποιίας λόγω του γρήγορου ποσοστού αντίδρασης, ευρέων βέλτιστων pH και θερμοκρασίας και έλλειψης της σε αμυλάσης ή πεντοζανάση σε δευτερεύουσες δραστηριότητες. Η επεξεργασία πρωτεάσεων βελτιώνει τη χαλάρωση ζύμης και τον όγκο ψωμιού, εμποδίζει τη ζύμη από το να ζαρώσει και επιτρέπει γρηγορότερη παραγωγή ψωμιού (Tanabe *et al.,* 1996).

1.3.5.3.3 Επεξεργασία τροφίμων

Η υδρόλυση των ζωικών ή φυτικών πρωτεϊνών τροφίμων πραγματοποιείται για διαφορετικούς λόγους: για να βελτιώσει τα θρεπτικά χαρακτηριστικά, για να καθυστερήσουν την επιδείνωση, την τροποποίηση των διαφορετικών λειτουργικών ιδιοτήτων (διαλυτότητα, άφρισμα, πήξη, και ικανότητες γαλακτωματοποίησης), την πρόληψη των ανεπιθύμητων αλληλεπιδράσεων, την αλλαγή της γεύσης και της μυρωδιάς και την αφαίρεση των τοξικών ή ανασταλτικών παραγόντων. Η ενζυμική υδρόλυση προτιμάται περισσότερο πέρα από τις χημικές μεθόδους γιατί αποδίδει υδρολύματα που περιέχουν καθορισμένα με σαφήνεια μίγματα πεπτιδίων και αποφεύγει την καταστροφή των L-αμινοξέων και το σχηματισμό τοξικών ουσιών. Οι πρωτεάσες κυστεΐνης, κυρίως παπαΐνη και βρομελαΐνη, χρησιμοποιούνται ευρέως στη παρασκευή πρωτεϊνικών υδρολυμάτων έχοντας εξαιρετικές ιδιότητες γεύσης λόγω της απουσίας πικρίας. Θαλασσινά (Vilhelmsson, 1997; Aspmo *et al.,* 2005), αυγά (Lee και Chen, 2002) και λαχανικά (σόγια, σίτος, ρύζι, ηλιοτρόπιο, σουσάμι και αραβόσιτος - Wu *et al.,* 1998; Bandyopadhyay και Ghosh, 2002) πρωτεϊνικά υδρολύματα δεν παρέχουν μόνο την άριστα ενισχυμένη γεύση σε ένα ευρύ φάσμα στα τρόφιμα αλλά και βελτιώνουν την πρωτεϊνική αφομοίωση (Adler-Nissen, 1986; Clemente, 2000).

1.3.5.3.4 Ζωοτροφή

Η προσθήκη παπαΐνης σε μερικές μικτές ζωοτροφές μπορεί να αυξήσει πολύ τη διαθεσιμότητα της πρωτεΐνης, να μειώσει το κόστος ζωοτροφής και να εκμεταλλευτεί τις πηγές πρωτεΐνης (Wong *et al.,* 1996). Μια σημαντική εφαρμογή των πρωτεάσεων στη βιομηχανία τροφίμων κατοικίδιων ζώων είναι να παραχθεί μια αφομοίωση που υγροποιεί την πρώτη ύλη και δημιουργεί μια αποδεκτή γεύση. Τότε αυτό επικαλύπτεται ή ανακατεύεται με τη ξηρή τροφή του κατοικίδιου ζώου για βελτιώσει την γεύση του.

1.3.5.3.5 Βιομηχανία δέρματος

Η βυρσοδεψία του δέρματος είναι μια τεχνική η οποία λαμβάνει μέρος πριν την κατεργασία του δέρματος και υιοθετείται για να παρέχει στα δέρματα και στα τομάρια την ευπλαστότητα και την μαλακότητα. Τα υλικά βυρσοδεψίας, τα οποία περιέχουν πρωτεάσες, εξυπηρετούν αυτό το σκοπό με το χωρισμό του πρωτεασικού υλικού των δερμάτων και των τομαριών. Ωστόσο, η πρωτεολυτική δραστηριότητα πρέπει μόνο να επιτρέπεται να συνεχίζει μέχρι ενός συγκεκριμένου επιπέδου έτσι ώστε να αποφεύγεται η καταστροφή της βασικής δομής του δέρματος. Επιπλέον, η παπαΐνη δρα επίσης σαν ένας αποτριχωτικός παράγοντας. Μια συμβατική διαδικασία απομάκρυνση της τρίχας με σουλφίδιο νατρίου και ασβέστη είναι μια σημαντική πηγή μόλυνσης η οποία σχετίζεται με την βιομηχανία βυρσοδεψίας. Αρκετές ενζυμικές (συμπεριλαμβάνοντας δραστηριότητες πρωτεάσης και αμυλάσης) και μη-ενζυμικές μέθοδοι απομάκρυνσης τρίχας έχουν εξελιχθεί κατά τη διάρκεια του τελευταίου αιώνα. Η παπαΐνη μαζί με διαλυτά πυριτικά άλατα μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα αποτριχωτικό για την κατεργασία δερμάτων, κάνοντας τα προϊόντα ομαλά και λαμπερά και εξαλείφοντας τη διασπορά χρωμίου των αποβλήτων δέρματος (Saravanabhavan *et al.,* 2005).

1.3.5.3.6 Βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας

Η παπαΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επεξεργασία μαλλιού, να ξεβράσει τα κουκούλια και να εξευγενίσει το μετάξι (Freddi *et al.,* 2003). Σαν αποτέλεσμα, τα προϊόντα δεν θα στενέψουν και θα είναι αρκετά μαλακά. Φυσικό μετάξι και τσίχλες που παράγονται από μεταξοσκώληκες είναι και τα δύο πρωτεασικά στη φύση. Στο παρελθόν, η παπαΐνη είχε χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη συρρίκνωση του μαλλιού. Μια πετυχημένη μέθοδος περιλάμβανε τη μερική υδρόλυση από τις άκρες. Αυτή η μέθοδος έδωσε επίσης στο μαλλί μια μεταξωτή λαμπρότητα και βελτίωσε την αξία του. Η μέθοδος εγκαταλείφθηκε πριν μερικά χρόνια για οικονομικούς λόγους.

1.3.5.3.7 Βιομηχανία καλλυντικών

Ενζυμικά ιαματικά λουτρά που περιέχουν βακτήρια και /ή ένζυμα είναι δημοφιλή σαν επεξεργασίες που δίνουν στο δέρμα μια απαλότητα. Η παπαΐνη μπορεί να βοηθήσει στο διασκορπισμό των ατελειών και των εξανθημάτων, στον καθαρισμό προσώπου και στην κυκλοφορία του αίματος κάνοντας το δέρμα υγιέστερο και πιο νέο. Η παπαΐνη και η βρομελαΐνη χρησιμοποιούνται στα προϊόντα φροντίδας προσώπου προκειμένου να παρέχουν ευγενή αποτελέσματα αποφλοίωσης.

1.3.5.3.8 Οργανική Χημεία

Η παπαΐνη χρησιμοποιείται στη σύνθεση αμινοξέων (Rai και Taneia, 1998), βιολογικά ενεργών πεπτιδίων (Gill *et al.*, 1996), αντικαρκινικών φαρμάκων (Du, 2003) και πολυασπαραγινικών οξέων (Soeda et al., 2003).

1.3.5.3.9 Χρήση των πρωτεάσεων κυστεΐνης στα φάρμακα και την ιατρική

Λόγω της διαθεσιμότητάς τους, οι πρωτεάσες που απομονώθηκαν από τα φυτά έχουν ένα ειδικό μέρος σε αυτή την περιοχή. Ένα ευρύ φάσμα των θεραπευτικών οφελών απαιτείται για τη βρομελαΐνη, που εισήχθηκε ως θεραπευτική ένωση από το 1957. Οι αρχές δραστηριότητας των βρομελαΐνων περιλαμβάνουν: την αντιστρέψιμη παρεμπόδιση της συνάθροισης αιμοπεταλίων (Morita *et al.*, 1979), φιβρινολυτική δραστηριότητα (Maurer *et al.*, 2000), αντι-φλεγμονώδη δράση (Inoue *et al.*, 1994), διαμόρφωση της κυτταροκίνησης και ανοσοποίηση (Desser *et al.*, 1994; Munzig *et al.*, 1995), χειρουργική αφαίρεση καμένου δέρματος (Rosenberg *et al.*, 2004), δραστηριότητα αντι-όγκου (Batkin *et al.*, 1988), ενισχυμένη απορρόφηση άλλων φαρμάκων (Tinozzi και Venegoni, 1978), μυκολυτικές ιδιότητες (Hunter *et al.*, 1957), ενίσχυση πέψης (Knill-Jones *et al.*, 1970), ενισχυμένη θεραπεία πληγών (Tassman *et al.*, 1965) και καρδιαγγειακή και κυκλοφοριακή βελτίωση (Taussig και Nieper, 1979). Εκτός από την πρωτεάση κυστεΐνης, τα παρασκευάσματα βρομελαΐνης περιέχουν επίσης άλλα βιολογικά ενεργά συστατικά όπως περοξυδάση, όξινες φωαφατάσες, μερικούς αναστολείς πρωτεάσεων και οργανικά συνδεδεμένο ασβέστιο. Βρέθηκε ότι απομόνωση του πρωτεολυτικού κλάσματος της βρομελαΐνης οδηγεί σε απώλεια των πολλών θετικών επιδράσεων που παρατηρούνται *in vivo* για ακατέργαστα εκχυλίσματα (Taussig και Nieper, 1979). Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τις φαρμακευτικές και προκλινικές μελέτες συστήνουν τη βρομελαΐνη σαν ένα προφορικά δεδομένο φάρμακο για τη συμπληρωματική θεραπεία όγκων. Η αντι-μεταστατική δραστηριότητα της βρομελαΐνης και η ικανότητά της να αναστέλλει τη μετάσταση-σχετική συνάθροιση αιμοπεταλίων καθώς και την ανάπτυξη και η εξάπλωση των κυττάρων όγκων είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα. Η αντι-εισβολική επίδραση βρέθηκε να είναι ανεξάρτητη από την πρωτεολυτική δραστηριότητα.

Ένα άλλο ένζυμο που χρησιμοποιείται ευρέως στην ιατρική και παραϊατρική πρακτική είναι η παπαΐνη. Αυτό το ένζυμο χρησιμοποιείται για χειρουργική αφαίρεση ιστού από πληγή, την αφαίρεση του νεκρωτικού ιστού (Mekkes *et al.*, 1997), την εξωτερική επεξεργασία των σκληρών ιστών, αφαίρεση ιστού ακροχορδώνων και σημαδιών, επεξεργασία ακμής, αφαίρεση τριχών, επεξεργασίες καθαρισμού δέρματος και ως συστατικό της οδοντόκρεμας. Η παπαΐνη χρησιμοποιείται στην παρασκευή παραγώγων τυροσίνης τα οποία χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του παρκινσονισμού και για την προετοιμασία των εμβολίων τετάνου και των ανοσοσφαιρινών δειγμάτων για ενδοφλέβιες εγχύσεις (Brocklehurst *et al.*, 1981). Η χυμοπαπαΐνη εφαρμόζεται στην χημειονουκλεόλυση των κατεστραμμένων ανθρωπίνων μεσοσπονδύλιων νωτιαίων δίσκων (Watts *et al.*, 1975).

Αν και η τοξικότητα των προαναφερθέντων ενζύμων είναι μάλλον χαμηλή, η έκθεση στη σκόνη ή τα αερολύματα των λύσεών τους είναι επιβλαβής. Τέτοια έκθεση μπορεί να προκαλέσει το άσθμα, τη ρινίτιδα και την αλλεργία (Baur και Fruhmann, 1979; Flindt, 1978; Novey *et al.*, 1979). Η παπαΐνη χρησιμοποιείται στην εργαστηριακή πρακτική για την τεχνητή επαγωγή του εμφυσήματος (Martorana *et al.*, 1982) και οστεοαρθρίτιδας (Kopp *et al.*, 1983) σε πειραματικά ζώα. Η αναφυλαξία είναι μια από τις περιπλοκές προκαλούμενες από χυμοπαπαΐνη που χρησιμοποιείται στη χημειονουκλεόλυση (Watts *et al.*, 1975; Ford, 1977; DiMaio, 1976). Άλλες είναι η αιμορραγία στην λεπτή μεμβράνη του εγκεφάλου (Buchman *et al.*, 1985), ο τραυματισμός νεύρων (Mackinnon *et al.*, 1984) και οι διαστημικές μολύνσεις μεσοσπονδύλιου (Deeb *et al.*, 1985).

1.3.5.4 Σαμπτιλυσίνες

1.3.5.4.1 Εφαρμογές σαμπτιλυσίνων στα απορρυπαντικά

Η μεγαλύτερη βιομηχανική εφαρμογή των ενζύμων αυτών είναι στα απορρυπαντικά. Αρχικά η χρήση των ενζύμων από τις ζωικές πηγές οδήγησε σε λίγες επιτυχίες, δεδομένου ότι εκείνα τα ένζυμα δεν ταίριαξαν στους επικρατούντες όρους πλύσης. Μια σημαντική ανακάλυψη για τα καθαριστικά ένζυμα εμφανίστηκε το 1963 με την έναρξη της αλκαλάσης με ένα χαμηλό αλκαλικό βέλτιστο pH. Τα ένζυμα που ενσωματώνονται στα απορρυπαντικά πρέπει να εκθέσουν τις ικανοποιητικές καταλυτικές δραστηριότητες παρουσία άλλων συστατικών και τους όρους πλύσης. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα είναι ενδεχομένως κατάλληλα για χρήση στα απορρυπαντικά, επομένως, πρέπει να είναι σταθερά σε αλκαλικό pH, στις σχετικά υψηλές θερμοκρασίες και σε παρουσία παραγόντων διαχωρισμού, χλωρίνη και τασιενεργά. Από τις διάφορες κατηγορίες πρωτεάσεων, μόνο οι πρωτεάσες σερίνης ταιριάζουν ενδεχομένως στο συνυπολογισμό στα απορρυπαντικά. Οι βακτηριακές σαμπτιλυσίνες προσδιορίστηκαν, σε αρχικό στάδιο, ως τα καταλληλότερα για τις καθαριστικές εφαρμογές. Η τρέχουσα καταναλωτική ζήτηση μαζί με την αυξανόμενη χρήση των συνθετικών ινών, που δεν αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες, έχει οδηγήσει στη χρήση των χαμηλότερων θερμοκρασιών πλύσης. Τα περισσότερα βιομηχανικά ένζυμα παράγονται χρησιμοποιώντας μικροοργανισμούς. Πρόσφατα, η πλειοψηφία των σαμπτιλυσίνων που χρησιμοποιούνται στα απορρυπαντικά απομονώθηκαν από *Bacillus licheniformis, B.lentus, B.alcalophilus* ή *B. amyloliquefaciens*. Αυτές γενικά: (1) εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα στο pH των απορρυπαντικών που περιέχει το νερό πλυσίματος, (2) είναι μετριοπαθώς σταθερά στην παρουσία άλλων συστατικών των απορρυπαντικών, (3) εμφανίζουν μια ευρεία εξειδίκευση υποστρωμάτων, καθιστώντας αυτές ικανές σε μια σειρά πρωτεϊνικών δομών. Παράγονται, εξωκυτταρικά, σε μεγάλες ποσότητες από την τεχνολογία ζύμωσης (Gupta *et al.*, 2002).

1.3.6 Επιπτώσεις των πρωτεολυτικών ενζύμων στην υγεία

Χαρακτηριστικά παραδείγματα συμμετοχής των πρωτεάσεων σε συχνές ασθένειες του ανθρώπου αναγράφονται στις ακόλουθες ενότητες.

1.3.6.1 Νευροεκφυλιστικές νόσοι

Οι εκφυλιστικές ασθένειες του νευρικού συστήματος, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, οι ασθένειες Alzheimer's, Batten, Huntigton's, Parkinson και πολλές άλλες, χαρακτηρίζονται από την προοδευτική αλλά και μαζική απώλεια νευρικών κυττάρων τα οποία όπως είναι γνωστό, σε αντίθεση με άλλα είδη κυττάρων, είναι δύσκολο να αναπληρωθούν. Αυτή η απώλεια οδηγεί σε μεγάλη μείωση των σωματικών και νοητικών λειτουργιών του ατόμου και τελικά στο θάνατο. Το πρωτεολυτικό σύστημα του πρωτεασώματος είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών που συσσωρεύονται κατά τις νευροεκφυλιστικές νόσους. Μεταλλάξεις σε γονίδια του πρωτεασώματος όπως το parkin οδηγούν σε αύξηση κινδύνου για νόσο του Parkinson. Επιπρόσθετα, για τη διάσπαση των τοξικών πρωτεϊνικών συσσωμάτων που παρατηρούνται στις νευροεκφυλιστικές νόσους χρησιμοποιείται και το σύστημα της μακροαυτοφαγίας. Ενεργοποιητές του συστήματος αυτού έχουν θεραπευτικές εφαρμογές.

1.3.6.2 Καρκίνος

Οι πρωτεάσες εμπλέκονται στα περισσότερα στάδια ανάπτυξης, διήθησης και μετάστασης κακοηθών όγκων. Τα μεταλλοπρωτεασικά ένζυμα (MMPs, matrix metalloproteases) θεωρούνται τα πιο σημαντικά μόρια για αποικοδόμηση του εξωκυτταρικού χώρου που διευκολύνει τη διήθηση και μετάσταση των καρκινικών κυττάρων. Επιπροσθέτως, στον καρκίνο υπάρχει υπερ-έκφραση του πρωτεασώματος σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα και, ως εκ τούτου, ειδικοί αναστολείς του πρωτεασώματος αποτελούν νέα στοχευόμενα αντικαρκινικά φάρμακα, όπως για παράδειγμα το Bortezomib (Millenium).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι φαρμακολογικά στοχεύεται συνήθως η υπερ-έκφραση των πρωτεάσεων γιατί είναι πιο εύκολο να αναπτυχθούν αναστολείς παρά ενεργοποιητές. Στην προσπάθεια ανάπτυξης φαρμακομορίων μικρού μοριακού βάρους πολύ σημαντική είναι η γνώση τις κρυσταλλικής δομής των πρωτεάσεων – στόχων, η οποία προσδιορίζεται με τεχνική περίθλασης ακτίνων Χ.

1.3.6.3 Νόσοι από μετάλλαξη σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες

Σημειώνεται ότι μόνο μία μετάλλαξη σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεάσες είναι αρκετή για την εκδήλωση σοβαρών γενετικών ανωμαλιών. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στο γονίδιο της *κασπάσης* 8 προκαλούν αυτοάνοσα λεμφοαναπτυξιακά σύνδρομα. Άλλο πολύ χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η εκδήλωση αιμορροφιλίας λόγω έλλειψης πρωτεάσεων που μετέχουν στον καταρράκτη δημιουργίας θρόμβου στο αίμα. Οι ασθένειες αυτές πλέον καταπολεμούνται με τη χορήγηση ανασυνδυασμένων πρωτεασών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ουδέτερη μεταλλοενδοπεπτιδάση από *Bacillus cereus*

2.1 Εισαγωγή

Τα συμβιωτικά βακτήρια στο σύστημα χώνευσης των ζώων συχνά παράγουν ένα συμπληρωματικό ένζυμο για χώνευση των τροφών καθώς συνθέτουν ενώσεις που είναι αφομοιωμένες από τον ξενιστή (McBee 1971; Hungate 1975).

Αυτές οι συμβιώσεις έχουν μελετηθεί καλά σε χερσαία ζώα. Όπως επίσης στην περίπτωση των υδρόβιων ζώων, πολλά μικρόβια βρίσκουν καταφύγιο στις διόδους χώνευσης των ψαριών, μόνο που ο ρόλος τους στο έντερο, η φυσιολογία, δεν είναι ιδιαίτερα κατανοητή. Ως εκ τούτου η πιθανότητα μια συμβιωτικής χλωρίδας εντέρων ξεκινά τώρα να μελετάται σε αρκετά θαλάσσια ασπόνδυλα. Τέτοια χλωρίδα έχει τεκμηριωθεί στους χορτοφάγους αχινούς (Lasker και Giese 1954; Fong και Mann 1980), γαρίδες (Hoodetal., 1979) κ.λπ...

Οι Chi et al.,2007, ανέφεραν ότι η βιολογική ποικιλομορφία των θαλάσσιων και αυτών που αποτίθενται σε εκβολή ειδών παρέχει μια ευρεία σειρά ενζύμων με μοναδικές ιδιότητες. Τα τελευταία χρόνια οι πρωτεάσες από τα εντόσθια των ψαριών λαμβάνουν μεγάλη προσοχή. Αυτό συνεισφέρει στην ανάπτυξη υψηλών προστιθέμενων εφαρμογών ή προϊόντων με τη χρησιμοποίηση πρωτεϊνών βοηθημένων ενζύμων χώνευσης από διάφορες πηγές συμπεριλαμβανομένου των θαλάσσιων ζώων.

Είναι ευρέως γνωστό ότι, η πηγή αζώτου είναι συνήθως το πιο ακριβό συστατικό βακτηριακών μέσων αύξησης. Προς το παρόν, οι πηγές αζώτου όπως πεπτόνες λαμβάνονται από την καζεΐνη, γεύμα σόγιας και ζελατίνη (πηχτή). Η επέκταση της βιοτεχνολογίας έχει δημιουργήσει μια αυξανόμενη ζήτηση για καινούργιες και χαμηλού κόστους πρωτεϊνικές πηγές.

Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υψηλής ποιότητας, τα ψάρια αντιπροσωπεύουν μία δυναμική πηγή βιομηχανικών πεπτονών για μια ευρεία κλίμακα εφαρμογών. Η βιομηχανία επεξεργασίας ψαριών παράγει αξιοσημείωτες ποσότητες βιο-προϊόντων σαν απόβλητα τα οποία περιλαμβάνουν: σπλάχνα, κοχύλια (από οστρακόδερμα και επεξεργασία σχετιζόμενη με μαλάκια), λέπια, πτερύγια και σκελετό κοκάλων. Όλα αυτά έχουν συχνά υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, που μπορούν να επεξεργαστούν σε χρήσιμα προϊόντα όπως: συμπυκνωμένη πρωτεΐνη ψαριού, ιχθυάλευρο, ιχθυοτροφή σε σιλό, ζωοτροφή κ.λπ... (Raa και Gilberg 1982).

Οι Vecht-Lifshitz et al., ήδη από το 1990 τόνισαν ότι αυτά τα απόβλητα ψαριών έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο σε μικροσκοπικό βαθμό σαν υπόστρωμα ζύμωσης για τη μικροβιακή παραγωγή βιο-προϊόντων, παρά τη διαθεσιμότητά τους σε μεγάλες ποσότητες και το χαμηλό κόστος τους.

Επιπλέον, τα εκχυλίσματα ψαριών φθείρονται εύκολα αποδεικνύοντας ότι είναι μια εξαιρετική πηγή θρεπτικών ουσιών για βακτηριακή ανάπτυξη. Η μεταθανάτια εξάπλωση της μικροχλωρίδας του δέρματος είναι η κύρια αιτία της γρήγορης αποσύνθεσης των ψαριών. Το δέρμα τους περιέχει μεγάλο αριθμό σπόρων ανθεκτικών σε χαμηλές θερμοκρασίες, ακόμα και μέχρι <-10°C (ψυχρότροφοι ή ψυχροανθεκτικοί μικροοργανισμοί). Η αποσύνθεση επιτυγχάνεται επίσης από τα βακτήρια που βρίσκονται στα έντερα των ψαριών (H.-D.Belitz et al., 2006). Ιδιαίτερα το ενζυμικό υδρόλυμα από εκχύλισμα αποβλήτων ψαριού (Jassim et al., 1988) και η αυτόλυση των εντοσθίων ψαριού (Clausen et al., 1985) έχουν αποδειχθεί σαν εξαιρετικά υποστρώματα για βακτηριακή ανάπτυξη. Αξίζει δε να σημειωθεί ότι η επιλογή βακτηρίου από ζώο έχει ένα ενδεχόμενο ρίσκο όσον αφορά την απρόσβλητη ανταπόκριση μετατροπής (Butler et al., 1987).

Συμπεριλαμβανομένων των ανωτέρω εν λόγω γεγονότων, στην παρούσα ενότητα θα ερευνηθεί η αποδοτικότητα της παραγωγής πρωτεάσης από το *Bacillus cereus* που απομονώνεται από έντερο του ψαριού υφάλμυρων νερών *Mugil cephalus* χρησιμοποιώντας χαμηλού κόστους πηγή αζώτου όπως τα απόβλητα επεξεργασίας τόνου (Esakkiraj et al., 2007).

2.2 Βακτήρια

Γενικά υπάρχει ποικιλία στο μέγεθος και το σχήμα των βακτηρίων. Διακρίνονται σε σφαιρικά (cocci), ραβγοειδή (bacilli) και σπειροειδή (spirilla). Ως προς τη μικροβιακή ποικιλότητα υπάρχει τρομακτική ποικιλία στις συνθήκες διαβίωσης (θερμοκρασία -20 μέχρι 110°C και pH από 1.5 μέχρι και 9).

Κάθε μικροοργανισμός που απομονώνεται κατατίθεται σε μια αναγνωρισμένη συλλογή καλλιεργειών.

- ATCC (American type culture collection)
- DSMZ (German collection for microorganisms and cell cultures)

Το πιο αναγνωρισμένο και πλήρες εγχειρίδιο καταχώρισης ταξινομημένων προκαρυωτικών μικροοργανισμών, που ενημερώνεται συνέχεια, είναι το εγχειρίδιο συστηματικής βακτηριολογίας του Bergey (Bergey's manual of systematic bacteriology). Οι μέθοδοι ταξινόμησης και ταυτοποίησης περιλαμβάνουν:

1. φαινοτυπική ανάλυση και προσδιορισμός μεταβολικών ιδιοτήτων
2. προσδιορισμός της αλληλουχίας του 16S rRNA
3. περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις γουανίνης και κυτοσίνης
4. υβριδισμός DNA:DNA
5. ανάλυση λιπαρών οξέων (FAME)
6. μελέτη πρωτεϊνών

Η ιεραρχία που έχει επικρατήσει για την ταξινόμηση των οργανισμών είναι με φθίνουσα σειρά η εξής:

Βασίλειο→Διαίρεση→Κλάση→Τάξη→Οικογένεια→Γένος→Είδος→Στέλεχος

Η βασική μονάδα ταξινόμησης είναι το *είδος*. Ως *είδος* ορίζεται η ομάδα στελεχών βακτηρίων που έχουν ομοιότητα φαινοτύπων σε μεγάλο βαθμό, ενώ συγχρόνως διαφέρουν αρκετά από συγγενείς ομάδες ώστε να είναι δυνατή η αναγνώρισή τους σαν βασική ταξινομική ομάδα.

Πολύ σημαντικό ρόλο για τη συγγένεια μεταξύ των οργανισμών παίζει το rRNA, το οποίο λειτουργεί σαν δείκτης της συγγένειας των οργανισμών και βρίσκεται στο ριβόσωμα. Αν η αλληλουχία βάσεων των 16S rRNA δύο προκαρυωτικών μικροοργανισμών είναι κατά $\geq$97% ταυτόσημη, τότε θεωρούνται ότι ανήκουν στο ίδιο είδος.

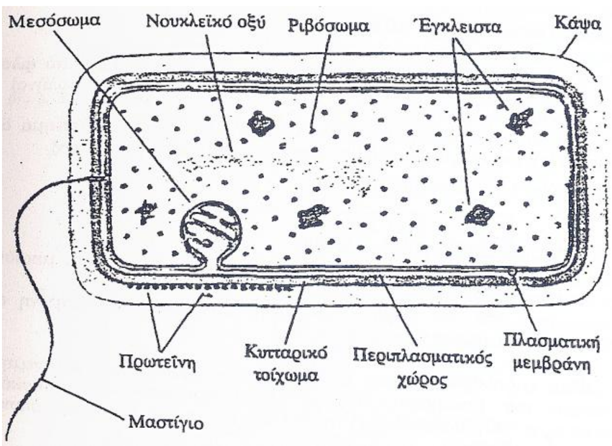
Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαχωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες (που διαφέρουν πάρα πολύ μεταξύ τους – σύγκριση του rRNA): 1) Ευβακτήρια ή απλά βακτήρια (Gram+, Gram -) και 2) Αρχαιοβακτήρια (μεθανοβακτήρια, θερμοοξεόφιλα, αλόφιλα). Οι πιο σημαντικές τους ιδιότητες αναφέρονται στην ικανότητά τους να προσαρμόζονται και να πολυποικίλουν (επιβιώνουν σε περιβάλλον που αλλάζει), παρουσιάζουν «βιοχημική ευλυγισία», είναι μονοκυτταρικοί οργανισμοί (δεν είναι ενωμένα με άλλα κύτταρα), μεγαλώνουν πολύ γρήγορα (χρόνος διπλασιασμού συνήθως <20 λεπτά). Μερικά γένη σχηματίζουν κάτω από αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες ενδοσπόρια. Τα ενδοσπόρια είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά στη ζέστη, κρύο, ακτινοβολίες(→δυσκολότερη αποστείρωση). Κάτω από ευνοϊκές συνθήκες μετατρέπονται σε κανονικά κύτταρα. Η κυτταρική τους δομή χαρακτηρίζεται από:

1. κυτταρικό τοίχωμα (cell wall) – σταθερό σχήμα και περιέχει πάντα το πολυσακχαρίδιο πεπτιδογλυκάνη.
2. κυτταρική μεμβράνη (cytoplasmic membrane) – έλεγχος εισερχόμενων και εξερχόμενων υλών από το κύτταρο.
3. κυτταρόπλασμα – υδατικό διάλυμα που περιέχει όλα τα συστατικά του κυττάρου.
4. χρωμόσωμα – κυκλικό μόριο DNA (cDNA) με διπλή έλικα χωρίς ιστόνες (χρωμοσωμικές πρωτεΐνες).
5. ριβοσώματα (ribosomes) – μέρος των αντιδράσεων για την παραγωγή πρωτεϊνών.
6. κενοτόπια (storage granules) – σωματίδια για αποθήκευση ουσιών.
7. φωτοσυνθετικές μεμβράνες (μόνο στα φωτοσυνθετικά κύτταρα).

Πίνακας 2.1: Χημική δομή ενός προκαρυωτικού κυττάρου.

DNA	3-4%
RNA	10-20%
Πρωτεΐνες	50%
Πολυμερή τοιχώματος	20%
Λιπίδια	10%
C	50%
O	20%
N	10-15%
H	10%
P	2-6%
S	Μικρό ποσοστό

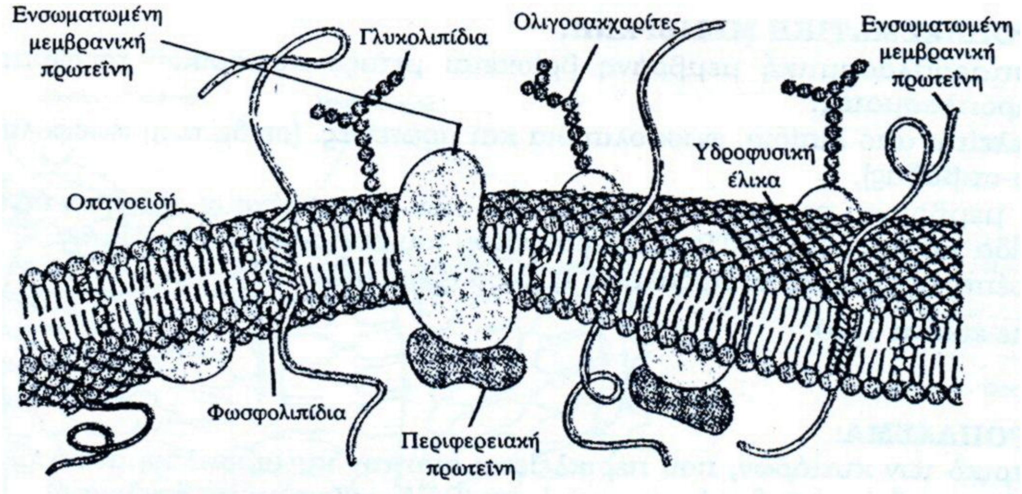
Πηγή: Ν. Καλογεράκης, Ε. Κατσίβελα, "Σημειώσεις περιβαλλοντικής μικροβιολογίας", 2002.



Εικόνα 2.1: Δομή ενός βακτηριακού κυττάρου.
Πηγή: Ν. Καλογεράκης, Ε. Κατσίβελα, "Σημειώσεις περιβαλλοντικής μικροβιολογίας", 2002.

.

Το τοίχωμα των Gram(+) βακτηρίων αποτελείται από πολλά στρώματα πεπτιδογλυκάνης (μουρεΐνη) σχηματίζοντας ένα παχύ στερεό στρώμα. Επιπρόσθετα περιέχουν επίσης τειχοϊκά οξέα, που αποτελούν μέχρι και 50% του συνολικού ξηρού βάρους του τοιχώματος.



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της κυτοπλασματικής μεμβράνης.
Πηγή: Ν. Καλογεράκης, Ε. Κατσίβελα, "Σημειώσεις περιβαλλοντικής μικροβιολογίας", 2002.

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται μια σειρά από χαρακτηριστικά των θετικά κατά Gram βακτηρίων.

Πίνακας 2.2: Χαρακτηριστικά των Gram(+) βακτηρίων.

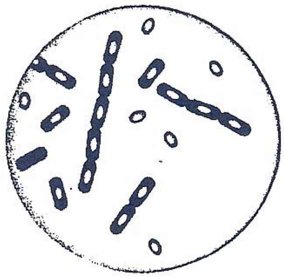
Χαρακτηριστικό	**Gram (+)**
Αντίδραση Gram	Θετική σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους
Πεπτιδογλυκάνη	Παχύ στρώμα / πολλαπλό
Τειχοικά οξέα	Παρόντα
Εξωτερική μεμβράνη	Απουσιάζει
Λιποπολυσακχαρίδια	Δεν υπάρχουν
Λιπίδια/λιποπρωτεΐνες	Μικρή περιεκτικότητα
Μορφή μαστιγίων	2 δακτύλιοι στη βάση
Σχηματισμός ενδοσπορίων	+
Παραγωγή τοξινών	Κυρίως εξωτοξίνες
Μηχανική ανθεκτικότητα	Υψηλή/Οσμωτ.πίεση 25bar
Συμπεριφορά έναντι λυσοζύμης	Προκύπτει λύση
Επίδραση β-Λακτάμης	Βακτηριοκτόνος
Επίδραση ανιονικών τασιενεργών ενώσεων	Μεγάλη επιρροή
NaN_3 (απολυμαντικό)	+/βακτηριοκτόνο

Πηγή: Ν. Καλογεράκης, Ε. Κατσίβελα, "Σημειώσεις περιβαλλοντικής μικροβιολογίας", 2002.

2.3 *Bacillus cereus*

Ο *Bacillus cereus* είναι αερόβιος οργανισμός, θετικό κατά Gram βακτήριο σε σχήμα ράβδου, μορφής ενδοσπορίου και που μπορεί να απομονωθεί από μια ευρεία ποικιλία διαφορετικών περιοχών.

Αξίζει να αναφερθεί ότι η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ενός τυπικού βακτηρίου με διάμετρο 200nm είναι από 40-50% σε μια καλλιέργεια που περιέχει $2 \cdot 10^9$ αποικίες στην καλλιέργεια ανά ml. Αυτό πρακτικά δείχνει το ποσό ανάκτησης πρωτεΐνης από βακτήριο (Aiba et al.,1973).



Εικόνα 2.3: Θέση και σχήμα ενδοσπορίων στο γένος *Bacillus*.
Πηγή : http://www.microbelibrary.org/

Εικόνα 2.4: Καλλιέργεια *Bacillus cereus*.
Πηγή : http//www.microbelibrary.org/

Ο *Bacillus cereus,* ένα θετικό κατά Gram, ευρέως διαδεδομένο στα εδαφολογικά βακτηριακά είδη, συσχετίζεται πολύ με τα *Bacillus anthracis* και *Bacillus thuringiensis*. Υπάρχουν αξιοπρόσεκτες μορφολογικές και βιοχημικές ομοιότητες μεταξύ αυτών των ειδών, παραδείγματος χάριν, στις δομές των rRNAs τους και στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων τους. Η κύρια απόκλιση μεταξύ των ειδών είναι το γεγονός των διαφορετικών τοξινών, που προκαλούν ένα μεταβλητό φάσμα συμπτωμάτων ασθενειών. Ο *B.cereus* περιγράφηκε σαν ένας οργανισμός τροφικής δηλητηρίασης, προκαλώντας ασθένεια εξαιτίας της παραγωγής μιας σταθερής στη θερμότητα εμετικής τοξίνης και διαρροιακές εντεροτοξίνες.

2.3.1 Ταξινόμηση

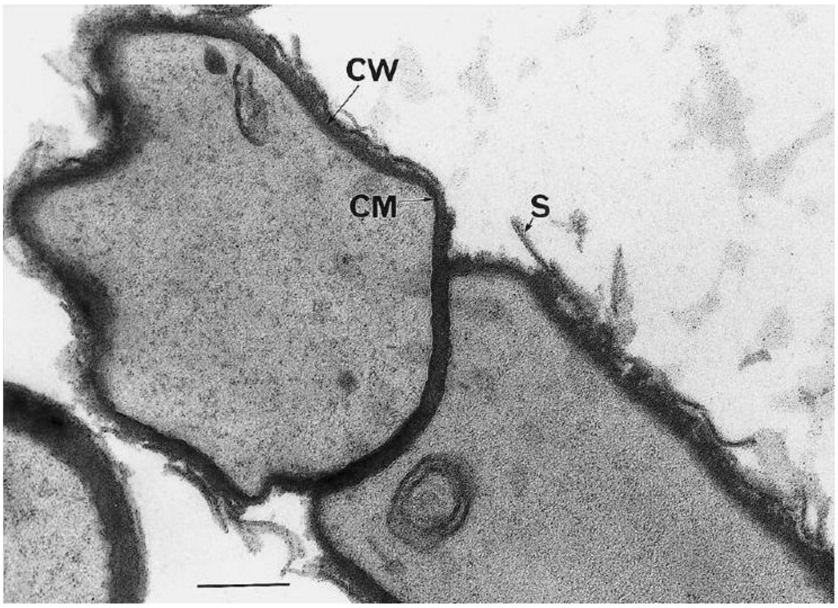
Ως προς την ταξινόμηση το γένος *Bacillus* είναι δύσκολο, εξαιτίας της ετερογένειας στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ειδών. Διάκριση μεταξύ του *B.cereus* και σχετικών με αυτό ειδών είναι περίπλοκο από ομοιότητες στις φαινοτυπικές και γονιδιακές ιδιότητες. Η ταξινομική γενεαλογία του *Bacillus cereus* σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της MEROPS είναι η εξής:

Βασίλειο: *Bacteria*
Διαίρεση: *Firmicutes*
Κλάση: *Bacilli*
Τάξη: *Bacillales*
Οικογένεια: *Bacillaceae*
Γένος: *Bacillus*
Είδη: *cereus*

2.3.2 Μορφολογία - Περιγραφή

Κατά γενική ομολογία περισσότερο από 99% ομοιότητα αλληλουχίας στις βασικές δομές των 16S rRNA, έχει αναφερθεί μεταξύ των *Bacillus anthracis, B.cereus, B.mycoides* και *Bacillus thuringiensis*.

Τα φυτικά κύτταρα και σπόρια είναι τυπικές μορφές του *B.cereus* καθώς και άλλων ειδών *Bacillus*. Η υπερδομή πρωτοπλάσματος φυτικού κυττάρου του *B.cereus* φαίνεται στο ηλεκτρομικρογράφημα μετάδοσης (Εικ.2.5). Η κυτταροπλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχος περικλείουν το κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Σε μερικά στελέχη ένα κρυσταλλικό επιφανειακό στρώμα πρωτεΐνης (S-layer), διαμορφώνει το εξώτατο στρώμα του κυτταρικού τοιχώματος. Κινητά στελέχη *B.cereus* έχουν τριχίδια γύρω απ’ τα μαστίγια, αλλά αρκετά μη κινητικά στελέχη έχουν περιγραφεί επίσης.

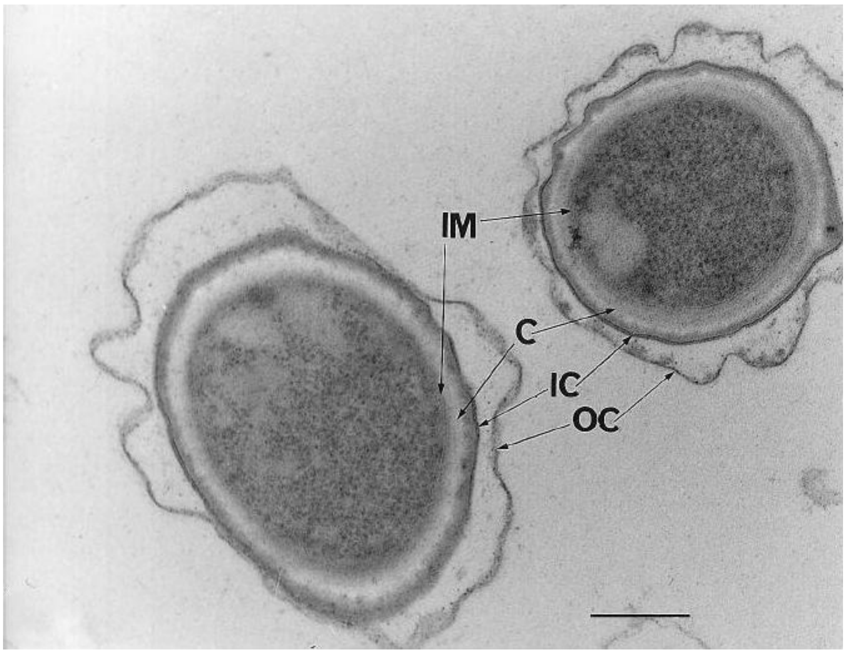


Εικόνα 2.5: Υπερδομή πρωτοπλάσματος ενός σποριαγγείου του *Bacillus cereus* (2.0μm). **CM**= κυτταροπλασματική μεμβράνη (cytoplasmic membrane) **CW**= κυτταρικό τοίχωμα (cell wall) **S**= επιφανειακό στρώμα (surface layer).
Πηγή: A. Kotiranta, “Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections”, 2000.

Σε κανονικές συνθήκες ο *Bacillus cereus* παράγει ενδοσπόρια ραγδαία. Τα ενδοσπόρια είναι αναπαυόμενα, αδρανή κύτταρα υψηλής αντοχής με ιδιαίτερα ανθεκτικά τοιχώματα. Περιέχουν DNA , μικρή ποσότητα RNA, ριβοσώματα, ένζυμα, μερικά μικρομοριακά μόρια, Ca^{++} και διπικολονικό οξύ. Δημιουργούνται από μερικά γένη βακτηρίων (*Bacillus, Clostridium*) κάτω από συνθήκες έλλειψης νερού ή θρεπτικών συστατικών.

Μπορούν να επιζήσουν σε ξηρό περιβάλλον, υψηλή θερμοκρασία, ακτινοβολία, έκθεση σε τοξικά. Όταν επανέλθουν σε ευνοϊκές συνθήκες περιβάλλοντος ενεργοποιούνται και παράγουν ένα βλαστικό κύτταρο (βλάστηση).

Η δομή του επιμηκυμένου ακριανού σπορίου (Εικ.2.6), το οποίο δεν διογκώνει το σποριαγγείο, είναι παρόμοιος με αυτόν άλλων βακίλων, όπου ο πυρήνας περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη, φλοιό, εσωτερικό επικάλυμμα και εξωτερικό επικάλυμμα. Αυτός ο βακτηριακός τύπος δεν έχει μεταβολική δραστηριότητα και τα σπόρια είναι σχετικά ανθεκτικά σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η ζέστη, το κρύο , η ξηρασία και η ακτινοβολία. Η ανάπτυξη των σπορίων και η έναρξη της σποριάγγειας ανάπτυξης εξαρτάται πάρα πολύ από τις κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες.



Εικόνα 2.6: Ένα λεπτά τεμαχισμένο σπόριο από *Bacillus cereus*. IM=inner membrane (εσωτερική μεμβράνη), C= cortex(φλοιός), IC=inner coat(εσωτερικό επικάλυμμα), OC= outer coat (εξωτερικό επικάλυμμα).

Πηγή: A. Kotiranta, "Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections", 2000.

2.3.3 Βιότοπος

Ο *Bacillus cereus* βρίσκεται παντού στο περιβάλλον στο έδαφος, τον αέρα και το νερό, αλλά όπως και πολλοί άλλοι βάκιλοι, βρίσκεται συχνά στα απόβλητα. Σύμφωνα με τους McBee,1971 και Hungate,1975 τα συμβιωτικά βακτήρια στο σύστημα χώνευσης των ζώων συχνά παράγουν ένα συμπληρωματικό ένζυμο για χώνευση των τροφών καθώς συνθέτουν ενώσεις που είναι αφομοιωμένες από τον ξενιστή. Σε μια περίπτωση τουλάχιστον, τα βακτήρια εφοδιάζουν τους ξενιστές τους με απαραίτητα αμινοξέα και παράγοντες ανάπτυξης. Η σχέση μεταξύ δύο μικροβιακών ειδών όταν αυτοί αλληλεπιδρούν μπορεί να ονομαστεί ως: 1)**ουδετερότητα**, όπου δεν υπάρχει αλλαγή στον ρυθμό ανάπτυξης κανενός από τους οργανισμούς εξαιτίας της παρουσίας του άλλου, 2)**αμοιβαιότητα**, όπου και τα δύο είδη αναπτύσσονται γρήγορα όταν είναι μαζί απ' ότι όταν είναι χωριστά, 3)**ανταγωνισμός**, κατά τον οποίο κάθε είδος ασκεί μια αρνητική επιρροή στο ρυθμό ανάπτυξης του άλλου, 4)**παρασιτισμός**, που είναι η περίπτωση κατά την οποία ο δεύτερος οργανισμός απολαμβάνει τα οφέλη. Το αντίθετο είναι ο **αντιπαρασιτισμός**, όπου το δεύτερο είδος υποφέρει, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής του με το πρώτο. Στην περίπτωση του *Bacillus cereus* που απομονώνεται από έντερο ψαριού, μπορούμε να ισχυριστούμε ότι πρόκειται για αμοιβαία συμβίωσή του με τους άλλους μικροοργανισμούς του εντέρου.

Οι θρεπτικές απαιτήσεις του *Bacillus cereus* είναι το K (Spector 1956). Επειδή λοιπόν δεν έχει πολύπλοκες θρεπτικές απαιτήσεις, συχνά βρίσκεται στα απόβλητα με ένα χαμηλό ποσό. Εξαιτίας αυτής της ιδιότητας και της ικανότητας να διαμορφώνει σπόρια ο *B.cereus* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται γρήγορα. Ο *Bacillus cereus* προτιμά να αναπτυχθεί στις θερμοκρασίες μεταξύ 30°C και 37°C πράγμα που σημαίνει ότι είναι μεσόφιλος οργανισμός, αν και μπορεί να αναπτυχθεί στις θερμοκρασίες μέχρι 55°C και σε μερικές περιπτώσεις κάτω από 5°C. Σε μερικές περιπτώσεις, ο *B.cereus* μπορεί να αναπτυχθεί σε όξινες συνθήκες, κάτω από pH 4.3 στους 30-35°C.

Πολλά είδη είναι ικανά να σχηματίζουν μπερδεμένες μάζες στα περιβάλλοντα που βρίσκονται. Ο πίνακας 2.3 περιέχει μια σειρά από βακτήρια και τους αντίστοιχους βιοτόπους που εμφανίζονται. Τέλος οι απαιτήσεις βιταμινών του *Bacillus cereus* φαίνεται να είναι μηδαμινές (Πίνακας 2.4).

Πίνακας 2.3: Βακτήρια που περιέχονται σε μπερδεμένες μάζες (McKinney, 1956).

Bacterium	Habitat
Alcaligenes faecalis	Intestinal tract
A. metalcaligenes	Intestinal tract
Bacillus cereus	Soil
B. lentus	Soil
Escherichia coli	Intestinal tract
E. freundii	Soil
E. intermedia	Soil
Flavobacterium sp.	Water
Lactobacillus delbrueckii	Milk
Nocardia actinomorpha	Soil
Paracolobactrum aerogenoides	Soil
Pseudomonas fluorescens	Soil
Ps. fragi	Soil
Ps. ovalis	Soil
Ps. perlurida	Soil
Ps. segnis	Trickling filter
Ps. solaniolens	Soil
Zoogloea ramigera	Activated sludge

Πίνακας 2.4: Συνοπτική παρουσίαση απαιτήσεων σε βιταμίνες διαφόρων βακτηρίων.

Bacteria	Vitamin A	Biotin	Vitamin C	Choline	Cobalamin	Vitamin D	Vitamin E	Folic acid	Inositol	Vitamin K	Niacin	Pantothenic acid	*p*-Aminobenzoic acid	Pyridoxals	Riboflavin	Thiamin
Bacillus alvei		−									−					+
B. anthracis		−									−					+
B. brevis		−									−					+
B. cereus		−									−					−
B. cereus mycoides		−									−					−
B. circulans		+									−					+
B. coagulans		+									+					+
B. licheniformis		−									−					−
B. macerans		+									−					+
B. megaterium		−									−					−
B. pasteurii		+									+					+
B. polymyxa		+									−					−
B. pumilis		+									−					−
B. sphaericus		+									−					+
B. subtilis		−									−					−
B. subtilis niger		−									−					−
Brucella abortus	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+
Bruc. melitensis	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+
Bruc. suis	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+
Enterobacter (Aerobacter) aerogenes	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Erwinia amylovora	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−
Er. tracheiphila	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−
Escherichia coli	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
Francisella tularensis																+
Haemophilus influenzae	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Lactobacillus																
Heterofermentative		+			+			+		+	+	+	+	−	+	
Homofermentative		+			+			+			+	+	+	+	+	−
Leuconostoc citrovorum		+						+			+	+		+	+	+
Leu. mesenteroides		+						+			+	+		+	+	+
Pasteurella multicida		+									+	+				
Proteus morgani											+	+				
Prot. vulgaris											+					
Salmonella cholerae-suis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
S. enteritidis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
S. gallinarum																+
S. pullorum	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
S. scholtmuelleri	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Serratia marcescens	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
Shigella alkarescens	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Shig. paradysenteriae											+	+				
Shig. sonnei											+	+				
Staphylococcus albus			+								+	+		+		+
Staph. aureus			+								+	+		+		+
Yersinia pestis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

- δεν απαιτείται

\+ απαιτείται

(Spector, 1956)

2.3.4 Επιδημιολογία και παθογένεια του *Bacillus cereus*

Ο *Bacillus cereus* είναι ένας αιτιολογικός παράγοντας σε γαστρεντερικές και μη γαστρεντερικές μολύνσεις. Εντεροτοξίνες, εμετικές τοξίνες, αιμολυσίνες και φωσφολιπάση C καθώς επίσης και άλλα ένζυμα όπως β-λακταμάσες, πρωτεάσες και κολλαγονάσες είναι γνωστές σαν ενδεχόμενοι μολυσματικοί παράγοντες από *B.cereus*. Έχει εκτιμηθεί σαν κατά προτίμηση μη παθογόνος ή σαν ένας καιροσκοπικά παθογενής οργανισμός. Ωστόσο, ο *Bacillus cereus* έχει απομονωθεί από ποικιλία μολύνσεων στους ανθρώπους (Kotiranta et al., 2007).

Τα σπόρια είναι σημαντικά για την εξάπλωση του *B.cereus* και σε μερικά στελέχη είναι γνωστά ότι προσκολλώνται στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα το οποίο έχει τεκμηριωθεί ότι είναι ένας πρόσθετος μολυσματικός μηχανισμός. Το ενδιαφέρον στον *B.cereus*, που σχετίζεται με ασθένειες και μολύνσεις, μεγαλώνει εξαιτίας του αυξανόμενου αριθμού ασθενειών που σχετίζονται με τον *B.cereus* και είναι κυρίως τροφικές δηλητηριάσεις. Ο *B.cereus* είναι οικολογικά διαρκής, που καταφέρνει να αναπτύσσεται και να επιβιώνει σε διάφορα περιβάλλοντα και θερμοκρασίες. Παράγοντες που σχετίζονται με την μολυσματικότητα του *B.cereus* είναι υπό μελέτη κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών. Η ιδιαίτερη δομή των επιφανειακών κυττάρων του *B.cereus*, το S-layer (στρώμα), έχει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων ξενιστή, στη φαγοκυττάρωση και στην αυξανόμενη αντίσταση στην ακτινοβολία.

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε ότι ευθύνεται για δύο τύπους τροφικής δηλητηρίασης, τον εμετό και τη διάρροια. Έχει γίνει προφανές ότι ο *B.cereus* ίσως προκαλεί πιο σοβαρά και μερικές φορές θανατηφόρες μολύνσεις όπως σηψαιμία, πνευμονία, μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, μόλυνση πληγών και οφθαλμική μόλυνση, ειδικά στα άτομα τα οποία είναι σε ανοσοεκτεθημένη κατάσταση, συμπεριλαμβανομένων εκείνων με μια οξεία λευχαιμία. Τέλος ο *B.cereus* είναι μεγάλης σπουδαιότητας ως κοινό παθογόνο για ιδιαίτερα εκκρινόμενα μετατραυματικά ενδοφθαλμικά.

2.4 Καμελυσίνη (camelysin)

2.4.1 Γενικά

Μια ποικιλία μικροοργανισμών εκκρίνουν εξωκυτταρικά πρωτεολυτικά ένζυμα στο περιβάλλον τους (Glenn 1976; Priest 1977). Τα είδη *B.cereus* εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα εξωκυτταρικών παραγόντων οξύτητας και εξωένζυμα, περιλαμβάνοντας φωσφολιπάση C, εντεροτοξίνες, σαμπτιλυσίνη-παρόμοια με τις πρωτεάσες και ουδέτερες μεταλλοπρωτεάσες (βακιλολυσίνη) με υψηλή ομολογία στη θερμολυσίνη. Κατά τη διάρκεια της αναζήτησης των βακτηριακών πρωτεάσεων επιφάνειας, ένας ιδιαίτερα ενεργός, φάκελος κυττάρων -δεσμευμένος αζωκαζεϊνολυτικής δραστηριότητας εντοπίστηκε στο *B.cereus*.

Σε μελέτη των βακτηριακών πρωτεάσεων επιφανείας οι Fricke et al., 2001 κατά την φασματομετρία μάζας (MS) ανακάλυψαν ότι η πρωτεάση από *Bacillus cereus* ήταν ομοιογενής με μοριακή μάζα 19.073,1 ± 15 Da και ονομάστηκε καζεΐνη – μεταλλοπρωτεάση διάσπασης ή καμελυσίνη (**camelysin**). Η πρωτεΐνη διαφέρει από γνωστές εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές βακτηριακές πρωτεάσες στη N-τερματική ακολουθία, εξειδίκευση υποστρώματος και τύπο αναστολής. Η μοναδική της N-τερματκή αλληλουχία Phe-Phe-Ser-Asp-Lys-Glu-Val-Ser-Asn-Asn-Thr-Phe-Ala-Ala-Gly-Thr-Leu-Asp-Leu-Thr-Leu-Asn-Pro-Lys-Thr-Leu-Val-Asp-(Ile-Lys-Asp)- είναι τέτοια που την κάνει να μην έχει ενταχθεί ακόμα σε κάποια βάση δεδομένων.

Η καμελυσίνη κατά προτίμηση διασπά πεπτιδικούς δεσμούς μπροστά από τα αλειφατικά υδροφοβικά αμινοξέα και τα υδρόφιλα υπολείμματα αμινοξέος ($-OH$, $-SO_3H$, αμινομάδες), αποφεύγοντας ογκώδη αρωματικά υπολείμματα στη θέση P1'.

Ο προσδιορισμός μαζικών δακτυλικών αποτυπωμάτων και πεπτιδίων ψευδάργυρου έδειξε ότι η καθαρισμένη καμελυσίνη περιείχε Zn^{2+} ιόντα σε μια ισομοριακή αναλογία. Επομένως, η καμελυσίνη προσδιορίστηκε σαν μια ουδέτερη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου, εμφανίζοντας την τυπικά ισχυρή αναστολή της από χημικές ενώσεις με κλειστό δακτύλιο που περιέχουν μεταλλικά στοιχεία, αλλά είναι απαθής σε φωσφοραμιδόν ή ψευδαργυροιόν, τα οποία είναι οι ισχυρότεροι αναστολείς των ουδέτερων μεταλλοπεπτιδάσεων των τύπων-θερμολυσίνης (Fricke *et al.*, 2001).

2.4.2 Ταξινόμηση

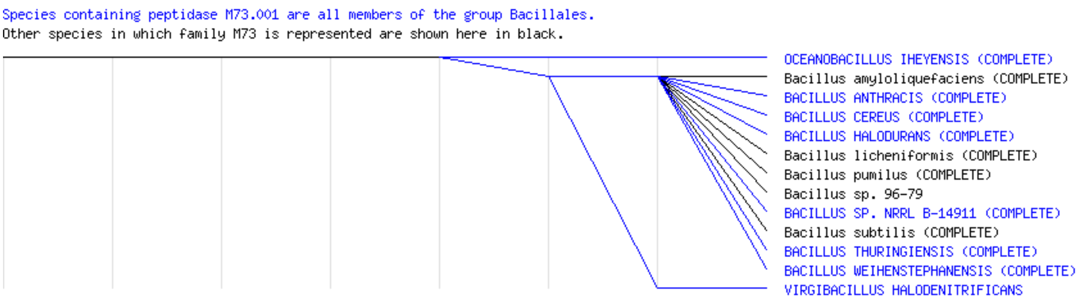
Η καμελυσίνη σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της MEROPS εντάσσεται στην κατηγορία των μεταλλοπεπτιδάσεων (M-), χωρίς να ανήκει ακόμα σε κάποια υποκατηγορία, στην οικογένεια M73 (υποκατηγορία καμία) και έχει κωδικό όνομα M73.001. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν ότι πρόκειται για ουδέτερη μεταλλοπρωτεάση με περίπου 70% ομολογία στη θερμολυσίνη.Ο ολότυπός της αναγράφεται σαν καμελυσίνη (*Bacillus cereus*). Οι Jadwigak et al., (1997), κατά τη μελέτη τους πάνω σε μια ουδέτερη πρωτεάση ανέφεραν τις επιδράσεις των μεταλλικών ιόντων σε μεταλλοπεπτιδάσες από *Bacillus cereus* είδη. Τα αποτελέσματα της έρευνάς τους έδειξαν ότι παρόμοια με αυτές συμπεριφέρεται και η καρβοξυπεπτιδάση A.

2.4.3 Καταλυτικός τύπος

Ο καταλυτικός τύπος της καμελυσίνης είναι μεταλλοενδοπεπτιδάση ενώ δεν περιλαμβάνεται ακόμα στις συστάσεις της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (IUBMB). Στην έρευνα των Fricke et al., 2001, σχετικά με την παθογένεια της πρωτεάσης που απομονώνεται από τον *Bacillus cereus*, αυτή η πρωτεάση μεμβράνης διαλύθηκε, καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε να είναι μια ουδέτερη μεταλλοπρωτεάση ψευδαργύρου η οποία ήταν ανίκανη να διασπάσει τυπικά p-νιτροανιλιδ υποστρώματα των καλά γνωστών εξωκυτταρικών βακτηριακών πρωτεασών όπως σαμπτιλυσίνη (EC 3.4.21.62) και θερμολυσίνη (EC 3.4.24.27). Η καμελυσίνη μπορούσε δηλαδή να διαλυθεί από το εξωτερικό κύτταρο με υψηλές συγκεντρώσεις του διπολικού ιόντος καθαριστικό sulfobetain SB-12.

2.4.4 Οικογένεια M73

Η οικογένεια πεπτιδάσης M73 περιέχει μεταλλοενδοπεπτιδάσες και περιλαμβάνει μια κυτταρο-επιφανειακή ενδοπεπτιδάση από τον *Bacillus cereus* γνωστή σαν καμελυσίνη. Στην παρακάτω παρουσιάζονται διάφορα είδη (μπλε χρωματισμός) της ευρύτερης ομάδας *Bacillalles* που περιέχουν την πεπτιδάση M73 ή αλλιώς καμελυσίνη. Με μαύρο χρωματισμό αναγράφονται άλλα είδη στα οποία εμφανίζεται η οικογένεια M73.



Εικόνα 2.7: Είδη στα οποία εμφανίζεται η οικογένεια M73.
Πηγή: http: //merops.sanger.ac.uk/.

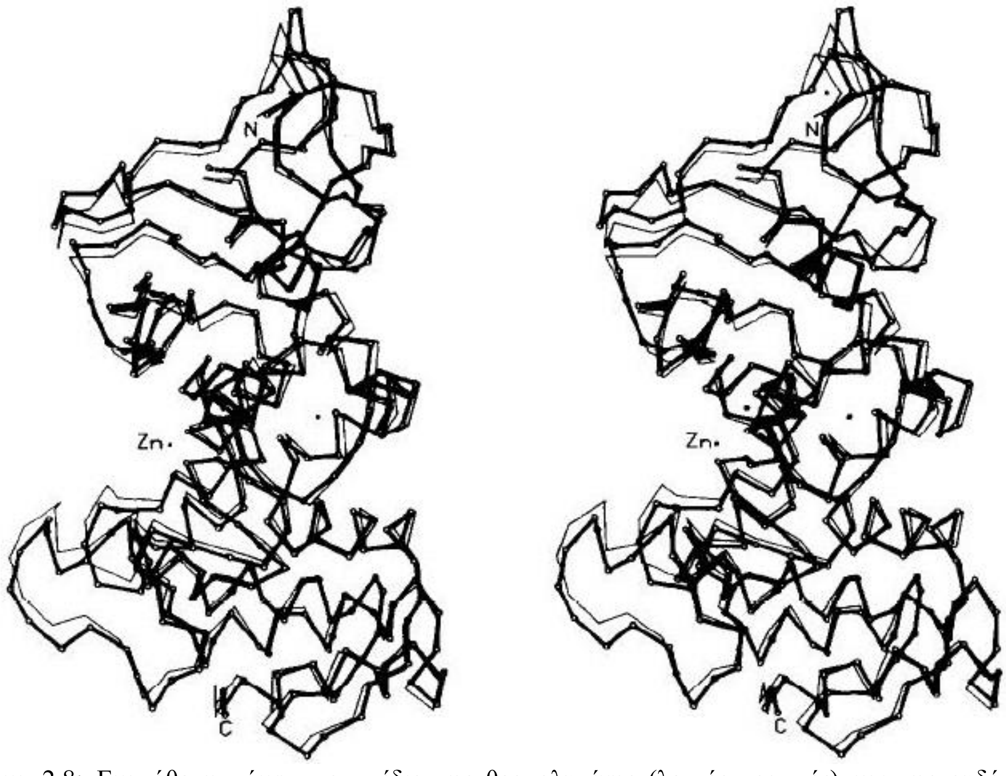
2.4.5 Ενεργές θέσεις

Τα ένζυμα έχουν ένα ενεργό κέντρο, που δημιουργείται μέσα από συγκεκριμένη αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Στο ενεργό κέντρο προσδένονται τα αντιδρώντα και δημιουργούν μαζί με το ένζυμο ένα ενεργοποιημένο σύμπλοκο, στο οποίο σχηματίζονται τα προϊόντα της χημικής αντίδρασης μετά από διάσπαση των χημικών δεσμών των αντιδρώντων και δημιουργία νέων χημικών δεσμών στα προϊόντα.

Υπολείμματα ενεργής θέσης και μεταλλικοί σύνδεσμοι δεν έχουν καθοριστεί πλήρως στην καμελυσίνη. Πλήρως συντηρημένοι δυναμικά μεταλλικοί σύνδεσμοι είναι Asp31, Asp63, Asn73, Asp101, Gln173 και Gln177, εν τούτοις δεν είναι όλα τα μέλη της οικογένειας γνωστά να είναι ενεργές πεπτιδάσες. Η περιεκτικότητα σε μέταλλα έχει καθοριστεί ως ένα ιόν ψευδάργυρου ανά μόριο (Grass et al., 2004).

Ως προς τις δραστηριότητες και τις ιδιομορφίες, η καμελυσίνη έχει φανεί ότι διασπά πρωτεΐνες όπως οι καζεΐνες, ακτινίδες και κολλαγόνο τύπου Ι. Η ιδιομορφία έχει καθοριστεί να είναι διάσπαση των δεσμών με ένα αλειφατικό ή υδρόφιλο υπόλειμμα στη θέση P1" (Fricke et al., 2001).

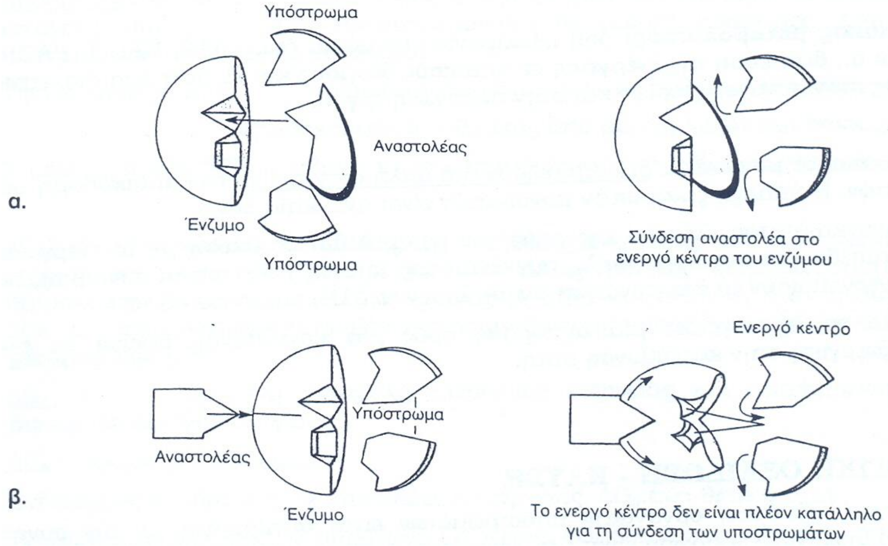
Οι Pauptit et al., (1987) σε μια προσπάθειά τους να συγκρίνουν μια ουδέτερη μεταλλοενδοπεπτιδάση από *Bacillus cereus* ανακάλυψαν ότι παρουσίαζε 73% ομολογία στη θερμολυσίνη. Η τριτοταγής δομή της πρωτεάσης αυτής δείχνει ένα μόριο Zn στην ενεργό θέση της (Εικ. 2.8). Η εικόνα δείχνει ότι η σχισμή της ενεργής θέσης είναι ελαφρά πιο πλατιά στην ουδέτερη πρωτεάση.



Εικόνα 2.8: Εναπόθεση πάνω στο σχέδιο της θερμολυσίνης (λεπτές γραμμές) και της ουδέτερης μεταλλοενδοπεπτιδάσης (χοντρές γραμμές) μετά από διύλιση. Οι κύκλοι αντιπροσωπεύουν τα μεταλλικά ιόντα. Τα αμινο- και καρβοξυ- τερματικά, καθώς και το μεταλλικό ιόν αναγράφονται.
Πηγή: R. Pauptit, "Crystal structure of neutral protease from Bacillus cereus refined at 3.0 A resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin", 1987.

2.4.6 Ανασταλτικοί παράγοντες

Αναστολείς και ενεργοποιητές ενζύμων είναι χημικές ενώσεις που προσδένονται στο ενεργό κέντρο ή στο ρυθμιστικό κέντρο του ενζύμου.Αναστολείς, που προσδένονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου λειτουργούν ανταγωνιστικά στα υποστρώματα και μερικοί δημιουργούν μη αντιστρεπτή πρόσδεση και αδρανοποίηση του ενζύμου. Αναστολείς και ενεργοποιητές, που προσδένονται στο ρυθμιστικό κέντρο του ενζύμου μεταβάλουν τη δομή του ενζύμου και την ενζυμική τους δραστικότητα (→αλλοστερικά ένζυμα). Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται ο μηχανισμός της αναστολής της δραστηριότητας των ενζύμων.



Εικόνα 2.9: Αναστολή ενζύμων: α) ο αναστολέας συνδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και το «καταλαμβάνει», β) ο αναστολέας με τη δράση του τροποποιεί το ενεργό κέντρο του ενζύμου, έτσι ώστε να μην μπορούν να συνδεθούν σ' αυτό τα μόρια – υποστρώματα.
Πηγή: Lubert Stryer, Βιοχημεία.

Η δραστηριότητα της καμελυσίνης αναστέλλεται από ενώσεις συμπλοκοποίησης (χηλικοί παράγοντες). Οι ενώσεις συμπλοκοποίησης έχουν αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία στην επεξεργασία ιχθυηρών. Η ικανότητά τους να δεσμεύουν μεταλλικά ιόντα έχει συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στη σταθεροποίηση του χρώματος, της υφής και του αρώματος των προϊόντων. Μερικοί από αυτούς είναι EDTA και 1,10-phenanthroline σε συγκεντρώσεις της τάξεως των mM. Παρεμπόδιση έχει φανεί επίσης με 10 mM διαιθυλπυροανθρακικό άλας, το οποίο τροποποιεί υπολείμματα ιστιδίνης (Fricke et al., 2001).

2.4.6.1 Μηχανισμός Παρεμπόδισης

Η αναστολή μιας μεταλλοπρωτεάσης κανονικά είναι αποτελέσματα της αφαίρεσης του ιόντος μετάλλου (συνήθως ψευδάργυρος). Το μεταλλικό ιόν μπορεί να είναι πολύ σφιχτά συνδεδεμένο με το ένζυμο, σε μεσο-μακροπρόθεσμο διάστημα για διαχωρισμό, στο οποίο προκαλείται αναστολή από EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) που μπορεί να είναι τόσο αργή ώστε να μην είναι ανιχνεύσιμη (Auld, 1995). Αν ένα μεταλλο-ελεύθερο αποένζυμο είναι σταθερό, μπορεί να επανενεργοποιηθεί από συγκεντρώσεις mM από κατάλληλα μεταλλικά ιόντα. Υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να είναι ανασταλτικές (Larsen & Auld, 1991).

Οι Jadwigak et al. (1997) σε έρευνά τους παρουσίασαν μια σειρά από ανασταλτικούς παράγοντες που αναστέλλουν τη δραστηριότητα ουδέτερης μεταλλοπεπτιδάσης από *Bacillus cereus*, όμοια δηλαδή της καμελυσίνης. Τα αποτελέσματά τους φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.5: Επίδραση διαφόρων αναστολέων και χημικών στη δραστηριότητα ουδέτερης πρωτεάσης από *Bacillus cereus*.

Inhibitors and chemicals	Concentration (mM)[a]	Remaining protease activity (%)
Control		100.0
EDTA-Na_2	10.0	0.0
	1.0	0.0
	0.1	90.2 ± 0.41
β-mercaptoethanol	10.0	0.0
	1.0	0.0
	0.1	0.0
1,10-phenanthroline	10.0	0.0
	1.0	60.0 ± 0.29
	0.1	60.0 ± 1.17
PMSF	10.0	60.0 ± 0.15
	1.0	87.0 ± 0.23
	0.1	100.0 ± 0.65
Benzamidine	10.0	0.0
	1.0	0.0
	0.1	0.0
DIPF	10.0	0.0
	1.0	54.2 ± 0.33
	0.1	54.2 ± 0.98
DTT	10.0	0.0
	1.0	0.0
	0.1	0.0
Glycerol	10.0	130.7 ± 0.20
	1.0	163.4 ± 0.52
	0.1	0.0
SDS	0.005[b]	103.9 ± 0.12
	0.010[b]	0.0
	0.030[b]	0.0
L-cysteine hydrochloride	10.0	0.0
L-histidine	10.0	0.0

a: η τελική συγκέντρωση
b: το ποσοστό (w/v)

2.4.7 Μοριακή δομή

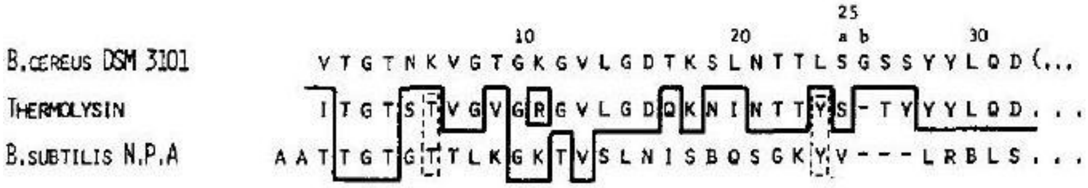
Προς το παρών καμία τριτογενής δομή δεν έχει καθοριστεί για οποιοδήποτε μέλος της οικογένειας M73. Η καμελυσίνη προβλέπεται να έχει ένα N-τερματικό signal πεπτίδιο και είναι ισχυρά συνδεδεμένο στην επιφάνεια κυττάρου (Grass et al., 2004).

2.4.8 Φαρμακευτική και βιοτεχνολογική σχετικότητα

Ο *Bacillus cereus* είναι αιτιολογικός παράγοντας της τροφικής δηλητηρίασης και εμπλέκεται στις δευτεροβάθμιες μολύνσεις στα νοσοκομεία (νοσοκομειακές ασθένειες). Η καμελυσίνη ίσως να έχει ένα ρόλο στη βακτηριακή εισβολή, επειδή είναι κολλαγονολυτική, και στη διείσδυση των θρόμβων φιβρίνης, επειδή μπορεί να ενεργοποιήσει τον πρόδρομο πλασμίνης (Fricke et al., 2001).

2.4.9 Καμελυσίνη και ομόλογα

Η ώριμη καμελυσίνη έχει προβλεφθεί ότι είναι μια πρωτεΐνη από 170 υπολείμματα αμινοξέος με μια μοριακή μάζα της τάξεως των 19.073,1 ± 15 Da και ένα pI = 4.56 (http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam). Η ακολουθία αμινοξέος δεν περιείχε μια μεταλλοπρωτεάση με ακολουθία συναίνεσης του HEXXH μοτίβου και δεν έδειξε καμία ομολογία σε καμία άλλη γνωστή πρωτεάση. Η N-τερματική ακολουθία παρουσιάζει ομογένεια σε ποσοστό 63% στη θερμολυσίνη και χαμηλή ομολογία (18%) στην ουδέτερη πρωτεάση από *Bacillus subtilis* πράγμα που σημαίνει ότι είναι αρκετά διαφορετική από αυτές που έχουν ήδη ανακαλυφθεί.



Εικόνα 2.10: Η N-τερματική ακολουθία αμινοξέος της ουδέτερης πρωτεάσης από τον *Bacillus cereus* DSM 3101 συγκρινόμενη με τη θερμολυσίνη (Titani et al. 1972) και την ουδέτερη πρωτεάση A από τον *Bacillus subtilis* (Levy et al.1975).
Πηγή: R. Pauptit, "Crystal structure of neutral protease from Bacillus cereus refined at 3.0 A resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin", 1987.

Η αλληλουχία αμινοξέων της καμελυσίνης σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της MEROPS είναι η ακόλουθη:

Sequence MER031615

```
>MER031615 - camelysin [M73.001] peptidase unit: 28-197 (Bacillus cereus) (Source: ProtID CAD55815)
1        MSLKKKLGMGVASAALGLALIGGGTFAFFSDKEVSNNTFAAGTLDLTLNPKTLVDIKDLK     60
61       PGDSVKKEFLLQNSGSLTIKDVKLATKYTVKDAKGDNAGEDFGKHVKVKFLWNWDKQSEP    120
121      VYETTLADLQKVDPDLLAKDIFAPEWGEKGGLAAGTEDYLWVQFEFVDNGKDQNIFQGDT    180
181      LNLEWTFNANQEAGEEK                                               197
```

Πηγή: http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/make_aaseq?mernum=MER031615.

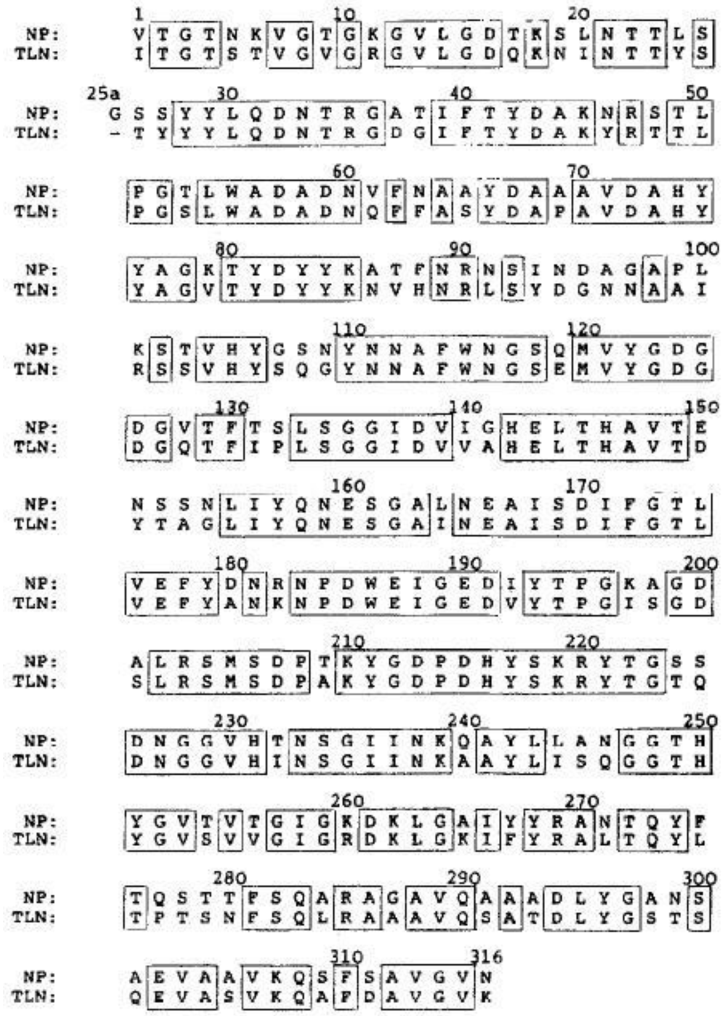
Στην έρευνα των Fricke et al., 2001, για την εξέταση της καμελυσίνης από *Bacillus cereus*, παράγοντα παθογένειας η κωδικοποιημένη calY περιοχή παρατίθεται παρακάτω.

```
1     CTTTGTTTTT CTTTTTTCTT ATAGTATTAA ATGATTTGAG TGTGAAAAAA GTTATAAATT
61    ATCATCATTT TTTTCTTGAA AAGTCTAAAT AATATTGAGA AATAAAAATA ACTGAAAATA
121   TTAATAAATA TGTGTTGTGT TTATATAGGG TTGTTCGTTA TAATGAACAT AAGGTTTTTA
181   AAAAAGAACA CATATTAGCT AAGCTAATAT AGTTTTCTTT ACATCTCTTA TTGAAAAATA

241   AGTGATAAAA ATATAAAAAA AAGCTAGGGG GAATTGATTG TGAGTCTGAA AAAGAAATTA
                                                V  S   L  K  K   K  L

301   GGTATGGGAG TTGCATCAGC AGCATTGGGG TTAGCTTTAA TTGGTGGAGG AACATTTGCA
       G  M  G   V  A  S   A  A  L   G  L  A   L  I  G   G  G  T   F  A

361   TTCTTTAGCG ATAAAGAAGT ATCAAACAAT ACATTTGCAG CTGGGACGTT AGACCTTACA
       F  F  S   D  K  E   V  S  N   N  T  F   A  A  G   T  L  D   L  T

421   TTAAACCCTA AGACGCTTGT AGATATTAAA GATTTAAAAC CAGGGGATTC TGTTAAGAAA
       L  N  P   K  T  L   V  D  I   K  D  L   K  P  G   D  S  V   K  K

481   GAGTTCTTAT TACAAAACAG CGGTTCGTTA ACTATTAAAG ATGTTAAATT AGCAACAAAG
       E  F  L   L  Q  N   S  G  S   L  T  I   K  D  V   K  L  A   T  K

541   TACACTGTTA AAGATGCAAA AGGTGATAAT GCTGGTGAAG ACTTTGGTAA GCACGTTAAA
       Y  T  V   K  D  A   K  G  D   N  A  G   E  D  F   G  K  H   V  K

601   GTAAAATTCC TTTGGAACTG GGATAAACAA AGTGAGCCTG TATACGAAAC AACTTTAGCA
       V  K  F   L  W  N   W  D  K   Q  S  E   P  V  Y   E  T  T   L  A

661   GACTTACAAA AAGTTGATCC AGATCTTTTA GCTAAAGACA TCTTTGCTCC TGAGTGGGGA
       D  L  Q   K  V  D   P  D  L   L  A  K   D  I  F   A  P  E   W  G

721   GAAAAGGGTG GATTAGCAGC TGGTACAGAG GATTATCTAT GGGTACAATT TGAATTTGTA
       E  K  G   G  L  A   A  G  T   E  D  Y   L  W  V   Q  F  E   F  V

781   GATAATGGAA AAGATCAAAA TATCTTCCAA GGTGATACAT TGAATTTAGA ATGGACATTC
       D  N  G   K  D  Q   N  I  F   Q  G  D   T  L  N   L  E  W   T  F

841   AATGCTAACC AAGAAGCTGG GGAAGAAAAA TAATAAAAAA AGCGGGTATC CCCCGCTTTT
       N  A  N   Q  E  A   G  E  E   K  -  -
                                     <------------------    ----------

901   TTTATAAAGA AAAAGAAGTG CTACTTGTAA GCACTTCTTT CTATTTATTA TTTTGCTTCC
      ----->     <------------        ------------->

961   ACTTTGTAAA TTCAAGAAAT TCACGAAATT GTTCTTTGGA GACACCAGAG TTCATTGCAT
1021  CTTTAACGAG TTGTGCCCAA TCGGAGTCCA
```
Εικόνα 2.11: Ακολουθία νουκλεοτιδίων της calY περιοχής. Οι ακολουθίες αμινοξέος του N-τερματικού (διπλές γραμμές) και τα παραγόμενα από διασπάσιμα πεπτίδια από θρυψίνη (απλή γραμμή) της ώριμης καμελυσίνης είναι υπογραμμισμένα (Fricke et al., 2001).

Πηγή: G. Grass, "Camelysin is a novel surface metalloproteinase from Bacillus cereus", 2004.

Διάσπαση του *calY* γονιδίου έχει ως αποτέλεσμα μια ισχυρή μείωση στον κυτταρικό δεσμό στη πρωτεολυτική δραστηριότητα στα διάφορα υποστρώματα.

Οι Pauptit et al., (1987) σε μια έρευνά τους που αφορούσε τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής ουδέτερης μεταλλοενδοπρωτεάσης που απομονώθηκε από στέλεχος του Bacillus cereus είδους όταν αυτή συγκρίθηκε με τη θερμολυσίνη παρατηρήθηκε ότι η ακολουθία αμινοξέων της παρουσίαζε 73% ομολογία με εκείνη της θερμολυσίνης.



Εικόνα 2.12: Η αλληλουχία αμινοξέων της ουδέτερης μεταλλοενδοπεπτιδάσης από *Bacillus cereus* – πάνω (NP) συγκρινόμενη με αυτή της θερμολυσίνης – κάτω (TLN). Τα κοινά υπολείμματα αμινοξέος είναι σε κουτιά.
Πηγή: R. Pauptit, "Crystal structure of neutral protease from Bacillus cereus refined at 3.0 A resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin", 1987.

2.4.10 Υλικά και μέθοδοι προσδιορισμού της καμελυσίνης

2.4.10.1 Δραστηριότητα μικροοργανισμού και καμελυσίνης

Η μεταλλοενδοπεπτιδάση που παραγάγει βακτηριακά στελέχη έχει απομονωθεί από το έντερο του ψαριού *Mugil cephalus* και έχει προσδιοριστεί από πρότυπες διαδικασίες που περιγράφονται στο εγχειρίδιο καθοριστικής βακτηριολογίας του Bergy (Holt et al., 1994).

Εικόνα 2.13: *Mugil cephalus.*
Πηγή: http://www.foodauthority.nsw.gov.au/.

Το μέτρο της καταλυτικής δραστηριότητας ενός ενζύμου είναι ο ρυθμός της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο. Οι συνθήκες μιας ανάλυσης της ενζυμικής δραστηριότητας βελτιστοποιούνται σχετικά με: τον τύπο και την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού, το pH, και τις συγκεντρώσεις υποστρώματος, συνυποστρώματος και των χρησιμοποιούμενων ενεργοποιητών. Οι στενά ελεγχόμενες συνθήκες της ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, είναι κρίσιμες επειδή, σε αντίθεση με την ανάλυση του υποστρώματος, η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων συχνά δεν μπορεί να επαληθευτεί σε αυτήν την περίπτωση με τη χρησιμοποίηση ενός ζυγισμένου πρότυπου δείγματος.

Η θερμοκρασία είναι μια ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος που επηρεάζει έντονα την ενζυμική ανάλυση. Οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας επιδρούν σημαντικά στο ρυθμό αντίδρασης, π.χ., αύξηση 1°C στη θερμοκρασία έχει ως αποτέλεσμα αύξηση περίπου 10% στη δραστηριότητα. Όποτε είναι δυνατόν, η θερμοκρασία επώασης πρέπει να διατηρείται κοντά στους 25°C.

Ο έλεγχος της ποιότητας επιβάλλει τη χρήση του άγαρ καζεΐνης (casein agar) ως μέσο καλλιέργειας όταν πρόκειται για πρωτεολυτικό οργανισμό (Atkinson 1983). Η καζεΐνη είναι αδιάλυτη σε ασθενώς όξινα διαλύματα. Το άγαρ είναι κατά βάση ένα ζελατινούχο προϊόν που απομονώνεται από φύκι (της τάξεως των ροδοφυκών, Rhodophyceae) με διαδικασία εκχύλισης με ζεστό νερό και χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή θρεπτικών μέσων στη μικροβιολογία. Η γενικότερη εφαρμογή του έγκειται στις κύριες ιδιότητές του: είναι ουσιαστικά άπεπτο, σχηματίζει ανθεκτικές στη θερμοκρασία πηκτές και έχει γαλακτωματοποιητική και σταθεροποιητική ικανότητα.

Οι Esakkiraj et al., το 2007 επισήμαναν τη χρήση της θερμοκρασίας επώασης για επιλεκτική απομόνωση. Σύμφωνα με την έρευνά τους η θερμοκρασία από μόνη της μπορεί να είναι ένας υψηλά επιλεκτικός μηχανισμός για την επιλεκτική απομόνωση συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών. Επώαση στους 55-65°C θα εξασφαλίσει τη μεμονωμένη ανάπτυξη των υποχρεωτικά θερμοφιλικών οργανισμών όπως ο *Bacillus stearothermophilus*. Καθαρισμός ενός αριθμού βακτηρίων στα ψάρια γενικά περιλαμβάνει επώαση σε πιάτα καλλιέργειας στους 20°C και έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη των ψυχροτροφικών οργανισμών που μεγαλώνουν βέλτιστα στους περίπου 25°C και οι οποίοι είναι επίσης ικανοί να αναπτυχθούν στους 2°C.

Έτσι ο προσδιορισμένος οργανισμός έχει ελεγχθεί για παραγωγή πρωτεάσης σε πιάτα άγαρ αποβουτυρωμένου γάλακτος. Μετά από 24 ώρες επώασης στους 32°C, η πρωτεολυτική δραστηριότητα επιβεβαιώνεται με τη διαμόρφωση μιας σαφούς ζώνης γύρω από την αποικία. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται από τα ακόλουθα βήματα.

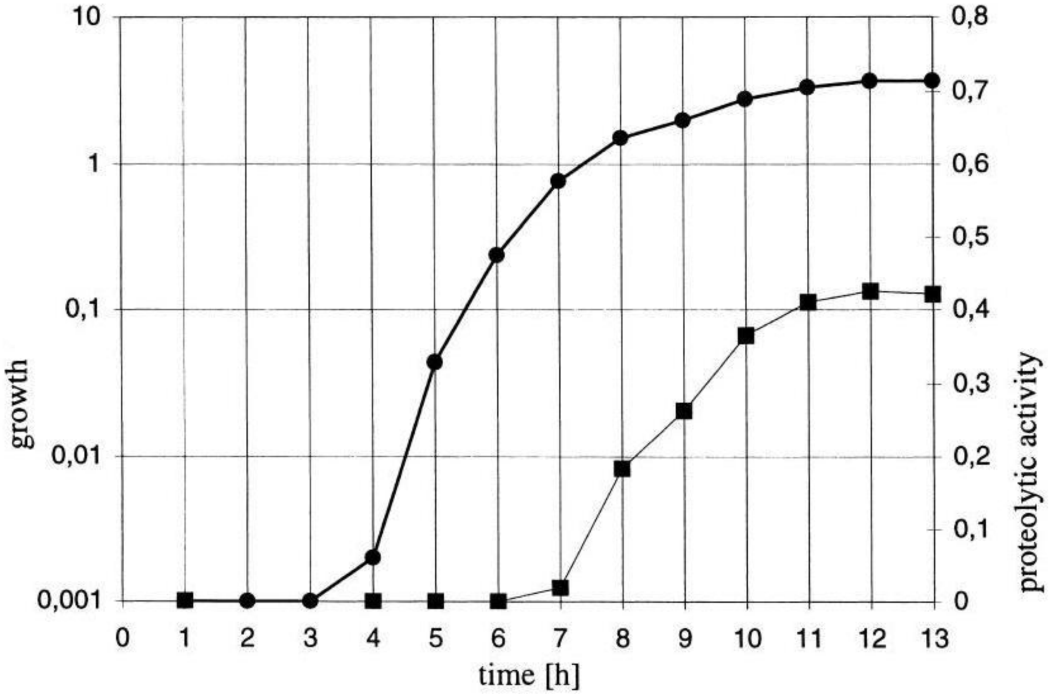
- Η δραστηριότητα πρωτεάσης στο υγρό μέσο αξιολογείται πρώτα, με εμπλουτισμό των βακτηρίων σε εμπλουτισμένο μέσο που περιέχει εκχύλισμα βοδινού κρέατος (0.3 %), πεπτόνη (0.5 %), NaCl (0,5 %) και γλυκόζη (0.5 %) σε pH=7 για 24 ώρες.
- Τότε 10 % της εμπλουτισμένης αποικίας εμβολιάζεται σε φιάλη 250 mL που περιέχει 45 ml βασικού μέσου του οποίου η σύνθεση σε (gr/l) είναι:

$(NH_4)_2SO_4$ - 2gr
K_2HPO_4 - 1gr
KH_2PO_4 - lgr
$MgSO_4.7H_2O$ - 0.4gr
$MnSO_4.H_2O$ - 0.01gr

$FeSO_4.7H_2O$ - 0.0lgr
Εκχύλισμα ζύμης - lgr
πεπτόνη - l0gr σε pH 7

- Η καλλιέργεια επωάζεται έπειτα για 2 ημέρες με αντίστροφη ανάδευση στους 32°C.
- Τα κύτταρα συγκομίζονται έπειτα από φυγοκέντριση 10000 rpm για 15 λεπτά και το εναιώρημα χρησιμοποιείται για την περαιτέρω χημική ανάλυση της πρωτεάσης.

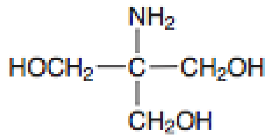
Σε έρευνα των Hartmann et al., (1999) επιβεβαιώνεται η απομόνωση ουδέτερης πρωτεάσης με χαρακτηριστικά όμοια της καμελυσίνης με μαγνητική λήψη με τη μέθοδο του υβριδισμού για τον καθαρισμό και εξέταση ουδέτερης πρωτεάσης από στέλεχος του είδους *Bacillus cereus* (DSM 3101). Η ανάπτυξη του βακτηρίου και η πρωτεολυτική δραστηριότητα στην έρευνά τους διαφαίνονται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 2.14: Ανάπτυξη του *Bacillus cereus* (●) και (■)πρωτεολυτική δραστηριότητα της ουδέτερης πρωτεάσης σε υγρή καλλιέργεια.
Πηγή: B. Atkinson, F. Mavituna, "Biochemical engineering and biotechnology handbook", 1983.

2.4.10.2 Χημική ανάλυση πρωτεΐνης

Η μέθοδος προσδιορισμού ενζυμικής δραστικότητας με υπόστρωμα την καζεΐνη χρησιμοποιείται αρκετά συχνά και είναι γνωστή ως μέθοδος του Kunitz (1947). Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της διακύμανσης του pH είναι το Tris. Το Tris-buffer έχει τιμή pKa 8.06, η οποία υποδηλώνει ότι το ρυθμιστικό διάλυμα έχει μια αποτελεσματική εμβέλεια pH μεταξύ 7.0 και 9.2. Το εύρος αυτό συμπίπτει με το τυπικά φυσιολογικό pH των περισσότερων ζώντων οργανισμών. Το γεγονός αυτό, καθώς επίσης το χαμηλό κόστος του, κάνουν το Tris ένα από τα πιο κοινά ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στα βιολογικά και βιοχημικά εργαστήρια (http: //en.wikipedia.org/). Ο χημικός τύπος του Tris – buffer φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 2.15: Χημικός τύπος του Tris – HCl buffer.

Το σύστημα χημικής ανάλυσης αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά:

- 1,25 ml Tris [(hydroxymethyl)-aminomethyl, pH=7.2-9.2] ρυθμιστικό διάλυμα (pH 7.2), για τον έλεγχο διακύμανσης του pH,
- 0,5 ml από 1% υδατικό διάλυμα καζεΐνης και
- 0,25 ml εναιώρημα καλλιέργειας.

Το μίγμα επωάζεται για 30 λεπτά, στους 30°C. Τότε 3 ml από 5% TCA προσθέτονται στο μίγμα και διαμορφώνεται ίζημα. Το TCA (trichloroacetic acid) μετουσιώνει την καζεΐνη πριν μπορέσει να υδρολυθεί από το ένζυμο και πρακτικά σταματά την αντίδραση. Το παραγόμενο ίζημα τοποθετείται στους 4°C για 10 λεπτά. Κατόπιν υποβάλλεται σε φυγοκέντριση στις 5000 rpm για 15 λεπτά. Από αυτό, 0,5 ml του εναιωρήματος που λαμβάνεται, προστίθεται σε αυτό 2,5 ml από ανθρακικό νάτριο 0.5M, αναδεύεται και επωάζεται για 20 λεπτά. Τέλος προστίθεται 0,5 ml αντιδραστηρίου φαινόλης φολίνης και διαβάζεται η απορρόφηση στα 660 nm χρησιμοποιώντας UV-Vis Φασματοφωτόμετρο.

Η ποσότητα της πρωτεάσης που παράγεται έχει καθοριστεί να μετριέται με τη βοήθεια της τυποποιημένης γραφικής παράστασης της τυροσίνης. Με βάση την τυροσίνη που απελευθερώνεται η δραστηριότητα της πρωτεάσης εκφράζεται σε μικρογραμμάρια τυροσίνης που απελευθερώνονται κάτω από κανονικές συνθήκες χημικής ανάλυσης (Genckal και Tari 2006).

2.4.10.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης

Στην πλειοψηφία των ερευνών, ο προσδιορισμός της η συγκέντρωση της διαλυτής πρωτεΐνης στο ελεύθερο δείγμα κυττάρων υπολογίζεται κατά τη **μέθοδο Lowry** χρησιμοποιώντας ορό μοσχαρίσιας λευκωματίνης (BSA-bovine serum albumin) σαν πρότυπο αναφοράς (Lowry et al., 1951).

Η μέθοδος συνδυάζει τις αντιδράσεις των δισθενών ιόντων χαλκού με τους πεπτιδικούς δεσμούς κάτω από αλκαλικές συνθήκες (μέθοδος Biuret) με την οξείδωση αρωματικών πρωτεϊνικών υπολειμμάτων. Η μέθοδος Lowry χρησιμοποιείται καλύτερα με συγκεντρώσεις πρωτεΐνης από 0.01 έως 1.0 mg/ml. Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του Cu^{+}, που παράγεται από την οξείδωση των πεπτιδικών δεσμών, με αντιδραστήριο φολίνης (ένα μίγμα από φωσφοβολφραμικό οξύ και φωσφομολυβδικό οξύ σε φαινόλη). Ο μηχανισμός αντίδρασης δεν είναι ιδιαίτερα κατανοητός, αλλά περιλαμβάνει μείωση του αντιδραστηρίου φολίνης και οξείδωση των αρωματικών υπολειμμάτων (κυρίως θρυπτοφάνη, επίσης τυροσίνη). Η συγκέντρωση του μειωμένου αντιδραστηρίου φολίνης μετριέται με απορρόφηση στα

750nm. Σαν αποτέλεσμα, η ολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο δείγμα μπορεί να συναχθεί αφαιρετικά από την συγκέντρωση των υπολειμμάτων θρυψίνης και τυροσίνης τα οποία οξειδώνουν το αντιδραστήριο φολίνης.

Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μεγάλος χρόνος επώασης και υπάρχουν συχνά παρεμβάσεις με τα συνήθη χρησιμοποιούμενα ρυθμιστικά διαλύματα.

2.4.10.4 Βελτιστοποίηση των μέσων συστατικών για την παραγωγή πρωτεΐνης

Η βελτιστοποίηση των μέσων συστατικών με τις κατάλληλες θρεπτικές πηγές για την παραγωγή πρωτεάσεων πραγματοποιείται με την αντικατάσταση των συστατικών που παρουσιάζονται στο βασικό μέσο και διαδοχική βελτιστοποίηση.

2.4.11 Επιδράσεις στην παραγωγή πρωτεΐνης

2.4.11.1 Επίδραση των αποβλήτων τόνου στην παραγωγή πρωτεΐνης

Η παρούσα εργασία ελέγχει την επίδραση των αποβλήτων επεξεργασίας τόνου σαν πηγή αζώτου για παραγωγή πρωτεάσης (καμελυσίνη) και την απομόνωσή της από τα απόβλητα τόνου. Διαφορετικά κλάσματα των πρωτεϊνών αποβλήτων τόνου όπως, ακατέργαστο κρέας τόνου, αποβουτυρωμένο κρέας τόνου, όξινα υδροδιαλυτά απόβλητα τόνου και αλκαλικά υδροδιαλυτά απόβλητα τόνου έχουν εξεταστεί και έχουν βγει χρήσιμα συμπεράσματα για την επίδρασή τους στην παραγωγή πρωτεάσης. Παρόλο που η διαδικασία της πρωτεϊνικής υδρόλυσης είναι σχετικά απλή, υπάρχει ένας αριθμός παραγόντων που χρειάζονται προσεκτική μελέτη πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την υδρόλυση. Η φύση και η ποιότητα της ακατέργαστης ύλης μπορεί να έχει μεγάλη επίδραση στη διαδικασία υδρόλυσης καθώς επίσης στην ποιότητα και τη λειτουργικότητα του τελικού προϊόντος.

Για να ληφθεί η σκόνη κρέατος ψαριού, μια γνωστή ποσότητα αποβλήτων μαγειρεύεται μέχρι να βράσει. Τα κόκαλα αφαιρούνται και το μαγειρευμένο κρέας πιέζεται ή αλλιώς συμπιέζεται για να αφαιρεθεί το κρέας και το λίπος. Το πιεσμένο προϊόν που προκύπτει, τεμαχίζεται σε μύλο κρέατος και έπειτα αποξηραίνεται στους 80°C για 24 με 48 ώρες. Το αποξηραμένο κρέας που παράγεται τεμαχίζεται ξανά για να ληφθεί η λεπτή σκόνη (πούδρα) και έπειτα αποθηκεύεται σε γυάλινα μπουκάλια σε θερμοκρασία δωματίου. Η προετοιμασία του αποβουτυρωμένου κρέατος τόνου γίνεται με εξαγωγή με μεθανόλη χλωροφορμίου σε αναλογία 3:1 με τη χρησιμοποίηση συσκευών Soxhlat. Η μέθοδος προετοιμασίας του όξινου υδρολύματος των αποβλήτων τόνου είναι μια διαδικασία που έχει περιγραφεί από τους Gao et al, (2006). Το δε αλκαλικό υδρόλυμα των αποβλήτων τόνου παρασκευάζεται σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τον Batista,(1999). Τέλος το ακατέργαστο κρέας ψαριών τόνου χρησιμοποιείται υπό την αυτή μορφή χωρίς οποιαδήποτε επεξεργασία. Τα επακόλουθα προϊόντα εξετάζονται χωριστά με την αντικατάσταση πεπτόνης που παρουσιάζεται στο βασικό μέσο, ταυτόχρονα η πεπτόνη που περιέχει το βασικό μέσο λαμβάνεται ως έλεγχος για εμπορικές πηγές αζώτου σε μια σειρά από πειράματα.

Μετά το διαχωρισμό του υλικού από κόσκινο η μέγιστη πρωτεάση αποδίδει υπόστρωμα, το οποίο βελτιστοποιείται περαιτέρω με ποικίλες συγκεντρώσεις (1,5, 2.0, 3.0, 3.5 και 4.0%). Η χρονική πορεία της παραγωγής πρωτεάσης στα δοκιμασμένα υποστρώματα μελετάται επίσης κατά τη διάρκεια των διαφορετικών χρονικών διαστημάτων της ζύμωσης (24-96 ώρες).

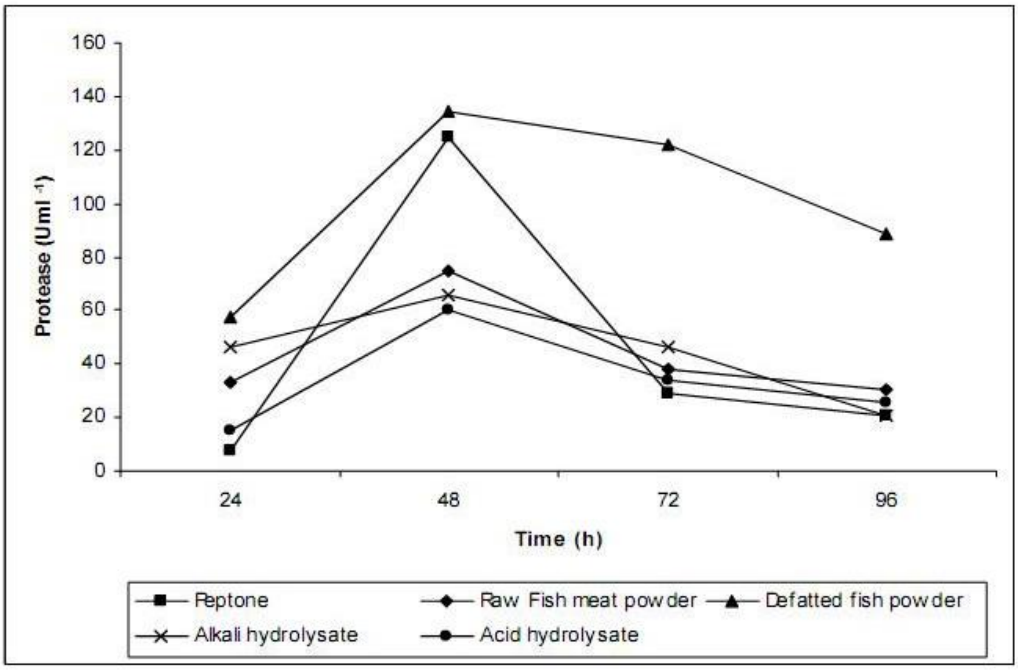
Η εικόνα 2.16, παρουσιάζει την επίδραση διαφορετικών παρασκευασμάτων αποβλήτων τόνου ως πηγή αζώτου για την παραγωγή πρωτεάσης. Από έρευνες αποδεικνύεται ότι το αποβουτυρωμένο κρέας ψαριών φαίνεται να είναι η καλύτερη πηγή αζώτου για μεγιστοποίηση της παραγωγής πρωτεάσης (134.57±0,47 U/ml) απ' ότι οι άλλες δοκιμασμένες προετοιμασίες συμπεριλαμβανομένου του μέσου ελέγχου για εμπορική πεπτόνη (124.90±0,08 U/ml) σε 48 ώρες φυγοκέντρισης. Στις άλλες προετοιμασίες όπως όξινο και αλκαλικό υδρόλυμα των αποβλήτων τόνου, παρατηρείται χαμηλή παραγωγή πρωτεάσης (60,37±0.59 και 65,96±0.64 U/ml αντίστοιχα). Στο προστιθέμενο μέσο ακατέργαστο κρέας ψαριών η παραγωγή πρωτεάσης που έχει καταγραφεί είναι 74.77±0,69 U/ml. Το two-way ANOVA test δείχνει ότι η διαφορά μεταξύ διαφορετικών παρασκευασμάτων αποβλήτων τόνου και πεπτόνης και επίσης οι πειραματικές διάρκειες επηρέασαν σημαντικά την παραγωγή πρωτεάσης ($p<0.05$).

Η αύξηση της παραγωγής πρωτεάσης στο προστιθέμενο μέσο αποβουτυρωμένου κρέατος ψαριών μπορεί ίσως να αποδοθεί στην ελεύθερη φύση λιπιδίων του προϊόντος, θα μπορούσε να υποστηρίξει η σύνθεση πρωτεάσης από τα υποψήφια είδη παρά από άλλα προ-παρασκευάσματα πηγών αζώτου. Μερικά λιπίδια είναι επιφανειακώς ενεργά δεδομένου ότι είναι αμφιφιλικά μόρια, δηλαδή περιέχουν τόσο υδρόφιλες όσο και υδρόφοβες μονάδες (H.-D.Belitz et al., 2006). Παρόμοια εύρεση παρατηρήθηκε επίσης στην πρόσφατη μελέτη για την παραγωγή λιπάσης με *Rhizopus oryzae* από τους Ghorbel et al, (2005). Αυτοί κατέγραψαν περισσότερη παραγωγή λιπάσης χρησιμοποιώντας υδρόλυμα αποβουτυρωμένης πρωτεΐνης σαρδέλας και λιγότερη παραγωγή στο ακατέργαστο αποβουτυρωμένο κρέας ψαριών και αυτό ήταν υψηλό όταν συγκρίθηκε με το ακατέργαστο κρέας ψαριών. Αυτή η έρευνα υποστηρίζει επίσης τα πρόσφατα ευρήματα των Ellouz et al. (2003 & 2004), Vazquez et al, (2004 & 2006) στη χρήση αποβλήτων ψαριών ως πηγή αζώτου για βακτηριακή ανάπτυξη και παραγωγή πρωτεάσης.

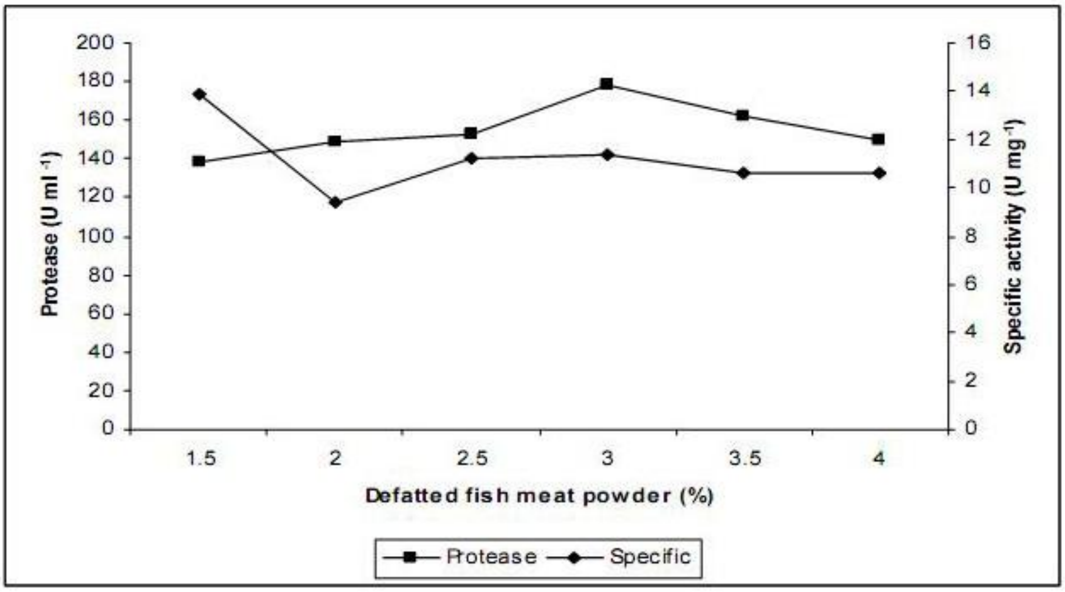
Δεδομένου ότι η παραγωγή πρωτεάσης είναι υψηλή στο αποβουτυρωμένο κρέας αποβλήτων τόνου συμπληρωμένο μέσο, διαφορετικές συγκεντρώσεις έχουν εξεταστεί για παραγωγή πρωτεάσης. Μεταξύ των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, 3% βρέθηκε να είναι το βέλτιστο να παράγει μέγιστη πρωτεάση (178,50±0.28 U/ml) και πάνω από αυτή τη συγκέντρωση, η ενζυμική παραγωγή μειώθηκε (Εικ. 2.17).

Η στατιστική ανάλυση με One-way ANOVA αποκαλύπτει ότι, η διαφορά στην παραγωγή πρωτεάσης μεταξύ των συγκεντρώσεων είναι στατιστικά σημαντική ($P<0.0001$).

Η τάση παραγωγής πρωτεάσης στη διάρκεια του χρόνου, δείχνει ότι η κατάλληλη διάρκεια για να παραχθεί η μέγιστη πρωτεάση είναι 48 ώρες, πάνω από αυτή την περίοδο η παραγωγή ενζύμου μειώνεται και αυτό ίσως εξαιτίας της επίτευξης μειωμένης φάσης από το βακτήριο ξενιστή. Η μετουσίωση συνήθως προκαλεί αλλαγές στην ευαισθησία των βακτηρίων στη θερμοκρασία, εκφράζοντας το γεγονός αυτό σε μεταβολές στο συγκεκριμένο ρυθμό ανάπτυξης. Η διάρκεια της φάσης υστέρησης σχετίζεται αντίστροφα με τη θερμοκρασία επώασης.



Εικόνα 2.16: Επίδραση των διαφορετικών παρασκευασμάτων αποβλήτων τόνου στην παραγωγή πρωτεΐνης σε διάφορα χρονικά διαστήματα.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.



Εικόνα 2.17: Βελτιστοποίηση των διαφορετικών συγκεντρώσεων σκόνη αποβουτυρωμένου κρέατος ψαριού σαν πηγή νιτρικών για την παραγωγή πρωτεΐνης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.

2.4.11.2 Επίδραση των πηγών άνθρακα στην παραγωγή πρωτεΐνης

Στο μικροβιακό μέσο πολιτισμού, ο τύπος πηγών άνθρακα είναι επίσης ένας σημαντικός θρεπτικός παράγοντας στην παραγωγή πρωτεάσεων. Οι Esakkiraj et al., 2007 ανέφεραν επίσης την επίδραση των πηγών άνθρακα στην παραγωγή πρωτεάσεων με τη χρησιμοποίηση δέκα διαφορετικών πηγών άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι μονοσακχαρίτες: γλυκόζη, γαλακτόζη και φρουκτόζη, οι ολισακχαρίτες: λακτόζη, σακχαρόζη, μαλτόζη (διζαχαρίτες) και ραφινόζη (τριζαχαρίτης) και πολυζαχαρίτες όπως το άμυλο. Επίσης εξετάστηκε η ξυλόζη και η αραβινόζη, οι οποίες είναι ημικυτταρίνες, για το λόγο ότι είναι εξαιρετικά ευαίσθητες στα χημικά διαλύματα και υδρολύονται εύκολα καθώς επίσης είναι πολύ αδύναμες στη θερμοκρασία και αποικοδομούνται εύκολα (Μαντάνης, 2001).

Εξέτασαν ξεχωριστά τις πηγές άνθρακα στη συγκέντρωση 0.5% σαν πηγή αζώτου βελτιστοποιημένο βασικό μέσο. Κατόπιν η μέγιστη παραγωγή ενζύμου στην πηγή άνθρακα βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω με ποικίλες συγκεντρώσεις (1, 1.5, 2, 2.5 και 3%).

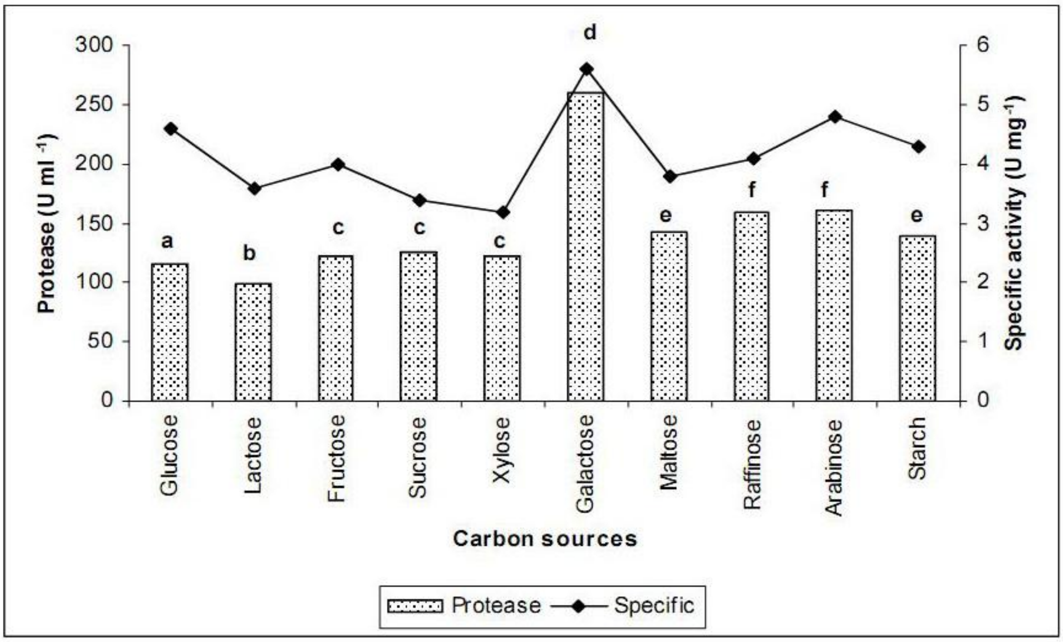
Στην παρούσα έρευνα το βακτηριακό είδος *B.cereus* ερευνήθηκε ότι παράγει μέγιστη πρωτεάση (259.83 ± 0.04 U/ml) απ' ότι οι άλλες δοκιμασμένες πηγές άνθρακα (Εικ. 2.18). Πολλαπλή σύγκριση μέσω SNK test, δείχνει την παραγωγή πρωτεάσης από το *B.cereus* σε διάφορες πηγές άνθρακα επίσης δείχνει και ύπαρξη σημαντικής διαφοράς ($p<0.05$) μεταξύ τους με λίγες εξαιρέσεις. Αυτό συμβαίνει επειδή η γαλακτόζη είναι ένας απλός μονοσακχαρίτης, πράγμα που σημαίνει ότι η διαλυτότητά της στο νερό είναι καλή με αποτέλεσμα να μπορεί να ληφθεί εύκολα από το βακτήριο ξενιστή. Γενικά οι μονοζαχαρίτες είναι διαλυτοί σε μικρή έκταση στην αιθανόλη και αδιάλυτοι σε οργανικούς διαλύτες όπως ο αιθέρας, το χλωροφόρμιο ή το βενζόλιο. Στην περίπτωση άλλων υδατανθράκων, η λακτόζη έδωσε φτωχή παραγωγή απ' ότι τα άλλα (98.97±0.12 U/ ml) και ο αρμόδιος λόγος γι' αυτή την κατασταλτική επίδραση στην παραγωγή πρωτεάσης επικυρώνεται στην καταβολική καταστολή (catabolic repression) (Kumar et al, 1999).

Η διακαταστολή (το αποτέλεσμα της καταστολής) μπορεί να επιτευχθεί με παραποίηση του περιβάλλοντος χρησιμοποιώντας μία ή και τις δύο από τις ακόλουθες διαδικασίες (Demain, 1972):

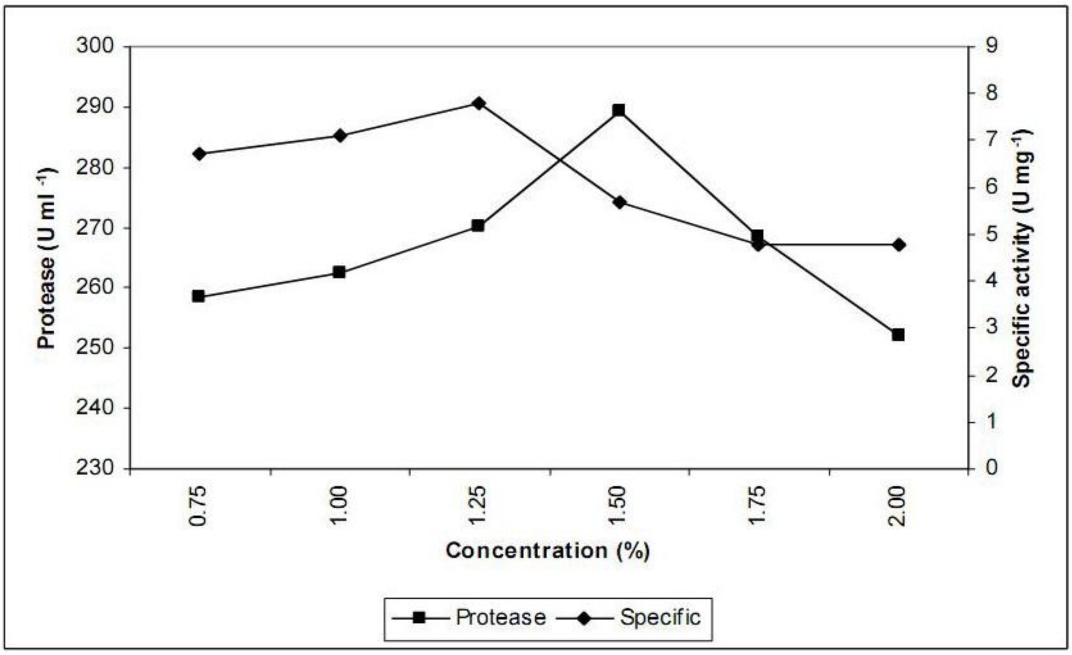
1) καταστολή από προϊόντα του μονοπατιού μπορούν να μειωθούν από περιορισμένη συσσώρευση προϊόντος.
2) καταβολική καταστολή είναι η μείωση της σύνθεσης, για παράδειγμα, αμυλάσες ή πρωτεάσες από τροποποιημένα προϊόντα όταν ραγδαία χρησιμοποιήσιμα θρεπτικά (π.χ. γλυκόζη ή αμμωνία) είναι διαθέσιμα. Περιορίζεται με την προσθήκη λιγότερο άμεσων θρεπτικών ουσιών (π.χ. άμυλο ή εκχύλισμα σόγιας).

Υπάρχουν πολλές αναφορές που αφορούν στην επίδραση των μονοσακχαριτών στην παραγωγή πρωτεάσης. Οι Mao et al.,1992, μελέτησαν τη βελτιστοποίηση της παραγωγής πρωτεάσης από το *B.Iicheniformis* χρησιμοποιώντας μονοσακχαρίτη – γλυκόζη. Οι Prakasham et al., 2006, ανέφεραν τη μέγιστη παραγωγή πρωτεάσης σε προστιθέμενο μέσο ξυλόζης και μαλτόζης. Η παρούσα έρευνα παρουσιάζει συνάφεια με τα παραπάνω ευρήματα.

Συμπεριλαμβάνοντας την αναφορά της γαλακτόζης για την παραγωγή πρωτεάσης, και η εξέτασή της σε διάφορες συγκεντρώσεις, βρέθηκε ότι 1.5% είναι η βέλτιστη συγκέντρωση για να παράγει το υψηλότερο ποσό του ενζύμου πρωτεάση (289,40±0.16 U/ ml) (Εικ. 2.19). Στατιστική ανάλυση με One-way ANOVA δείχνει ότι οι διαφορές στην παραγωγή πρωτεάσης μεταξύ των συγκεντρώσεων είναι στατιστικά σημαντική. ($P<0.0001$)



Εικόνα 2.18: Επίδραση των διαφορετικών πηγών άνθρακα στην παραγωγή πρωτεάσης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.



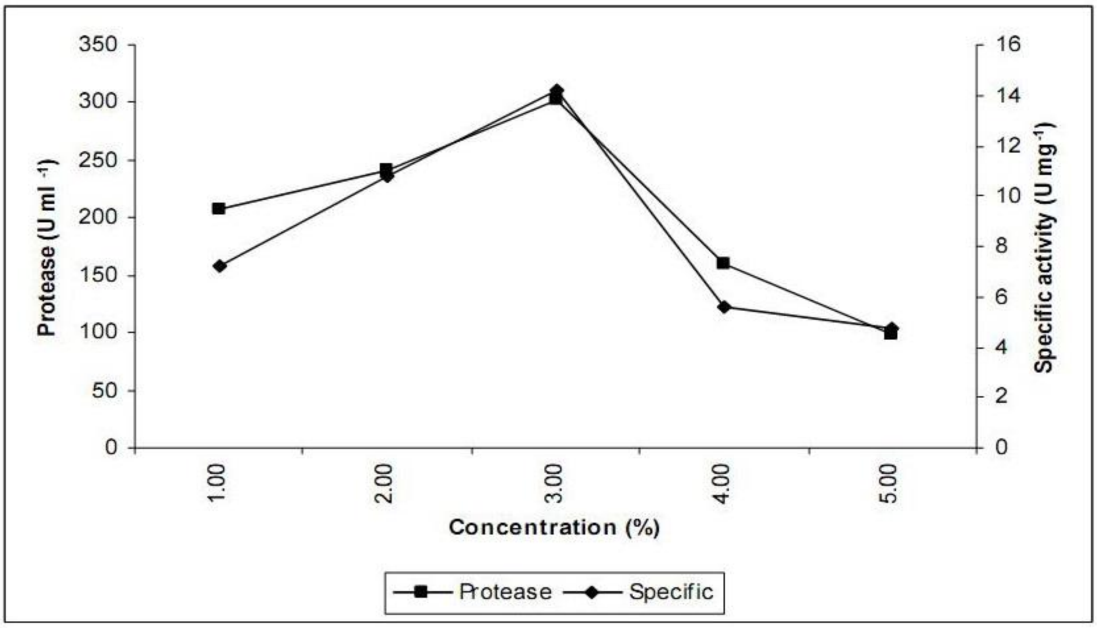
Εικόνα 2.19: Βελτιστοποίηση των διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλακτόζης σαν πηγή άνθρακα για παραγωγή πρωτεάσης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.

2.4.11.3 Επίδραση του χλωριούχου νατρίου στην παραγωγή πρωτεΐνης

Δεδομένου ότι ο *Bacillus cereus* απομονώνεται από το έντερο των ψαριών στις εκβολές ποταμών, εκ τούτου η επίδραση του NaCl στην παραγωγή πρωτεάσης εξετάζεται επίσης με την προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων NaCl (1, 2, 3,4 και 5%) στο βελτιστοποιημένο μέσο αζώτου και άνθρακα.

Τα αποτελέσματα για την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του NaCl στην παραγωγή πρωτεάσης από το *B.cereus* δείχνουν ότι είναι μέγιστη (301.63±0.20 U/ ml

) σε συγκέντρωση 3% (Εικ. 2.20). Επιπλέον αυτό δείχνει ότι το βακτήριο ξενιστής είναι συγκρατημένο αλοφιλικό. Ο όρος αλοφιλικός οργανισμός αναφέρεται σε οργανισμούς που για την ανάπτυξή τους απαιτείται αλμυρό περιβάλλον. Μία συγκέντρωση NaCl της τάξης του 7.5% λειτουργεί ανασταλτικά στα περισσότερα θετικά και αρνητικά κατά Gram βακτήρια. Στατιστική ανάλυση με One-way ANOVA δείχνει ότι η διαφορά στην παραγωγή πρωτεάσης για τις διάφορες συγκεντρώσεις είναι στατιστικά σημαντική ($P<0.0001$). Ο λόγος είναι ότι το βακτήριο που εξετάζεται θεωρείται ότι απομονώθηκε από έντερα παράκτιου ψαριού. Η αλατούχος φύση της εκβολής είναι συχνά γνωστό να κυμαίνεται πού λόγω της εισροής του γλυκού και του θαλασσινού νερού. Παρόμοια μελέτη έχει αποδειχθεί για την παραγωγή πρωτεάσης από το θαλασσινό νερό απομονώνοντας το *Bacillus* Sp σε 10% NaCl (Patel et al, 2006) και την ανθεκτική στο αλάτι εξωκυτταρική πρωτεάση από *B.sublilis* FP 133 από βρασμένο αλάτι από πολτό ψαριού (Strtyorini et al., 2006).



Εικόνα 2.20: Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων χλωριούχου νατρίου στην παραγωγή πρωτεάσης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.

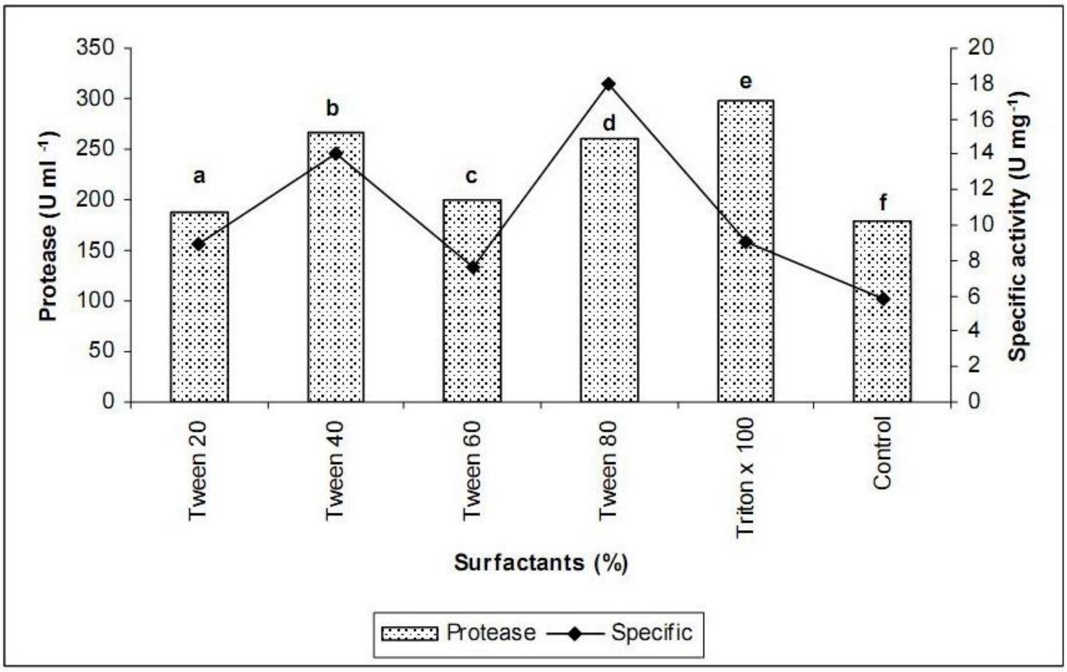
2.4.11.4 Επίδραση των επιφανειοδραστικών στην παραγωγή πρωτείνης

Οι τασιενεργοί παράγοντες (επιφανειοδραστικές ενώσεις) που απαντώνται στη φύση αλλά και συνθετικοί χρησιμοποιούνται όταν είναι επιθυμητή η μείωση της επιφανειακής τάσης π.χ. στην παρασκευή και σταθεροποίηση όλων των ειδών διασποράς, συμπεριλαμβανομένου γαλακτωμάτων, αφρών, αερολυμάτων (αεροζόλ) και αιωρημάτων. Σε όλες τις περιπτώσεις μια εξωτερική, συνεχής φάση διαχωρίζεται από μια εσωτερική, ασυνεχή, διασπαρμένη φάση.

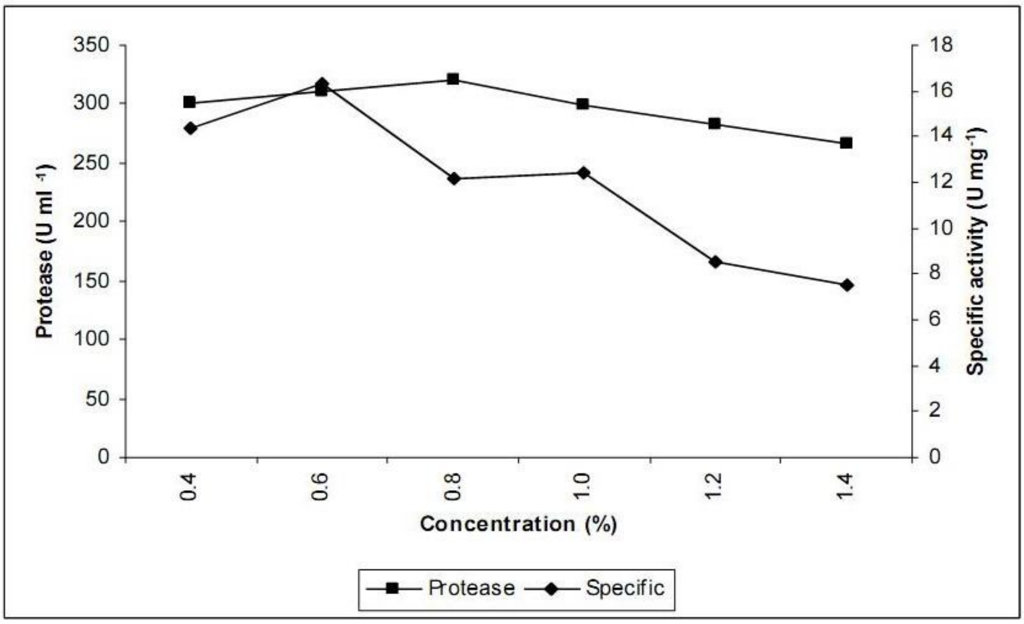
Οι Esakkiraj et al., 2007 μελέτησαν την επίδραση των τασιενεργών στην παραγωγή πρωτεάσης. Πέντε διαφορετικά απορρυπαντικά χρησιμοποιήθηκαν για πειραματισμό. Αυτά ήταν : Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 και Triton x 100. Τα επιλεγμένα απορρυπαντικά ενσωματώθηκαν ξεχωριστά στις πηγές αζώτου και το βελτιστοποιημένο μέσο άνθρακα στη συγκέντρωση 0.2%. Σε όλη τη δοκιμή, ένα μέσο χωρίς τασιενεργά χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος. Η αποδοτικότητα καθορίστηκε μετά από 48 ώρες επώασης. Κατόπιν η μέγιστη πρωτεάση που παρήγαγε απορρυπαντικό βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω από ποικίλες συγκεντρώσεις όπως 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 και 1.2% σε ξεχωριστό παρασκευασμένο μέσο.

Η επιλογή και η βελτιστοποίηση των απορρυπαντικών στην παραγωγή πρωτεάσης έχει μελετηθεί με τη χρησιμοποίηση πέντε μη-ιοντικών επιφανειοδραστικών, δηλαδή, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 και Triton X 100 και έναν έλεγχο χωρίς απορρυπαντικό (Εικ. 2.21). Το αποτέλεσμα έδειξε τη σταθερότητα του *B.cereus* να παράγει πρωτεάση έναντι όλων των απορρυπαντικών. Μεταξύ των δοκιμασμένων απορρυπαντικών, το προστιθέμενο μέσο Triton X 100 παρήγαγε τη μέγιστη πρωτεάση (298,63 ± 0,12 U/ml), ενώ το παρεχόμενο μέσο Tween 20 έδωσε πολύ χαμηλή παραγωγικότητα (186,57±0.09 U/ ml).

Πολλαπλή σύγκριση με SNK test δείχνει ότι η διαφορά στην παραγωγή πρωτεάσης από το *B.cereus* στα δοκιμασμένα απορρυπαντικά είναι στατιστικά σημαντική (p<0,01). Παρόμοιες αναφορές υπάρχουν για την επίδραση των απορρυπαντικών στην παραγωγή λιπάσης από *Yarrowia lipotica* (Alberto et al., 2003). Απορρυπαντικά που βοηθούν στην παραγωγή αμυλάσης από το *B.subtilis* (Goes και Sheppard 1999) και σταθερότητα της παραγόμενης πρωτεάσης από *B.clausii* έναντι το Triton X 100 και το Tween 20 (Ganesh Kumar et al., 2004). Στη βελτιστοποίηση του Triton X 100, μια συγκέντρωση της τάξης του 0,8% φαίνεται να είναι βέλτιστη για τη μεγιστοποίηση της παραγωγής πρωτεάσης,(320,57±0,17 U/ml) (Εικ. 2.22). One way ANOVA test αποκαλύπτει ότι, η διαφορά στην παραγωγή πρωτεάσης μεταξύ των δοκιμασμένων συγκεντρώσεων του Triton X 100 είναι στατιστικά σημαντική. (P<0.0001)



Εικόνα 2.21: Επίδραση των διάφορων επιφανειοδραστικών στην παραγωγή πρωτεάσης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.



Εικόνα 2.22: Βελτιστοποίηση του απορρυπαντικού TritonX100 για παραγωγή πρωτεάσης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.

2.4.11.5 Μερικώς χαρακτηρισμός της ακατέργαστης καμελυσίνης

Η ακατέργαστη πηγή ενζύμου που αποκτάται από την ανωτέρω εν λόγω βελτιστοποιημένη θρεπτική ουσία με φυγοκέντριση, χαρακτηρίζεται για τη θερμική σταθερότητά της και την ανθεκτικότητά της στο pH. Το βέλτιστο pH για την δραστηριότητα της καμελυσίνης από τον μικροοργανισμό *Bacillus cereus* καθορίζεται από τη χρησιμοποίηση διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων pH στο μέσο δοκιμής. Η χημική ανάλυση πραγματοποιείται χωριστά σε διάφορα pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 και 10). Η επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα της καμελυσίνης μελετάται με την επώαση του ενζύμου και τη λύση του υποστρώματος σε διάφορες θερμοκρασίες. Η χημική ανάλυση πραγματοποιείται χωριστά σε διάφορες θερμοκρασίες όπως 10, 20, 30,40, 50, 60, 70, 80, 90 και 100°C.

2.4.11.6 Επίδραση του pH στην ενζυμική δραστηριότητα

Κάθε ένζυμο είναι καταλυτικά ενεργό μόνο σε μία στενή περιοχή του pH και, κατά κανόνα, καθένα έχει ένα βέλτιστο pH που συχνά βρίσκεται μεταξύ των τιμών pH 5.5 και 7.5. Το βέλτιστο pH επηρεάζεται από τον τύπο και την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού που χρησιμοποιείται στη δοκιμή. Οι λόγοι για την ευαισθησία του ενζύμου στις μεταβολές του pH είναι δύο:

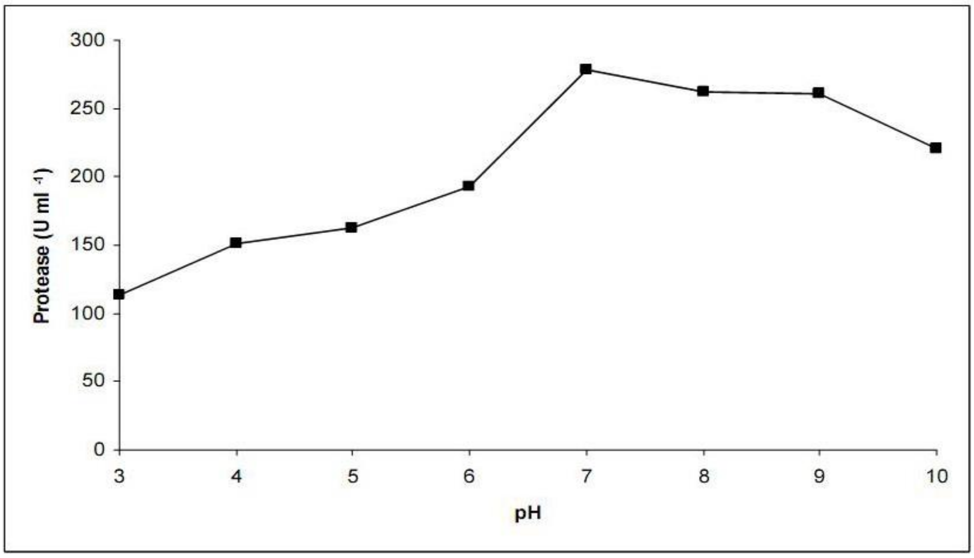
i. η ευαισθησία συνδέεται με μια αλλαγή στην πρωτεϊνική δομή που οδηγεί σε αμφίδρομη μετουσίωση,
ii. η καταλυτική δραστηριότητα εξαρτάται από την ποσότητα των ηλεκτροστατικών φορτίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου που παράγεται από τις πρωτοποριακές ομάδες του ενζύμου.

Επιπλέον ο ιονισμός διιστάμενων υποστρωμάτων καθώς επηρεάζεται το pH μπορεί να είναι σημαντικός παράγοντας για την ταχύτητα της αντίδρασης. Εντούτοις, τέτοιες επιδράσεις πρέπει να προσδιοριστούν ξεχωριστά (H.-D. Belitz et al., 2006).

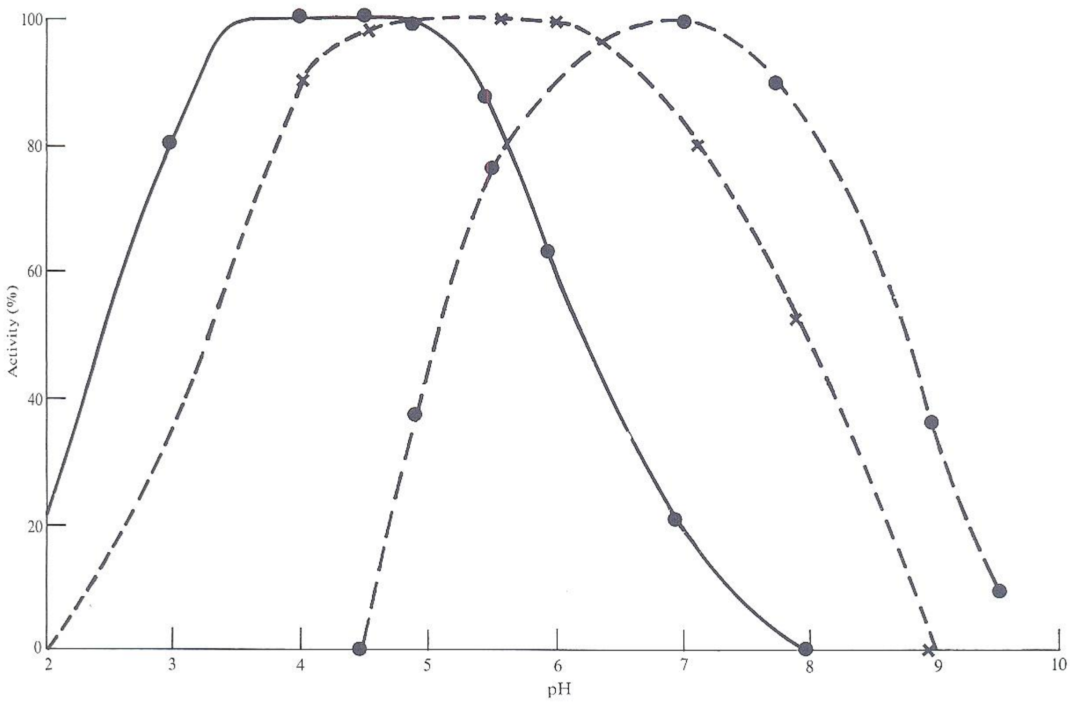
Η επίδραση του pH στην δραστηριότητα της πρωτεάσης παρουσιάζεται στη εικόνα 2.23. Το αποτέλεσμα συμπέρανε ότι το pH 7.0 ήταν το βέλτιστο για την ενίσχυση της δραστηριότητας της πρωτεάσης (278,90±0.08 U/ml). Αυτό κατέγραψε μια θετική αύξηση στην δραστηριότητα ενζύμου μέχρι pH 7.0 και περαιτέρω αύξηση στο pH πέρα από 7.0, η ενζυμική δραστηριότητα μειώθηκε. Η παραλλαγή στη δραστηριότητα πρωτεάσης μεταξύ των δοκιμασμένων pH ήταν στατιστικά σημαντική, ($P<0.0001$).

Σχετικά πολύ λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για την εξωκυτταρική ενζυμική δραστηριότητα από τα βακτηρίδια εντέρων ψαριών. Οι Ray et al.,(2007) ανέφεραν ότι η βέλτιστη διακύμανση του pH για παραγωγή κυτταρινάσης από έντερο ψαριού απομονώνει *B.subtilis* CY5 και *B.circulans* ήταν 7 – 7.5 . Γι' αυτό το λόγο η παρούσα μελέτη υποστηρίζει το παραπάνω αποτέλεσμα και επίσης τη συνέπεια με την ουδέτερη παραγωγή πρωτεάσης από το *B.cereus* (Sam Sum et al, 2000) και το *B.stearothermophilus* (Fujio και Kume 1991).

Οι Atkinson et al., το 1983 ανέφεραν διάφορες διακυμάνσεις το pH από πρωτεάσες διαφόρων πηγών. Οι πρωτεάσες βακτηριακής προέλευσης παρόμοια με την καμελυσίνη φάνηκε να είχαν βέλτιστο pH κοντά στο pH 7 (Εικ. 2.24).

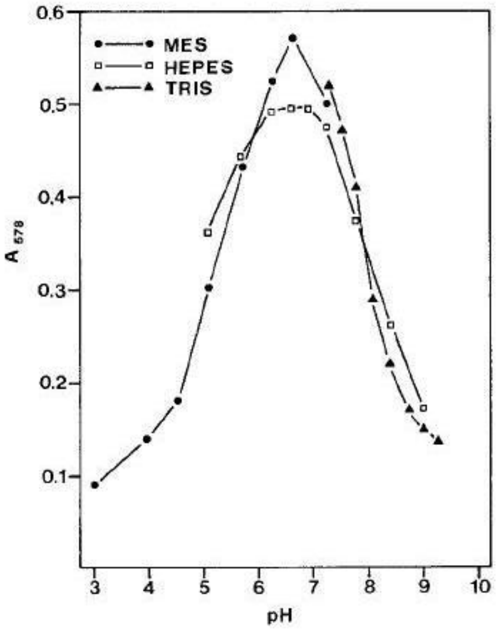


Εικόνα 2.23: Επίδραση των διαφορετικών pH στη δραστηριότητα καμελυσίνης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.



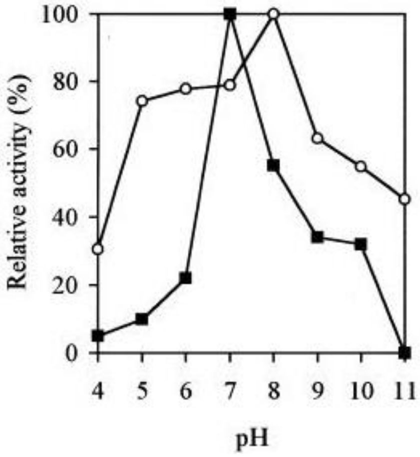
Εικόνα 2.24: Καμπύλες διακύμανσης του pH για γλυκόζη οξειδάση πρωτεάση (--x--), βακτηριακή πρωτεάση (--● --) και α-αμυλάση (— ● —).
Πηγή: B. Atkinson, F. Mavituna, "Biochemical engineering and biotechnology handbook", 1983.

Το 1986 οι Walter Silder et al., ανακάλυψαν μια ουδέτερη πρωτεάση από τον *Bacillus cereus* DSM 3101 με υψηλή ομολογία στη θερμολυσίνη. Η συγκεκριμένη ουδέτερη βακτηριακή πρωτεάση παρουσίασε βέλτιστο pH 6.8. Το προφίλ του pH φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 2.25: προφίλ του pH της ουδέτερης πρωτεάσης από τον Bacillus cereus DSM 3101 με μπλε χρωστική ουσία σε σκόνη σαν υπόστρωμα. Το ένζυμο επωάστηκε με μπλε χρωστική ουσία σε σκόνη. Τρία διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν: MES (N-Morpholinoethanesulfonic acid) pH 3.0-7.2; HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-ethanesulfonic acid) pH 5.1-9.0; TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethane) pH 7.2-9.2.
Πηγή: B. Atkinson, F. Mavituna, "Biochemical engineering and biotechnology handbook", 1983.

Το 1997 οι Jadwigak et al., σε έρευνά τους για τον καθαρισμό και το μερικό χαρακτηρισμό μιας ουδέτερης πρωτεάσης από μολυσματικό στέλεχος του είδους Bacillus cereus, βρήκαν ότι το βέλτιστο pH για την ενζυμική δραστηριότητα ήταν pH 7, χρησιμοποιώντας αιμογλοβίνη ως υπόστρωμα.



Εικόνα 2.26: Επίδραση του pH στη δραστηριότητα πρωτεάσης από Bacillus cereus χρησιμοποιώντας α) (Ο) λευκοματίνη (albumin) ως υπόστρωμα, β) (■) αιμογλοβίνη ως υπόστρωμα.
Πηγή: B. Atkinson, F. Mavituna, "Biochemical engineering and biotechnology handbook", 1983.

2.4.11.7 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα

Η θερμική επεξεργασία μπορεί είτε να επιταχύνει επιθυμητές χημικές ή ενζυμικές αντιδράσεις είτε να εμποδίσει ανεπιθύμητες μεταβολές με αδρανοποίηση των ενζύμων ή των μικροοργανισμών. Η επίπτωση της θερμικής αδρανοποίησης στις πρωτεάσες που χρησιμοποιούνται στα προϊόντα ιχθυηρών είναι απώλεια της ποιότητας ως προς τη υφή (ρευστοποίηση) και απώλεια βιταμίνης B_1. Η θερμοκρασία και ο χρόνος είναι δύο παράμετροι υπεύθυνες για τις επιδράσεις σε μια θερμική επεξεργασία. Η επίδραση της θερμοκρασίας αναλύεται στις επιμέρους ενότητες.

2.4.11.7.1 Χρονική εξάρτηση των επιδράσεων

Η αδρανοποίηση των ενζύμων και η καταστροφή των μικροοργανισμών μπορούν να απεικονιστούν ως αντίδραση $1^{ης}$ τάξης:

$$c_t = c_o e^{-kt} \tag{2.1}$$

με c_o και c_t, =τις συγκεντρώσεις (δραστηριότητες, μετρήσεις μικροβίων) στους χρόνους 0 και t, και k=σταθερά ταχύτητας για την αντίδραση. Για το c_t και το t από την εξίσωση (1) προκύπτει:

$$\log c_t = -\frac{k}{2.3} \cdot t + \log c_o \tag{2.2}$$

$$t = \frac{2.3}{k} \log \frac{c_o}{c_t} \tag{2.3}$$

c_o / c_t=10

$$t = \frac{2.3}{k} = D \quad (2.4)$$

Η αποκαλούμενη ''D-τιμή'' αντιπροσωπεύει το χρόνο που απαιτείται για να μειώσει την αρχική συγκέντρωση (δραστηριότητα, μέτρηση μικροβίων) κατά μια δύναμη του δέκα. Αναφέρεται σε μια ορισμένη θερμοκρασία η οποία πρέπει να δηλώνεται σε κάθε περίπτωση. Παραδείγματος χάριν: Bacillus cereus $D_{121°C} = 2.3s$.

2.4.11.7.2 Θερμοκρασιακή εξάρτηση των επιδράσεων

Υπάρχει μια σχέση για την εξάρτηση του ρυθμού αντίδρασης από τη θερμοκρασία. Εκφράζεται από μια εξίσωση *Arrhenius*:

$$k = A \cdot e^{-Ea/RT}$$

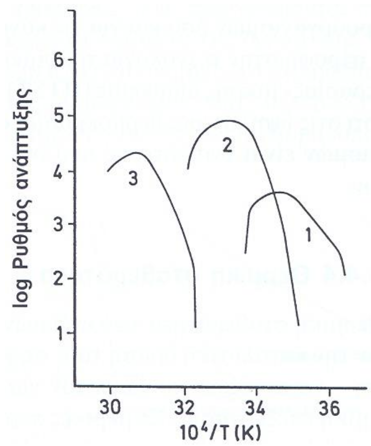
με k=σταθερά ταχύτητας για το ρυθμό αντίδρασης, E_a = ενέργεια ενεργοποίησης, R=παγκόσμια σταθερά αερίων και A= ο παράγοντας *Arrhenius*.

2.4.11.7.3 Βέλτιστη θερμοκρασία

Σε αντίθεση με τις κοινές χημικές αντιδράσεις, οι ενζυμικά – καταλυόμενες αντιδράσεις καθώς επίσης και η ανάπτυξη των μικροοργανισμών παρουσιάζουν το αποκαλούμενο βέλτιστο της θερμοκρασίας, το οποίο είναι ένα θερμοκρασιακά εξαρτώμενο μέγιστο ως αποτέλεσμα της επικάλυψης δύο αντίθετων φαινόμενων με σημαντικά διαφορετικές ενέργειες ενεργοποίησης:

- αύξηση στο ρυθμό αντίδρασης ή ανάπτυξης
- αύξηση στο ρυθμό αδρανοποίησης ή καταστροφής

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών ακολουθεί παρόμοια εξάρτηση από τη θερμοκρασία και μπορεί επίσης να απεικονιστεί σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius (Εικ. 2.27) με αντικατάσταση της τιμής k από το ρυθμό ανάπτυξης και υποθέτοντας ότι E_a είναι η τιμή αναφοράς μ της θερμοκρασίας για την ανάπτυξη.



Εικόνα 2.27: Ρυθμός ανάπτυξης και θερμοκρασία για 1) ψυχρόφιλους (Vibrio AF-1), 2) μεσόφιλους (E.coli K-12) και 3)θερμόφιλους (Bacillus cereus) μικροοργανισμούς (σύμφωνα με τους Herbert et al., 1989). *Πηγή: B. Atkinson, F. Mavituna, "Biochemical engineering and biotechnology handbook", 1983.*

2.4.11.7.4 Θερμική σταθερότητα

Η θερμική σταθερότητα των ενζύμων είναι αρκετά μεταβλητή. Μερικά ένζυμα χάνουν την καταλυτική τους δράση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, ενώ άλλα είναι σε θέση – να αντέξουν τουλάχιστον για μια μικρή χρονική περίοδο – μια πιο έντονη θερμική επεξεργασία. Σε μερικές περιπτώσεις η ενζυμική σταθερότητα είναι χαμηλότερη σε χαμηλές θερμοκρασίες απ' ότι στη μέση περιοχή θερμοκρασιών.

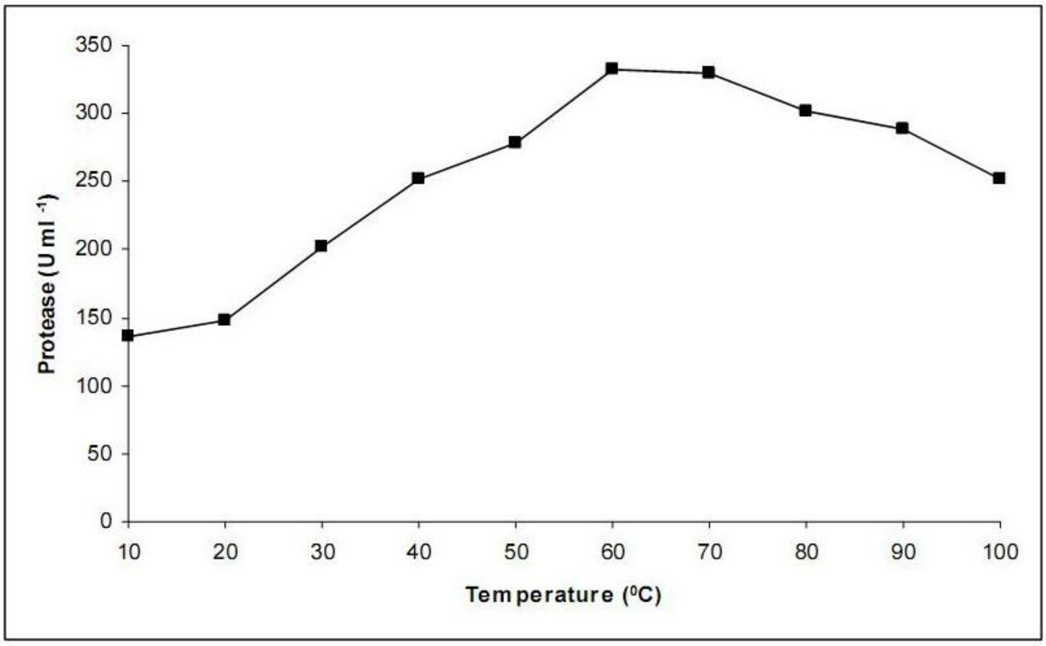
2.4.11.7.5 Επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή καμελυσίνης

Τα αποτελέσματα για την επίδραση της θερμοκρασίας στην παραγωγή καμελυσίνης από το *B.cereus* δείχνουν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για την δραστηριότητα της πρωτεάσης είναι 60°C (332,37±0,18 U/ml), πέρα από αυτήν την θερμοκρασία, η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται. One-way ANOVA test δείχνει ότι η διαφορά στη δραστηριότητα καμελυσίνης μεταξύ των δοκιμασμένων θερμοκρασιών είναι στατιστικά σημαντική, ($P<0.0001$),(Εικ. 2.28).

Αν λάβουμε υπόψη μας ότι οι μικροοργανισμοί τοποθετούνται σε μια συγκεκριμένη ομάδα ανάλογα με την θερμοκρασία ανάπτυξης μπορούμε να διακρίνουμε τους εξής (Atkinson 1983):

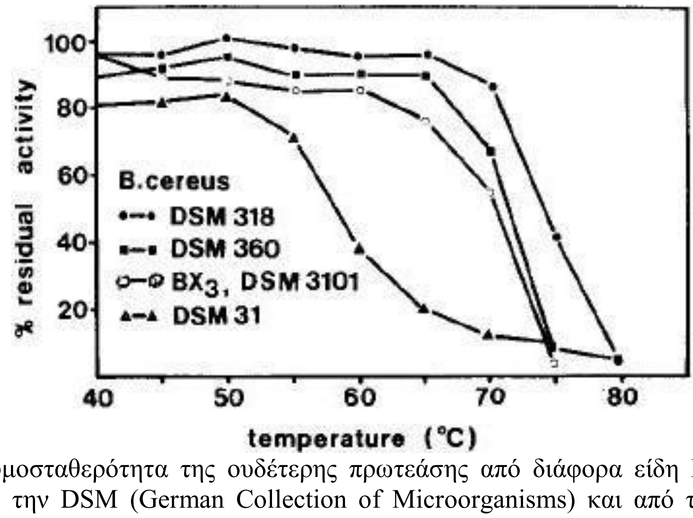
- **Υποχρεωτικά ψυχρόφιλοι**, ορίζονται εκείνοι οι οργανισμοί που είναι ικανοί να αναπτυχθούν σε ή κοντά 0°C αλλά όχι στους 20°C. Τέτοιοι οργανισμοί έχουν συνήθως μια μέγιστη θερμοκρασία που μπορούν να αναπτυχθούν από 15°C έως 17°C.
- **Ψυχρότροφοι**, είναι οργανισμοί ικανοί να μεγαλώσουν στους ή κοντά 0°C αλλά παρουσιάζουν βέλτιστη ανάπτυξη στους περίπου 25°C και είναι συχνά ανίκανοι να αναπτυχθούν στους 30°C.
- **Μεσόφιλοι**, ονομάζονται αυτοί που παρουσιάζουν ανάπτυξη από 40-45°C με μια βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης συνήθως από 30-35°C.
- **Θερμόφιλοι**, ονομάζονται οι οργανισμοί που παρουσιάζουν ανάπτυξη στους 40 - 65°C.
- **Υπερθεμόφιλοι**, είναι οργανισμοί από ωκεάνιες θερμικές διόδους και είναι περιορισμένοι σε θερμοκρασίες ανάπτυξης 70 - 120°C. Οι υπερθερμόφιλοι δεν έχουν ακόμα απομονωθεί από κάποια τροφή.

Λαμβάνοντας υπόψη την παραπάνω κατηγοριοποίηση αποδεικνύεται ότι η πρωτεάση που απομονώνεται από το *B.cereus* είναι θερμοφιλική στη φύση. Σε αντίθεση με αυτό, μελέτη από τους Hoshino et al. (1997) στην επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα πρωτεάσης από έντερα ψαριών που απομονώνει *Pseudomonas sp.* έδειξαν ότι, η μέγιστη δραστηριότητα στη χαμηλή θερμοκρασία στους 15 °C και στους 40 °C, η δραστηριότητα ήταν ελάχιστη. Οι Ray et al. (2007) ανέφεραν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για παραγωγή κυτταρινάσης από έντερο ψαριού που απομονώνεται από *B.subtilis* CY5 και *B.circulans* ήταν 40°C. Αυτή η εργασία επίσης υποστηρίζει τη θερμοφιλική παραγωγή πρωτεάσης από το *B.cereus* KCTC 3674 (Kim et al, 2001) και *B.clausii (Ganesh* Kumar et al.. 2004).

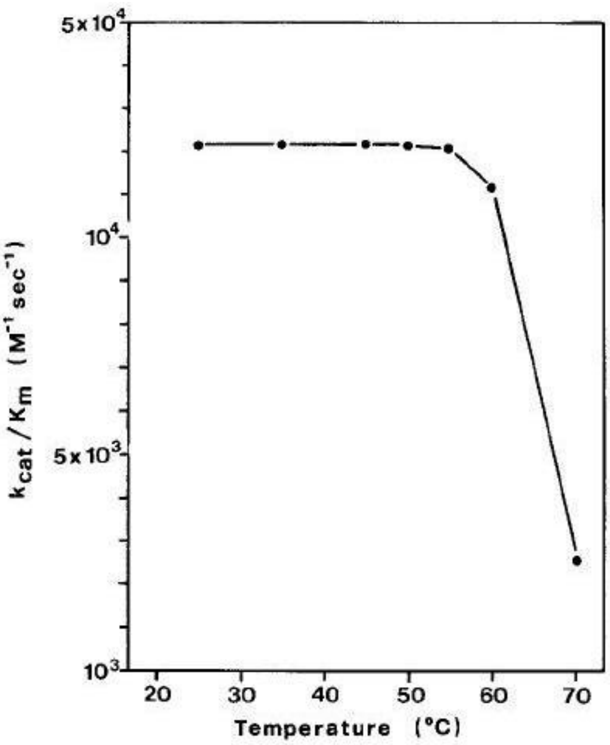


Εικόνα 2.28: Επίδραση των διαφόρων θερμοκρασιών (°C) στη δραστηριότητα καμελυσίνης.
Πηγή: D. Esakkiraj, "Evaluation of protease producing ability of fish gut isolate Bacillus cereus for aqua feed", 2007.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί στην έρευνα των Sidler et al., το 1986 σχετικά με την απομόνωση ουδέτερης πρωτεάσης από Bacillus cereus με υψηλή ομολογία στη θερμολυσίνη. Η πρωτεάση φάνηκε να είναι σταθερή πάνω από 60^oC με την παραμένων πρωτεολυτική δραστηριότητα να μετριέται στους 40^oC μετά από προ-επώαση για 20 λεπτά σε διάφορες θερμοκρασίες όπως φαίνονται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 2.29: Θερμοσταθερότητα της ουδέτερης πρωτεάσης από διάφορα είδη Bacillus cereus που αποκτήθηκαν από την DSM (German Collection of Microorganisms) και από το προκείμενο είδος Bacillus cereus DSM 3101. Η παραμένων πρωτεολυτική δραστηριότητα μετρήθηκε στους 40^oC μετά από προεπώαση για 20 λεπτά σε διάφορες θερμοκρασίες που υποδεικνύονται.



Εικόνα 2.30: Προφίλ της θερμοκρασίας από την υδρόλυση της κατάλυσης του FAGLA από την ουδέτερη πρωτεάση από τον Bacillus cereus DSM 3101. Σε κάθε θερμοκρασία που υποδεικνύεται, τέσσερα υποπολλαπλάσια από κάθε μια από τις έξι συγκεντρώσεις του FAGLA (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5mM) σε 50 mM PIPES ρυθμιστικό pH 6.2 δοκιμάστηκαν για 1 λεπτό στην συγκέντρωση του ενζύμου $4.73 \cdot 10^{-9} mol/ml$.

Το 1997 οι Jadwigak et al., σε έρευνά τους για τον καθαρισμό και το μερικό χαρακτηρισμό μιας ουδέτερης πρωτεάσης από μολυσματικό στέλεχος του είδους *Bacillus cereus*, βρήκαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για μεγιστοποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας ήταν 40-45°C με την ουδέτερη πρωτεάση να παρουσιάζει μια σταθερότητα στους 40°C μετά από 30 λεπτά επώασης. Η ουδέτερη πρωτεάση από στέλεχος *Bacillus cereus* έχανε περίπου το 18% της αρχικής της δραστηριότητας στους 60°C.

2.4.11.8 Επίδραση της πίεσης

Η εφαρμογή υψηλών πιέσεων μπορεί να αναστείλει την αύξηση των μικροοργανισμών και τη δραστηριότητα των ενζύμων. Οι μικροοργανισμοί είναι σχετικά ευαίσθητοι στην υψηλή πίεση επειδή η αύξησή τους αναστέλλεται σε πιέσεις 300-600 MPa και χαμηλότερες τιμές pH αυξάνουν αυτή την επίδραση. Εντούτοις, βακτηριακά σπόρια από Bacillus cereus αντέχουν σε πιέσεις μεγαλύτερες των 1200MPa.

Σε αντίθεση με τη θερμική κατεργασία, η υψηλή πίεση δεν προσβάλλει την πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών σε θερμοκρασία δωματίου. Διασπώνται μόνο Η-γέφυρες, ιοντικοί δεσμοί και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Οι τεταρτοταγείς δομές διαχωρίζονται σε υπομονάδες σε συγκριτικά χαμηλές πιέσεις (<150 MPa). Υψηλότερες πιέσεις (>1200 MPa) μεταβάλλουν την τριτοταγή δομή και πολύ υψηλές πιέσεις διασπούν τις Η-γέφυρες που σταθεροποιούν την δευτεροταγή δομή. Η ενυδάτωση των πρωτεϊνών μεταβάλλεται επίσης με την υψηλή πίεση επειδή τα μόρια του νερού πιέζονται μέσα σε κοιλότητες που μπορεί να βρίσκονται στο υδρόφοβο εσωτερικό των πρωτεϊνών. Γενικά οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται αμετάκλητα σε θερμοκρασία δωματίου με την εφαρμογή πιέσεων πάνω από 300 MPa ενώ χαμηλότερες πιέσεις προκαλούν μόνο αμφίδρομες μεταβολές στην πρωτεϊνική δομή.

2.4.12 Εφαρμογές της καμελυσίνης

Η εφαρμογές της καμελυσίνη αν ληφθεί υπόψη σαν μεμονωμένη μεταλλοπεπτιδάση δεν έχουν ακόμα καθοριστεί. Σαν μεταλλοπεπτιδάση όμως μπορεί να λάβει μέρος σε μια ευρεία κλίμακα εφαρμογών. Η σύνθεση μεγάλης κλίμακας των πεπτιδίων έχει γίνει όλο και περισσότερο σημαντική για τα τρόφιμα και τις φαρμακευτικές βιομηχανίες κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Η κύρια εφαρμογή των πεπτιδίων είναι η χρήση τους ως λίγων θερμίδων γλυκαντικές ουσίες. Επιπλέον, διάφορα βιολογικά ενεργά πεπτίδια έχουν βρει ενδιαφέρον ως φάρμακα για τη θεραπεία των ασθενειών όπως η απομόνωση ουδέτερης μεταλλοπεπτιδάσης από *Bacillus cereus,* με δημιουργία του γονιδιώματος *cal Y*.

Μια άλλη πολύ σημαντική βιομηχανική εφαρμογή που μπορεί να λάβει μέρος η καμελυσίνη, ίσως σε συνδυασμό με άλλες πρωτεάσες, είναι η παραγωγή υδρολυμάτων πρωτεϊνών τροφής και πεπτιδίων ενίσχυσης της γεύσης. Υδρολύματα από πρωτεΐνες κρέατος και ψαριού ή η ζελατίνη αναπτύσσουν λιγότερη πικρή γεύση απ' ότι υδρολύματα από πρωτεΐνες αραβόσιτου, καζεΐνη ή ομογλοβίνη. Μια άλλη ευεργετική επίδραση των πρωτεϊνικών υδρολυμάτων στην υγεία ίσως να είναι τα αντιοξειδωτικά αποτελέσματά τους (Hernandez-Ledesma *et al.,* 2005) και η αναστολή τους από μεταλλαγμένα ένζυμα (Vercruysse *et al.,* 2005).

Περαιτέρω εμπορικές εφαρμογές της καμελυσίνης, αφού ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των μεταλλοπρωτεάσεων, μπορούν να βρεθούν στη βιομηχανία μπύρας (βελτιωμένη διήθηση της μπύρας, μειωμένο περιεχόμενο σε θερμίδες), στη βιομηχανία δέρματος (αφαίρεση τρίχας και μαλλιού), στη επεξεργασία των αποβλήτων σφαγής, στη βελτίωση των χαρακτηριστικών ψησίματος του αλευριού, και στη βιομηχανία ταινιών (απομάκρυνση της ζελατίνης από φωτογραφικά φιλμ και ανάκτηση ασημιού).

Στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας οι πρωτεάσες από είδη *Bacillus* φαίνεται να παίζουν ένα ξεχωριστό ρόλο στην προετοιμασία υψηλής ποιότητας λειτουργικών τροφών μέσω βιο-μετατροπής υλικών τροφής χαμηλού κόστους, επειδή η βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας εξαρτάται παγκοσμίως από τη διαθεσιμότητα χαμηλού κόστους, υψηλής ποιότητας τροφές.

Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί η ενδεχόμενη βιομηχανική εφαρμογή της καμελυσίνης στα απορρυπαντικά, την επεξεργασία δέρματος, την αποκατάσταση στο ασήμι, στην ιατρική, στην επεξεργασία τροφίμων, στις τροφές, στη χημική βιομηχανία όπως και την επεξεργασία αποβλήτων, (Kumar και Tagaki 1999). Αλλά πολύ τρομακτικές πληροφορίες είναι διαθέσιμες στην περιοχή των βακτηριακών ενζύμων εντοσθίων κυρίως πρωτεάσες όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση.

Η καμελυσίνη που απομονώνεται από στέλεχος του βακτηριακού είδους *Bacillus cereus* παίζει ίσως ρόλο στη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων και υπερσυμπυκνωμάτων (isolates) τα οποία χρησιμεύουν στην ενίσχυση της διατροφικής αξίας και στην ενίσχυση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων. Μία εκ των πρώτων υλών στις οποίες γίνεται πρωτεϊνικός εμπλουτισμός είναι το ψάρι, το οποίο παρέχει πρωτεϊνικά συμπυκνώματα μετά την εξαγωγή του λίπους του.

2.4.13 Ενζυμικές μονάδες

Η φύση της αντίδρασης την οποία καταλύει κάθε ένζυμο καθορίζει την κατηγορία του, ενώ η *δραστικότητα* (activity) του ένζυμου αποτελεί ένδειξη μεγέθους του αποτελέσματος το οποίο μπορεί να επιφέρει. Η εμπορική αξία κάθε ενζυμικού παρασκευάσματος επηρεάζεται από την ενζυμική δραστικότητα την οποία αυτό παρουσιάζει ανά μονάδα βάρους. Τα ένζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία είναι γνωστά ως βιομηχανικά ένζυμα ή ένζυμα υψηλού όγκου παραγωγής/αγοράς. Συνήθως τα εν λόγω ένζυμα (βιοκαταλύτες) αποτελούν παρασκευάσματα χαμηλής έως μεσαίας καθαρότητας και αξιολογούνται μάλλον ανάλογα με την καταλυτική φύση τους παρά με την περιεκτικότητά τους σε άλλες προσμίξεις.

Τα βιομηχανικά ένζυμα, συνήθως διατίθενται με βάση τις *μονάδες βάρους παρασκευάσματος (kg) το οποίο έχει συγκεκριμένη δραστικότητα ανά μονάδα βάρους*. Αντίθετα, τα ένζυμα αναλυτικών, διαγνωστικών και θεραπευτικών εφαρμογών αποτελούν παρασκευάσματα μεσαίας έως πλήρους ενζυμικής καθαρότητας. Τα ένζυμα αυτά διατίθενται με βάση τις *μονάδες δραστικότητας συγκεκριμένου ένζυμου του παρασκευάσματος ανά μονάδα βάρους του παρασκευάσματος (enzyme units/g) ή ανά μονάδα βάρους της συνολικής πρωτεΐνης του παρασκευάσματος (enzyme units/mg protein)*. Η τελευταία ποσοτική έννοια είναι γνωστή ως *ειδική δραστικότητα* (*specific activity, SA*) του ένζυμου και αποτελεί ένα από τα μέτρα της ενζυμικής καθαρότητας.

Η ειδική επιτροπή για τα ένζυμα (Enzyme Commission) της Διεθνούς Ενώσεως Βιοχημικών (IUB International Union of Biochemists) θέσπισε την λεγόμενη διεθνή ενζυμική μονάδα (international enzyme unit, IU). Αυτή ορίζεται ως η *ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για να μετατραπεί ένα micromole (μmol) συγκεκριμένου υποστρώματος ανά λεπτό υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες* (συνήθως θερμοκρασία 25 °C).

2.4.14 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα που αναγράφονται στην παρούσα εργασία έχουν υποβληθεί στη σχετική στατιστική ανάλυση (Zar 1974). Αρχικά γίνεται έλεγχος για να εξακριβωθεί αν υπάρχει κανονικότητα και ομοιογένεια στις διακυμάνσεις. Η δοκιμή για τις σημαντικές διαφορές έχει αναλυθεί με τη χρησιμοποίηση one-way και two-way ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA). Η πολλαπλή σύγκριση έχει γίνει χρησιμοποιώντας τιμές πιθανότητας 0,05 χρησιμοποιώντας SNK test. Ως παράγοντας ορίζεται η συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα επώασης και ως αποτέλεσμα η δύναμη διάτμησης.

2.4.15 Αποτελέσματα

Όντας πλούσιες θρεπτικές ουσίες, το περιβάλλον της πεπτικής οδού των ψαριών παρέχει ένα πιο ευνοϊκό περιβάλλον αύξησης για τους μικροοργανισμούς σε σύγκριση με το περιβάλλον νερό (Saha et al., 2006). Η γαστροεντερική οδός των ψαριών μπορεί να επηρεάζει τη διατροφή, την ανάπτυξη και την ευαισθησία ασθενειών.

Ωστόσο το σενάριο της ζυμωτικής διατροφής στο κυρίαρχο υδρόβιο ζώο παραμένει ανεπαρκώς κατανοητό, μόνο λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την ενζυμική μικρο-χλωρίδα του εντέρου του ψαριού.

Οι Stellwag et al. (1995) μελέτησαν τη καρβοξυλ-μεθυλ κυτταρινάση (Carboxy methyl cellulase (CMCase)) που παρήγαγε βακτήρια από Ιαπωνικά παράκτια ψάρια.

Οι Hoshino et al. (1997) μελέτησαν τη παραγωγή πρωτεάσης στα εντερικά βακτήρια από Ιαπωνικά ψάρια.

Οι Bairagi et al, (2002) εξέθεσε την ποικιλομορφία του ενζύμου να παράγει μικρο-χλωρίδα από κάποια ψάρια του γλυκού νερού. Αλλά μόνο πολύ λίγες μελέτες αναλήφθηκαν για να χαρακτηρίσουν τις συνθήκες καλλιέργειας για την παραγωγή ενζύμου από βακτήρια εντέρων ψαριών συμπεριλαμβανομένου παραγωγή κυτταρινάσης από το *Bacillus subtilis* CY5 και *Bacillus circulans* TP3, που απομονώθηκαν από *Cyprinus carpio* και *Oreochromis mossambicus* αντίστοιχα (Ray et al, 2007).

Αυτή η εργασία υποστηρίζει επίσης τα ενζυμικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων από έντερα ψαριών και που στοχεύουν στη βιο-μετατροπή. Στην παρούσα εργασία ερευνάται κατά πόσο τα βακτήρια, που προσδιορίζονται σαν *Bacillus cereus* μπορούν να παράγουν ουδέτερη μεταλλοπρωτεάση (καμελυσίνη) η οποία φαίνεται να είναι θερμοσταθερή και μπορεί να δώσει σημαντικές ενζυμικές ποσότητες χρησιμοποιώντας σαν πρώτη ύλη απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου.

2.4.16 Συμπέρασμα

Η πρωτεάση έχει πολλές βιομηχανικές εφαρμογές ειδικά στη βιομηχανία τροφίμων και τα ένζυμα από τα εντερικά βακτηρίδια ψαριών είναι ένας άθικτος βιο-πόρος για την ενζυμική παραγωγή. Αυτή η εργασία αναφέρεται στην απομόνωση και παραγωγή μιας νέας αλοφιλικής (οργανισμός ακμάζων σε αλμυρότητα), θερμοσταθερής πρωτεάσης από το *B.cereus* και ανήκει στην ευρύτερη κατηγορία των μεταλλοενδοπεπτιδάσεων χωρίς να έχει μέχρι στιγμής προσδιοριστεί η πλήρης αλληλουχία αμινοξέων της, χρησιμοποιώντας επεξεργασμένα απόβλητα ψαριών τόνου. Οφείλοντας τη δυνατότητά του *Bacillus cereus* να παράγει μεταλλαγμένες πρωτεΐνες αποβλήτου για παραγωγή πρωτεάσης, τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για βιο-μετατροπή αποβλήτων ψαριών για την διατύπωση ιχθυοτροφής και διαδοχική μείωση σχετικών με τη τροφή εκροών. Εκτός από αυτό, η σταθερότητα σε μεταβολή θερμοκρασίας, και ανοχή της καμελυσίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πολλούς βιομηχανικούς σκοπούς συμπεριλαμβανομένης της βιομηχανίας απορρυπαντικών. Στις επόμενες ενότητες θα δούμε με ποιο τρόπο μπορεί να επιτευχθεί η απομόνωση της καμελυσίνης από απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος **SuperPro Designer**.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Προσομοίωση παραλαβής της καμελυσίνης με χρήση του SuperPro Designer

3.1 Λογισμικό του προγράμματος

Το λογισμικό πρόγραμμα SuperPro Designer αποτελεί μια καλή επιλογή για κάθε χημικό, βιοχημικό ή περιβαλλοντολόγο μηχανικό, καθώς και για τους επιστήμονες που ασχολούνται με την έρευνα, τη βιομηχανική επεξεργασία ή την κατασκευή. Το SuperPro Designer διευκολύνει τη μοντελοποίηση, την αξιολόγηση και τη βελτιστοποίηση των ολοκληρωμένων διεργασιών σε ένα ευρύ πεδίο βιομηχανικών εφαρμογών (Φαρμακοβιομηχανία, Βιοτεχνολογία, Χημική βιομηχανία, Βιομηχανία τροφίμων, καταναλωτικών αγαθών, μικροηλεκτρονικών, επεξεργασίας ορυκτών, επεξεργασίας αποβλήτων, καθαρισμού νερού, ελέγχου αέριας ρύπανσης κτλ.).

Ο συνδυασμός των μοντέλων κατασκευής και των περιβαλλοντικών διεργασιών στην ίδια εφαρμογή, δίνει τη δυνατότητα στο χρήστη να σχεδιάζει και να αξιολογεί ταυτόχρονα την κατασκευή και το τελικό προϊόν των διεργασιών επεξεργασίας, και να εφαρμόζει την ελαχιστοποίηση αποβλήτων μέσω της πρόληψης καθώς και του ελέγχου της ρύπανσης. Έχει αναπτυχθεί από τον Έλληνα επιστήμονα Δ. Πετρίδη, επικεφαλής της εταιρίας Intelligen Inc, και στην παρούσα διπλωματική εργασίας χρησιμοποιείται στα ακαδημαϊκά πλαίσια.

Το λογισμικό πρόγραμμα SuperPro Designer διευκολύνει τις παρακάτω διαδικασίες σε μια ποικιλία βιομηχανιών:

- Την προσομοίωση των συνεχών διεργασιών και των διεργασιών διαλείποντος έργου
- Τον προγραμματισμό των διεργασιών διαλείποντος έργου
- Τον εντοπισμό των πηγών που απαιτούνται
- Την ανάλυση κόστους
- Τη μείωση του χρόνου του κύκλου λειτουργίας και την αντιμετώπιση των επιβραδυντικών παραγόντων
- Την αξιολόγηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων
- Τον καθαρισμό του νερού και την ανακύκλωσή του
- Την επεξεργασία αποβλήτων
- Τον έλεγχο της αέριας ρύπανσης

Τα κύρια χαρακτηριστικά του SuperPro Designer είναι:

- Μοντέλα για περισσότερες από 140 φυσικές διεργασίες/λειτουργίες
- Αυστηρά πρότυπα αντιδραστήρων
- Ισοζύγια υλικών και ενέργειας
- Εκτενείς βάσεις δεδομένων χημικών συστατικών και μιγμάτων
- Εκτενείς βάσεις δεδομένων εξοπλισμού και πηγών
- Διαστασιολόγηση και οικονομική εκτίμηση εξοπλισμού
- Λεπτομερής οικονομική ανάλυση διεργασιών
- Προγραμματισμός των διεργασιών διαλείποντος έργου
- Ανάλυση του συνολικού έργου και αντιμετώπιση των επιβραδυντικών παραγόντων
- Εντοπισμός των πηγών (αναλώσιμα, πρώτες ύλες και εργασία) σα συνάρτηση με το χρόνο

- Χαρακτηρισμός του ρεύματος των αποβλήτων
- Αξιολόγηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων
- Δημιουργία διαγραμμάτων ροής και προσαρμογή τους μέσω της εισαγωγής γραφικών και κειμένων του χρήστη
- Συμβατότητα με μία ποικιλία προγραμμάτων γραφικών και επεξεργασίας κειμένων

3.2 Κατηγορίες υγρών αποβλήτων από τη λειτουργία μιας μονάδας πάχυνσης

Τα απόβλητα από την λειτουργία της μονάδας πάχυνσης διακρίνονται σε δύο κυρίως κατηγορίες:

- Τα **στερεά**, που περιλαμβάνουν μη αφομοιωθέντα από το πεπτικό σύστημα συστατικά της τροφής, όπως επίσης και μέρος της τροφής που δεν καταναλώθηκε.
- Τα **υγρά**, που περιλαμβάνουν τα απόβλητα προϊόντα από τη λειτουργία των νεφρών, όπως επίσης και μικρές ποσότητες των βλεννών.

Η ποσότητα των παραγόμενων προϊόντων μεταβολισμού των ψαριών (απόβλητα ή περιττώματα) επηρεάζεται σημαντικά από το είδος των ψαριών, την ηλικία, τη θερμοκρασία, το διαθέσιμο οξυγόνο, το ρυθμό ανάπτυξης και την υγιεινή κατάσταση των ψαριών, την ποιότητα και την ποσότητα της τροφής.

Θα πρέπει να αναφέρουμε πως για κάθε στάδιο των ιχθυδίων αντιστοιχεί και ένας συντελεστής διατροφής (ο οποίος σχετίζεται με την θερμοκρασία του νερού) σύμφωνα με τον οποίο υπολογίζεται η αναγκαία ποσότητα τροφής που χορηγείται.

Είναι δε πολύ σημαντικό να τονίσουμε πως οι ποσότητες αποβλήτων που παράγονται εξαρτώνται άμεσα από τη βιομάζα που υπάρχει στους ιχθυοκλωβούς σε κάθε φάση εκτροφής. Κατ’ επέκταση οι παραγόμενες ποσότητες φωσφόρου, αζώτου, περιττωμάτων, ούρων και κοπράνων εξαρτώνται από την πραγματική βιομάζα που υπάρχει στους ιχθυοκλωβούς όπως επίσης και η τροφή που θα χορηγείται στον ιχθυοπληθυσμό.

Ακόμα από τη λειτουργία των μονάδων πάχυνσης παράγονται ζωικά υποπροϊόντα που ταξινομούνται ως υλικά κατηγορίας 2 (πτώματα ζώων ή άρρωστα ψάρια-θνησιμότητες ψαριών των πλωτών μονάδων πάχυνσης), αλλά και υλικά κατηγορίας 3 (υποπροϊόντα που προέρχονται από υγιή ζώα καθώς και μεταποιημένες ζωικές πρωτεΐνες – ληγμένες ιχθυοτροφές).

3.2.1 Σύσταση υγρών αποβλήτων από μονάδα πάχυνσης τόνου

Η σύσταση και η φύση των αποβλήτων μιας μονάδας πάχυνσης έχει άμεση σχέση με την σύσταση των παρεχόμενων τροφών και την πεπτικότητα των συστατικών της. Στις περισσότερες μονάδες με ιχθυοκλωβούς δίνεται τροφή υπό μορφή συμπήκτων (pellets), που η σύσταση των συστατικών της δίνεται από το εργοστάσιο παραγωγής.

Σύμφωνα με μελέτη του Εθνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών σχετικά με σύγχρονους τρόπους προσέγγισης των επιπτώσεων στο θαλάσσιο περιβάλλον από την λειτουργία πλωτών ιχθυοκλωβών, η ανάλυση μιας κοινής ιχθυοτροφής σε εργαστήριο έχει την παρακάτω σύσταση:

- Πρωτεΐνες 46,86 %

- Ολικά λίπη 12,00 %
- Τέφρα 10,97 %
- Υδατάνθρακες 16,78 %
- Υγρασία 6,98 %

Οι τροφές αυτές περιέχουν συμπληρωματικά φωσφόρο, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία σε ποσοστό 1-2 %. Η ποσοτική σύνθεση στο κρέας αλλά και στο συκώτι του τόνου, όπου και εντοπίζεται ο *Bacillus cereus* και συνεπώς η ερευνηθείς πρωτεΐνη, δείχνει στον πίνακα που ακολουθεί την σύγκλισή της στα δύο μέρη του ψαριού.

Πίνακας 3.1: Κατά προσέγγιση σύσταση επί τοις εκατό στο κόκκινο κρέας τόνου και στο συκώτι τόνου.

Σύσταση (%)	**Κόκκινο κρέας τόνου**	**Συκώτι τόνου**
Υγρασία	72.10	71-73
Πρωτεΐνες	23.70	17-19
Λίπη	3.10	5-7
Τέφρα	1.10	1.4-1.5

Πηγή:Thankappan, T.K., G. George, K.G.R.Nair, in: Technological Advancement in Fish, Hameed, M.S., B.M.Kurup, eds., Cochin: University of Science and Technology, 1998, pp329-333.

3.3 Κριτήρια καταλληλότητας λάσπης για κατιούσα επεξεργασία

Οι απαιτήσεις για τα αρχικά στάδια της κατιούσας επεξεργασίας παρατίθενται παρακάτω:

1. Υψηλή ανάκτηση προϊόντων με κατά προτίμηση υψηλή απόρριψη των ανεπιθύμητων συστατικών.
2. Αξιόπιστες και σημαντικές διαδικασίες και εξοπλισμός που δεν παρουσιάζει ευαισθησία στις δευτερεύουσες παραλλαγές της λάσπης.
3. Διαδικασίες που δίνουν μια μεγάλη μείωση όγκου προκειμένου να μειωθούν οι κύριες και λειτουργικές δαπάνες στα επόμενα στάδια.
4. Διαδικασίες που αφήνουν την απορριπτόμενη λάσπη κατάλληλη για ανακύκλωση ή επεξεργασία αποβλήτων εκροών.
5. Χαμηλό κεφάλαιο, χαμηλή παύση και χαμηλές ενεργειακές διαδικασίες.

3.4 Διάγραμμα Ροής

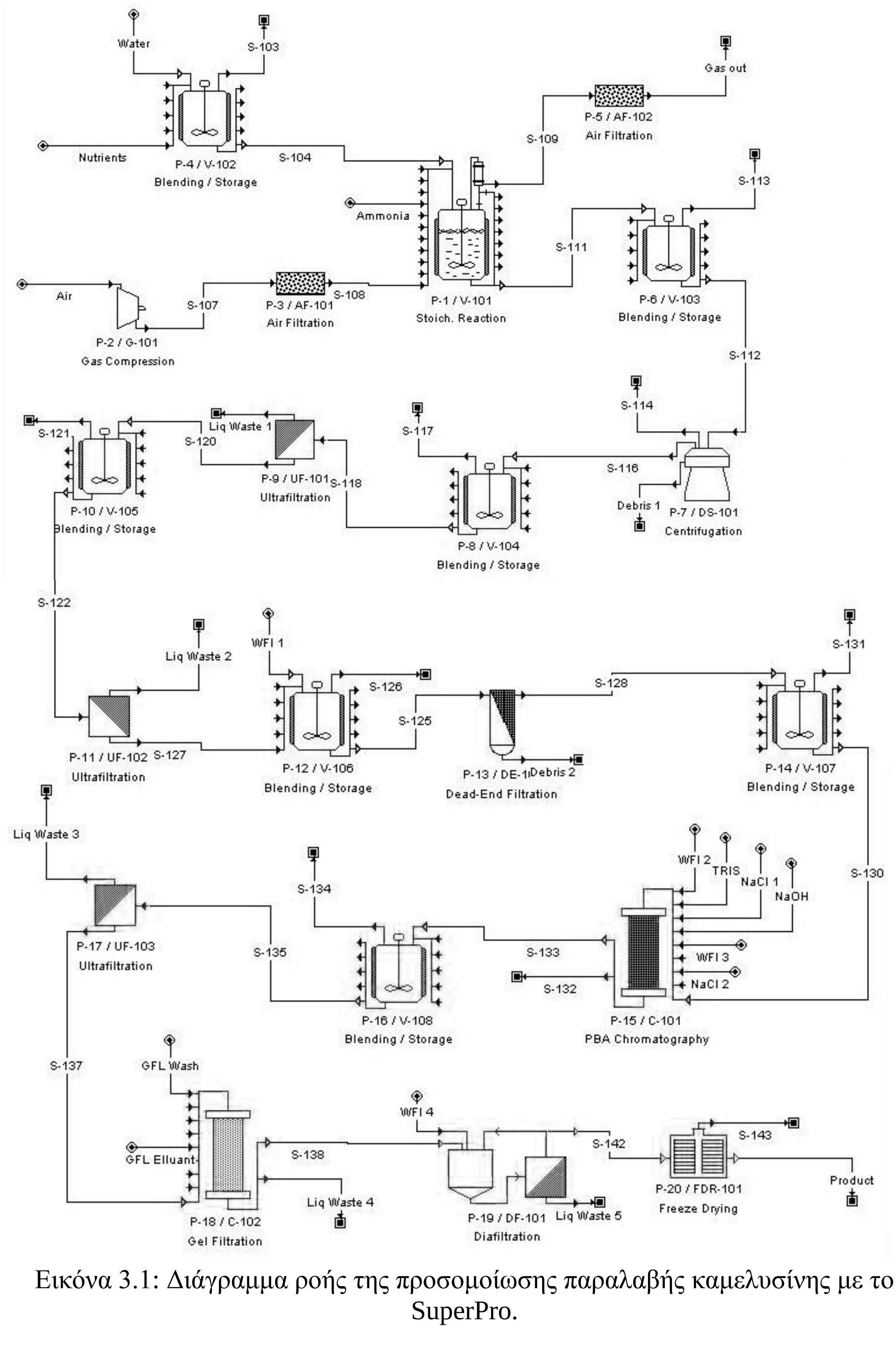
Στο παρακάτω σχήμα δίνεται το πλήρες διάγραμμα ροής της απομόνωσης πρωτεάσης από υγρά απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου.

Ένας τομέας το διαγράμματος ροής είναι μια ομάδα από μονάδες διαδικασιών (unit procedures) οι οποίες έχουν κάτι κοινό. Το διάγραμμα ροής της απομόνωσης της καμελυσίνης από υγρά απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου, χωρίζεται σε τρεις τομείς:

1) Ζύμωση (**Fermentation**)

2) Πρωταρχική ανάκτηση (**Primary recovery**)

3) Καθαρισμός (**Purification**)

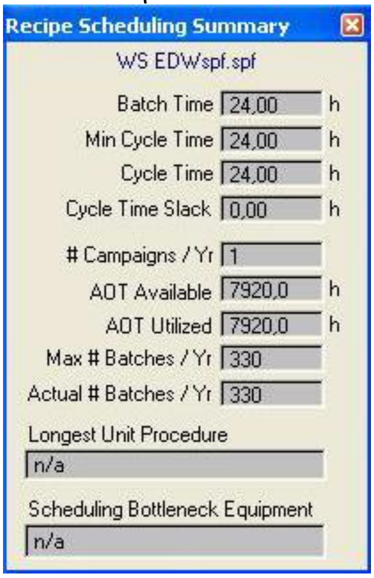


Εικόνα 3.1: Διάγραμμα ροής της προσομοίωσης παραλαβής καμελυσίνης με το SuperPro.

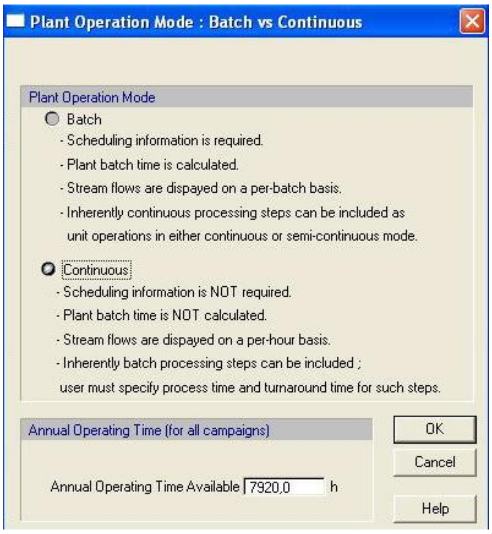
3.5 Τρόπος λειτουργίας (operation mode)

Για τη μοντελοποίηση του διαγράμματος ροής επιλέχθηκε ο συνεχής τρόπος λειτουργίας. Η συνεχούς ροής παραγωγή (**Continuous-flow manufacturing**) είναι μια παραγωγική στρατηγική η οποία παράγει ένα μέρος μέσω μιας προσέγγισης πάνω στην ώρα παραγωγής και προχωρά προς μια τρέχουσα εξέταση και βελτιωτικές προσπάθειες οι οποίες τελικά απαιτούν ολοκλήρωση όλων των στοιχείων του συστήματος παραγωγής. Ο στόχος είναι μια βέλτιστα ισορροπημένη γραμμή παραγωγής με λίγα απόβλητα, το χαμηλότερο κόστος, σε χρονική και όχι ελαττωματική παραγωγή.

Το πρόγραμμα λειτουργίας του μοντέλου βασίζεται σε 24 ώρες ανά φορτίο (batch time), 7.920 ώρες ετήσιου διαθέσιμου χρόνου λειτουργίας (annual operating time available) και πραγματοποιούνται 330 πραγματικά φορτία ανά έτος (batches per year). Στην παρακάτω εικόνα δίνεται αναλυτικά μια περίληψη του προγράμματος λειτουργίας. Η συγκεκριμένη δραστηριότητα της καμελυσίνης έχει οριστεί στα 100U/ml, όμοια με τη β-γαλακτοσιδάση.



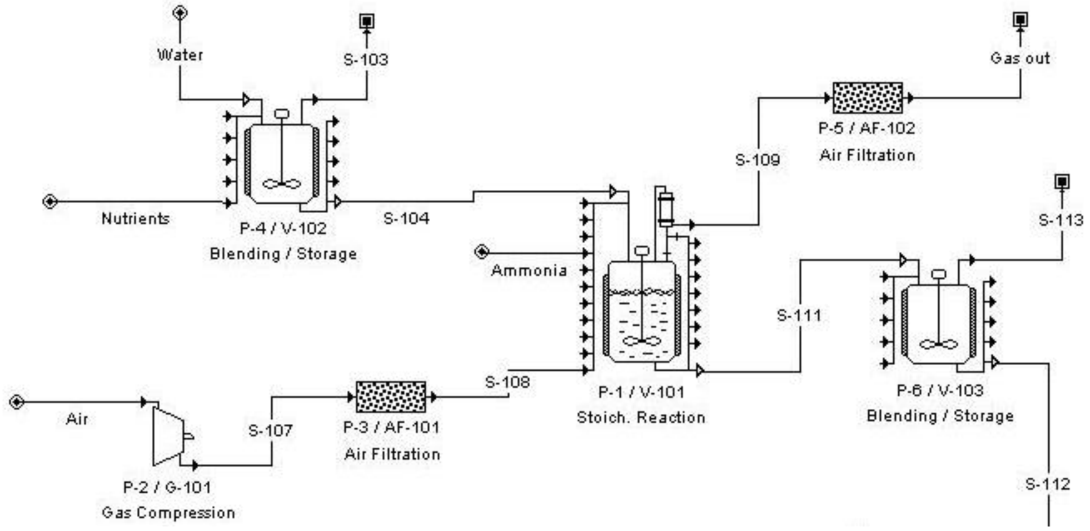
Εικόνα 3.2: Περίληψη προγράμματος λειτουργίας.



Εικόνα 3.3: Τρόπος λειτουργίας.

3.6 Τομέας ζύμωσης (Fermentation section)

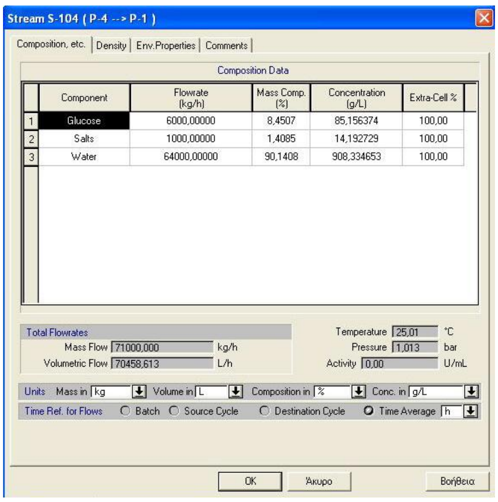
Τα μέσα ζύμωσης προετοιμάζονται σε μια δεξαμενή ανοξείδωτου χάλυβα (V-102). Ένας συμπιεστής (G-101) και ένα απόλυτο φίλτρο αέρα (AF-101) παρέχουν τον αποστειρωμένο αέρα σε μια συνεχή στοιχειομετρικής αντίδρασης μονάδα σε έναν συνεχή αντιδραστήρα πλήρης ανάδευσης (continuous stirred tank reactor), (V-101). Αέρια αμμωνία χρησιμοποιείται σαν πηγή νιτρικών. Μετά τη ζύμωση τα προϊόντα συλλέγονται σε μια δεξαμενή ανοξείδωτου χάλυβα (V-103) πριν προχωρήσουν στον επόμενο τομέα επεξεργασίας.



Εικόνα 3.4: Τομέας ζύμωσης.

3.6.1 Παροχή θρεπτικών συστατικών

Πιο συγκεκριμένα μια σημαντική ποσότητα θρεπτικών της τάξεως των $7000\frac{kg}{hr}$ που αποτελείται από άλατα και γλυκόζη προστίθενται μαζί με νερό σε δεξαμενή ανάμιξης (V-102), η οποία μονάδα μιμείται την αποθήκευση μιας συνεχούς ροής. Η δεξαμενή τροφοδοτεί στη συνέχεια τον συνεχή αντιδραστήρα πλήρους ανάδευσης (V-101). Τα φορτία των θρεπτικών συστατικών διέρχονται μέσα από το ρεύμα S-104 οι τιμές των οποίων φαίνονται στην εικόνα 3.5.


Stream S-104 (P-4 --> P-1)

Composition, etc. | Density | Env.Properties | Comments

Composition Data

	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	Glucose	6000,00000	8,4507	85,156374	100,00
2	Salts	1000,00000	1,4085	14,192729	100,00
3	Water	64000,00000	90,1408	908,334653	100,00

Total Flowrates
Mass Flow 71000,000 kg/h
Volumetric Flow 70458,613 L/h

Temperature 25,01 °C
Pressure 1,013 bar
Activity 0,00 U/mL

Units Mass in kg | Volume in L | Composition in % | Conc. in g/L

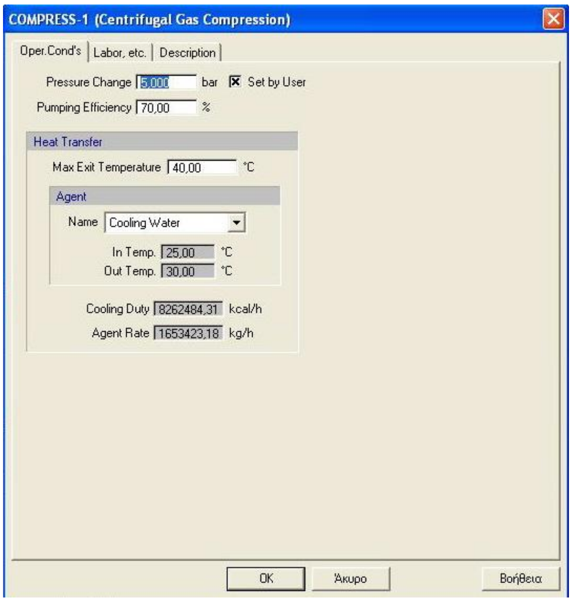
Time Ref. for Flows: Batch | Source Cycle | Destination Cycle | Time Average h

OK | Άκυρο | Βοήθεια

Εικόνα 3.5: Φορτία θρεπτικών συστατικών και νερού στο ρεύμα S-104.

3.6.2 Παροχή αποστειρωμένου αέρα

Η παροχή του αποστειρωμένου αέρα γίνεται μέσω ενός συμπιεστή (G-101) και ενός απόλυτου φίλτρου αέρα (AF-101). Ο συμπιεστής στην ουσία μοντελοποιεί τη μεταφορά αέριων υλικών χρησιμοποιώντας έναν φυγοκεντρικό συμπιεστή. Λόγω της λειτουργίας του επί 24ώρου βάσεως, η αποδοτικότητα της άντλησης έχει ρυθμιστεί στο 70% και η μέγιστη θερμοκρασία εξόδου στους $40^{o}C$.



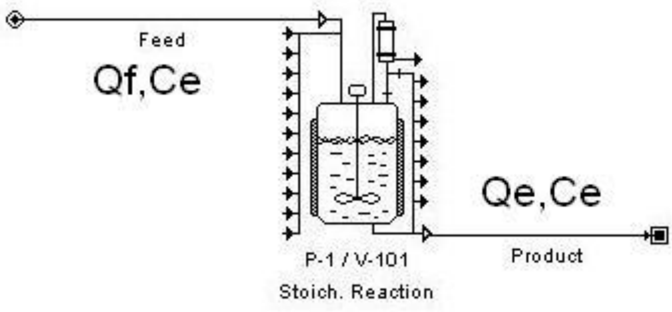
Εικόνα 3.6: Ρυθμίσεις φυγοκεντρικού συμπιεστή.

Ο ρόλος του απολύτου φίλτρου αέρα (AF-101) είναι να μιμείται την σχετική με όλους τους ανήκοντες στην ίδια κατηγορία διήθησης αέρα. Η παροχή ποσότητας των υλικών η οποία φιλτράρεται είναι της τάξεως των $3,473 \, m^3/s$ και ο χρόνος λειτουργίας 24 ώρες.

3.6.3 Συνεχής Αντιδραστήρας Πλήρους Ανάδευσης

Οι χημικοί αντιδραστήρες διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό ως προς το μέγεθος, το σχήμα και τη μέθοδο λειτουργίας τους. Υπάρχει μια σταθερή ροή αντιδρώντων που εισέρχονται και προϊόντων που εξέρχονται. Αυτός είναι ο τύπος αντιδραστήρα με συνεχή ροή, στον οποίο η έκταση της αντίδρασης και οι ιδιότητες, όπως η θερμοκρασία και η σύσταση, είναι δυνατό να διαφέρουν ανάλογα με τη θέση μέσα στον αντιδραστήρα, αλλά όχι με το χρόνο.

Μια ακόμη ταξινόμηση γίνεται σύμφωνα με το σχήμα του αντιδραστήρα. Αν το εργαστηριακό ‘’δοχείο’’ (αντιδραστήρας) είναι εξοπλισμένος με ένα αναδευτήρα, τότε η σύσταση και η θερμοκρασία της μάζας των αντιδρώντων θα είναι περίπου ίδιες σε όλα τα σημεία του αντιδραστήρα. Ένα δοχείο το οποίο οι τιμές των ιδιοτήτων είναι ομοιόμορφες ονομάζεται αντιδραστήρας με πλήρη ανάδευση (stirred-tank reactor, SRT).



Εικόνα 3.7: Συνεχής αντιδραστήρας πλήρους ανάδευσης.

3.6.3.1 Ισοζύγιο Μάζας

Όπως προαναφέρθηκε το χαρακτηριστικό του αντιδραστήρα αυτού είναι η πλήρης ανάδευση του αντιδρώντος μίγματος, με αποτέλεσμα οι ιδιότητές του, όπως η συγκέντρωση και η θερμοκρασία, να είναι ομοιόμορφες σε ολόκληρη την επικράτειά του. Σ' ένα τέτοιο αντιδραστήρα με συνεχή ροή, οι ιδιότητες του αντιδρώντος μίγματος είναι ίδιες με αυτές του ρεύματος εξόδου (ή προϊόντος).

Ο σχεδιασμός του αναδευτήρα και η ταχύτητα περιστροφής του rpm είναι δυνατό να επηρεάσουν την προσέγγιση των συνθηκών καλής ανάμιξης σε ένα αντιδραστήρα με συνεχή ανάδευση.

Εξαιτίας της αρχής διατήρησης της μάζας για οποιοδήποτε αντιδραστήρα, η μάζα ενός συστατικού i σε ένα στοιχειώδες όγκο του αντιδραστήρα ΔV υπακούει στην ακόλουθη έκφραση:

[***συγκέντρωση***] = [**είσοδος**] − [**έξοδος**] + [**παραγωγή**] (3.1)

ή

[***ρυθμός του είδους i που εισέρχεται στο στοιχειώδη όγκο***] - [***ρυθμός του i που εξέρχεται από το στοιχειώδη όγκο***] + [***ρυθμός παραγωγής του i στο στοιχειώδη όγκο***] = [***ρυθμός συσσώρευσης του i στο στοιχειώδη όγκο***] (3.2)

Αυτό σημαίνει ότι στην εξίσωση 3.2 θεωρείται σαν στοιχειώδης όγκος ο συνολικός όγκος V του αντιδραστήρα. Επίσης, η σύσταση και η θερμοκρασία, στις οποίες θα λάβει χώρα η αντίδραση, θα είναι ίδιες με τη σύσταση και τη θερμοκρασία του ρεύματος εξόδου. Επομένως, η αντίδραση θα διεξάγεται μ' ένα ρυθμό, ο οποίος θα αντιστοιχεί στις συνθήκες εξόδου (θερμοκρασία, σύσταση) και όχι στις συνθήκες εισόδου.

3.6.3.2 Συνθήκες μόνιμης κατάστασης

Σε μόνιμη κατάσταση, ο τελευταίος όρος της εξίσωσης 3.2 είναι μηδέν. Αν δειχθεί με Q η ολική ογκομετρική παροχή και οι δείκτες f και e αναφέρονται αντίστοιχα στα ρεύματα τροφοδοσίας και εξόδου, τότε το ισοζύγιο μάζας γίνεται:

$$Q_f(C_i)_f - Q_e(C_i)_e + r_iV = 0 \quad \text{ή}$$

$$Q_f(C_i)_f - Q_e(C_i)_e = -r_iV \tag{3.3}$$

Όταν οι ρυθμοί παροχής είναι μεταξύ τους ίσοι, δηλαδή: $Q_e = Q_f = Q$ τότε η εξίσωση 3.3 ανάγεται στην ακόλουθη μορφή:

$$(C_i)_f - (C_i)_e = -r_i(\frac{V}{Q}) = -r_i\overline{\theta} \text{ (σταθερή παροχή)} \tag{3.4}$$

Όπου με $\overline{\theta}$ (=V/Q) παριστάνεται ο μέσος χρόνος παραμονής του ρευστού στον αντιδραστήρα.

Οι παραπάνω αλγεβρικές εξισώσεις είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν , για να υπολογιστεί η συγκέντρωση του προϊόντος για ένα συγκεκριμένο όγκο αντιδραστήρα και για ένα ορισμένο ρυθμό ροής τροφοδοσίας Q_f. Ο ρυθμός παραγωγής r_i είναι σταθερός διαμέσου του αντιδραστήρα και αντιστοιχεί στις συγκεντρώσεις και στη θερμοκρασία του ρεύματος εξόδου. Ο ρυθμός της αντίδρασης, *r*, γενικά εξαρτάται από την συγκέντρωση των αντιδρώντων και τη σταθερά ρυθμού (k). Η σταθερά ρυθμού μπορεί να σχεδιαστεί χρησιμοποιώντας την **θερμοκρασιακή εξάρτηση** ***Arrhenius*** (*Arrhenius* temperature dependence). Γενικά, καθώς η αυξάνεται θερμοκρασία αυξάνεται και ο ρυθμός με τον οποίο συμβαίνει η αντίδραση. Παρόμοια, οι συγκεντρώσεις στον αντιδραστήρα είναι ίσες με αυτές στο ρεύμα εξόδου. Αφού σε αυτόν τον τύπο αντιδραστήρα η θερμοκρασία θα είναι ίδια σε όλα τα σημεία, είναι δυνατό να επιτευχθεί σχεδόν εύκολα ισοθερμοκρασιακή λειτουργία όσο διατηρούνται συνθήκες μόνιμης κατάστασης. Όμως η θερμοκρασία του αντιδραστήρα είναι δυνατό να είναι διαφορετική από τη θερμοκρασία του ρεύματος τροφοδοσίας εξαιτίας είτε της θερμότητας αντίδρασης είτε της εναλλαγής ενέργειας με το περιβάλλον.

3.6.3.3 Ισοζύγιο Ενέργειας

Μια έκφραση για τη διατήρηση της ενέργειας στον αντιδραστήρα, με βάση το ισοζύγιο μάζας είναι δυνατό να γραφτεί ως εξής:

[***ενέργεια των ρευμάτων που εισέρχονται στον στοιχειώδη όγκο***] - [***ενέργεια των ρευμάτων που εξέρχονται από τον στοιχειώδη όγκο***] + [***ενέργεια που μεταφέρεται από το περιβάλλον προς τον στοιχειώδη όγκο***] = [***συσσώρευση ενέργειας στον στοιχειώδη όγκο***] (3.5)

3.6.3.4 Συνάρτηση κατανομής του χρόνου παραμονής

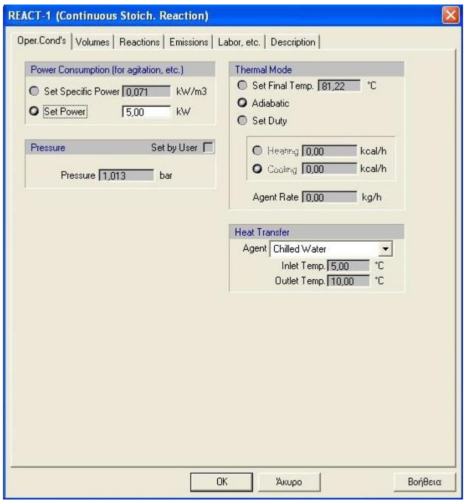
Ο χρόνος που απαιτείται για να διατρέξει ένα μόριο του αντιδραστήρα ονομάζεται χρόνος παραμονής (residence time) και συμβολίζεται με θ. Δύο ιδιότητες του θ είναι σημαντικές: ο χρόνος που έχει περάσει από τη στιγμή που το μόριο εισήλθε στον αντιδραστήρα (ηλικία του μορίου) και ο χρόνος που απομένει μέχρι το μόριο να εξέλθει από τον αντιδραστήρα (υπολειπόμενος χρόνος ζωής).

Οι μεταβολές της πυκνότητας, που μπορεί να προκαλούνται από τις διαφορές πίεσης και θερμοκρασίας, είναι δυνατό να επηρεάσουν το χρόνο παραμονής. Πρέπει δε να τονιστεί ότι αυτές υπερισχύουν των επιδράσεων που οφείλονται στις μεταβολές της ταχύτητας και στη μικροανάμιξη.

3.6.3.5 Ρυθμίσεις παραμέτρων

- **Συνθήκες Λειτουργίας**

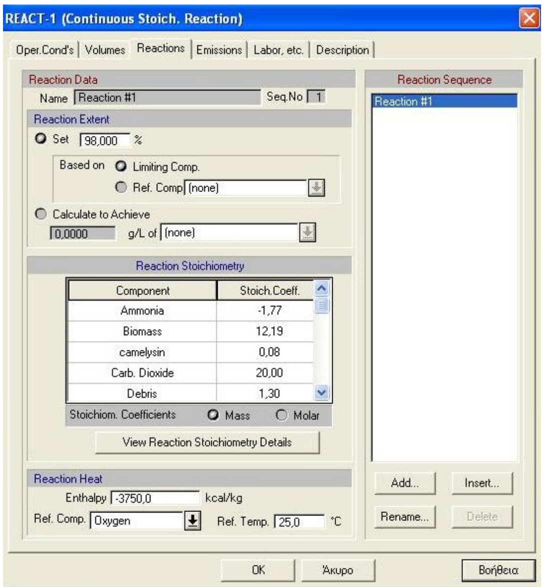
Οι συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα έχουν ρυθμιστεί με ισχύ $0,071 \, {kW}/{m^3}$, και η θερμική του λειτουργία είναι αδιαβατική. Οι ρυθμίσεις φαίνονται στην εικόνα 3.8.



Εικόνα 3.8: Συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα (P-1/V-101).

- **Στοιχειομετρία**

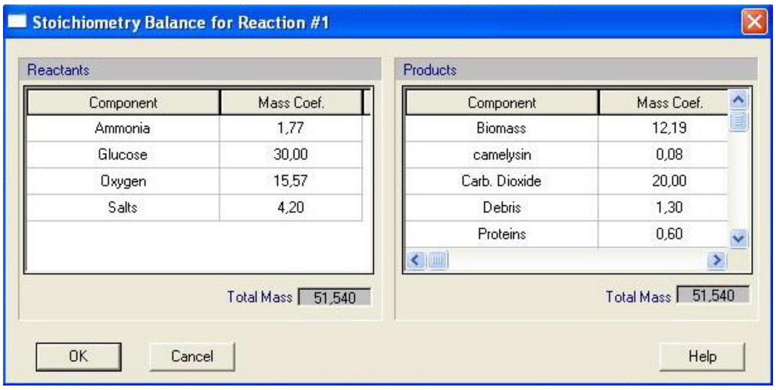
Η στοιχειομετρική αντίδραση μέσα στον αντιδραστήρα παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή προϊόντων της αντίδρασης.



Εικόνα 3.9: Παράμετροι στοιχειομετρικής αντίδρασης.

Στους στοιχειομετρικούς συντελεστές (stoichiometric coefficients) χρησιμοποιούνται αρνητικές τιμές για τα αντιδραστήρια (συστατικά που καταναλώνονται) και θετικές για τα προϊόντα (συστατικά που παράγονται). Για τους στοιχειομετρικούς συντελεστές μάζας, όπως αυτοί που χρησιμοποιούνται εδώ, το ποσό όλων των συντελεστών πρέπει να είναι ίσο με μηδέν.

Για μοριακούς στοιχειομετρικούς συντελεστές, το άθροισμα των προϊόντων {Στοιχειομετρικός συντελεστής} x {Μοριακό βάρος (i)} για όλα τα συστατικά που παίρνουν μέρος στην αντίδραση πρέπει να είναι ίσο με το μηδέν. Στην εικόνα 3.10 φαίνονται οι στοιχειομετρικοί συντελεστές και η ισορροπία τους, ενώ οι συντελεστές των προϊόντων συμπληρώνονται από (+1.00) για τα ολικά αιωρούμενα στερεά και (+16,37) για το νερό .

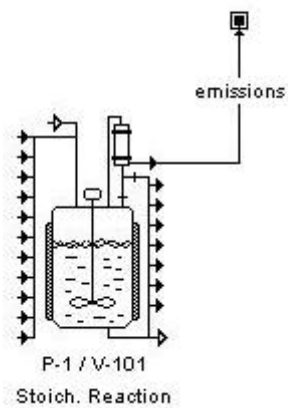


Εικόνα 3.10: Στοιχειομετρική ισορροπία αντίδρασης.

- **Έκταση Αντίδρασης**

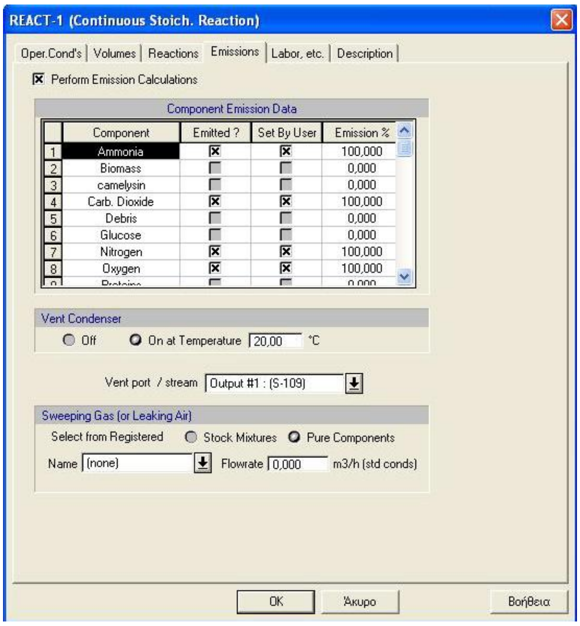
Η έκταση της αντίδρασης (reaction extent) έχει ρυθμιστεί στο να αγγίζει το 98% και αντιπροσωπεύει την κλασματική μετατροπή του περιορισμένου ή σε αυτό που γίνεται αναφορά συστατικού. Εάν η έκταση διευκρινίζεται με βάση σε ένα συστατικό αναφοράς και η αξία του δεν είναι εφικτή, το πρόγραμμα χρησιμοποιεί την ανώτατη πιθανή αξία (αντίστοιχος στην έκταση 0 ή 100%).

- **Εκπομπές**

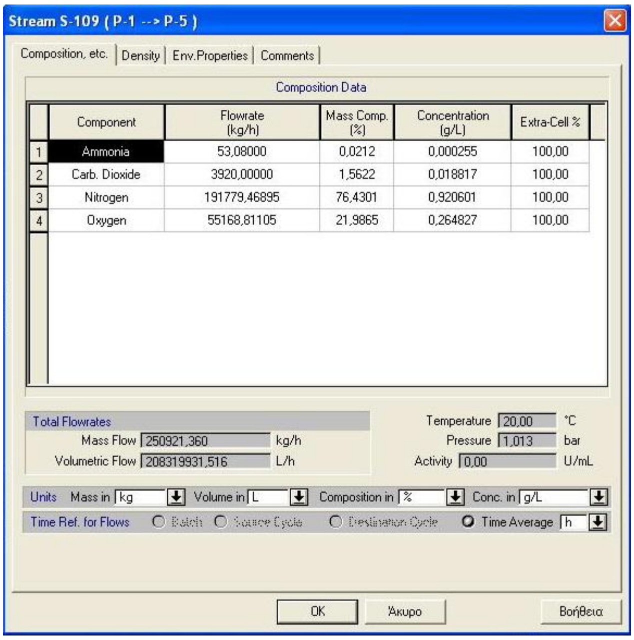


Εικόνα 3.11: Εκπομπές αερίων από τον αντιδραστήρα P-1/V-101.

Οι εκπομπές που λαμβάνουν χώρα κατά τη ζύμωση περιλαμβάνουν την αμμωνία, διοξείδιο του άνθρακα, άζωτο και οξυγόνο σε ποσοστό 100 τοις εκατό για το καθένα. Η θερμοκρασία εξόδου των αερίων είναι 20 ^oC όταν εισέρχονται στο ρεύμα S-109 και η πίεση στα 1.013 Bar. Τα ποσοστά εκπομπών φαίνονται στην εικόνα 3.12, και οι αντίστοιχες εκροές τους σε kg/hr, με πίεση ρεύματος 1,013 bar, αναγράφονται στην εικόνα 3.13. Στο ρεύμα εκπομπών απομακρύνεται όλη η ποσότητα της αμμωνίας, του διοξειδίου του άνθρακα, του αζώτου και του οξυγόνου.



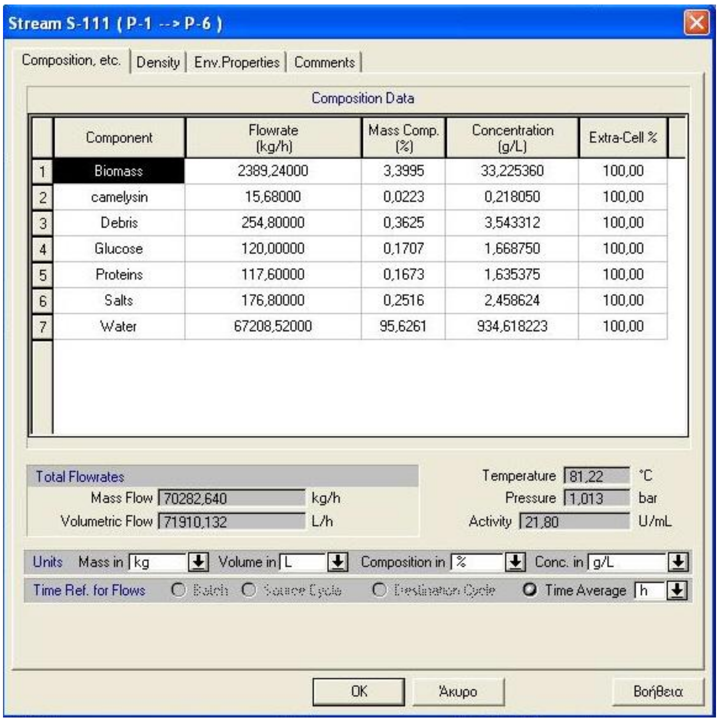
Εικόνα 3.12: Ποσοστά εκπομπής αερίων ζύμωσης.



Εικόνα 3.13: Παροχές αερίων στο ρεύμα εξόδου S-109.

3.6.3.6 Εκροές συστατικών από τον αντιδραστήρα P-1/V-101

Μετά από χρόνο παραμονής μιας ώρας στον αντιδραστήρα και αφού λάβουν χώρα οι αντιδράσεις που προαναφέρθηκαν, μια ποσότητα προϊόντων 70282,64 $^{kg}/_{hr}$ εισέρχεται μέσω του ρεύματος S-111 (Εικόνα 3.14) και από εκεί στην δεξαμενή αποθήκευσης V-103,στον δεύτερο τομέα της πρωτεύουσας ανάκτησης. Τα προϊόντα της αντίδρασης στον αντιδραστήρα V-101 και οι παροχές τους αναγράφονται στην εικόνα 3.14. Η πίεση στο ρεύμα είναι 1,013 bar και η θερμοκρασία που εξέρχονται τα προϊόντα από τον αντιδραστήρα αγγίζει τους 81,22 ^oC , ενώ η δραστηριότητα της καμελυσίνης φτάνει τις 21,80 ενζυμικές μονάδες ανά ml. Το σύνολο των συστατικών εκροής εισέρχεται σε μια δεξαμενή ανάμιξης (P-6/V-103) όπου μένουν για μια ώρα. Η θερμοκρασία ρυθμισμένη σε αδιαβατικό μοντέλο φτάνει τους 81,23 ^oC πριν τα συστατικά εισέλθουν στον φυγοκεντρωτή.

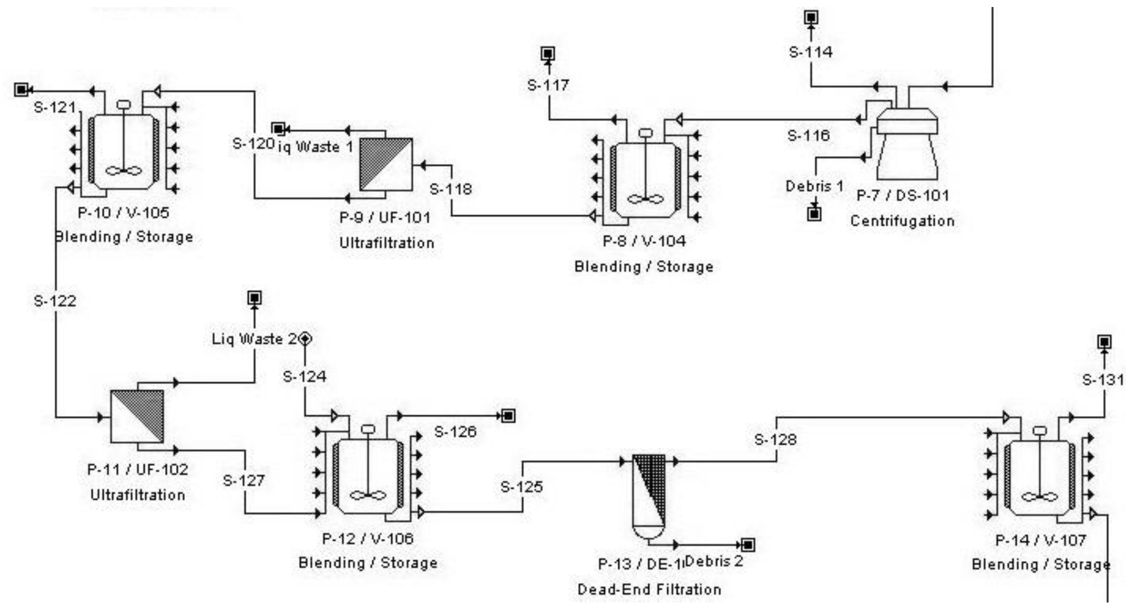


	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	Biomass	2389,24000	3,3995	33,225360	100,00
2	camelysin	15,68000	0,0223	0,218050	100,00
3	Debris	254,80000	0,3625	3,543312	100,00
4	Glucose	120,00000	0,1707	1,668750	100,00
5	Proteins	117,60000	0,1673	1,635375	100,00
6	Salts	176,80000	0,2516	2,458624	100,00
7	Water	67208,52000	95,6261	934,618223	100,00

Εικόνα 3.14: Παροχές προϊόντων ζύμωσης στο ρεύμα S-111.

3.7 Πρωταρχικός τομέας ανάκτησης (Primary recovery section)

Το πρώτο βήμα στον δεύτερο τομέα είναι η συγκομιδή κυττάρων για να μειωθεί ο όγκος της καλλιέργειας και να απομακρυνθούν οι εξωκυτταρικές ακαθαρσίες. Ένας disk-stack centrifuge (DS-101) χρησιμοποιείται για να αφαιρέσει τα περισσότερα από τα κυτταρικά διαλυμένα μέρη. Η προκύπτουσα πρωτεϊνική λύση συγκεντρώνεται από δύο διαδοχικές υπερδιηθήσεις (ultrafilters) UF-101 και UF-102 και αποθηκεύεται στις δεξαμενές ανάμιξης V-105 και V-106. Μια συσκευή κατά μέτωπου διήθησης (DE-101) απομακρύνει τα εναπομείναντα κυτταρικά διαλυμένα μέρη.



Εικόνα 3.15: Πρωταρχικός τομέας ανάκτησης.

3.7.1 Φυγοκεντρωτής Disk – Stack

Αυτή η μονάδα επεξεργασίας προσομοιώνει τον στερεό-υγρό ή υγρό-υγρό διαχωρισμό σε ένα φυγοκεντρωτή τύπου disk stack. Ο διαχωρισμός βασίζεται στην διαφορά πυκνότητας μεταξύ των δύο φάσεων.

3.7.1.1 Θεωρία φυγοκέντρισης

Η φυγοκέντριση (centrifugation) είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ή τη συγκέντρωση υλικών που αιωρούνται σε ένα υγρό μέσο. Η θεωρητική βάση αυτής της τεχνικής είναι η επίδραση της βαρύτητας στα σωματίδια (συμπεριλαμβανομένων των μακρομορίων) που βρίσκονται στο αιώρημα. Δύο σωματίδια με διαφορετικές μάζες θα καθιζάνουν σε ένα σωλήνα με διαφορετικούς ρυθμούς εξαιτίας της βαρύτητας. Αυτή η μονάδα επεξεργασίας μιμείται στερεό – υγρό ή υγρό – υγρό διαχωρισμό με ένα disk- tank centrifuge. Ο διαχωρισμός βασίζεται στη διαφορετική πυκνότητα μεταξύ των δύο φάσεων. Η φυγόκεντρος δύναμη χρησιμοποιείται για να αυξήσει αυτό το ρυθμό καθίζησης σε ένα όργανο που ονομάζεται φυγοκεντρωτής.

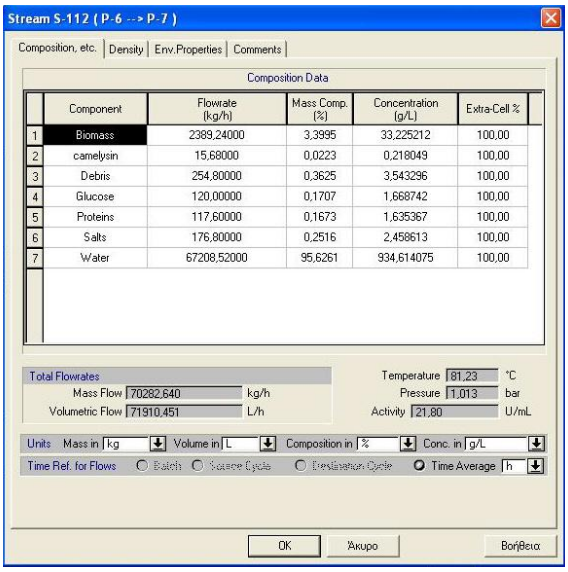
Οι φυγοκεντρωτές είναι συσκευές που χρησιμοποιούνται σε μια ποικιλία επιστημονικών και τεχνικών εφαρμογών, οι οποίες περιστρέφουν δοχεία (σωλήνες φυγοκέντρισης) σε υψηλές ταχύτητες περιστροφής και με πολύ υψηλή φυγόκεντρο δύναμη.

Η φυγόκεντρος δύναμη που παράγεται είναι ανάλογη με το ρυθμό περιστροφής του δίσκου (σε στροφές/λεπτό) και με την απόσταση μεταξύ του κεντρικού ρότορα και το σωλήνα φυγοκέντρισης.

Οι φυγοκεντρωτές γενικά λειτουργούν υπό κενό και ψύξη για να μειώσουν τη θερμότητα που προκαλείται από δυνάμεις τριβής, καθώς ο ρότορας περιστρέφεται.

3.7.1.2 Τροφοδοσία

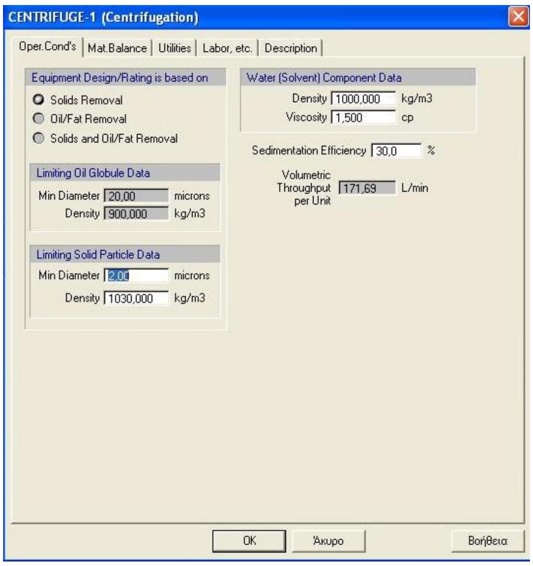
Η τροφοδοσία του φυγοκεντρωτή DS-101 γίνεται από το ρεύμα S-112 και αφού πρώτα το υλικό έχει αποθηκευτεί σε δεξαμενή ανάμιξης για μία ώρα. Τα συστατικά που θα υποβληθούν σε φυγοκέντριση και τα αντίστοιχα φορτία τους φαίνονται στην εικόνα 3.17.



Εικόνα 3.16: Παροχές συστατικών στο ρεύμα τροφοδοσίας S-112.

3.7.1.3 Συνθήκες Λειτουργίας

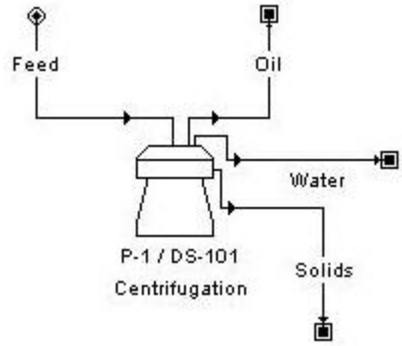
Οι συνθήκες λειτουργίας του φυγοκεντρωτή έχουν ρυθμιστεί να γίνεται απομάκρυνση στερεών. Η αποδοτικότητα ιζηματαπόθεσης (sedimentation efficiency) είναι 30%, η πυκνότητα των στερεών που καθιζάνουν είναι 1030 kg/m^3. Η ελάχιστη διάμετρος των στερεών είναι της τάξεως των 2 εκατομμυριοστών του μέτρου.



Εικόνα 3.17: Συνθήκες λειτουργίας του φυγοκεντρωτή DS-101.

3.7.1.4 Ρυθμίσεις παραμέτρων φυγοκεντρωτή P-7/DS-101

Μια μεγάλη ποσότητα συστατικών εισέρχεται στον φυγοκεντρωτή από τη ζώνη εισόδου (feed zone) με παράλληλη μείωση των διατμητικών δυνάμεων και του ποσού του αφρίσματος.

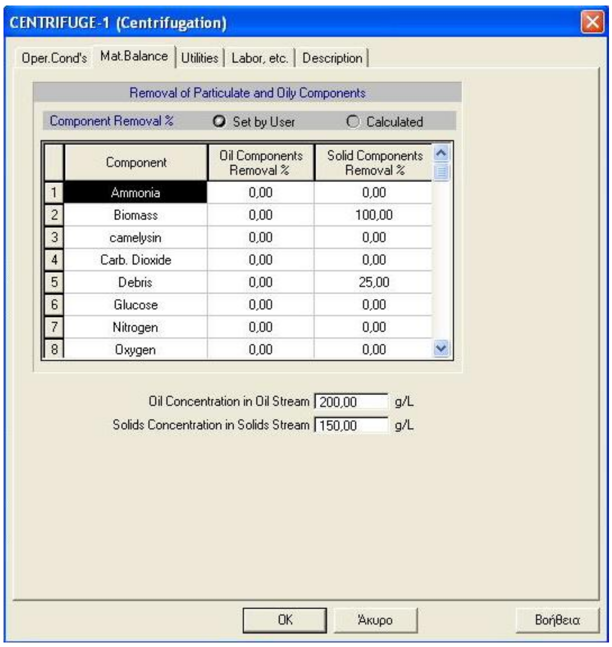


Εικόνα 3.18: Ζώνες του φυγοκεντρωτή DS-101.

Στόχος μας είναι η συγκομιδή κυττάρων για να μειωθεί ο όγκος της καλλιέργειας και να απομακρυνθούν οι εξωκυτταρικές ακαθαρσίες. Με τη χρήση του disk-stack centrifuge (DS-101) αφαιρούνται τα περισσότερα από τα κυτταρικά διαλυμένα μέρη και απομονώνεται η προκύπτουσα πρωτεϊνική λύση.

Με τη φυγοκέντριση επιτυγχάνουμε το διαχωρισμό του ενζύμου από το υπόστρωμά του (αδιάλυτη γλυκόζη) με σκοπό να σταματήσει η αντίδραση. Με τη διαδικασία της φυγοκέντρισης αναμένουμε την καθίζηση των κυτταρικών υπολειμμάτων και τη συλλογή πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας ενζυμικού εκχυλίσματος. Το ένζυμο, το οποίο είναι διαλυτό, θα παραμείνει στο εναιώρημα.

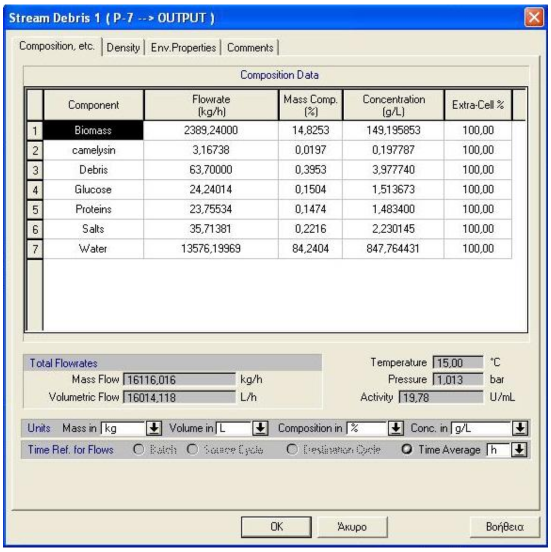
Σε αυτή τη φάση απομακρύνεται ολόκληρη η ποσότητα της βιομάζας, το 25% των θραυσμάτων (debris) που περιλαμβάνονται στα συστατικά.



Εικόνα 3.19: Ποσοστά απομάκρυνσης σωματιδίων κατά την φυγοκέντριση.

3.7.1.5 Εκροές αποβλήτων από τον φυγοκεντρωτή DS-101

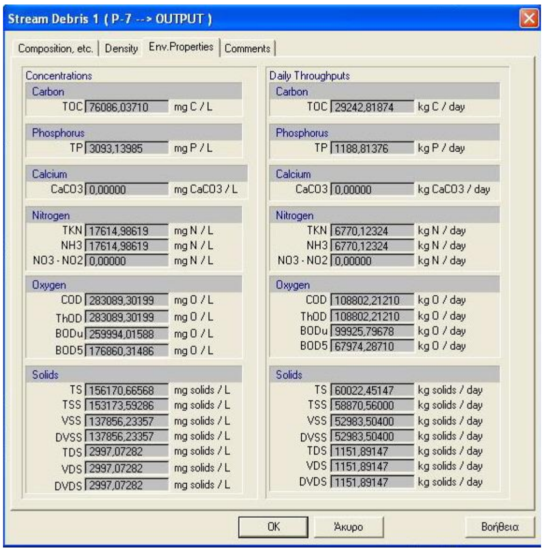
Σύμφωνα με τις ρυθμίσεις φυγοκέντρισης που προαναφέρθηκαν από το ρεύμα εξόδου των στερεών Debris 1, πυκνότητας 1006,36g/L, θα απομακρυνθεί το σύνολο της βιομάζας και το 25% των ακαθαρσιών (debris). Η διεργασία της φυγοκέντρισης θα έχει επιπτώσεις στα άλατα (περίπου 20% απομάκρυνση) και στις πρωτεΐνες ακόμα με μια απομάκρυνση της τάξεως του 20%. Με την διεργασία αυτή αποβάλλεται το 20% της αρχικής ποσότητας του νερού.



	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	Biomass	2389,24000	14,8253	149,195853	100,00
2	camelysin	3,16738	0,0197	0,197787	100,00
3	Debris	63,70000	0,3953	3,977740	100,00
4	Glucose	24,24014	0,1504	1,513673	100,00
5	Proteins	23,75534	0,1474	1,483400	100,00
6	Salts	35,71381	0,2216	2,230145	100,00
7	Water	13576,19969	84,2404	847,764431	100,00

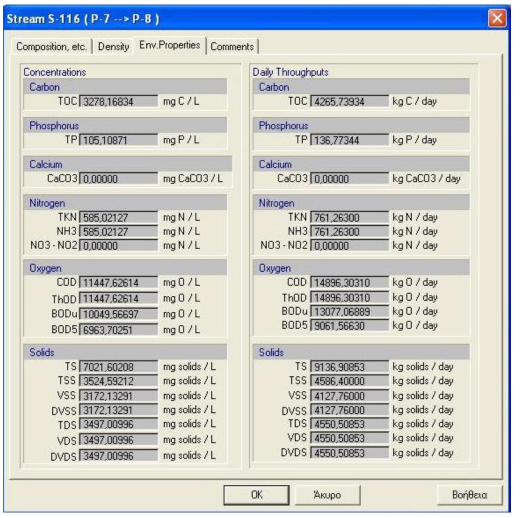
Εικόνα 3.20: Εκροές αποβλήτων από τη φυγοκέντριση, ρεύμα Debris 1.

Η σημαντικότητα της διεργασία της φυγοκέντρισης φαίνεται στην ποσότητα των ολικών αιωρούμενων στερεών (TSS), που απομακρύνονται. Η αρχική παροχή των TSS πριν τη φυγοκέντριση ήταν 63456,96 kg solids/day, ενώ με την φυγοκέντριση αποβάλλονται 58870,56 kg solids/day (εικόνα 3.21). Άρα το ποσοστό απομάκρυνσης των TSS με τη φυγοκέντριση φτάνει το 92%.



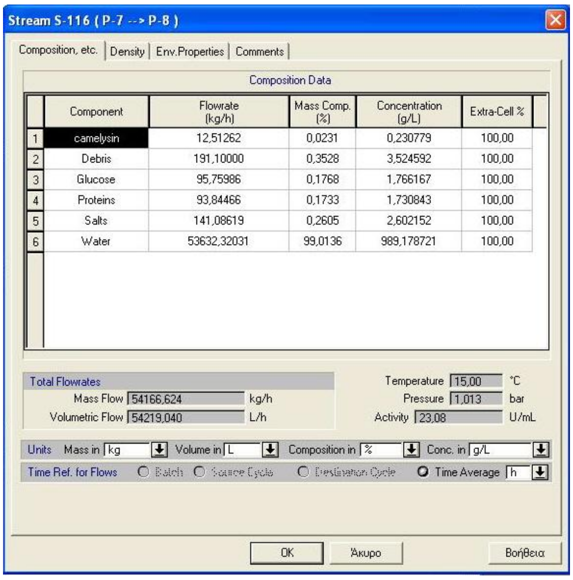
Εικόνα 3.21: Περιβαλλοντικές ιδιότητες του ρεύματος debris 1.

3.7.1.6 Εκροές συστατικών από τον φυγοκεντρωτή DS-101



Εικόνα 3.22: Περιβαλλοντικές ιδιότητες του ρεύματος S-116.

Μετά τη φυγοκέντριση εναπομείναντα υλικά μεταφέρονται μέσω του ρεύματος S-116 σε μια δεξαμενή ανάμιξης V-104 με χρόνο παραμονής 1 ώρα. Έτσι τα συστατικά τώρα αποτελούμενα από καμελυσίνη, εναπομείναντες ακαθαρσίες, γλυκόζη που παρέμεινε μετά τη φυγοκέντριση, πρωτεΐνες, άλατα και νερό μεταφέρονται στη διεργασία της υπερδιήθησης. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε την παρατηρούμενη αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας της καμελυσίνης μιας και από 21,80 ενζυμικές μονάδες ανά ml πριν τη φυγοκέντριση αυξήθηκε στις 23,08 ενζυμικές μονάδες ανά ml μετά τη φυγοκέντριση. Το πιο σημαντικό όμως στοιχείο είναι ότι η θερμοκρασία του ρεύματος εισόδου πριν τη φυγοκέντριση άγγιζε τους 81,23 ^oC μιας και μεταφέρθηκε αδιαβατικά μέσα από τη δεξαμενή V-103, ενώ στο ρεύμα εξόδου S-116 η θερμοκρασία είναι 15,00 ^oC. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως η καμελυσίνη συνεχίζει να είναι δραστική ακόμα και σε απότομες μεταβολές θερμοκρασίας, πράγμα το οποίο έχει διερευνηθεί και αναπτυχθεί σε προηγούμενες ενότητες.



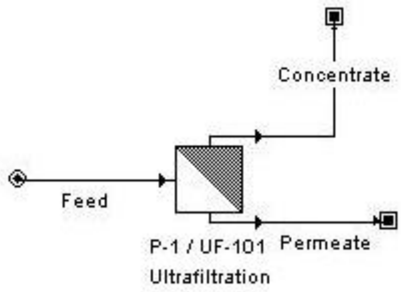
	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	camelysin	12,51262	0,0231	0,230779	100,00
2	Debris	191,10000	0,3528	3,524592	100,00
3	Glucose	95,75986	0,1768	1,766167	100,00
4	Proteins	93,84466	0,1733	1,730843	100,00
5	Salts	141,08619	0,2605	2,602152	100,00
6	Water	53632,32031	99,0136	989,178721	100,00

Εικόνα 3.23: Παροχές συστατικών μετά τη φυγοκέντριση (S-116).

Τέλος η αποδοτικότητα της φυγοκέντρισης μπορεί να αυξηθεί επηρεάζοντας μία ή περισσότερες από τις παρακάτω παραμέτρους:

1. Αύξηση της διαμέτρου των στερεών μερών
2. Αύξηση του χρόνου παραμονής
3. Αύξηση της απόστασης από την ιζηματογένεση

3.7.2 Υπερδιήθηση (ultrafiltration), P-9/UF-101

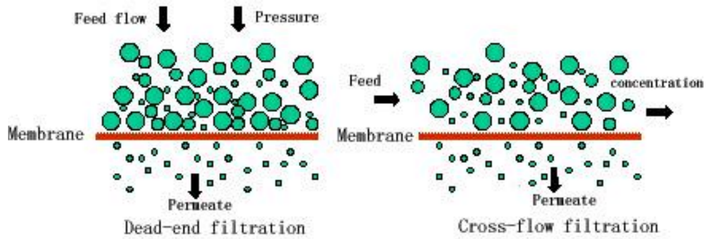


Εικόνα 3.24: Υπερδιήθηση (P-9/UF-101).

3.7.2.1 Φάσεις - συστατικά

Η φάση μπορεί να είναι μία οπότε υπάρχει ένα συνεχές μέσο, το διάλυμα ή μπορεί να είναι δύο φάσεις, στερεή φάση-υδάτινη φάση, π.χ. αιωρούμενα στερεά (συνήθως όχι ορατά με γυμνό μάτι) και υγρή φάση. Επίσης έχουμε την παραμβένουσα φάση (intervening phase) που είναι η μεμβράνη υπερδιήθησης.
Τα διαλυμένα συστατικά ή τα μόρια που διαχωρίζονται γενικά με αυτή τη μέθοδο έχουν μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 500 και έως 1.000.000 ή περισσότερο (σύμφωνα με άλλη πηγή το μοριακό βάρος κυμαίνεται από 20.000 έως 100.000), όπως μακρομόρια πρωτεϊνών.

Η μεμβράνη παρεμβάλλεται ανάμεσα στην τροφοδοσία και το πέρασμα ή διήθημα. Η φάση προς την πλευρά της τροφοδοσίας ονομάζεται υπόλειμμα και είναι συνήθως η φάση του συμπυκνώματος, δηλαδή ότι δεν περνάει από την μεμβράνη. Η άλλη φάση από την άλλη πλευρά της μεμβράνης είναι το πέρασμα, δηλαδή ότι περνάει από τη μεμβράνη. Η φάση το υπολείμματος δεν ταυτίζεται απαραίτητα με τη φάση τροφοδοσίας. Αυτό συμβαίνει μόνο στη μέθοδο της κατά μέτωπο τροφοδοσίας (dead end), η οποία χρησιμοποιείται στην κλασική διήθηση και εν μέρει στην μικροδιήθηση. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις και ειδικά στην υπερδιήθηση που μας ενδιαφέρει, έχει επικρατήσει η μέθοδος της εφαπτομενικής τροφοδοσίας (cross flow). Η διαφορά τους περιγράφεται στην εικόνα 3.25.



Εικόνα 3.25: Διαφορά εφαπτομενικής (cross-flow) και κατά μέτωπο (dead-end) διήθησης.
Πηγή: http//www.hydrotech.cn/English/images/mo_1.jpg.

Η εφαπτομενική τροφοδοσία έχει ως στόχο τον περιορισμό των εναποθέσεων υλικού πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης, ώστε να καθυστερεί η υποβάθμιση της απόδοσης της μεμβράνης (fouling).

3.7.2.2 Κρίσιμη ιδιότητα

Η πιο σημαντική ιδιότητα για το διαχωρισμό με υπερδιήθηση είναι η διάμετρος (μέγεθος) των διαχωριζομένων σωματιδίων. Αυτό φυσικά συνδέεται και με το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης. Με τελική επίδραση στην ημιπερατότητα της μεμβράνης υπερδιήθησης.

Επίσης σημαντικός παράγοντας είναι η συγκέντρωση του διαλύματος που διαχωρίζεται. Η εφαρμοζόμενη πίεση ή η διαφορά της πίεσης εγκάρσια της μεμβράνης εκτός από δρώσα δύναμη αποτελεί και κρίσιμη ιδιότητα της διεργασίας. Η ταχύτητα του ρευστού κατά μήκος της μεμβράνης επίσης αποτελεί κρίσιμη ιδιότητα λόγω του φαινόμενου πόλωσης. Τέλος παίζει ρόλο και η θερμοκρασία.

3.7.2.3 Μηχανισμοί

Το προς διαχωρισμό διάλυμα διαβιβάζεται υπό πίεση διαμέσου της πορώδους μεμβράνης, η οποία συγκρατεί μηχανικά σαν ένα λεπτό κόσκινο τα σωματίδια και επιτρέπει τη διέλευση των μικρότερων μορίων και του διαλύτη. Η χρησιμοποιούμενη πίεση κυμαίνεται μεταξύ 0.5-5bar (ή 1-10bar).

Κύριος μηχανισμός: Σούρωμα (Sieving effect). Αυτό που έχει μεγαλύτερη διάμετρο από τη διάμετρο των πόρων συγκρατείται. Το σούρωμα είναι τριών ειδών:

1.Επιφανειακό σούρωμα
2.Σούρωμα σε βάθος
3.Δημιουργία πλακούντα (cake filtration)

Δρώσα δύναμη είναι η διαφορά πίεσης ή η κλίση της πίεσης εγκάρσια της μεμβράνης.

$$J = K\frac{\Delta P}{b} \quad \text{ή} \quad J = K'\Delta P \tag{3.6}$$

Όπου K: συντελεστής διαπερατότητας της μεμβράνης

$$\textit{Driving force} = \frac{\Delta P}{b} \tag{3.7}$$

Όμως σπάνια η πίεση είναι η μόνη δρώσα δύναμη. Δευτερεύουσες δρώσες δυνάμεις μπορεί να προέρχονται από την πόλωση της συγκέντρωσης και / ή τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταφερόμενων μορίων και του υλικού της μεμβράνης.

Πόλωση συμβαίνει όταν τα συσσωρεμένα στερεά βρίσκονται σε εν διαλύσει κατάσταση. Σε αυτή την περίπτωση δεν έχουμε δημιουργία πλακούντα αλλά μεγάλη συγκέντρωση διαλυμένων στερεών. Το στρώμα πόλωσης προσφέρει μια πρόσθετη αντίσταση στη ροή διαμέσου της μεμβράνης και αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στη διεργασία.

Ένα από τα χαρακτηριστικά της μεμβράνης είναι επίσης η τάση που έχει να μειώνει την απόδοσή της με τη χρήση (fouling effects). Αυτή η τάση εξαρτάται από τις ιδιότητες που έχει η επιφάνεια της μεμβράνης (υδρόφιλη/υδρόφοβη) και η διαλυμένη ουσία καθώς και τα χαρακτηριστικά του μεγέθους των πόρων της μεμβράνης σε σύγκριση με το μέγεθος της διαλυμένης ουσίας.

3.7.2.4 Συγκράτηση

Η αποτελεσματικότητα της υπερδιήθησης ή βαθμός απόρριψης ή συγκράτησης (rejection or retention) δίνεται από την εξίσωση:

$$R = \frac{C_{εισ.} - C_{εξ.}}{C_{εισ.}} = 1 - \frac{C_{εξ.}}{C_{εισ.}} \tag{3.8}$$

ή

$$R = \left(1 - \frac{C_{εξ.}}{C_{εισ.}}\right) \times 100\% \tag{3.9}$$

3.7.2.5 Συνεχές σύστημα

Για ένα συνεχές σύστημα έχουμε το συνολικό ισοζύγιο παροχών:

$$Q_F = Q_P + Q_C \tag{3.10}$$

Και για κάθε συστατικό του διαλύματος έχουμε:

$$C_F Q_F = C_P Q_P + C_C Q_C \tag{3.11}$$

Όπου: F:τροφοδοσία (feed)
P:πέρασμα (permeate)
C:συμπύκνωμα ή υπόλειμμα (concentrate)

Επίσης ο βαθμός συγκράτησης για κάθε συστατικό είναι:

$$R = 1 - \frac{C_P}{C_C} \tag{3.12}$$

Και ο συντελεστής συμπύκνωσης είναι:

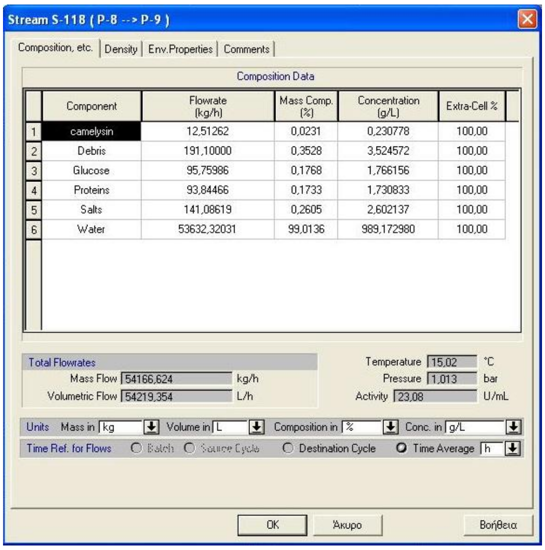
$$F_K = \frac{C_C}{C_F} \tag{3.13}$$

Ο βαθμός ανάκτησης (recovery) προκύπτει με συνδυασμό των δύο παραπάνω εξισώσεων:

$$\frac{Q_P}{Q_F} = \frac{F_K - 1}{F_K R} \tag{3.14}$$

3.7.2.6 Τροφοδοσία

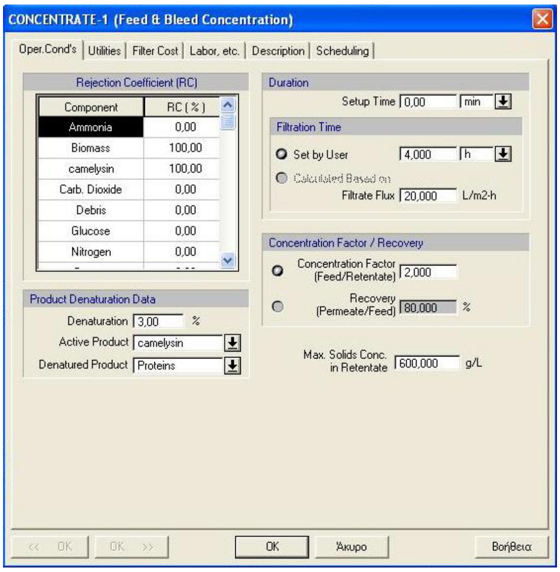
Στην επόμενη εικόνα δίνονται οι παροχές των συστατικών πριν αυτά εισέλθουν στην διεργασίας της υπερδιήθησης (ultrafiltration process).



Εικόνα 3.26: Παροχές συστατικών στο ρεύμα τροφοδοσίας S-118.

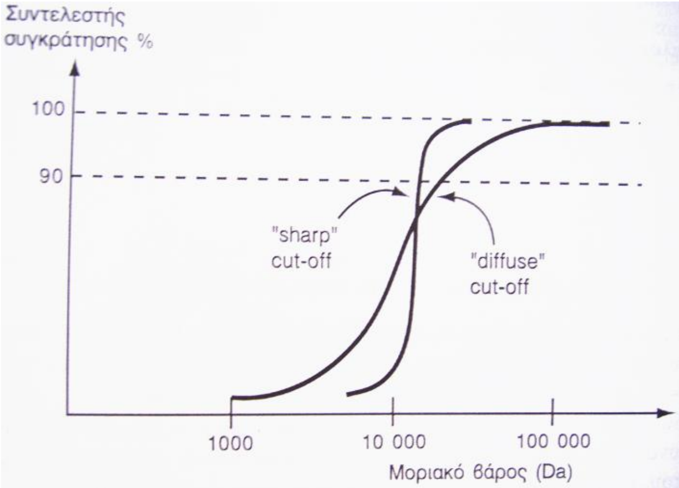
3.7.2.7 Συνθήκες λειτουργίας

Όπως προαναφέρθηκε η συνεχή υπερδιήθηση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση διαλυμάτων μεγάλου μοριακού βάρους και σωματιδιακά συστατικά από το νερό. Εδώ όπως και στη βιομηχανία αλλά και στην βιομηχανία τροφίμων, η υπερδιήθηση εφαπτομενικής τροφοδοσίας χρησιμοποιείται κυρίως για τη συγκέντρωση πρωτεϊνικών διαλυμάτων και διαχωρισμού πρωτεϊνών από μικρού μοριακού βάρους διαλύματα. Ο ρόλος της εφαπτομενικής τροφοδοσίας είναι ο περιορισμός των εναποθέσεων υλικού πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης, ώστε να καθυστερεί υ υποβάθμιση της απόδοσης της μεμβράνης (fouling).



Εικόνα 3.27: Συνθήκες λειτουργίας της υπερδιήθησης UF-101.

Οι μεμβράνες υπερδιήθησης εκτιμώνται με βάση την **καμπύλη μοριακού βάρους cut-off**. Το cut-off στις μεμβράνες υπερδιήθησης ορίζεται ως το μοριακό βάρος σφαιρικών πρωτεϊνών, οι οποίες κατακρατούνται κατά 90% από την μεμβράνη. Η καμπύλη cut-off (εικόνα 3.28) είναι η απεικόνιση του βαθμού συγκράτησης σε συνάρτηση με τον λογάριθμο του μοριακού βάρους. Η καμπύλη έχει σιγμοειδές σχήμα και όταν είναι απότομη αναφέρεται ως (απότομο) “sharp” cut-off, ενώ όταν η καμπύλη είναι ευρεία χρησιμοποιούμε τον όρο “diffuse” cut-off (διάχυσης).



Εικόνα 3.28: Καμπύλη cut-off.

Πηγή: Δρ. Γκέκας Β., Πρωιμάκη Σπ., “Φυσικοχημικές διεργασίες διαχωρισμού για μηχανικούς περιβάλλοντος”, Εκδόσεις Τζιόλα, 2002.

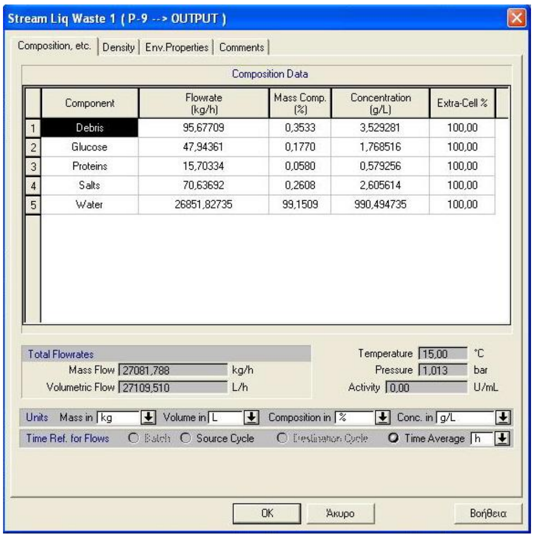
Ο χρόνος λειτουργίας της διήθησης έχει οριστεί στις τέσσερις ώρες. Για τη διεργασία αυτή με βάση την ροή μάζας (mass flow=54.166,624 kg/hr), θα χρησιμοποιηθούν 17 μονάδες υπερδιήθησης συνολικής περιοχής μεμβράνης 79,734 m^2. Ο **συντελεστής απόρριψης**-rejection coefficient (RC), είναι 100% για την καμελυσίνη και τη βιομάζα αντίστοιχα, πράγμα που σημαίνει πως το έχουμε ρυθμίσει έτσι ώστε όλη η ποσότητα της καμελυσίνης να περάσει από τη μεμβράνη, αλλά με μια μικρή απώλεια λόγω της αλλοίωσης του προϊόντος.

Η αλλοίωση του προϊόντος κατά τη διάρκεια που διηθείται στην μεμβράνη είναι κοινό χαρακτηριστικό στην βιοεπεξεργασία. Για να υπολογίσουμε το ποσοστό της αλλοίωσης του προϊόντος πρέπει να ορίσουμε το ενεργό προϊόν (active product) και το προϊόν που αλλοιώνεται καθώς και το ποσοστό αλλοίωσης. Το ενεργό προϊόν (active product) που μας ενδιαφέρει, στην προκειμένη περίπτωση η καμελυσίνη θα έχει μια φυσική αλλοίωση της τάξης του 3%.

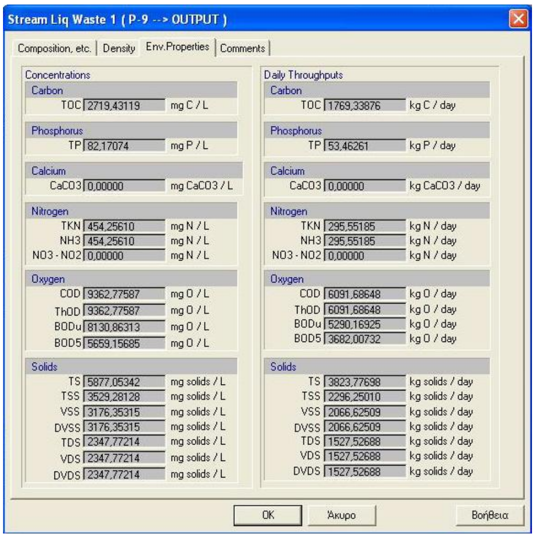
Υπάρχουν δύο ισοδύναμοι τρόποι για τον καθορισμό της έκτασης της διήθησης (συγκέντρωση). Πρώτον ο παράγοντας συγκέντρωσης (concentration factor, feed/retentate) πρέπει να είναι πάνω από 1, διότι σε αντίθετη περίπτωση δεν θα περνούσε καθόλου υλικό για υπερδιήθηση, εδώ ορίζεται στο 2. Δεύτερον, η ανάκτηση (recovery) του επιθυμητού αποτελέσματος ανάμεσα στην τροφοδοσία και το διήθημα είναι (permeate/feed) 80%. Επίσης σημαντικός παράγοντας είναι η συγκέντρωση του διαλύματος που διαχωρίζεται.

3.7.2.8 Εκροές αποβλήτων από την υπερδιήθηση UF-101

Τα παραπάνω στοιχεία σε συνδυασμό με τη μέγιστη συγκέντρωση των στερεών στην κατακράτηση να είναι 600g/L και μετά από τέσσερις ώρες υπερδιήθησης έχουμε την περίπου 50% απομάκρυνση των αλάτων, των θραυσμάτων (debris) και της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα της υπερδιήθησης και οι αντίστοιχες παροχές των αποβλήτων (εικόνα 3.29) και οι περιβαλλοντικές ιδιότητες στο ρεύμα αποβλήτων (εικόνα 3.30) φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 3.29: Εκροές αποβλήτων από την υπερδιήθηση (Liq Waste 1).

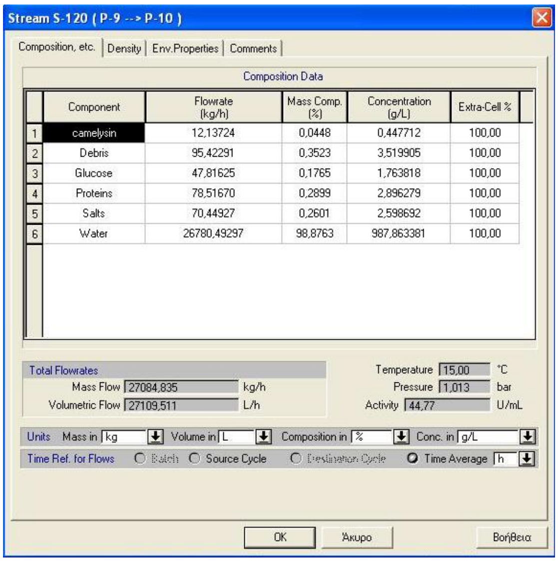


Εικόνα 3.30: Εκροές ολικών αιωρούμενων στερεών στο ρεύμα αποβλήτων.

Η παροχή των ολικών αιωρούμενων στερεών πριν την υπερδιήθηση ήταν 4586,4 kg solids/day, ενώ μετά την υπερδιήθηση ήταν 2296,52 kg solids/day. Το ποσοστό απομάκρυνσής τους είναι της τάξεως του 50%.

3.7.2.9 Εκροές συστατικών από την υπερδιήθηση UF-101

Τα συστατικά της υπερδιήθησης (εικόνα 3.31),το διήθημα, εξέρχονται από τη διεργασία από το ρεύμα εξόδου S-120 και οδηγούνται σε μια δεξαμενή ανάμιξης P-10/V-105 όπου και θα παραμείνουν για μια ώρα πριν εισέλθουν στην επόμενη διεργασία υπερδιήθησης.



Εικόνα 3.31: Παροχές συστατικών μετά την υπερδιήθηση (S-120).

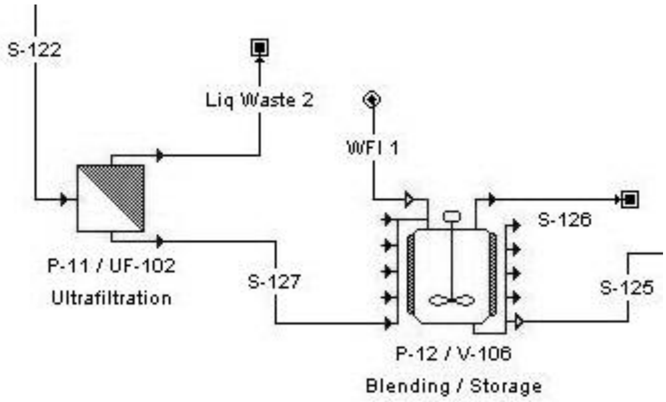
3.7.2.10 Βαθμός απόρριψης

Το προς διαχωρισμό διάλυμα διαβιβάζεται υπό πίεση διαμέσου της πορώδους μεμβράνης. Η χρησιμοποιούμενη πίεση κυμαίνεται μεταξύ 0.5-5bar (ή 1-10bar). Εδώ η πίεση ρυθμίζεται στο 1.013 bar. Η αποτελεσματικότητα της υπερδιήθησης ή βαθμός απόρριψης ή συγκράτησης (rejection or retention) των συστατικών φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.2: Βαθμοί απόρριψης των συστατικών (%) από τη UF-101.

Α/Α	**Συστατικό**	**Βαθμός απόρριψης,** $R=\left(1-\frac{Q_{\varepsilon\xi.}}{Q_{\varepsilon\iota\sigma.}}\right)x100\%$
1.	*Camelysin*	3 (λόγω αλλοίωσης)
2.	*Debris*	50,067
3.	*Glucose*	50,067
4.	*Proteins*	16,334
5.	*Salts*	50,067
6.	*Water*	50,067

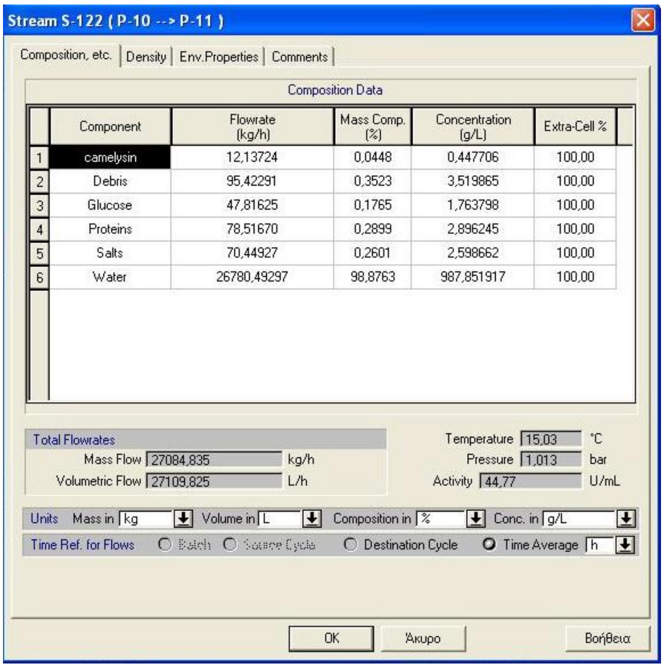
3.7.3 Υπερδιήθηση (ultrafiltration), P-11/UF-102



Εικόνα 3.32: Υπερδιήθηση (P-11/UF-102).

3.7.3.1 Τροφοδοσία

Οι παροχές των συστατικών πριν αυτά εισέλθουν στην διεργασίας της υπερδιήθησης UF-102 (ultrafiltration process) φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.


Stream S-122 (P-10 --> P-11)

Composition, etc. | Density | Env.Properties | Comments

Composition Data

	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	camelysin	12,13724	0,0448	0,447706	100,00
2	Debris	95,42291	0,3523	3,519865	100,00
3	Glucose	47,81625	0,1765	1,763798	100,00
4	Proteins	78,51670	0,2899	2,896245	100,00
5	Salts	70,44927	0,2601	2,598662	100,00
6	Water	26780,49297	98,8763	987,851917	100,00

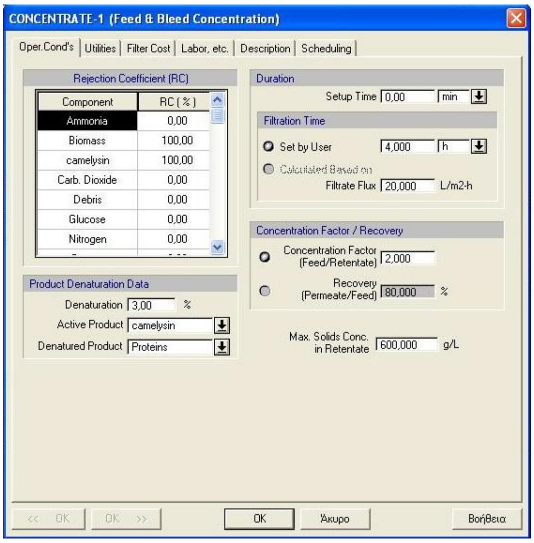
Total Flowrates
Mass Flow 27084,835 kg/h
Volumetric Flow 27109,825 L/h
Temperature 15,03 °C
Pressure 1,013 bar
Activity 44,77 U/mL

Units Mass in kg Volume in L Composition in % Conc. in g/L
Time Ref. for Flows Batch Source Cycle Destination Cycle Time Average h

OK Άκυρο Βοήθεια

Εικόνα 3.33: Παροχές συστατικών στο ρεύμα τροφοδοσίας S-122.

3.7.3.2 Συνθήκες λειτουργίας

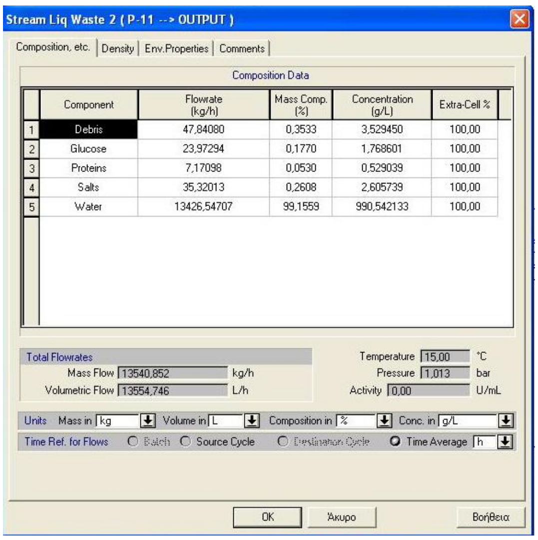


Εικόνα 3.34: Συνθήκες λειτουργίας της υπερδιήθησης UF-102.

Ο χρόνος λειτουργίας της διήθησης έχει οριστεί στις τέσσερις ώρες. Για τη διεργασία αυτή με βάση την ροή μάζας (mass flow=27.084,835 kg/hr), θα χρησιμοποιηθούν 9 μονάδες υπερδιήθησης συνολικής περιοχής μεμβράνης 75,305 m^2. Ο **συντελεστής απόρριψης**-rejection coefficient (RC), όμοια με την προηγούμενη υπερδιήθηση είναι 100% για την καμελυσίνη και τη βιομάζα αντίστοιχα, πράγμα που σημαίνει πως και εδώ όλη η ποσότητα της καμελυσίνης που θα περάσει από την θα είναι μειωμένη κατά 3% λόγω του συντελεστή αλλοίωσης.

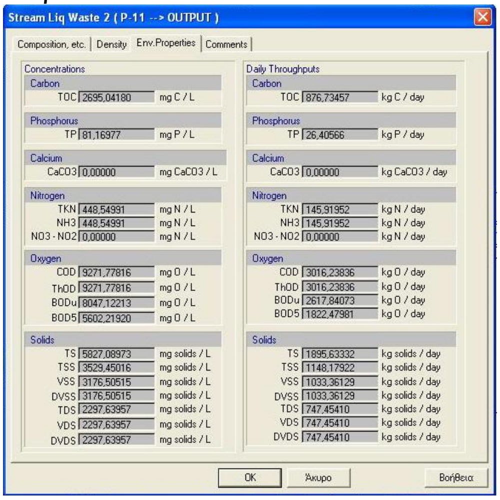
Το ενεργό προϊόν (active product) στην UF-102 είναι η καμελυσίνη θα έχει μια φυσική αλλοίωση της τάξης του 3%. Ο παράγοντας συγκέντρωσης (concentration factor, feed/retentate) εδώ ορίζεται στο 2. Η ανάκτηση (recovery) του επιθυμητού αποτελέσματος ανάμεσα στην τροφοδοσία και το διήθημα είναι (permeate/feed) 80%. Η δε μέγιστη συγκέντρωση των στερεών στην κατακράτηση να είναι 600g/L και μετά από τέσσερις ώρες υπερδιήθησης έχουμε τα εξής αποτελέσματα:

3.7.3.3 Εκροές αποβλήτων από την υπερδιήθηση UF-102



Εικόνα 3.35: Εκροές αποβλήτων από την υπερδιήθηση (Liq Waste 2).

Τα παραπάνω στοιχεία σε συνδυασμό με τη μέγιστη συγκέντρωση των στερεών στην κατακράτηση να είναι 600g/L και μετά από τέσσερις ώρες υπερδιήθησης έχουμε την περίπου 50% απομάκρυνση των αλάτων, των θραυσμάτων (debris) και της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα της υπερδιήθησης και οι αντίστοιχες παροχές των αποβλήτων (εικόνα 3.35) και οι περιβαλλοντικές ιδιότητες στο ρεύμα αποβλήτων (εικόνα 3.36) φαίνονται παρακάτω.

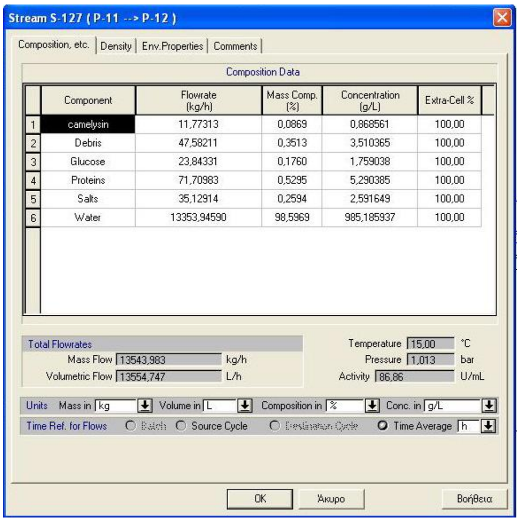


Εικόνα 3.36: Εκροές ολικών αιωρούμενων στερεών στο ρεύμα αποβλήτων.

Η παροχή των ολικών αιωρούμενων στερεών πριν την υπερδιήθηση UF-102 ήταν 2290,1499 kg solids/day, ενώ μετά την υπερδιήθηση UF-102 στο ρεύμα αποβλήτων ήταν 1148,17922 kg solids/day (εικόνα 3.36). Το ποσοστό απομάκρυνσής τους είναι της τάξεως του 50,13%.

3.7.3.4 Εκροές συστατικών από την υπερδιήθηση UF-102

Τα συστατικά της υπερδιήθησης (εικόνα 3.37), το διήθημα, εξέρχονται από τη διεργασία από το ρεύμα εξόδου S-127 και οδηγούνται σε μια δεξαμενή ανάμιξης P-12/V-106 όπου και θα παραμείνουν για μια ώρα πριν εισέλθουν στην επόμενη διεργασία υπερδιήθησης.



Εικόνα 3.37: Παροχές συστατικών μετά την υπερδιήθηση (S-127).

3.7.3.5 Βαθμός απόρριψης

Το προς διαχωρισμό διάλυμα διαβιβάζεται υπό πίεση διαμέσου της πορώδους μεμβράνης. Η χρησιμοποιούμενη πίεση κυμαίνεται μεταξύ 0.5-5bar (ή 1-10bar). Εδώ η πίεση ρυθμίζεται στο 1.013 bar. Η αποτελεσματικότητα της υπερδιήθησης ή βαθμός απόρριψης ή συγκράτησης (rejection or retention) των συστατικών φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

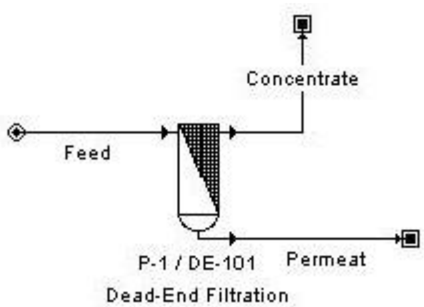
Πίνακας 3.3: Βαθμοί απόρριψης των συστατικών (%) από τη UF-102.

Α/Α	**Συστατικό**	**Βαθμός απόρριψης,** $R=\left(1-\frac{Q_{\varepsilon\xi.}}{Q_{\varepsilon\iota\sigma.}}\right)x100\%$
1.	*Camelysin*	3 (λόγω αλλοίωσης)
2.	*Debris*	50,14
3.	*Glucose*	50,14
4.	*Proteins*	8,67
5.	*Salts*	50,14
6.	*Water*	50,14

3.7.4 Κατά μέτωπο διήθηση (Dead-End Filtration)

Η κατά μέτωπο (dead-end) τροφοδοσία είναι συνήθως ένα βήμα εξευγενισμού. Ανήκει στις διεργασίες διήθησης και στην βιοεπεξεργασία χρησιμοποιείται συνήθως μετά τη φυγοκέντριση και πριν την μονάδα χρωματογραφίας. Το φίλτρο συνήθως τοποθετείται σε ένα φυσίγγιο το οποίο αντικαθίσταται περιοδικά.

3.7.4.1 Θεωρία της κατά μέτωπο διήθησης



Εικόνα 3.38: Κατά μέτωπο διήθηση (dead-end filtration) DE-101.

Όμοια με την υπερδιήθηση, η μεμβράνη παρεμβάλλεται ανάμεσα στην τροφοδοσία και το πέρασμα ή διήθημα. Η φάση προς την πλευρά της τροφοδοσίας ονομάζεται υπόλειμμα και είναι συνήθως η φάση του συμπυκνώματος, δηλαδή ότι δεν περνάει από την μεμβράνη. Η άλλη φάση από την άλλη πλευρά της μεμβράνης είναι το πέρασμα, δηλαδή ότι περνάει από τη μεμβράνη. Στην κατά μέτωπο τροφοδοσία η φάση του υπολείμματος ταυτίζεται με τη φάση τροφοδοσίας.

Στην κατά μέτωπο διήθηση, όλο το διάλυμα τροφοδοσίας πιέζεται από μια πίεση που εφαρμόζεται. Τα εναπομείναντα σωματίδια συλλέγονται πάνω ή στη μεμβράνη. Η κατεύθυνση της ροής τροφοδοσίας είναι κάθετη στην επιφάνεια της μεμβράνης διήθησης. Η κατεύθυνση του διηθήματος το οποίο περνά την μεμβράνη είναι ίδια με αυτή της ροής τροφοδοσίας. Τα εναπομείναντα σωματίδια στο διάλυμα τροφοδοσίας θα μείνουν προσκολλημένα στην επιφάνεια της μεμβράνης, η οποία προκαλεί την συχνή αλλαγή του φυσιγγίου φίλτρου και τη μείωση του χρόνου ζωής του.

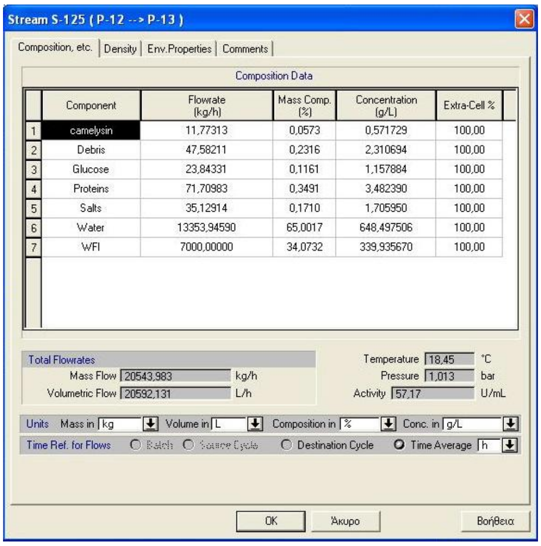
Κατά τη διάρκεια καθαρισμού της μεμβράνης, τα συστατικά απομακρύνονται υδραυλικά, χημικά ή φυσικά.

Όταν εκτελείται η διαδικασία καθαρισμού, μία μονάδα είναι προσωρινά εκτός λειτουργίας, σαν αποτέλεσμα η κατά μέτωπο διήθηση είναι μια ασυνεχή διεργασία.

Όταν μια μεμβράνη καθαρίζεται με διήθημα, δεν έχει μια συνεχή παραγωγή νερού. Αυτό οδηγεί σε μια χαμηλότερη παραγωγή. Ο παράγοντας που δείχνει το ποσό της παραγωγής ονομάζεται ανάκτηση (recovery).

3.7.4.2 Τροφοδοσία

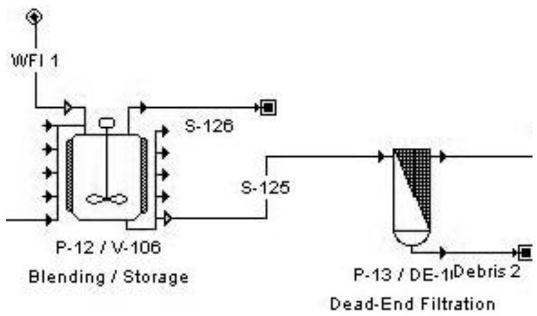
Στην επόμενη εικόνα δίνονται οι παροχές των συστατικών πριν αυτά εισέλθουν στην διεργασίας της κατά μέτωπο διήθησης (dead end filtration), DE-101. Για μια τέτοια ροή μάζας (20543,983 kg/hr), θα χρησιμοποιηθούν 14 μονάδες από dead – end filters συνολικού εμβαδού των φίλτρων $49,5326 m^2$.



	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	camelysin	11,77313	0,0573	0,571729	100,00
2	Debris	47,58211	0,2316	2,310694	100,00
3	Glucose	23,84331	0,1161	1,157884	100,00
4	Proteins	71,70983	0,3491	3,482390	100,00
5	Salts	35,12914	0,1710	1,705950	100,00
6	Water	13353,94590	65,0017	648,497506	100,00
7	WFI	7000,00000	34,0732	339,935670	100,00

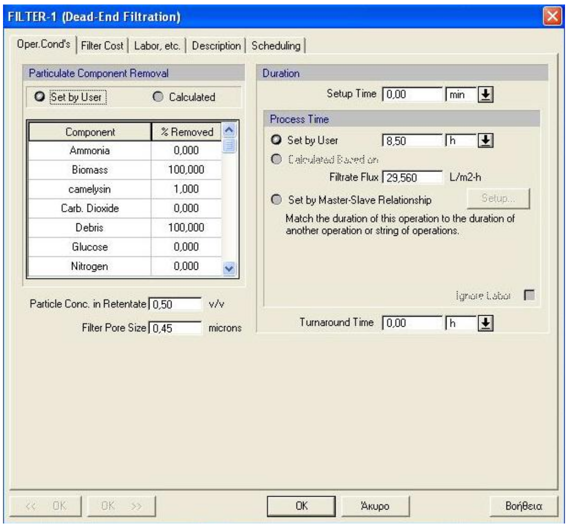
Εικόνα 3.39: Παροχές συστατικών στο ρεύμα τροφοδοσίας S-125.

Στην δεξαμενή ανάμιξης V-106 (εικόνα 3.40), στην οποία παραμένουν τα συστατικά για μία ώρα μετά την υπερδιήθηση και πριν την κατά μέτωπο διήθηση, γίνεται εισαγωγή WFI-1 (Water for Injection) παροχής 7000 kg/hr. Το νερό για έγχυση είναι νερό που έχει καθαριστεί με απόσταξη (distillation) ή αντίστροφη όσμωση (reverse osmosis). Το νερό αυτό συνήθως αποθηκεύεται και διατηρείται ζεστό στους $80^{o}C$ προκειμένου να καλύψει τις μικροβιακές ποιοτικές απαιτήσεις. Τέλος οι χημικές απαιτήσεις καθαρότητας του WFI είναι οι ίδιες με αυτές του καθαρού νερού (purified water- PW).



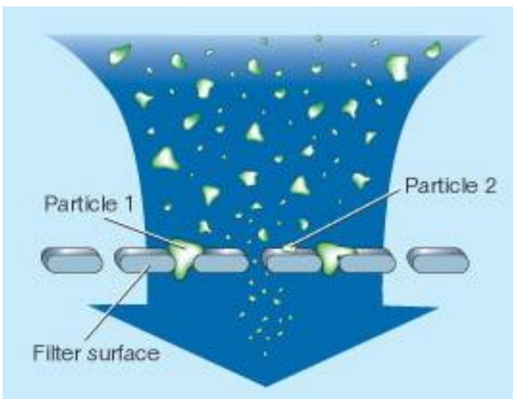
Εικόνα 3.40: Εισαγωγή WFI στην δεξαμενή ανάμιξης V-106.

3.7.4.3 Συνθήκες λειτουργίας



Εικόνα 3.41: Συνθήκες λειτουργίας της κατά μέτωπο διήθησης DE-101.

Στην κατά μέτωπο διήθηση (dead-end filtration), η ροή του υγρού είναι κάθετη στην επιφάνεια του φίλτρου και το φίλτρο φράζεται γρήγορα με σωματίδια. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.42, τα σωματίδια μπορούν να κατακρατηθούν με το κοσκίνισμα όταν είναι μεγαλύτερα από το μέγεθος πόρων του φίλτρου (particle 1), ή με hydrosol διήθηση όταν είναι μικρότερα από το μέγεθος των πόρων (particle 2). Σε αυτή την περίπτωση τα μικρότερα σωματίδια κολλούν στα στοιχεία του φίλτρου.

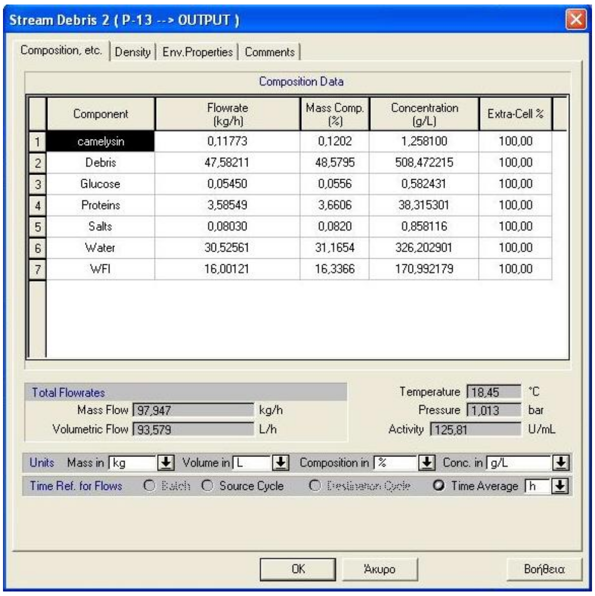


Εικόνα 3.42: Περιγραφή της κατά μέτωπο διήθησης.
Πηγή: http//www.nature.com/.../n6845/images/412387ab.2.jpg.

Οι υλικές ισορροπίες βασίζονται στην απομάκρυνση του ποσοστού των σωματιδιακών συστατικών και της ξηρότητας της κρούστας. Η ξηρότητα της κρούστας (Particle Conc. in Retentate) εκφράζεται ως v/v και καθορίζει την ποσότητα των διαλυτών και των διαλυτών συστατικών τα οποία παραμένουν στο υπόλειμμα (retentate). Η σωματιδιακή συγκέντρωση στο υπόλειμμα (Particle Conc. in Retentate), είναι 0.5 v/v. Το ποσοστό αφαίρεσης των συστατικών έχει καθοριστεί στο 100% για τα θραύσματα (debris) και στο 5% για τις πρωτεΐνες. Το ποσοστό αφαίρεσης επίσης μπορεί να καθοριστεί από το μέγεθος των πόρων του φίλτρου (0.45 microns εξ ορισμού). Το ποσοστό απομάκρυνσης των σωματιδιακών συστατικών καθορίζει την ποσότητα εκείνων των συστατικών τα οποία κατακρατούνται από το φίλτρο.

Ο χρόνος διεργασίας της συγκεκριμένης μονάδας είναι 8,5 ώρες και η ροή φίλτρου είναι $29.56 \, {}^{L}\!/_{m^2 hr}$. Βασικό πλεονέκτημα της διεργασίας είναι ο υψηλός βαθμός συλλογής (σχεδόν 100%), το χαμηλό κόστος, ενώ λείανση και χημικός καθαρισμός δεν απαιτούνται.

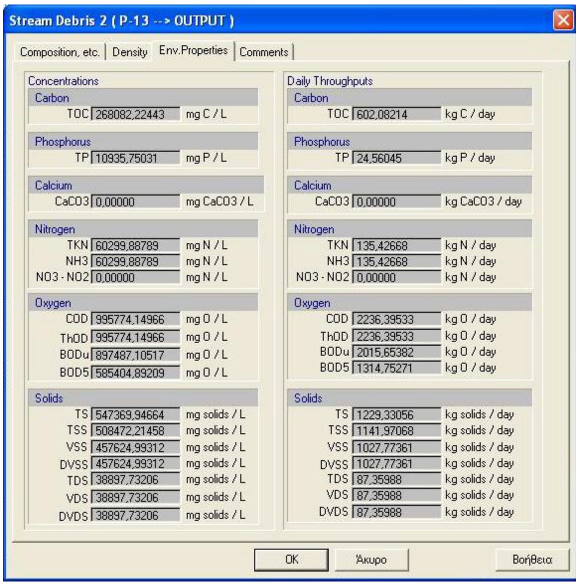
3.7.4.4 Εκροές αποβλήτων από την κατά μέτωπο διήθηση DE-101



	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	camelysin	0,11773	0,1202	1,258100	100,00
2	Debris	47,58211	48,5795	508,472215	100,00
3	Glucose	0,05450	0,0556	0,582431	100,00
4	Proteins	3,58549	3,6606	38,315301	100,00
5	Salts	0,08030	0,0820	0,858116	100,00
6	Water	30,52561	31,1654	326,202901	100,00
7	WFI	16,00121	16,3366	170,992179	100,00

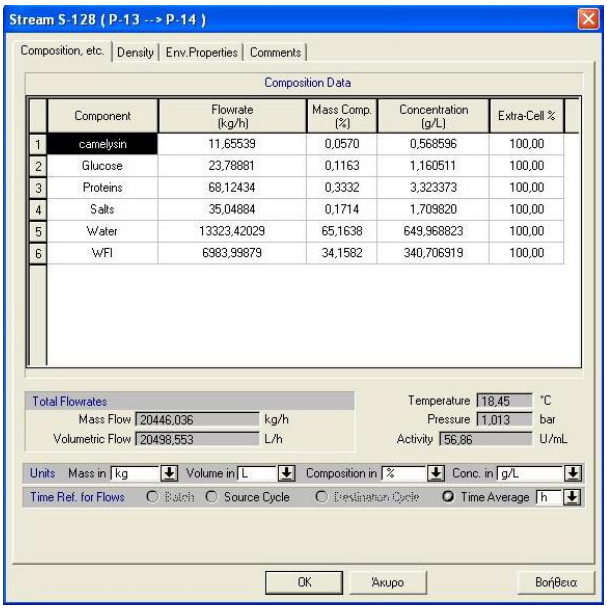
Εικόνα 3.43: Εκροές αποβλήτων στο ρεύμα Debris 2.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.43 παρατηρείται μια μεγάλη ποσότητα απομάκρυνσης θραυσμάτων (debris). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στις περιβαλλοντικές ιδιότητες του ρεύματος αυτού (εικόνα 3.44) με επίσης μεγάλη ποσότητα απομάκρυνσης ολικών αιωρούμενων στερεών (TSS) 1141,97068 kg στερεών ανά ημέρα.



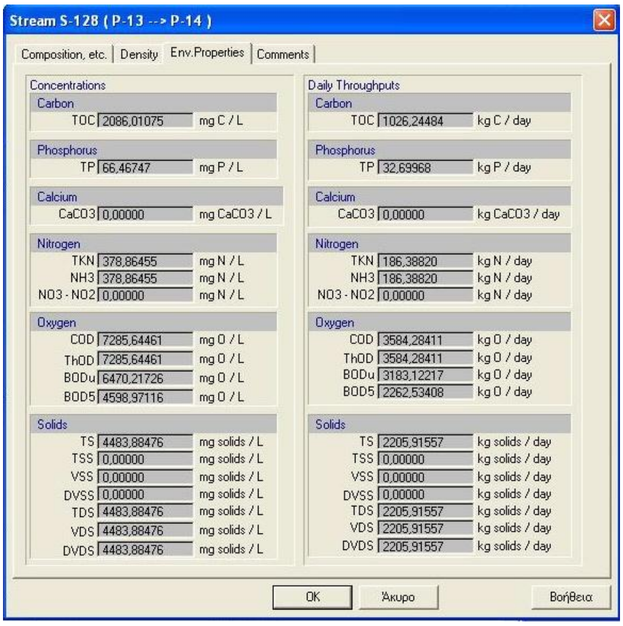
Εικόνα 3.44: Εκροές ολικών αιωρούμενων στερεών στο ρεύμα αποβλήτων.

3.7.4.5 Εκροές συστατικών από την κατά μέτωπο διήθηση DE-101



Εικόνα 3.45: Παροχές συστατικών μετά την κατά μέτωπο διήθηση (S-128).

Στον ρεύμα του διηθήματος S-128, είναι εμφανές ότι έχει εξέλθει το 100% των θραυσμάτων (Debris), ενώ είναι αξιοπρόσεκτη μια μικρή μείωση στην δραστικότητα της καμελυσίνης λόγω μείωσης της ποσότητας της κατά 1%. Με 100% απομάκρυνση των θραυσμάτων, όλα τα ολικά αιωρούμενα στερεά που έχουν απομείνει απομακρύνονται από το ρεύμα του υπολείμματος. Άρα στο επόμενο τομέα του καθαρισμού δεν αναμένεται συγκέντρωση αιωρούμενων στερεών. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.46, η εκροή ολικών αιωρούμενων στερεών προς το τρίτο στάδιο, αυτό του καθαρισμού είναι μηδενική.



Εικόνα 3.46: Εκροές ολικών αιωρούμενων στερεών στο ρεύμα αποβλήτων, διηθήματος S-128.

3.8 Τομέας καθαρισμού (Purification section)

Στον τομέα αυτό το δείγμα αρχικά καθαρίζεται σε στήλη χρωματογραφίας ιοναντaλλαγής (P-15/C-101) και η δραστηριότητα της καμελυσίνης αυξάνεται ραγδαία φτάνοντας κατά την έξοδο της διεργασίας τις 2667,94 U/ml. Στη συνέχεια το δείγμα συγκεντρώνεται από μια υπερδιήθηση (P-17/UF-102), και στιλβώνεται από μια χρωματογραφία gel (P-18/C-102), στην οποία διαχωρίζονται οι ενώσεις με μεγάλο μοριακό βάρος μέσω μιας στήλης που περιέχει σαν υλικό πλήρωσης *gel* ρητίνης. Πριν το τελικό στάδιο του τομέα καθαρισμού, μια διεργασία διαδιήθησης (P-19/DF-101) μειώνει σε μεγάλο βαθμό τη συγκέντρωση των αλάτων του διαλύματος. Το τελικό στάδιο του τομέα αυτού περιλαμβάνει την κρυοξήρανση ή λυοφιλίωση (P-20/FDR-01) όπου το πρωτεϊνικό διάλυμα κρυοξηραίνεται.

3.8.1 Χρωματογραφία ιοναντaλλαγής (PBA Chromatography), P-15/C-101

3.8.1.1 Γενικά η χρωματογραφία

Η χρωματογραφία εκφράζει μια ποικιλία από διεργασίες, που όλες στηρίζονται στις διαφορετικές κατανομές των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ δύο φάσεων. Η μία φάση παραμένει σταθερή στο σύστημα και λέγεται ακίνητη ή στατική φάση (stationary phase), ενώ η άλλη λέγεται κινητή φάση (mobile phase) και διέρχεται μέσα ή πάνω από την επιφάνεια της σταθερής φάσης. Η κινητή φάση προκαλεί μετατόπιση των συστατικών του μείγματος σε διαφορετικές θέσεις μέσα στη χρωματογραφική στήλη, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους. Στη χρωματογραφία η κινητή φάση κινείται συνεχώς και η αποκατάσταση της ισορροπίας σε κάθε σημείο της στήλης, αν και ποτέ πλήρης, είναι ταχεία.

Υπάρχουν πολλοί τρόποι ταξινόμησης των χρωματογραφικών τεχνικών. Οι σπουδαιότεροι στηρίζονται στη φύση των χρησιμοποιούμενων φάσεων (κινητήςακίνητης), λ.χ. αερίου-υγρού (GLC), αερίου-στερεού (GSC), υγρού-υγρού (LLC), και υγρού-στερεού (LSC). Ένα άλλο κριτήριο για την ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών είναι ο μηχανισμός κατανομής των φάσεων.

3.8.1.2 Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (Ion exchange chromatography)

Η μέθοδος αυτή ανήκει στη χρωματογραφία υγρού-στερεού και όπως λέει και ο τίτλος εφαρμόζεται κυρίως σε ιονισμένα σωματίδια, στα οποία δεν μπορεί να εφαρμοστεί κανένα άλλο είδος χρωματογραφίας. Σαν υλικό πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών, χρησιμοποιούνται συνθετικές ρητίνες (που έχουν ιονανταλλακτικές ιδιότητες).

Οι ρητίνες αποτελούνται από τεράστιες δικτυωτές πολυμερείς αλυσίδες, διασταυρωμένες με μικρές αλυσίδες που περιέχουν φορτισμένες δραστικές ομάδες. Συνεπώς υπάρχει μια αδιάλυτη φάση με μόνιμες φορτισμένες θέσεις του ίδιου φορτίου, ενώ τα αντίθετα φορτισμένα σωματίδια είναι ελεύθερα να κινηθούν μέσα στο διαλύτη και να αντικατασταθούν από άλλα ιόντα του ίδιου φορτίου, με την προϋπόθεση ότι διατηρείται η ηλεκτρική ουδετερότητα. Οι ρητίνες αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μια συνεχή πορεία για μια ολικά ανταλλαγή των ιόντων με εκείνα του διαλύματος ή σαν υλικό πλήρωσης στηλών σε ένα χρωματογραφικό διαχωρισμό. Οι ρητίνες έχουν μεγάλη ευαισθησία στο διαχωρισμό ιονισμένων ενώσεων με παραπλήσια χημική συμπεριφορά.

Οι βασικές ιδιότητες που προσδιορίζουν τη συμπεριφορά μιας ρητίνης είναι:

1. Το μέγεθος των σωματιδίων-ταχύτητα ανταλλαγής και διαπερατότητας της γεμισμένης στήλης.
2. Ο βαθμός των διασταυρώσεων-ευκαμψία, πορώδες, διόγκωση.
3. Η φύση των δραστικών ομάδων-είδος ιονανταλλαγής.
4. Η ισχύς των δραστικών ομάδων-συντελεστής κατανομής.
5. Ο αριθμός των δραστικών ομάδων-χωρητικότητα ρητίνης.

3.8.1.3 Θεωρητικές Αρχές

3.8.1.3.1 Ισορροπία ιονανταλλαγής

Μια αντίδραση ιονανταλλαγής μπορεί να θεωρηθεί σα μια αντικατάσταση ισοδύναμων ποσοτήτων από ιόντα του αυτού φορτίου:

$$HR + Na^{+} \rightleftarrows NaR + H^{+}$$

$$2HR + Ca^{+} \rightleftarrows CaR_2 + 2H^{+}$$

$$RCl + OH^{-} \rightleftarrows ROH + Cl^{-}$$

Όπου τα R^{+} και R^{-} αντιπροσωπεύουν την κατιονική και ανιονική μορφή της ρητίνης αντίστοιχα.

3.8.1.3.2 Επίδραση του pH του συστατικού έκλουσης

Η έκταση της διάστασης των ασθενών οξέων και βάσεων και η υδρόλυση των αλάτων και των μεταλλικών ιόντων ελέγχονται από το pH του διαλυτικού μέσου. Συνεπώς, το ηλεκτρικό φορτίο των χημικών ειδών μπορεί να αυξάνεται, να ελαττώνεται ή ακόμη και να αντιστρέφεται με τη μεταβολή του pH. Με τον τρόπο αυτό διαθέτουμε ένα ευαίσθητο και ισχυρό μέσο για να επηρεάσουμε την κατανομή και να εμποδίσουμε την ολοκληρωτική ανταλλαγή.

Η συμπεριφορά αυτή είναι σπουδαία στο διαχωρισμό αμινοξέων, τα οποία φέρουν ένα θετικό ή αρνητικό ή ουδέτερο φορτίο, που εξαρτάται από το pH του συστατικού έκλουσης. Για τους διαχωρισμούς αυτού του είδους χρησιμοποιούνται σα συστατικά έκλουσης ρυθμιστικά διαλύματα, αλλά σε αυτή την περίπτωση τα ιοντικά σωματίδια του ρυθμιστικού διαλύματος μπορούν να ανταλλαγούν με τη ρητίνη, με αποτέλεσμα το pH μέσα στη στήλη να διαφέρει από εκείνο που παρασκευάσαμε.

3.8.1.4 Τεχνική της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής

3.8.1.4.1 Εκλογή και παρασκευή της ρητίνης

Στο εμπόριο υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία ρητινών, από τις οποίες κάποιος πρέπει να επιλέξει την κατάλληλη ποιότητα, το κατάλληλο μέγεθος των σωματιδίων και τους διασταυρούμενους δεσμούς. Από όλες αυτές τις ρητίνες προτιμώνται οι ρητίνες αναλυτικής ποιότητας (analytical-grade, AG), γιατί έχουν σωματίδια με ομοιόμορφο μέγεθος και οι ξένες ανόργανες και οργανικές ουσίες απομακρύνονται εύκολα με ένα καλό πλύσιμο.

3.8.1.4.2 Πλήρωση της στήλης

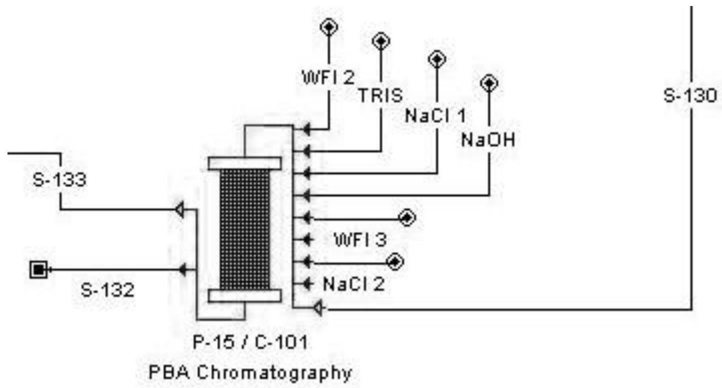
Οι απλές στήλες κατασκευάζονται από γυάλινους σωλήνες με ένα ρεζερβουάρ στην κορυφή για το συστατικό έκλουσης και με ένα πορώδη δίσκο ή ένα κομμάτι υαλοβάμβακα στον πυθμένα για να συγκρατούν τη ρητίνη. Συνήθως ο πυθμένας της στήλης σχεδιάζεται με στενότερη διάμετρο και κάμπτεται έτσι ώστε η στήλη να έχει σχήμα διπλού U και το άκρο της να βρίσκεται υψηλότερα από την κορυφή της ρητίνης. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται φυσαλίδες του αέρα μέσα στη στήλη.

Η ρητίνη προστίθεται στη στήλη σαν πολτός και δονείται συχνά. Από τη στιγμή αυτή, η επιφάνεια του υγρού δεν πρέπει να κατέρχεται ποτέ κάτω από την επιφάνεια της ρητίνης. Ένας δίσκος από διηθητικό χαρτί τοποθετείται επάνω από την επιφάνεια της ρητίνης για να αποφεύγονται οι διαταραχές της κατά την προσθήκη του δείγματος.

3.8.1.4.3 Ολική χωρητικότητα της στήλης

Η ολική χωρητικότητα ανταλλαγής επηρεάζει το μέγιστο μέγεθος του δείγματος και χρησιμοποιείται για να ελέγχει τη σταθερότητα της ρητίνης. Η χωρητικότητα προσδιορίζεται από την ολοκληρωτική μετατροπή της ρητίνης στη μορφή της με υδρογόνο (αν η ρητίνη είναι κατιονική) και ακολούθως εκλούεται με ένα διάλυμα χλωριούχου νατρίου, μέχρις ότου μετατραπεί ολοκληρωτικά στη μορφή της με νάτριο. Το υγρό έκλουσης πρέπει να περιέχει υδροχλωρικό οξύ σε μια ποσότητα ισοδύναμη με τη χωρητικότητα της στήλης. Οι συνηθισμένες ρητίνες έχουν χωρητικότητα 1 έως 5 *meq/ml*.

3.8.1.5 Χρωματογραφία ιονανταλλαγής, P-15/C-101



Εικόνα 3.47: PBA Chromatography, P-15/C-101.

Προπαρασκευαστικής ιονανταλλαγή χρωματογραφία στήλης (PBA Chromatography, C-101) χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό καμελυσίνης (camelysin purification). Οι πρωτεΐνες, όπως και η καμελυσίνη, έχουν πολυάριθμες λειτουργικές ομάδες που έχουν θετικές και αρνητικές φορτίσεις.

Η επιφάνεια της στατικής φάσης εμφανίζει λειτουργικές ιοντικές ομάδες (R-X) οι οποίες αντιδρούν με ιόντα αναλυτών αντίθετης φόρτισης. Η ιοντική ένωση που αποτελείται από τα κατιονικά είδη M^+ και τα ανιονικά είδη M^- μπορεί να συγκρατηθεί στη στατική φάση.

Η κατιονανταλλακτική χρωματογραφία συγκρατεί θετικά φορτισμένα κατιόντα διότι η στατική φάση εμφανίζει μια αρνητικά φορτισμένη λειτουργική ομάδα:

$$\text{R-X}^-\text{C}^+ + \text{M}^+\text{B}^- \rightleftarrows \text{R-X}^-\text{M}^+ + \text{C}^+ + \text{B}^-$$

Η ανιονανταλλακτική χρωματογραφία συγκρατεί ανιόντα χρησιμοποιώντας θετικά φορτισμένες λειτουργικές ομάδες:

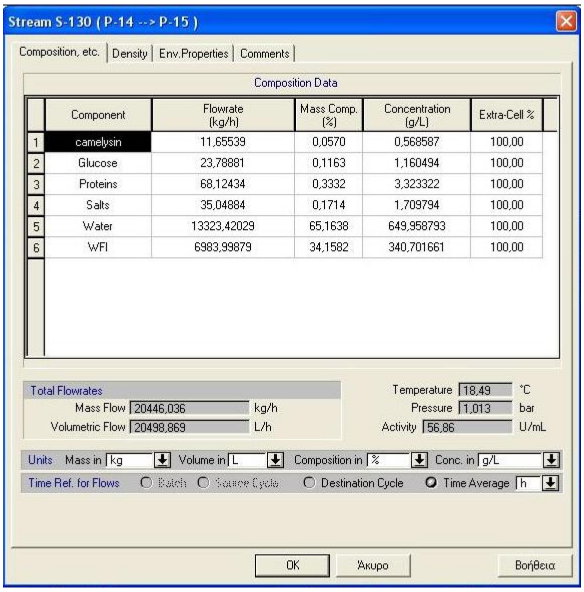
$$\text{R-X}^+\text{A}^- + \text{M}^+\text{B}^- \rightleftarrows \text{R-X}^+\text{B}^- + \text{M}^+ + \text{A}^-$$

Παρατηρούμε ότι η ιοντική ισχύ των C^+ ή A^- στην κινητή μπορεί να ρυθμιστεί ώστε να μετατοπίσει τη θέση ισορροπίας και έτσι το χρόνο παραμονής.

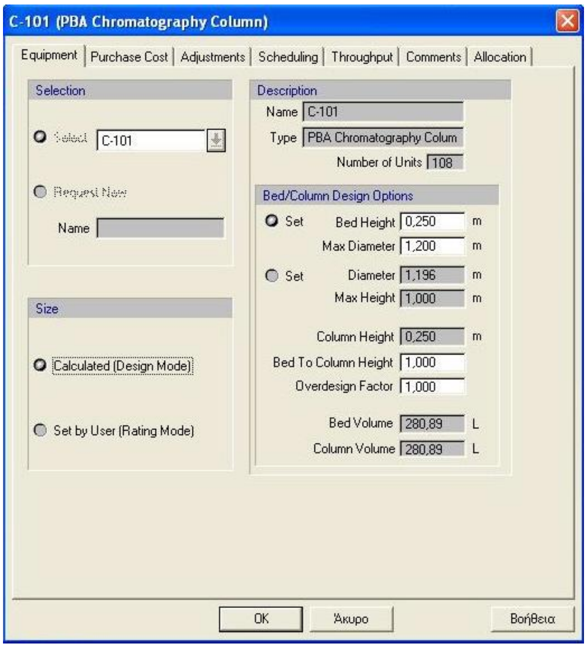
Ρυθμίζοντας το pH ή την ιοντική συγκέντρωση της κινητής φάσης, διάφορα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να διαχωριστούν. Για παράδειγμα αν μια πρωτεΐνη έχει ένα θετικά φορτισμένο τερματικό σε pH 7, τότε αυτό θα δεσμευτεί σε μια στήλη αρνητικά φορτισμένων σταγονιδίων, ενώ η αρνητικά φορτισμένη πρωτεΐνη όχι. Με την αλλαγή του pH έτσι ώστε η τερματική φόρτιση να είναι αρνητική, θα εκλουστεί.

3.8.1.6 Τροφοδοσία

Στο ρεύμα τροφοδοσίας (εικόνα 3.48) ένα σύνολο συστατικών, τα οποία αποτελούν τους αναλυτές εισάγονται στην διεργασίας της χρωματογραφίας ιονανταλλαγής με συνολική ροή μάζας 20446,036 kg/hr. Με μια παροχή τροφοδοσίας της τάξεως αυτής θα χρησιμοποιηθούν 108 συσκευές. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της κάθε συσκευής φαίνονται στην εικόνα 3.49.



Εικόνα 3.48: Παροχές συστατικών στο ρεύμα τροφοδοσίας S-130.



Εικόνα 3.49: Τεχνικά χαρακτηριστικά μονάδας PBA χρωματογραφίας P15/C-101.

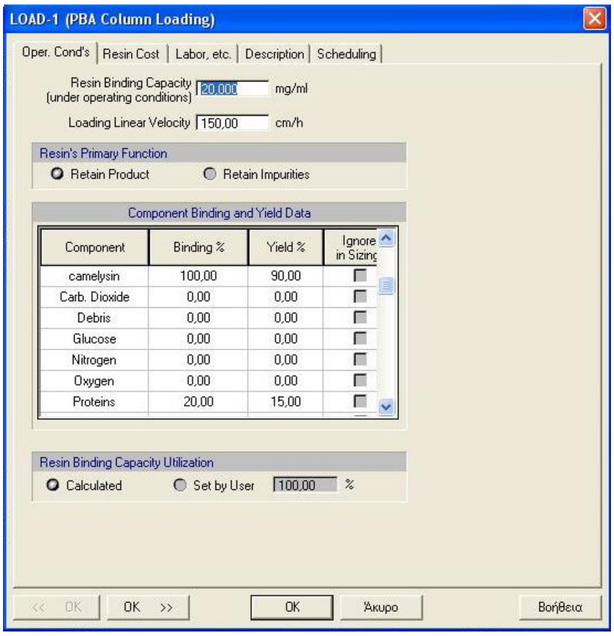
3.8.1.7 Ρυθμίσεις παραμέτρων λειτουργίας

3.8.1.7.1 Φόρτωση προϊόντος (PBA Column Loading)

Το δείγμα, η σύσταση του οποίου αναφέρεται στην τροφοδοσία, εισάγεται είτε με το χέρι είτε με αυτόματο δειγματολήπτη, σε ένα βρόγχο δείγματος γνωστού όγκου. Το ρυθμιστικό υδατικό διάλυμα (τροφοδοσία) γνωστό ως κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα από το βρόγχο επάνω στη στήλη η οποία περιέχει κάποιο τύπο υλικού (ρητίνη) στη στάσιμη φάση. Η διάρκεια της διεργασίας είναι 162,17 min.

Μια στήλη χρησιμοποιείται για να δεσμεύει είτε συστατικά προϊόντων είτε συστατικά. Στην πρώτη περίπτωση (κατακράτηση των συστατικών του προϊόντος), για ένα συστατικό το οποίο δεσμεύεται στη ρητίνη, η ποσότητά του στο ρεύμα εκροής είναι ίση με την ποσότητά του στους χρόνους του ρεύμα τροφοδοσίας, την κλασματική του δέσμευση και την απόδοση έκλουσής του. Όλα τα συστατικά που περιέχει το ρεύμα τροφοδοσίας, τα οποία δεν δεσμεύονται στη ρητίνη, αποβάλλονται στο ρεύμα λυμάτων (S-132). Η δεσμευτική ικανότητα της ρητίνης (rennin binding capacity) ρυθμίζεται στα 20,00 mg/ml. Ενώ από το πρόγραμμα υπολογίζεται πως η χρησιμοποίηση της δεσμευτικής ικανότητας της ρητίνης ανέρχεται σε ποσοστό 100%.

Κύρια λειτουργία της ρητίνης είναι η διατήρηση του προϊόντος. Η δέσμευση της καμελυσίνης και των πρωτεϊνών είναι 100% και 20% αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες αποδόσεις είναι 90% και 15%.



Εικόνα 3.50: Ρυθμίσεις παραμέτρων δέσμευσης συστατικών στη P-15/C-101.

3.8.1.7.2 Πλύση Στήλης (Column Wash)

Το κύριο αντικείμενο αυτής της διεργασίας είναι ο υπολογισμός του χρόνου και του ρυθμιστικού διαλύματος που απαιτείται για την πλύση της στήλης. Η πλύση της στήλης μπορεί να έχει σκοπό την εξισορρόπηση (equilibrating), το ξέπλυμα (rinsing) και την ανανέωση (regenerating). Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για πλύση, εξισορρόπηση (equilibrating) και ανανέωση (regenerating) της στήλης καταλήγουν στο ρεύμα αποβλήτων (S-132).

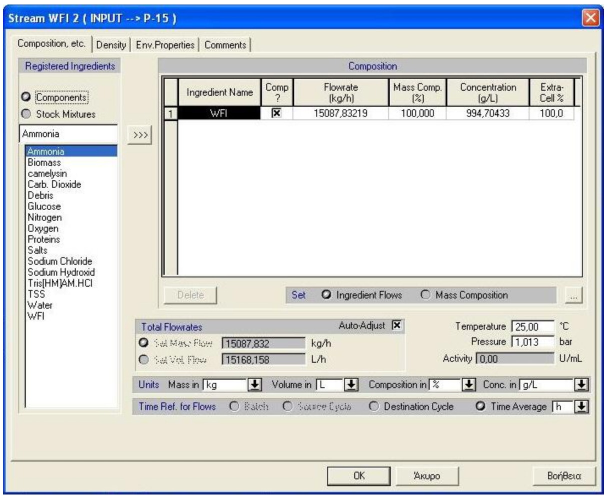
Ο χρόνος της διαδικασίας υπολογίζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

(Χρόνος διαδικασίας) = (Ύψος Κλίνης) x (Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος) / (Γραμμική ταχύτητα)

(3.15)

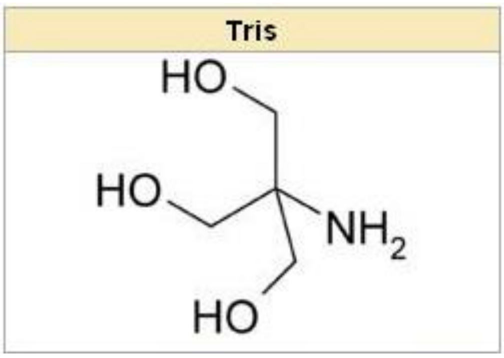
- **Πλύση με WFI (WFI Rinse)**

Στο ρεύμα αυτό εισάγεται WFI παροχής 15087,83219 kg/hr για πλύση της στήλης και η διάρκεια της διεργασίας είναι 60min.



Εικόνα 3.51: WFI Rinse, ρεύμα WFI 2.

- **Πλύση με ρυθμιστικό διάλυμα Tris (Tris Wash)**



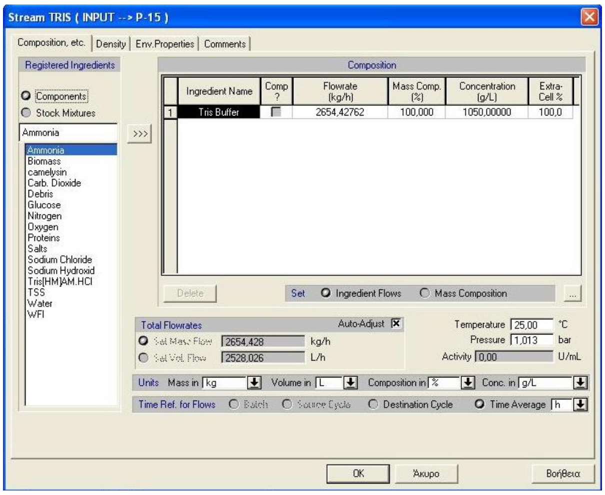
Εικόνα 3.52: Δομή του Tris buffer.
Πηγή: http://en.wikipedia.org/wiki/Tris.

Το “Tris” είναι μια χημική ένωση που χρησιμοποιείται σαν ρυθμιστικό διάλυμα. Το πλήρες όνομα είναι tris(hydroxymethyl)aminomethane. Η οξύτητά του είναι pKa=8.06, πράγμα που σημαίνει ότι το ρυθμιστικό διάλυμα έχει μία κλίμακα pH από 7,0 έως 9,2. Η διαλυτότητά του στο νερό είναι περίπου 50mg/100ml στους $25\,^{o}C$.

Γενικά έχει αναφερθεί πως το Tris αναστέλλει έναν αριθμό ενζύμων και συνεπώς πρέπει να χρησιμοποιείται με προσοχή όταν μελετάμε πρωτεΐνες όπως εδώ. Η κλίμακα του pH του ρυθμιστικού αυτού διαλύματος συμπίπτει με το τυπικό φυσιολογικό pH των περισσότερων ζωντανών οργανισμών. Το γεγονός αυτό, αλλά και το χαμηλό του κόστος το κάνει να θεωρείται ένα από τα πιο κοινά ρυθμιστικά διαλύματα στα βιολογικά και βιοχημικά εργαστήρια.

Το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα έχει την ικανότητα να απορροφά αντίθετα ιόντα (+H και -OH) έτσι ώστε να διατηρεί το pH του διαλύματος που βρίσκονται σταθερά στο 7. Όταν το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ρυθμίζεται χρησιμοποιώντας HCl (υδροχλωρικό οξύ) το ρυθμιστικό διάλυμα ονομάζεται Tris HCl.

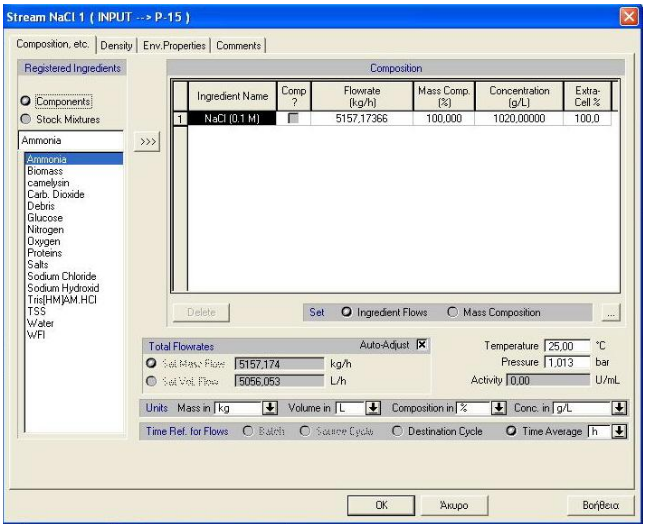
Στο ρεύμα αυτό εισάγεται ρυθμιστικό διάλυμα Tris. Η σύσταση του tris buffer είναι 7,65% (Tris[HM]AM. HCl) και 92,35% WFI (water for injection). Η παροχή του είναι 2654,42762 kg/hr και συμβαίνει μόλις για 15min για λόγους αποφυγής ανασταλτικής συμπεριφοράς των πρωτεϊνών.



Εικόνα 3.53: Ρεύμα τροφοδοσίας Tris (Tris Wash).

- **Εκλεπισμός με NaCl (NaCl Strip)**

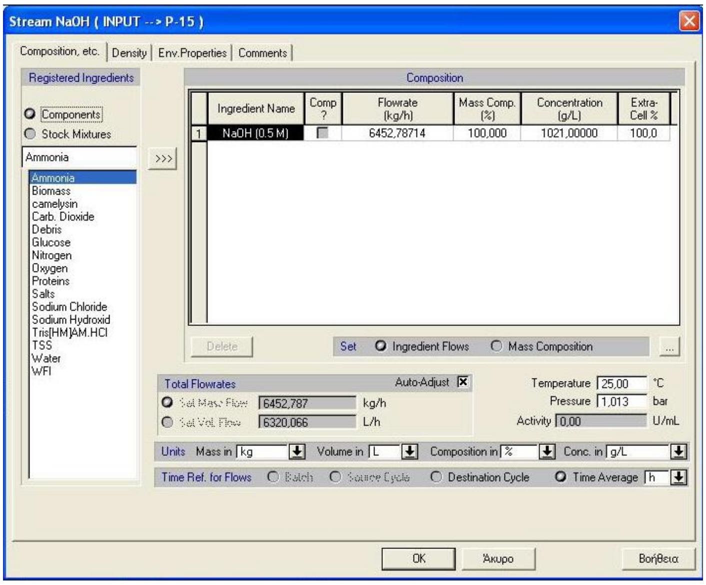
Στο ρεύμα αυτό εισάγεται χλωριούχο νάτριο συγκέντρωσης 0,1M. Η σύστασή του με βάση τη μάζα είναι 0,5845% χλωριούχο νάτριο (sodium chloride) και 99,4155% νερό. Η παροχή του είναι 5157,17366 kg/hr και λαμβάνει χώρα για 30min.



Εικόνα 3.54: Ρεύμα τροφοδοσίας NaCl (0.1M).

- **Ανανέωση με NaOH (NaOH Regeneration)**

Στο ρεύμα αυτό εισάγεται υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) συγκέντρωσης 0.5M. Η σύστασή του με βάση τη μάζα είναι 1,96% υδροξείδιο του νατρίου (sodium hydroxide) και 98,04% νερό. Η παροχή του είναι 6452,78718 kg/hr και λαμβάνει χώρα για 37,5min.



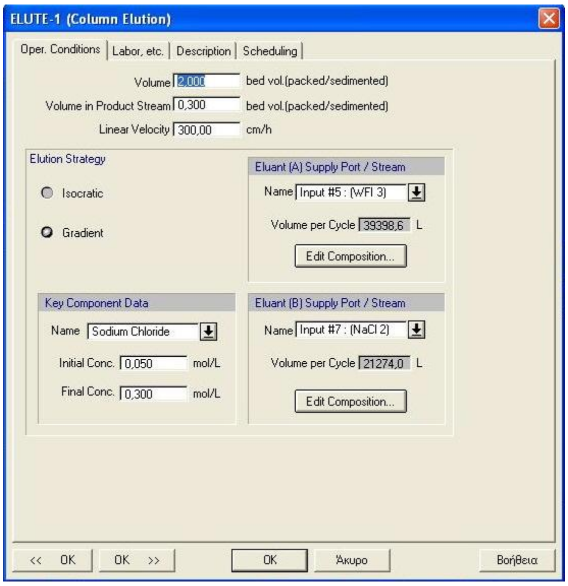
Εικόνα 3.55: Ρεύμα τροφοδοσίας NaOH (0.5M).

3.8.1.7.3 Έκλουση προϊόντος (Product Elution)

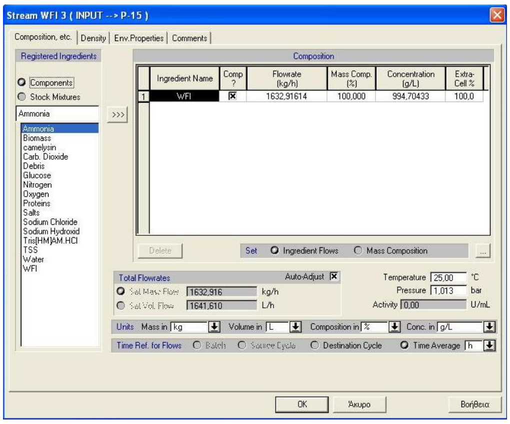
Το υλικό που προκύπτει από τη στήλη είναι γνωστό ως έκλουσμα ή κινητή φάση. Η έκλουση είναι το συστατικό που μεταφέρει τα χημικά μέσα από τη στήλη. Στην προκειμένη περίπτωση αυτό που τα μεταφέρει είναι το υγρό διάλυμα. Ο χρόνος έκλουσης ενός διαλύματος είναι ο χρόνος μεταξύ της αρχής του διαχωρισμού (τη στιγμή που το διάλυμα μπαίνει στη στήλη) και της στιγμής που το διάλυμα εκλούεται.

Η έκλουση κατά την οποία γίνεται αλλαγή της ιοντικής ισχύς της κινητής φάσης είναι μια λεπτή επίδραση και λειτουργεί καθώς τα ιόντα από την κινητή φάση θα αντιδράσουν με τα ακινητοποιημένα ιόντα κατά προτίμηση σε σχέση με αυτά της στατικής φάσης. Αυτό προασπίζει τη στατική φάση από την πρωτεΐνη (και αντίστροφα) και επιτρέπει την έκλουση της πρωτεΐνης. Το δείγμα δεν εκλούεται ισοκρατικά αλλά εφαρμόζεται στρατηγική κλίσης, οπότε κρίνεται απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν παραπάνω από ένα ρυθμιστικά διαλύματα.

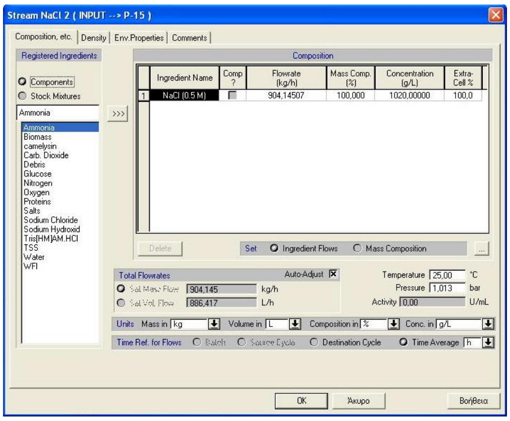
Το συστατικό κλειδί είναι το χλωριούχο νάτριο με αρχική συγκέντρωση 0,05mol/L και τελική συγκέντρωση 0,3mol/L. Το πρώτο έκλουσμα είναι το WFI 3 με παροχή WFI= 1632,91614kg/hr (εικόνα 3.57) και το δεύτερο το χλωριούχο νάτριο συγκέντρωσης 0,5M, με παροχή NaCl =904,14507 kg/hr (εικόνα 3.58).



Εικόνα 3.56: Ρυθμίσεις παραμέτρων έκλουσης.



Εικόνα 3.57: Ρεύμα τροφοδοσίας WFI 3

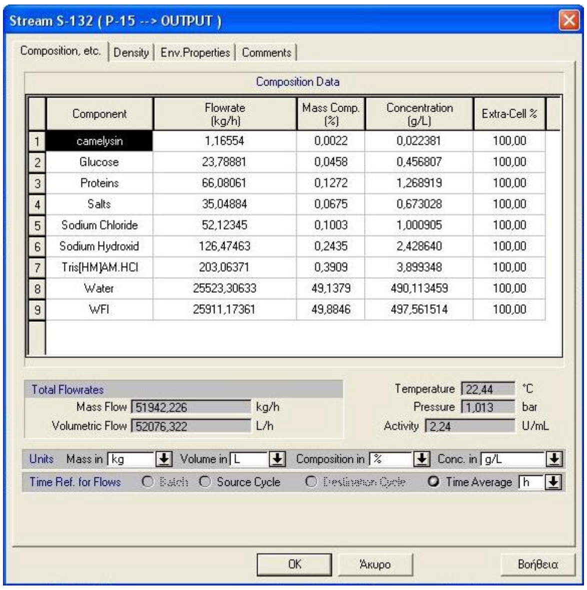


Εικόνα 3.58 : Ρεύμα τροφοδοσίας NaCl 2.

3.8.1.8 Εκροές αποβλήτων και συστατικών από την χρωματογραφία ιονανταλλαγής

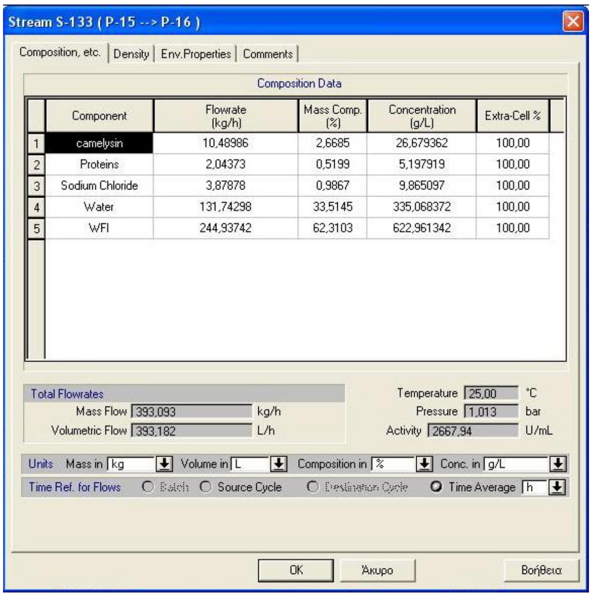
Το διάλυμα που εγχέεται (διάλυμα ρεύματος S-130), αποτελεί το δείγμα και τα διαχωριζόμενα συστατικά αποτελούν τους αναλυτές. Όλα τα συστατικά που υπάρχουν στο ρεύμα τροφοδοσίας και δεν δεσμεύονται από τη ρητίνη, αποβάλλονται στο ρεύμα αποβλήτων S-132 (εικόνα 3.59).

Επίσης όλα τα υλικά στα ρεύματα πλύσης(wash), ανανέωσης (regeneration) και εξισορρόπησης (equilibration) καταλήγουν στο ρεύμα S-132 ρεύμα αποβλήτων.



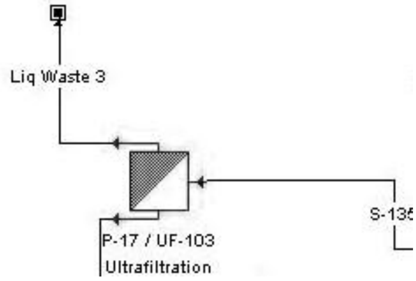
Εικόνα 3.59: Εκροές αποβλήτων στο ρεύμα S-132.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται πως η ενζυμική δραστηριότητα της καμελυσίνης αυξήθηκε σε τεράστιο βαθμό μετά την χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Πιο συγκεκριμένα πριν την χρωματογραφία η ενζυμική δραστηριότητα της καμελυσίνης ήταν 56,86 U/ml και αμέσως μετά την χρωματογραφία ιοναλταλλαγής έφτασε τις 2667,94 U/ml. Το αποτέλεσμα είναι εντυπωσιακό και αναμενόμενο μιας και από τη διεργασία αυτή περιμέναμε τον περαιτέρω καθαρισμό της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.60: Εκροές συστατικών από την χρωματογραφία ιονανταλλαγής P-15.

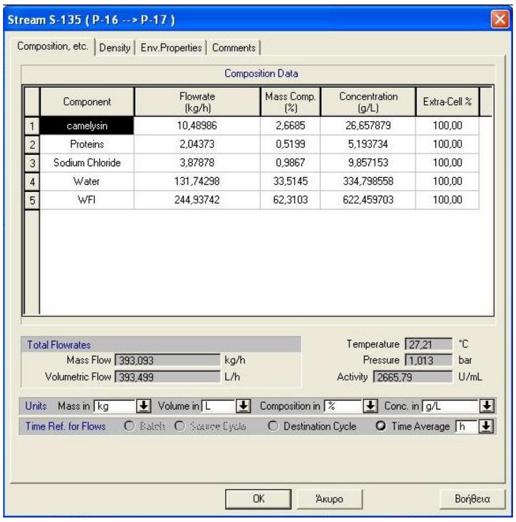
3.8.2 Υπερδιήθηση (ultrafiltration), P-17/UF-103



Εικόνα 3.61: Υπερδιήθηση (P-17/UF-103).

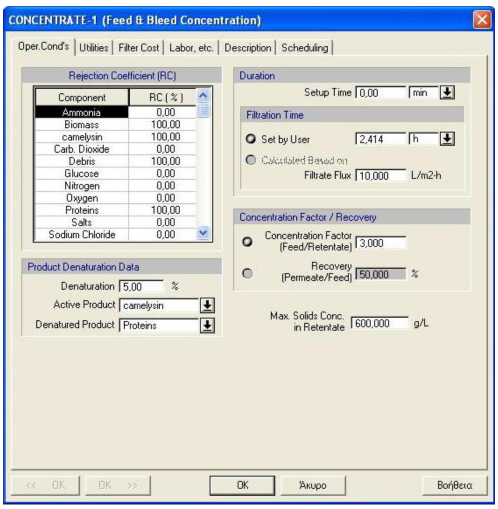
3.8.2.1 Τροφοδοσία

Στην επόμενη εικόνα δίνονται οι παροχές των συστατικών πριν αυτά εισέλθουν στην διεργασίας της υπερδιήθησης UF-103 (ultrafiltration process). Τα συστατικά προέρχονται από την P-16, δεξαμενή ανάμιξης με μία ώρα χρόνο παραμονής.



Εικόνα 3.62: Παροχές συστατικών στο ρεύμα τροφοδοσίας S-135.

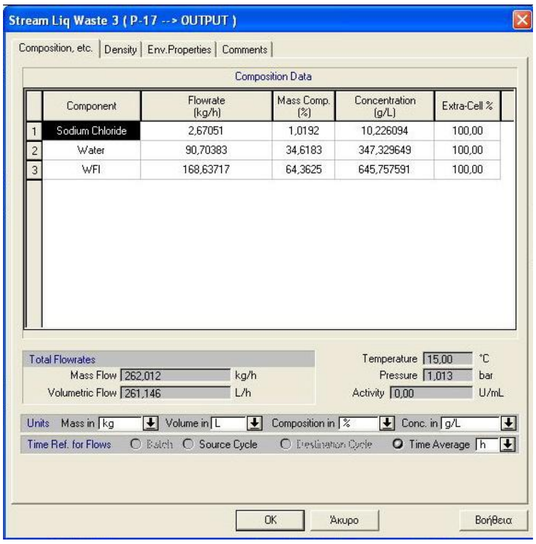
3.8.2.2 Συνθήκες λειτουργίας-Εκροές αποβλήτων-Εκροές συστατικών



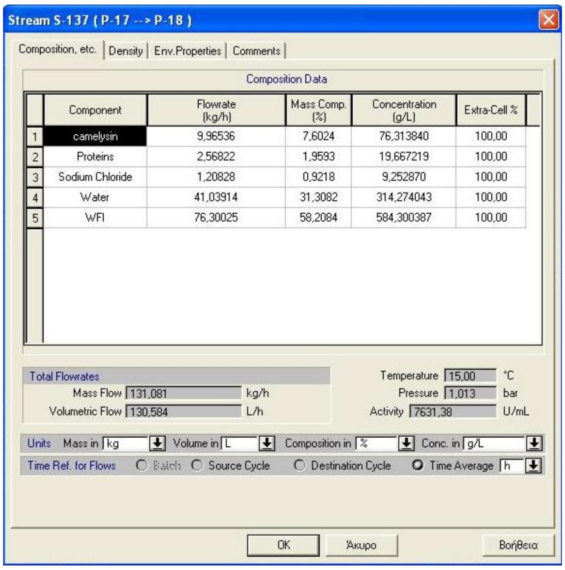
Εικόνα 3.63: Συνθήκες λειτουργίας της υπερδιήθησης P-17/UF-103.

Ο χρόνος λειτουργίας της διήθησης έχει οριστεί στις 2,414 hr. Για τη διεργασία αυτή με βάση την ροή μάζας (mass flow=393,093 kg/hr), θα χρησιμοποιηθεί μία μονάδα υπερδιήθησης συνολικής περιοχής μεμβράνης 26,231 m^2. Ο **συντελεστής απόρριψης**-rejection coefficient (RC), είναι 100% για την καμελυσίνη και τις πρωτεΐνες. πράγμα που σημαίνει πως όλη η ποσότητα της καμελυσίνης που θα περάσει από την θα είναι μειωμένη κατά 5% λόγω του συντελεστή αλλοίωσης.

Το ενεργό προϊόν (active product) στην UF-103 είναι η καμελυσίνη θα έχει μια φυσική αλλοίωση της τάξης του 5%. Ο παράγοντας συγκέντρωσης (concentration factor, feed/retentate) εδώ ορίζεται στο 3. Η ανάκτηση (recovery) του επιθυμητού αποτελέσματος ανάμεσα στην τροφοδοσία και το διήθημα είναι (permeate/feed) 50%. Η δε μέγιστη συγκέντρωση των στερεών στην κατακράτηση να είναι 600g/L και μετά από 2,414 ώρες υπερδιήθησης έχουμε τα εξής αποτελέσματα:



Εικόνα 3.64: Εκροές αποβλήτων από την υπερδιήθηση (Liq Waste 3).

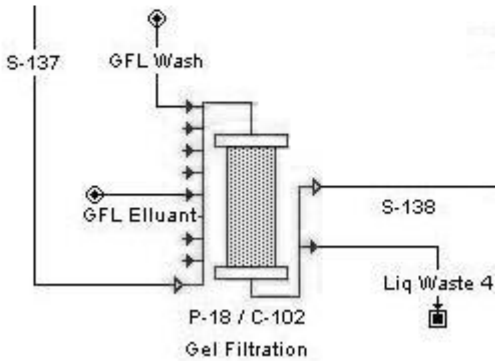


Εικόνα 3.65: Εκροές συστατικών μετά την υπερδιήθηση (S-127).

Το προς διαχωρισμό διάλυμα διαβιβάζεται υπό πίεση διαμέσου της πορώδους μεμβράνης. Η χρησιμοποιούμενη πίεση κυμαίνεται μεταξύ 0.5-5bar (ή 1-10bar). Εδώ η πίεση ρυθμίζεται στο 1.013 bar.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ενζυμική δραστηριότητα. Όπως και μετά την χρωματογραφία ιονανταλλαγής, έτσι και τώρα παρατηρείται μια μεγάλη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Η ενζυμική δραστηριότητα της καμελυσίνης φτάνει τις 7631,38 ενζυμικές μονάδες ανά ml. Όσο θα απορρίπτονται ποσότητες των συστατικών του διαλύματος και καθαρίζεται περισσότερο η καμελυσίνη, τέτοιες δραστηριότητες θα είναι αναμενόμενες.

3.8.3 Χρωματογραφία gel ή Gel Filtration



Εικόνα 3.66: Χρωματογραφία gel P-18/C-102.

Ο διαχωρισμός των ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος γίνεται κυρίως με στήλες που περιέχουν σαν υλικό πλήρωσης διάφορα *gels*. Οι διάφορες ποικιλίες των *gels* διαχωρίζουν τα μόρια με βάση το μέγεθός τους, με τη μέθοδο του κοσκινίσματος (sieving) ή της διήθησης (filtering). Συνεπώς η διήθηση με gel (*gel filtration*) και η χρωματογραφία διάχυσης με *gel*, αναφέρονται στην ίδια τεχνική. Η προσρόφηση και τα ηλεκτρικά φορτία παίζουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο σε αυτούς τους διαχωρισμούς.

Τα *gels* έχουν πολύ ανοιχτά τρισδιάστατα επίπεδα πλέγματα, που σχηματίζονται με διασταυρούμενους συνδυασμούς από μεγάλες πολυμερείς αλυσίδες. Τα περισσότερα από αυτά τα *gels*, αντί για κέντρα ιονανταλλαγής έχουν πολικές ομάδες ικανές να προσροφούν και μη πολικούς διαλύτες. Ανάλογα με την έκταση των διασταυρούμενων δεσμών του gel υπάρχει ένα οριακό μέγεθος (*exclusion limit*) για το μόριο, που μπορεί να εισχωρήσει στο εσωτερικό του *gel*.

Τα μεγαλύτερα μόρια διέρχονται από τη στήλη δίχως να επιβραδύνονται, γιατί δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο *gel*, ενώ τα μικρότερα μόρια εισχωρούν στο *gel* κατά ένα βαθμό που προσδιορίζεται από το μέγεθός τους. Με κατάλληλη εκλογή του gel μπορούμε να διαχωρίσουμε μόρια που έχουν μοριακό βάρος από 1000 μέχρι μερικά εκατομμύρια.

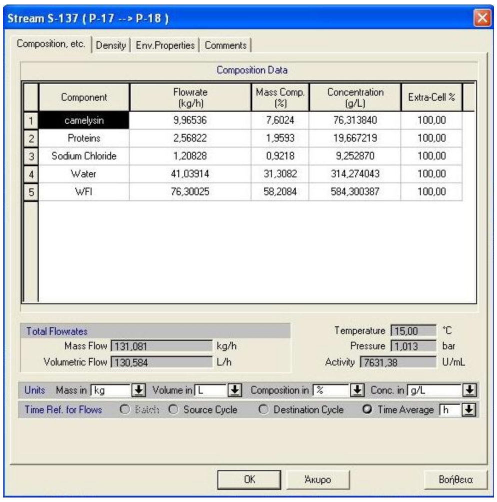
Η χρωματογραφία *gel* είναι ένα άλλο είδος της γενικής χρωματογραφικής μεθόδου, όπου και εδώ εφαρμόζονται οι ίδιες αρχές, αν και ο μηχανισμός του διαχωρισμού, η μεταχείριση του δείγματος και η ανίχνευση των συστατικών διαφέρουν στη λεπτομέρεια. Σε ευρεία κλίμακα η χρωματογραφία gel χρησιμοποιείται κυρίως από τους βιοχημικούς στο διαχωρισμό πρωτεϊνών, πεπτιδίων, νουκλεϊνικών οξέων, πολυσακχαριτών, ενζύμων και ορμονών.

3.8.3.1 Είδη gels

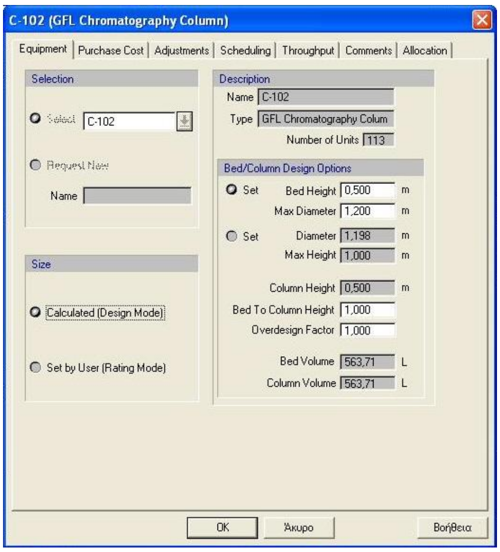
Για τις πρωτεΐνες και τα περισσότερα μεγάλα μόρια βιοχημικού ενδιαφέροντος, το *Sephadex* είναι το πιο συνηθισμένο από τα gels. Το *Sephadex* παρασκευάζεται από τις δεξτράνες των πολυσακχαριτών, που παράγονται με την επίδραση ενός βακτηριδίου στο καλαμοσάκχαρο. Κάθε μόριο γλυκόζης περιέχει τρεις υδροξυλομάδες που δίνουν στη δεξτράνη ένα πολικό χαρακτήρα. Με κατάλληλες συνθήκες μπορούμε να ελέγξουμε των αριθμό των διασταυρούμενων δεσμών και συνεπώς το μέγεθος των πόρων. Τα *Sephadex gels* είναι αδιάλυτα στο νερό και είναι σταθερά στις βάσεις, στα ασθενή οξέα και στα ήπια αναγωγικά και οξειδωτικά μέσα.

3.8.3.2 Τροφοδοσία.

Στο ρεύμα τροφοδοσίας (εικόνα 3.67) ένα σύνολο συστατικών, τα οποία αποτελούν τους αναλυτές εισάγονται στην διεργασίας της χρωματογραφίας gel με συνολική ροή μάζας 131,081kg/hr. Με μια παροχή τροφοδοσίας της τάξεως αυτής θα χρησιμοποιηθούν 113 συσκευές. Τα τεχνικά χαρακτηριστικά της κάθε συσκευής φαίνονται στην εικόνα 3.68.

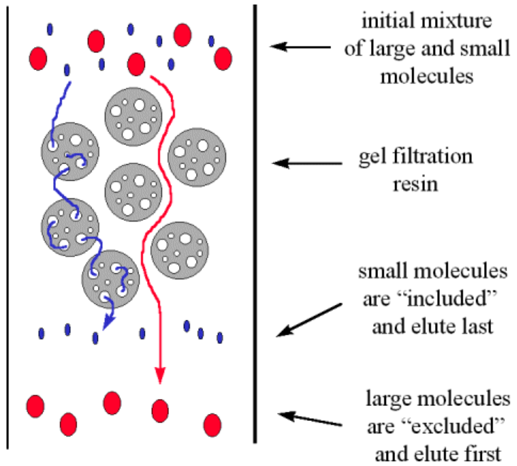


Εικόνα 3.67: Παροχές τροφοδοσίας στο ρεύμα S-137.



Εικόνα 3.68: Τεχνικά χαρακτηριστικά μονάδας Gel Filtration.

3.8.3.3 Φόρτωση προϊόντος (PBA Column Loading)



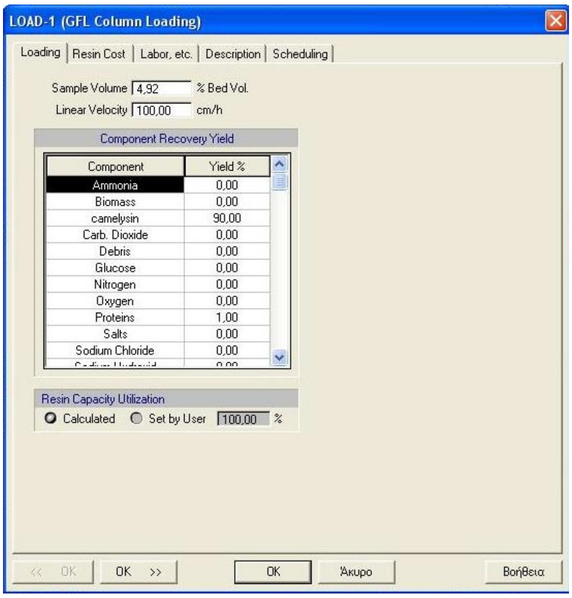
Εικόνα 3.69: Διεργασία χρωματογραφίας gel.

Πηγή:http://slohs.slcusd.org/pages/teachers/rhamley/Biology/Basis%20of%20Life/gel.htm

Το υλικό πλήρωσης (ρητίνη) εισάγεται στη στήλη για να πάρει μια συμπαγή μορφή. Το πορώδες υλικό πλήρωσης έχει σφαιρικά σωματίδια τα οποία επιλέγονται με κατάλληλη χημική και φυσική σταθερότητα και αδράνεια (έλλειψη αντιδραστικότητας και προσροφητικών ιδιοτήτων). Η κλίνη εξισορροπεί με το ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο γεμίζει τους πόρους του υλικού πλήρωσης και τα κενά μεταξύ των σωματιδίων. Το υγρό πλήρωσης στους πόρους αποτελεί τη στατική φάση και εξισορροπείται με το υγρό εξωτερικά των σωματιδίων το οποίο αποτελεί τη κινητή φάση.

Καθώς το ρυθμιστικό διάλυμα ρέει διαμέσου της στήλης το αρχικό δείγμα πρωτεϊνών εισέρχεται δια μέσου της στήλης και αντιδρά με τη ρητίνη (εικόνα 3.69). Ο πραγματικός τύπο διαχωρισμού εξαρτάται από τη φύση της ρητίνης. Στην περίπτωση της χρωματογραφίας gel (C-102), θεωρούμε ότι η καμελυσίνη αντιδρά σε πολύ μικρό βαθμό με τη ρητίνη, ενώ αντίθετα οι λοιπές πρωτεΐνες αντιδρούν σε μεγάλο βαθμό. Με τον τρόπο αυτό απομονώνεται περισσότερο η καμελυσίνη από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Τα μόρια διαχέονται μέσα και έξω από τους πόρους του υλικού πλήρωσης. Τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους του υλικού πλήρωσης είναι ανίκανα να διαχυθούν μέσα στους πόρους, με αποτέλεσμα να περνούν γρηγορότερα διαμέσου της στήλης και να εκλούονται πρώτα. Τα μικρότερα μόρια διαχέονται μέσα στους πόρους του υλικού πλήρωσης και εκλούονται τελευταία. Η διάρκεια της διεργασίας είναι 1,48 hr.

Η απόδοση της ανάκτησης προϊόντος (component recovery yield) στην χρωματογραφία gel, εκτιμάται ότι στην καμελυσίνη φτάνει το 90% και στις πρωτεΐνες το 1% (εικόνα 3.70). Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι στο ρεύμα εκροών μετά το πέρας της χρωματογραφίας gel θα έχει εκλουστεί το 90% της αρχικής ποσότητας (ρεύμα εισόδου) της καμελυσίνης και μόλις το 1% αυτής των πρωτεϊνών (εικόνα 3.70). Γενικά η απόδοση της ανάκτησης (recovery yield) ενός συστατικού χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του κλάσματος του συστατικού το οποίο καταλήγει στο ρεύμα προϊόντος (S-138).

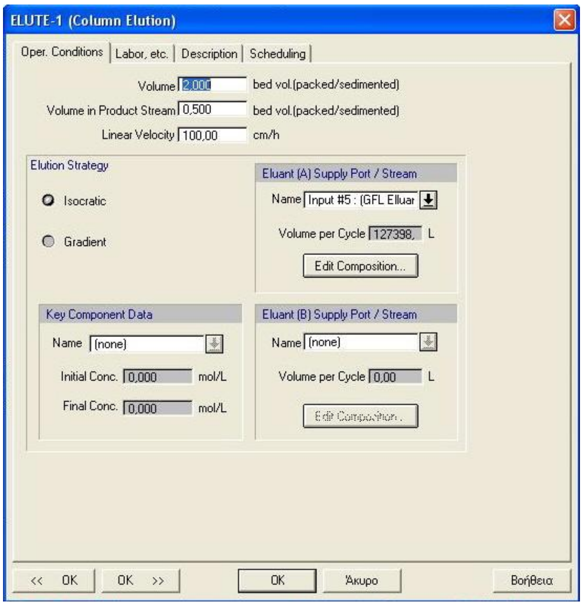


Εικόνα 3.70: Ρυθμίσεις παραμέτρων ποσοστών ανάκτησης συστατικών στη C-102.

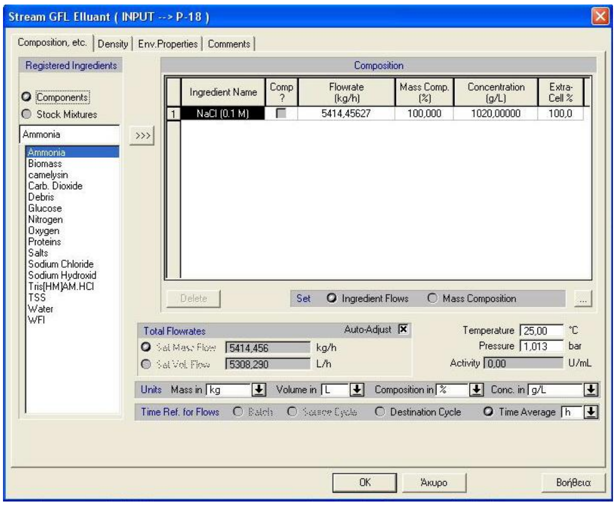
3.8.3.4 Έκλουση προϊόντος (Product Elution)

Η έκλουση γίνεται με σταθερή υδροστατική πίεση (1,013 bar), για να διατηρείται σταθερή η ταχύτητα ροής του φέροντος συστατικού. Στην εικόνα 3.71, στην οποία φαίνονται οι ρυθμίσεις του ρεύματος έκλουσης, σημειώνεται ότι το δείγμα εκλούεται ισοκρατικά (isocratic), δηλαδή δεν είναι απαραίτητο να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα κατά τη διάρκεια του διαχωρισμού. Για σφαιρικές πρωτεΐνες, οι όγκοι έκλουσης εξαρτώνται ευθέως από το μοριακό βάρος.

Σα συστατικό έκλουσης χρησιμοποιείται χλωριούχο νάτριο (NaCl) συγκέντρωσης 0,1M, με παροχή τροφοδοσίας (εικόνα 3.72) 5414,4527 kg/hr.



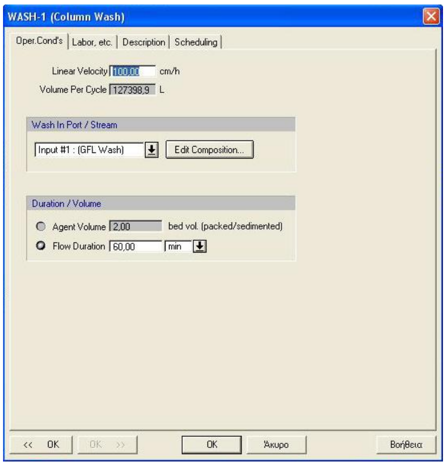
Εικόνα 3.71: Ρυθμίσεις παραμέτρων έκλουσης στήλης.

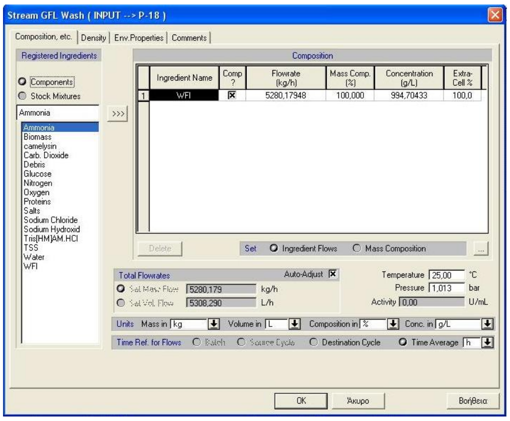


Εικόνα 3.72: Ρεύμα παροχής GFL Elluant.

3.8.3.5 Πλύση στήλης, GFL Wash

Ένα στάδιο πλυσίματος λαμβάνει χώρα στο τέλος του διαχωρισμού με σκοπό να απομακρύνει τα όποια μόρια μπορεί να έχουν παραμείνει στη στήλη και να προετοιμάσει τη στήλη για μια νέα διεργασία. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε WFI για 60min (εικόνα 3.73) με παροχή (εικόνα 3.74) 5280,17948 kg/hr.



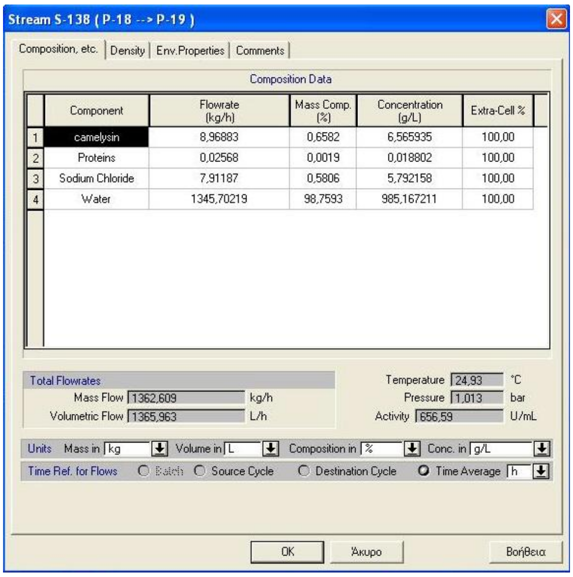


Εικόνα 3.73: Ρυθμίσεις πλυσίματος στήλης, C-102. Εικόνα 3.74: Παροχή WFI στο ρεύμα πλυσίματος.

3.8.3.6 Εκροές αποβλήτων και συστατικών από την χρωματογραφία gel, P-18

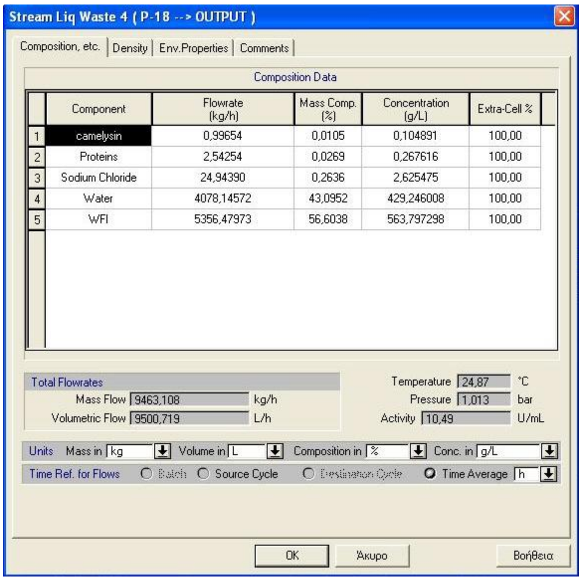
Όλα τα συστατικά που υπάρχουν στο ρεύμα τροφοδοσίας και δεν δεσμεύονται από τη ρητίνη, αποβάλλονται στο ρεύμα προϊόντων S-138 (εικόνα 3.75).

Επίσης όλα τα συστατικά τα οποία δεσμεύονται από τη ρητίνη καταλήγουν στο liq waste 4 ρεύμα αποβλήτων (εικόνα 3.76).



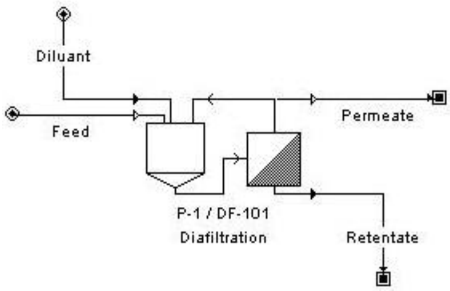
Εικόνα 3.75: Εκροές συστατικών στο ρεύμα προϊόντων S-138.

Στο ρεύμα των αποβλήτων της διεργασίας της χρωματογραφίας gel, αποβάλλεται η μεγαλύτερη ποσότητα από τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για πλύση της στήλης, εδώ WFI, και όπως επίσης η μεγαλύτερη ποσότητα από το νερό του NaCl (0.1M). Η πολύ μικρή ποσότητα της καμελυσίνης αλλά και των πρωτεϊνών που απορρίπτονται στο ρεύμα αποβλήτων οφείλεται στις ρυθμίσεις λειτουργίας της διεργασίας. Το 10% της καμελυσίνης απορρίπτεται αφού η απόδοσή της ρυθμίστηκε να είναι στο 90%, μετά το πέρας της διεργασίας, δηλαδή ύστερα από 2,02 ώρες, χρόνος που αντιστοιχεί στην χρονική διάρκεια της διεργασίας. Κατά παρόμοιο απορρίπτεται και το 99% του συνόλου των πρωτεϊνών πριν τη διαδιήθηση.



Εικόνα 3.76: Εκροές υγρών αποβλήτων από την χρωματογραφία gel C-102.

3.8.4 Διαδιήθηση (Diafiltration), P19/DF -101



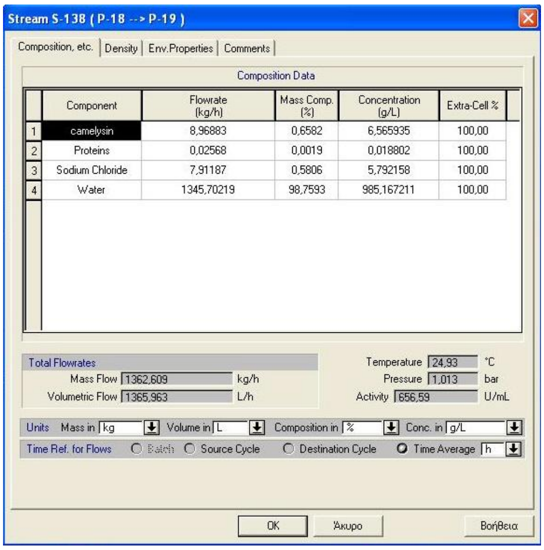
Εικόνα 3.77: Διαδιήθηση (Diafiltration), DF-101.

Η διαδιήθηση (Diafiltration) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιεί μεμβράνες υπερδιήθησης για να απομακρύνει αντικαταστήσει ή μειώσει τη συγκέντρωση των αλάτων ή διαλυτών από διαλύματα που περιέχουν πρωτεΐνες, πεπτίδια και άλλα βιομόρια. Η διεργασία επιλεκτικά χρησιμοποιεί διαπερατές μεμβράνες διήθησης ώστε να διαχωρίσει τα συστατικά των διαλυμάτων και των αναστολέων βασισμένη στα μοριακά τους μεγέθη. Όπως έχει αναφερθεί στις προηγούμενες ενότητες η μεμβράνη υπερδιήθησης συγκρατεί τα μόρια που είναι μεγαλύτερα από τους πόρους της μεμβράνης, ενώ τα μικρότερα μόρια όπως άλατα, διαλύτες και νερό, τα οποία είναι 100% διαπερατά, περνούν ελεύθερα διαμέσου της μεμβράνης.

Η ιοντική ισχύ του υπολείμματος μπορεί ακολούθως να μειωθεί ξεπλένοντας τα άλατα με νερό (διεργασία που ορίζεται ως diafiltration). Αυτή είναι ουσιαστικά μια διεργασία αραίωσης.

3.8.4.1 Τροφοδοσία

Μια ποσότητα υλικού εισέρχεται μέσω του ρεύματος S-138 (εικόνα 3.78), το οποίο αποτελεί ρεύμα εκροής της χρωματαγραφίας gel, στην διεργασία της διαδιήθησης (diafiltration). Η ολική παροχή του ρεύματος (εικόνα) είναι 1362,609 kg/hr, η πίεση σταθερή στα 1.013 bar και η θερμοκρασία στους 24.93 ^{o}C . Για τέτοια παροχή τροφοδοσίας θα χρησιμοποιήσουμε εξοπλισμό πέντε μονάδων διαδιήθησης συνολικού εμβαδού μεμβράνης 70,456 m^2 .


Stream S-138 (P-18 --> P-19)

Composition, etc. | Density | Env.Properties | Comments

Composition Data

	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	camelysin	8,96883	0,6582	6,565935	100,00
2	Proteins	0,02568	0,0019	0,018802	100,00
3	Sodium Chloride	7,91187	0,5806	5,792158	100,00
4	Water	1345,70219	98,7593	985,167211	100,00

Total Flowrates
Mass Flow 1362,609 kg/h
Volumetric Flow 1365,963 L/h

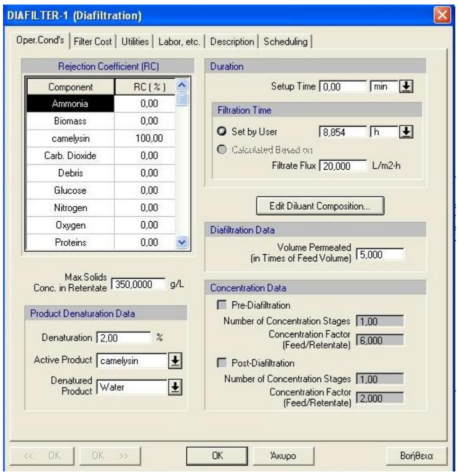
Temperature 24,93 °C
Pressure 1,013 bar
Activity 656,59 U/mL

Units Mass in kg Volume in L Composition in % Conc. in g/L
Time Ref. for Flows Batch Source Cycle Destination Cycle Time Average h

OK Άκυρο Βοήθεια

Εικόνα 3.78: Παροχές τροφοδοσίας στο ρεύμα S-138.

3.8.4.2 Συνθήκες λειτουργίας



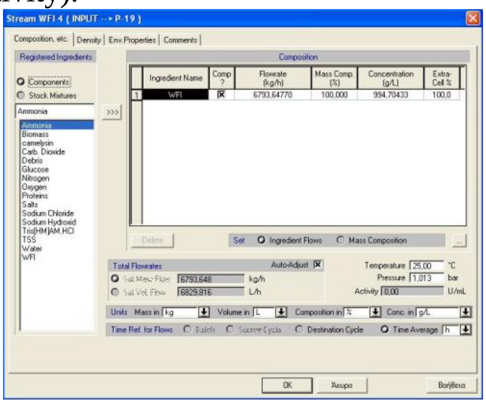
Εικόνα 3.79: Συνθήκες λειτουργίας της διαδιήθησης (diafiltration) DF-101.

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα η διάρκεια της διήθησης είναι 8,854 ώρες. Στο διάστημα αυτό ο ρυθμός ροής της διήθησης είναι της τάξεως των 20 λίτρων ανά μονάδα επιφάνειας της μεμβράνης ανά ώρα. Ο ρυθμός ροής αυτός, ο οποίος είναι και ο ρυθμός ροής της μεμβράνης, σχετίζεται άμεσα με το μέγεθος των πόρων της. Όσο μικρότερος είναι οι πόροι της μεμβράνης τόσο μικρότερος είναι ο ρυθμός ροής με την ίδια εφαρμοζόμενη πίεση.

Ο παράγοντας απόρριψης έχει ρυθμιστεί στο 100% για την καμελυσίνη, δηλαδή η ποσότητα της καμελυσίνης που θα περάσει από τη διεργασία αυτή θα είναι η ίδια που ήταν και στο ρεύμα τροφοδοσίας μειωμένη κατά 2% λόγω αλλοίωσης (αλλοίωσης προϊόντος). Συνεπώς ως ενεργό προϊόν θεωρείται η καμελυσίνη και αλλοιωμένο προϊόν το νερό. Η μέγιστη συγκέντρωση των στερεών στο υπόλειμμα (max solids concentration in retentate) είναι 350g/L.

3.8.4.3 Πλύση με WFI

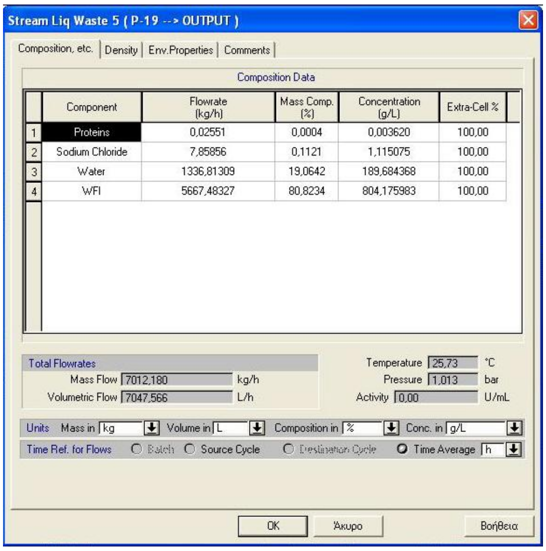
Η ιοντική ισχύ του υπολείμματος μειώνεται περαιτέρω αφού ξεπλύνουμε τα άλατα με νερό για να δημιουργηθούν συνθήκες αραίωσης. Μια ποσότητα από WFI έρχεται από το ρεύμα WFI 4 με συνεχή παροχή (εικόνα 3.80). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα ο όγκος του υπολείμματος και η συγκέντρωση του προϊόντος να μην αλλάζουν κατά τη διάρκεια της διαδιήθησης. Με τη χρήση του WFI ξεπλένονται τα άλατα και μειώνεται η αγωγιμότητα (conductivity).



Εικόνα 3.80: Παροχή WFI στο ρεύμα πλύσης WFI 4.

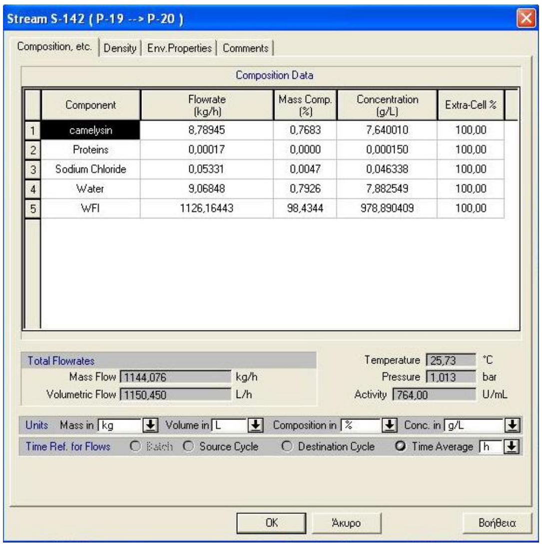
3.8.4.4 Εκροές αποβλήτων και συστατικών από τη διαδιήθηση P-19/DF-101

Στα υγρά απόβλητα της διαδιήθησης αναμένουμε το 99% της παροχής εισροής των πρωτεϊνών και μεγάλες ποσότητες νερού (προϊόν αλλοίωσης) και αλάτων (πλύση με WFI) (εικόνα 3.81). Από τη στιγμή που η διαδιήθηση σαν διεργασία λαμβάνει χώρα στα τελικά στάδια καθαρισμού πρωτεϊνών, η απόρριψη του συστατικού που μας αφορά είναι μικρή και ίση με το ποσοστό αλλοίωσης, δηλαδή μόλις 2%. Το 99% του νερού απορρίπτεται ούτως ώστε κατά την διάρκεια της επόμενης και τελικής διεργασίας της ξήρανσης να υπάρχει ως επί των πλείστον WFI, ούτως ώστε να μην επηρεαστεί η ξήρανση του προϊόντος από πρόσθετες ουσίες του νερού και αλλοιωθεί η τελική του ποιότητα.



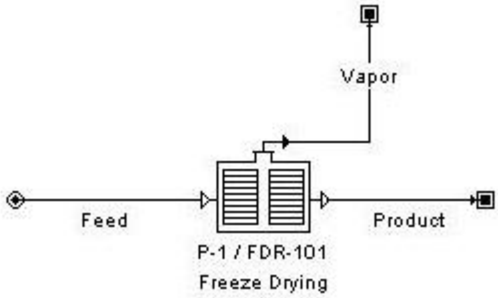
Εικόνα 3.81: Εκροές υγρών αποβλήτων στο ρεύμα Liq Waste 4.

Στην εικόνα 3.82 φαίνονται τα αποτελέσματα της διεργασίας της διαδιήθησης, δηλαδή τα συστατικά και οι αντίστοιχες παροχές τους πριν την είσοδό τους στην ξήρανση. Η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της καμελυσίνης (764U/ml) σήμανε ότι η διεργασία της διαδιήθησης είχε αποτέλεσμα και συντέλεσε θετικά στην προσπάθεια του επιπλέον καθαρισμού της καμελυσίνης πριν την τελική επεξεργασία.



Εικόνα 3.82: Εκροές συστατικών στο ρεύμα προϊόντων, S-142.

3.8.5 Κρυοξήρανση (Freeze drying)



Εικόνα 3.83: Κρυοξηραντής (freeze dryer).

Η κρυοξήρανση (freeze drying), επίσης γνωστή και ως λυοφιλίωση, πραγματοποιείται με τη χρήση μιας ειδική μηχανής που προσομοιώνει την ξήρανση των θερμικά ευαίσθητων υλικών, όπως είναι οι πρωτεΐνες και οι βιταμίνες, του λυοφιλιωτή (εικόνα 3.83). Αυτό το μηχάνημα αποτελείται από ένα μεγάλο θάλαμο για κατάψυξη και από μία αντλία κενού για απομάκρυνση της υγρασίας.

Η επεξεργασία περιλαμβάνει 4 στάδια: 1) Κατάψυξη, ώστε να δημιουργηθούν οι συνθήκες για ξήρανση σε χαμηλή θερμοκρασία, 2) Αντλία κενού για να επιτυγχάνεται η εξάτμιση του παγωμένου νερού/διαλύτη χωρίς να περνά από την υγρή φάση, π.χ. εξάχνωση, 3) Εφαρμογή θερμότητας για να επιταχυνθεί η εξάχνωση, 4) Συμπύκνωση του εξατμισμένου διαλύτη από τον θάλαμο κενού με τη μετατροπή του ξανά σε στερεό.

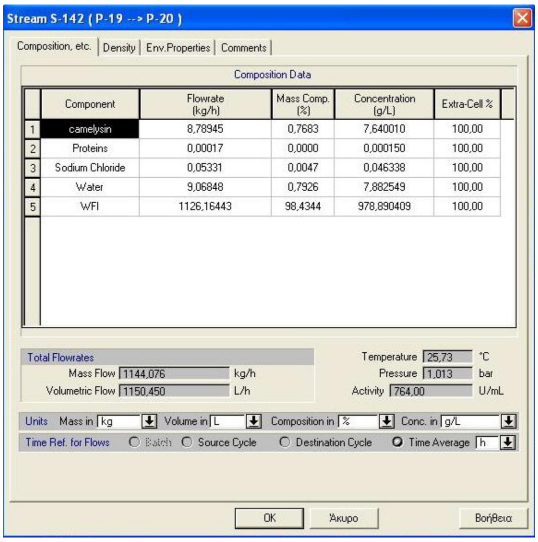
Αφού η διαδικασία της ψύξης είναι γρήγορη, σχηματίζονται μόνο μικροί κρύσταλλοι πάγου. Η αργή ψύξη θα σχημάτιζε πολύ μεγαλύτερους κρυστάλλους πάγου και θα μπορούσε να καταστρέψει τη δομή του προϊόντος, με την εισχώρηση των κρυστάλλων στα κυτταρικά τοιχώματα. Στο στάδιο της εφαρμογής κενού, η χαμηλή πίεση προστατεύει τα παγωμένα προϊόντα από το να λιώσουν και επιταχύνει το επόμενο στάδιο της διαδικασίας που είναι το πρωταρχικό στάδιο της ξήρανσης. Η εξάχνωση του πάγου διασφαλίζει ότι η δομή του προϊόντος παραμένει ανέπαφη. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου της ξήρανσης, περίπου το 95% του νερού απομακρύνεται από το προϊόν. Στο δεύτερο στάδιο της ξήρανσης-που μερικές φορές λαμβάνει χώρα σε υψηλότερες θερμοκρασίες-το νερό που είναι συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και υδατάνθρακες μέσα στο προϊόν, επίσης, απομακρύνεται.

Η μέθοδος της λυοφιλίωσης πλεονεκτεί των υπολοίπων μεθόδων αφυδάτωσης καθώς έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα (α) δεν καταστρέφει τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου και επιπλέον διατηρεί τα πτητικά αρωματικά συστατικά του, (β) συντηρεί καλύτερα τα χαρακτηριστικά της δομής και εμφάνισης καθώς η συρρίκνωση είναι αμελητέα, (γ) τα δείγματα δεν αφρίζουν, δεν σκληραίνουν, δεν οξειδώνονται και (δ) δεν υφίστανται καμία μεταβολή στην μικροβιοχλωρίδα τους κατά την επεξεργασία αυτή.

Υπάρχουν, όμως, και μειονεκτήματα της λυοφιλίωσης: (α) είναι περίπου 4-8 φορές πιο ακριβή από την τεχνική ξήρανσης με ζεστό αέρα με ψεκασμό και (β) καταναλώνει 2-5 φορές περισσότερη ενέργεια. Επιπλέον, αφού η λυοφιλίωση είναι ασυνεχής μέθοδος (γίνεται σε στάδια) και απαιτεί πολλούς χειρισμούς, οι χρόνοι που απαιτούνται για την ξήρανση είναι σημαντικά μεγαλύτεροι από τους αντίστοιχους χρόνους. Μπορεί, επίσης, να υπάρχουν προβλήματα με οξειδωτικό στράγγισμα στα προϊόντα κρυοξήρανσης, λόγω του χαμηλού ποσοστού υγρασίας που περιέχουν. Για τους λόγους αυτούς, η λυοφιλίωση έχει χρησιμοποιηθεί μόνο για προϊόντα, όπου η ποιότητα είναι ύψιστης σημασίας, όπως διατροφοδραστικά συστατικά, εμβόλια, αντιβιοτικά, βότανα και μπαχαρικά, τρόφιμα για αστροναύτες, χημικά προϊόντα υψηλής αξίας και χρωστικές ουσίες.

3.8.5.1 Τροφοδοσία

Ένα ρεύμα τροφοδοσίας S-142 (εικόνα 3.84), το υλικό στην συσκευή κρυοξήρανσης με συνολική ροή μάζας 1144,076 kg/hr.



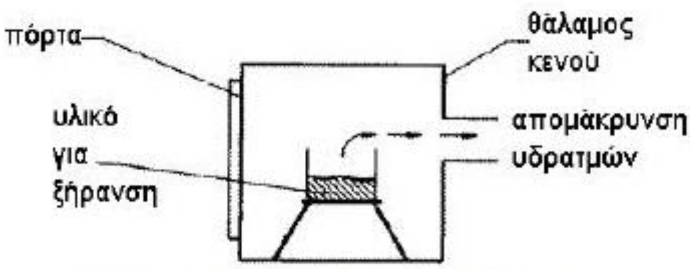
	Component	Flowrate (kg/h)	Mass Comp. (%)	Concentration (g/L)	Extra-Cell %
1	camelysin	8,78945	0,7683	7,640010	100,00
2	Proteins	0,00017	0,0000	0,000150	100,00
3	Sodium Chloride	0,05331	0,0047	0,046338	100,00
4	Water	9,06848	0,7926	7,882549	100,00
5	WFI	1126,16443	98,4344	978,890409	100,00

Εικόνα 3.84: Ρεύμα τροφοδοσίας της κρυοξήρανσης, S-142.

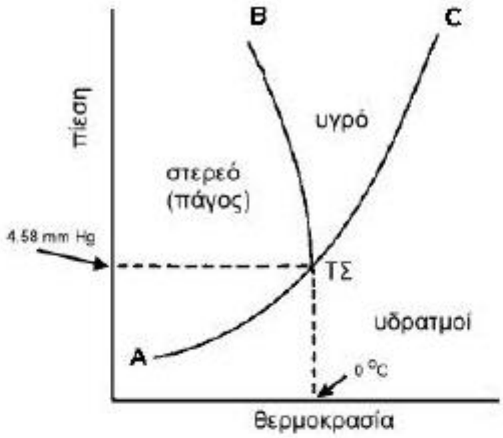
3.8.5.2 Συνθήκες λειτουργίας

Κατά τη διεργασία αυτή μια ουσία μεταβαίνει από τη στερεή στην αέρια φάση απευθείας, με εξάχνωση, χωρίς να περάσει από το στάδιο της υγρής φάσης. Η απομάκρυνση του νερού είναι 100% και του WFI 99,5%, όπως φαίνεται στην εικόνα.3.88. Η διάρκεια της αφυδάτωσης εξαρτάται από το είδος του δείγματος και κυμαίνεται γενικά από 12 έως 30 ώρες. Στην συγκεκριμένη διεργασία έχει ρυθμιστεί στις 15 ώρες.

Καθώς το διάλυμα ψύχεται αρχικά, το περιεχόμενο σε αυτό νερό παγώνει. Στη συνέχεια τοποθετείται σε αεροστεγή χώρο (εικόνα 3.85) όπου μειώνεται η πίεση σε σημείο κάτω από το τριπλό σημείο του νερού. Το τριπλό σημείο του νερού (εικόνα 3.86) είναι σε $T_{ΤΣ} = 0^o C$ και πίεση 4,58mmHg.



Εικόνα 3.85: Βασική διάταξη κρυοξήρανσης.
Πηγή: http://eng.auth.gr/.

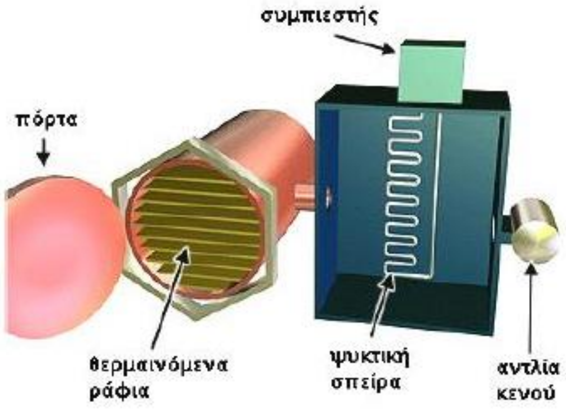


Εικόνα 3.86: Τριπλό σημείο νερού.
Πηγή: http://eng.auth.gr/.

Στη χαμηλή αυτή πίεση, το νερό απομακρύνεται με εξάχνωση ο ρυθμός της οποίας (sublimation rate) είναι 0,502 mm/hr με ικανότητα εξάχνωσης (sublimation capacity) της κάθε συσκευής είναι 589.358 kgH2O/hr (εικόνα 3.89) και απομακρύνεται με κατάλληλο συμπυκνωτή-παγίδα υδρατμών, ενώ ταυτόχρονα το υλικό ψύχεται, δεδομένου ότι για την εξάχνωση του νερού απαιτείται η αντίστοιχη *λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης*. Στον συμπυκνωτή ή παγίδα υδρατμών διέρχονται οι υδρατμοί. Ο συμπυκνωτής έχει την δυνατότητα απόψυξης, ώστε να απομακρύνεται ο σχηματιζόμενος πάγος, χωρίς διακοπή της διεργασίας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση κρυοξήρανσης διαλυμάτων, το υλικό πρέπει να ψυχθεί σε θερμοκρασία τόσο χαμηλή ώστε να προκύπτει αποκλειστικά στερεή φάση, δηλαδή να είναι χαμηλότερη από το τυχόν ευτηκτικό σημείο που είναι πιθανό να σχηματίζουν τα συστατικά του διαλύματος.

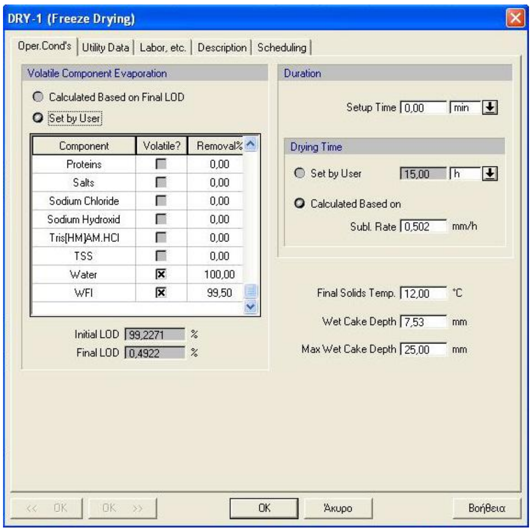
Στην εικόνα 3.87 παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική σχηματική διάταξη της κρυοξήρανσης, που περιλαμβάνει τον κύριο θάλαμο, την ψυχόμενη ατμοπαγίδα με την ψυκτική μονάδα και την αντλία κενού.



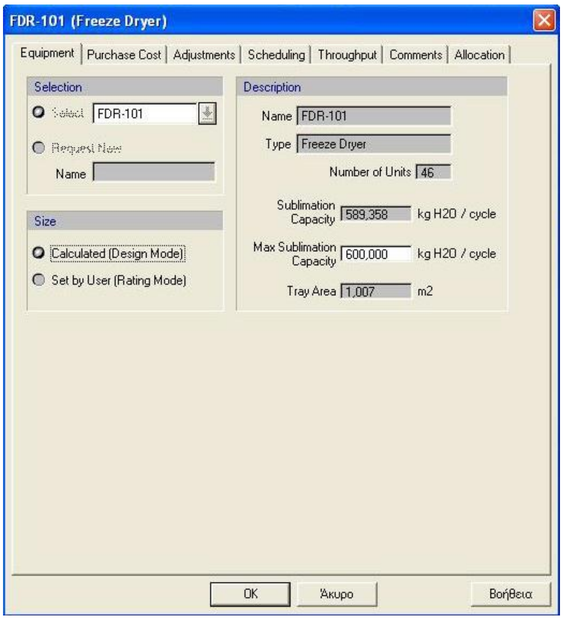
Εικόνα 3.87: Σχηματικό διάγραμμα θαλάμου κρυοξήρανσης.
Πηγή: http://eng.auth.gr/.

Η απομάκρυνση των υδρατμών από το χώρο της κρυοξήρανσης επιταχύνει τον ρυθμό της διεργασίας. Η απομάκρυνση αυτή επιτυγχάνεται με αντλία κενού. Το ψυκτικό σύστημα παρέχει δύο επίπεδα ψύξης: ένα σε θερμοκρασία κάτω των $-5^{o}C$ (για το υλικό) και το άλλο σε πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία (από $-40^{o}C$ έως

$-60^o C$) για την απομάκρυνση των υδρατμών. Για να εξαχνωθεί μια ποσότητα νερού πρέπει να απορροφήσει ορισμένη ενέργεια, που αντιστοιχεί στη *λανθάνουσα θερμότητα εξάχνωσης*.



Εικόνα 3.88: Συνθήκες λειτουργίας της κρυοξήρανσης, FDR-101.

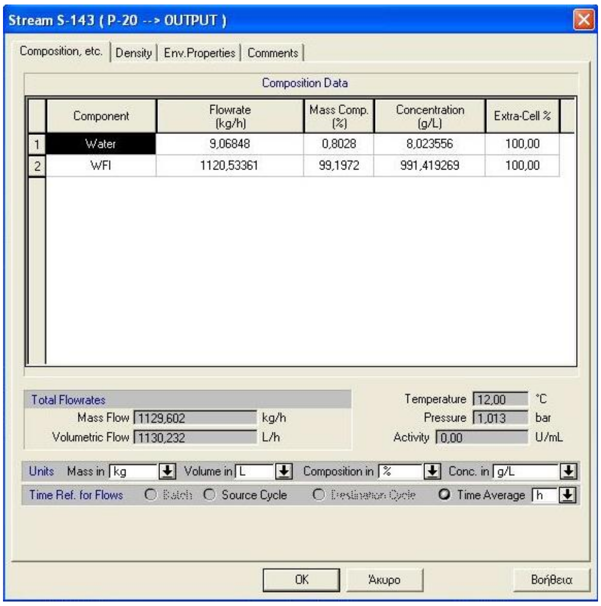


Εικόνα 3.89: Τεχνικά χαρακτηριστικά εξοπλισμού κρυοξήρανσης.

Για μικρές ποσότητες υλικού η απαιτούμενη ενέργεια παραλαμβάνεται είτε από το ίδιο το υλικό είτε από το περιβάλλον μέσα από τα τοιχώματα της συσκευής. Επειδή εδώ οι ποσότητες του υλικού είναι μεγάλες, είναι αναγκαία η θέρμανσή του, αλλιώς θα μειωθεί σταδιακά ο ρυθμός της κρυοξήρανσης. Κατά τη θέρμανση του υλικού η θερμοκρασία τόσο κατά την είσοδο όσο και κατά την έξοδο είναι $152^o C$. Για την διεκπεραίωση της κρυοξήρανσης θα χρησιμοποιηθούν 46 τέτοιες μονάδες κρυοξήρανσης.

3.8.5.3 Εκπομπές ατμού

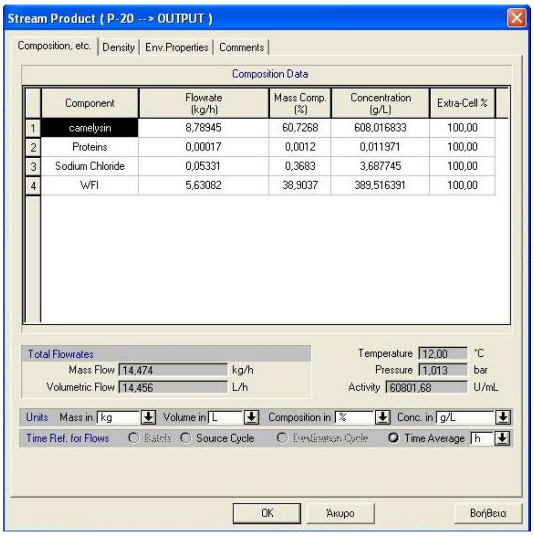
Στο ρεύμα S-143, παρουσιάζονται οι τελικές εκπομπές ως αποτέλεσμα της εξάχνωσης του νερού αλλά και του WFI.



Εικόνα 3.90: Εκπομπές ατμού στο ρεύμα S-143.

3.8.5.4 Εκροές συστατικών

Η λυοφιλίωση ή κρυοξήρανση είναι μια διεργασία που μπορεί να οδηγήσει σε εξαιρετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, της τάξεως του 0,05 έως 4%, προλαμβάνοντας την ανάπτυξη βακτηρίων και μούχλας. Στο τελικό ρεύμα του προϊόντος (εικόνα 3.91) παράγονται μαζί με την καμελυσίνη, η δραστηριότητα της οποίας είναι πολύ μεγάλη (60801,68 U/ml), ελάχιστες ποσότητες πρωτεϊνών και χλωριούχου νατρίου.



Εικόνα 3.91: Εκροές συστατικών στο ρεύμα προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Συμπεράσματα – Σχόλια - Προτάσεις

Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη υψηλής ποιότητας, ο τόνος και γενικά τα ψάρια αντιπροσωπεύουν μία δυναμική πηγή βιομηχανικών πεπτονών για μια ευρεία κλίμακα εφαρμογών. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα ψαριών φθείρονται εύκολα αποδεικνύοντας ότι είναι μια εξαιρετική πηγή θρεπτικών ουσιών για βακτηριακή ανάπτυξη.

Ο *Bacillus cereus* σαν μεσόφιλος οργανισμός είναι ευρέως διαδεδομένος στα εδαφολογικά βακτηριακά είδη και στα απόβλητα και για αυτό το λόγο ανιχνεύεται εύκολα. Επιπλέον η υψηλή περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες το κάνει ακόμα πιο περιζήτητο. Αν και ως προς την ταξινόμηση το γένος *Bacillus* είναι δύσκολο, η δομή του είναι παρόμοια με αυτή των άλλων βακίλων, δεν έχει μεταβολική δραστηριότητα και τα σπόρια είναι σχετικά ανθεκτικά σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι θρεπτικές απαιτήσεις του είναι ελάχιστες και αυτός είναι ο λόγος που συχνά βρίσκεται στα απόβλητα με ένα χαμηλό ποσό.

Η έρευνα των ειδών *B.cereus* έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη πως εκκρίνουν ένα ευρύ φάσμα εξωκυτταρικών παραγόντων οξύτητας και εξωένζυμα, μεταξύ των οποίων ουδέτερες μεταλλοπρωτεάσες με υψηλή ομολογία στη θερμολυσίνη. Μια τέτοια πρωτεάση είναι και η καμελυσίνη, η οποία ανακαλύφθηκε κατά τη διάρκεια της αναζήτησης των βακτηριακών πρωτεάσεων επιφάνειας, εντοπίστηκες ένας ιδιαίτερα ενεργός, φάκελος κυττάρων -δεσμευμένος αζωκαζεϊνολυτικής δραστηριότητας στο *B.cereus*.

Η καμελυσίνη παρουσιάζει μια διαφορά από γνωστές εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές βακτηριακές πρωτεάσες στη Ν-τερματική ακολουθία, εξειδίκευση υποστρώματος και τύπο αναστολής. Η μοναδική της Ν-τερματική αλληλουχία είναι τέτοια που την κάνει να μην έχει ενταχθεί ακόμα σε κάποια βάση δεδομένων. Παρουσιάζει μια ομολογία περίπου 70% με τη θερμολυσίνη και ως προς τον καταλυτικό τύπο είναι μεταλλοενδοπεπτιδάση. Η τριτοταγής δομή της δείχνει ένα μόριο Zn στην ενεργό θέση της και η δραστηριότητά της αναστέλλεται από ενώσεις συμπλοκοποίησης (χηλικοί παράγοντες).

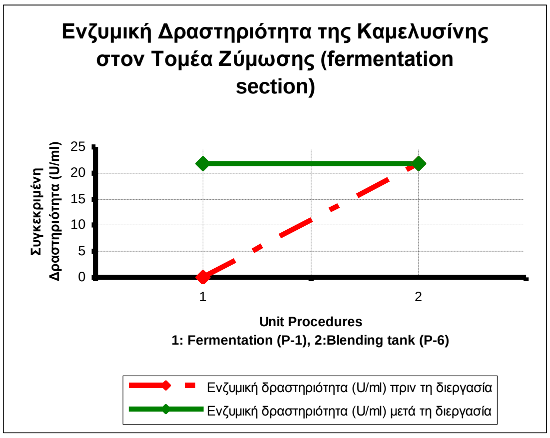
Διαφορετικά κλάσματα των πρωτεϊνών αποβλήτων τόνου έχουν εξεταστεί και έχουν βγει χρήσιμα συμπεράσματα για την επίδρασή τους στην παραγωγή καμελυσίνης με το αποβουτυρωμένο κρέας ψαριών να δίνει μέγιστη παραγωγή καμελυσίνης. Η επίδραση του χλωριούχου νατρίου στην παραγωγή της καμελυσίνης από το *B.cereus* έχει ερευνηθεί ότι είναι μέγιστη σε συγκέντρωση 3%, πράγμα το οποίο δείχνει ότι το βακτήριο ξενιστής είναι συγκρατημένο αλοφιλικό. Αυτό σημαίνει την περιορισμένη ίσως χρήση συστατικών άλατος σε συνθήκες ζύμωσης. Επίσης διάφορα επιφανειοδραστικά έχουν μελετηθεί ως προς το ρόλο τους στην παραγωγή καμελυσίνης, με τα αποτελέσματα να δείχνουν τη σταθερότητα του *B.cereus* να παράγει πρωτεάση έναντι όλων των απορρυπαντικών. Η επίδραση του pH στην ενζυμική παραγωγή παίζει γενικά ένα σημαντικό ρόλο. Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι το pH 7.0 είναι το βέλτιστο για την ενίσχυση της δραστηριότητας της καμελυσίνης και πως πέρα από αυτό η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται. Οι Ray et al.,(2007) ανέφεραν ότι η βέλτιστη διακύμανση του pH για παραγωγή κυτταρινάσης από έντερο ψαριού απομονώνει *B.subtilis* CY5 και *B.circulans* ήταν 7 – 7.5 . Γι' αυτό το λόγο, η παρούσα έρευνα υποστηρίζει το παραπάνω αποτέλεσμα και επίσης τη συνέπεια με την ουδέτερη παραγωγή πρωτεάσης από το *B.cereus* (Sam Sum et al, 2000) και το *B.stearothermophilus* (Fujio και Kume 1991). Οι Atkinson et al., το 1983 ανέφεραν πως πρωτεάσες βακτηριακής προέλευσης παρόμοια με την καμελυσίνη φάνηκε να είχαν βέλτιστο pH κοντά στο 7.

Ως προς τη θερμική μεταβολή στην επεξεργασία της, η καμελυσίνη παρουσιάζει κάποια σταθερότητα. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την δραστηριότητά της είναι 60°C και ότι πέρα από αυτήν την θερμοκρασία, η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται.

Οι εφαρμογές της καμελυσίνη, αν ληφθεί υπόψη σαν μεμονωμένη μεταλλοπεπτιδάση, δεν έχουν ακόμα καθοριστεί. Δεδομένης της αντιστοιχίας της σαν μεταλλοπεπτιδάση, λαμβάνει μέρος σε μια ευρεία κλίμακα εφαρμογών όπως σύνθεση μεγάλης κλίμακας των πεπτιδίων. Επιπλέον, διάφορα βιολογικά ενεργά πεπτίδια έχουν βρει ενδιαφέρον ως φάρμακα για τη θεραπεία των ασθενειών όπως η απομόνωση ουδέτερης μεταλλοπεπτιδάσης από *Bacillus cereus*, με δημιουργία του γονιδιώματος *cal Y*. Επιπλέον η παραγωγή υδρολυμάτων πρωτεϊνών τροφής και πεπτιδίων ενίσχυσης της γεύσης είναι στα πλαίσια εφαρμογής της καμελυσίνης. Περαιτέρω εμπορικές εφαρμογές της καμελυσίνης, μπορούν να βρεθούν στη βιομηχανία μπύρας, στη βιομηχανία δέρματος, στη επεξεργασία των αποβλήτων σφαγής, στη βελτίωση των χαρακτηριστικών ψησίματος του αλευριού, και στη βιομηχανία ταινιών. Η καμελυσίνη που απομονώνεται από στέλεχος του βακτηριακού είδους *Bacillus cereus* παίζει ίσως ρόλο στη δημιουργία πρωτεϊνικών συμπυκνωμάτων και υπερσυμπυκνωμάτων (isolates) τα οποία χρησιμεύουν στην ενίσχυση της διατροφικής αξίας και στην ενίσχυση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των τροφίμων.

Τα απόβλητα από μια μονάδα πάχυνσης τόνου διακρίνονται στα στερεά, δηλαδή τα συστατικά που δεν αφομοιώθηκαν από το πεπτικό σύστημα και μέρος της τροφής που δεν καταναλώθηκε, και τα υγρά, τα οποία περιλαμβάνουν απόβλητα προϊόντα από την λειτουργία των νεφρών. Τα απόβλητα αυτά, των οποίων το ποσοστό σε πρωτεΐνες φτάνει περίπου το 48%, εκτιμώνται θεωρητικά με σκοπό την ανάκτηση της καμελυσίνης με χρήσης του SuperPro Designer, σε συνθήκες συνεχούς ροής αποβλήτων.

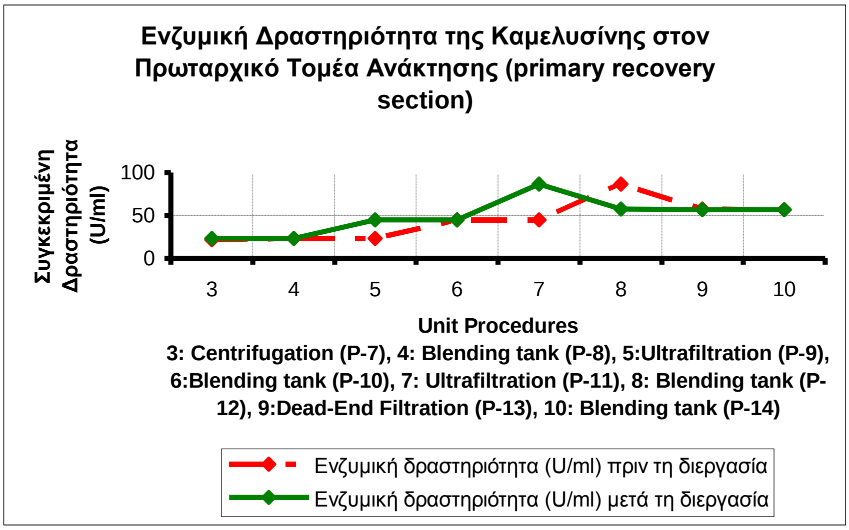
Η προσομοίωση γίνεται σε τρεις τομείς επεξεργασίας. Στον πρώτο τομέα της ζύμωσης, θεωρείται ότι στη μονάδα του συνεχή αντιδραστήρα πλήρους ανάδευσης η έκταση της αντίδρασης (98%), επιτρέπει την αρκετά ικανοποιητική κλασματική μετατροπή της καμελυσίνης.



Εικόνα 4.1: Συγκεκριμένη δραστηριότητα της καμελυσίνης στον τομέα ζύμωσης.

Η συγκεκριμένη δραστηριότητα (ο αριθμός των ενζυμικών μονάδων ανά ml, πολλαπλασιασμένος με την συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε mg/ml.) της καμελυσίνης στο τομέα αυτό (Εικ. 4.1), φαίνεται για πρώτη φορά μετά την ζύμωση και διατηρείται στην ίδια τιμή μέχρι την αρχή του επόμενου τομέα.

Στον πρωταρχικό τομέα καθαρισμού, πετυχαίνουμε μείωση του όγκου της καλλιέργειας και συγκομιδή κυττάρων, με τη χρήση του disk-stack φυγοκεντρωτή καθιζάνουν τα κυτταρικά υπολείμματα και συλλέγετε η πρωτεϊνική λύση. Σε αυτή τη φάση απομακρύνεται ολόκληρη η ποσότητα της βιομάζας, το 25% των θραυσμάτων (debris) που περιλαμβάνονται στα συστατικά. Με τις δύο διεργασίες της υπερδιήθησης που ακολουθούν (UF-101 και UF-102), καταφέρνουμε την επιπλέον μείωση του όγκου και απομάκρυνση των ακαθαρσιών από το διάλυμα, μιας και σε κάθε μία από τις διεργασίες αυτές απομακρύνεται η μισή ποσότητα των αλάτων, debris και γλυκόζης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την σημαντική μείωση των ολικών αιωρούμενων στερεών στο διάλυμα. Ο καθαρισμός της καμελυσίνης έχει μια αναπόφευκτη μείωση της τάξεως του 6%, λόγω αλλοίωσής του στη διάρκεια των υπερδιηθήσεων. Ολόκληρη η ποσότητα των θραυσμάτων απομακρύνεται με μια κατά μέτωπο διήθηση και ταυτόχρονα την ολική απομάκρυνση των ολικών αιωρούμενων στερεών. Η συγκεκριμένη δραστηριότητα της καμελυσίνης στον τομέα αυτό (Εικ. 4.2), όπου παρατηρείται συνεχώς μια αναμενόμενη αύξηση σε σχέση με το προηγούμενο τομέα, με μια μείωση στην δεξαμενή ανάμιξης (P-12), λόγω μείωσης της συγκέντρωσης της καμελυσίνης στο διάλυμα μετά την προσθήκη WFI. Επίσης μια ανεπαίσθητη μείωση της δραστικότητας στη διάρκεια της κατά μέτωπο διήθησης προκαλείται από μείωση της συγκέντρωσης της καμελυσίνης στο διάλυμα λόγω αλλοίωσής της από τη διεργασία.



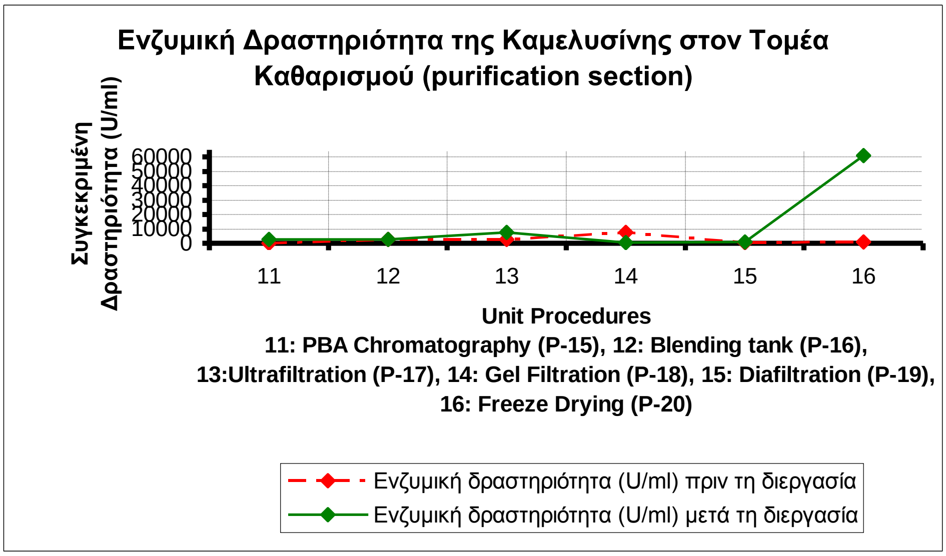
Εικόνα 4.2: Συγκεκριμένη δραστηριότητα της καμελυσίνης στον πρωταρχικό τομέα ανάκτησης.

Μια χρωματογραφία ιονανταλλαγής σαν μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική καθαρισμού πρωτεϊνών, χρησιμοποιείται ρυθμισμένη με δεσμευτική ικανότητα της ρητίνης στο 100% και την απόδοση της καμελυσίνης και των πρωτεϊνών στο 90% και 15% αντίστοιχα. Με την υπερδιήθηση (UF-103), απομακρύνεται ένα σημαντικό ποσοστό από χλωριούχο νάτριο. Η χρήση της χρωματογραφίας χρωματογραφία gel (P-18/C-102), πιάνει τόπο με διαχωρισμό των ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος, μέσω της στήλης που περιέχει σαν υλικό πλήρωσης *gel* ρητίνης. Επειδή η περιεκτικότητα του διαλύματος είναι σε σφαιρικές πρωτεΐνες, ο όγκος έκλουσης με χλωριούχο νάτριο είναι μεγάλος (5414,4527 kg/hr), μιας και ο όγκος έκλουσης εξαρτάται ευθέως από το μοριακό βάρος για σφαιρικές πρωτεΐνες. Οι μεγαλύτερες ποσότητες των συστατικών έκλουσης και πλύσης, αποβάλλονται στο τέλος της χρωματογραφίας gel, ενώ το 90% για καμελυσίνης και το 1% για τις λοιπές πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν την απόδοση των δύο αυτών πρωταρχικής σημασίας συστατικών, στην χρωματογραφία gel.

Σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των περιεχόμενων στο διάλυμα αλάτων επιτυγχάνεται με τη διεργασία της διαδιήθησης. Η ιοντική ισχύ του υπολείμματος μειώνεται με ξέπλυμα των αλάτων με WFI και δημιουργούνται συνθήκες αραίωσης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες αλάτων και νερού (προϊόν αλλοίωσης), να απομακρύνονται στο ρεύμα εξόδου της διεργασίας. Η αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας της καμελυσίνης (764U/ml) σήμανε ότι η διεργασία της διαδιήθησης είναι αποτελεσματική και συντελεί θετικά στην προσπάθεια του επιπλέον καθαρισμού της καμελυσίνης πριν την τελική επεξεργασία.

Επειδή οι πρωτεΐνες είναι θερμικά ευαίσθητα υλικά και η υψηλής ποιότητας ανακτώμενης καμελυσίνης είναι ο βασικός στόχος, επιλέχθηκε η διεργασία της κρυοξήρανσης ή λυοφιλίωσης. Το 100% του νερού και το 99,5% του WFI απομακρύνονται κατά τη διεργασία αυτή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα το τελικό προϊόν να έχει μια υγρασία της τάξεως του 5%, προλαμβάνοντας έτσι την ανάπτυξη βακτηρίων και μούχλας.

Η συγκεκριμένη δραστηριότητα της καμελυσίνης στον τομέα αυτό (Εικ. 4.3), αυξάνεται σταδιακά μέχρι την υπερδιήθηση (UF-103) και μειώνεται στην διάρκεια της χρωματογραφίας gel. Παρόλο που η χρωματογραφία gel είναι διεργασία καθαρισμού, η προσθήκη ποσότητας χλωριούχου νατρίου για την έκλουση του προϊόντος, έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση της συγκέντρωσης της καμελυσίνης στο διάλυμα και κατά συνέπεια την αντίστοιχη μείωση της συγκεκριμένης ενζυμικής δραστηριότητας. Όπως φαίνεται και στο γράφημα η διεργασία της κρυοξήρανσης επεμβαίνει σημαντικά στην απότομη αύξηση της συγκεκριμένης δραστηριότητας της καμελυσίνης (60801,68 U/ml). Η συγκεκριμένη ενζυμική δραστηριότητα είναι ενδεικτική της καθαρότητας και της ποιότητας του τελικού προϊόντος.



Εικόνα 4.3: Συγκεκριμένη δραστηριότητα της καμελυσίνης στον τομέα καθαρισμού.

Βάση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας αλλά και των βιβλιογραφικών αναφορών, προκύπτει ότι τα αποτελέσματα της έρευνας είναι ενθαρρυντικά για την πιθανή χρήση της καμελυσίνης σε εφαρμογές βιομηχανικής κλίμακας. Η παρούσα μέθοδος προσομοίωσης της απομόνωσης της καμελυσίνης από υγρά απόβλητα ιχθυοκαλλιέργειας τόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μαζικότερη παραγωγή του ενζύμου καμελυσίνη (camelysin) και εφαρμογή του στην προετοιμασία υψηλής ποιότητας λειτουργικών τροφών. Το γεγονός ότι η καμελυσίνη παρουσιάζει μια διαφορά από γνωστές εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές βακτηριακές πρωτεάσες στη N-τερματική ακολουθία, εξειδίκευση υποστρώματος και τύπο αναστολής, με αποτέλεσμα να μην έχει ενταχθεί ακόμα σε κάποια βάση δεδομένων, ενισχύει την σημαντικότητα της έρευνας αυτής.

Επειδή η βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας εξαρτάται παγκοσμίως από τη διαθεσιμότητα χαμηλού κόστους, υψηλής ποιότητας τροφές, η αφθονία της ενζυμικής πηγής και η χαμηλή εμπορική της αξία είναι ένας βιοπόρος ο οποίος εσωκλείει τις κατάλληλες συνθήκες και προϋποθέσεις για επεξεργασία και ανάκτηση σημαντικής ποσότητας ενζύμων.

Το γεγονός ότι με την προσομοίωση αυτή χρησιμοποιείται κρυοξήρανση για την τελική απομόνωση της καμελυσίνης, το τελικό λυοφιλιωμένο προϊόν ενισχύεται ως προς τη διάρκεια ζωής μιας και τα λυοφιλιωμένα προϊόντα έχουν μακρά διάρκεια ζωής, αφού σφραγίζονται σε συσκευασίες που τα προστατεύουν από την υγρασία, το φως και το οξυγόνο, με αποτέλεσμα να μπορούν να αποθηκευτούν σε θερμοκρασία δωματίου για πολλά χρόνια. Μετά την επανυδάτωσή τους, ενισχύεται η γεύση τους αλλά και η εμφάνισή τους. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως σαν μεταλλοενδοπρωτεάση, η καμελυσίνη δύναται να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα στα απορρυπαντικά, την επεξεργασία δέρματος, την αποκατάσταση στο ασήμι, στην ιατρική, στην επεξεργασία τροφίμων, στις τροφές, στη χημική βιομηχανία όπως και την επεξεργασία αποβλήτων.

Γενικά τα υγρά απόβλητα από μονάδες πάχυνσης, λόγω της χαμηλής τους εμπορικής αξίας και της μεγάλης περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες, είναι ένας τομέας για περαιτέρω έρευνα ικανός να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά την απομόνωση πολύτιμων πρωτεϊνών και επιπλέον βιομηχανική εφαρμογή τους. Το διάγραμμα ροής το οποίο προσομοιώνει την απομόνωσης της καμελυσίνης είναι ένα σχέδιο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλη κλίμακα για απομόνωση πρωτεϊνών από απόβλητα μονάδων πάχυνσης.

Βιβλιογραφία

1. Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γκέκας Βασ., Πρωιμάκη Σπυρ., "Φυσικοχημικές Διεργασίες Διαχωρισμού για Μηχανικούς Περιβάλλοντος", Εκδόσεις Τζιόλα, 2002.
- Γκέκας Βασ., Μπαλτά Κ., "Βιομηχανία Τροφίμων και Περιβάλλον", Εκδόσεις Τζιόλα, 2005.
- Smith J.,M., "Μηχανική Χημικών Διεργασιών", Εκδόσεις Τζιόλα, 2003.
- Metcalfy & Eddy, "Μηχανική Υγρών Αποβλήτων, Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση", τόμος Α και Β, Εκδόσεις Τζιόλα, 2007.
- Pecsok R., Shields L.D., Cairns Th., McWilliam I., "Σύγχρονες Μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση", Εκδόσεις Πνευματικός, 1980.
- Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P., "Χημεία Τροφίμων", 3η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, 2006.
- Καλογεράκης Ν., Κατσίβελα Ελ., "Σημειώσεις Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας", Χανιά 2002.
- Κλώνης Ι., "Ενζυμική Βιοτεχνολογία", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1998, ISBN: 960-524-041-6.
- Stryer Lum., "Βιοχημεία", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997, ISBN: 960-7309-63-4.
- Lamans, "Μελέτη Περιβαλλοντικών επιπτώσεων της Εταιρίας «Ελληνικαί Ιχθυοκαλλιέργειαι Α.Β.Ε.Ε.»", Σεπτέμβριος 2007.
- Σωτηροπούλου Γ., (2006), "Πρωτεάσες και Αναστολείς", Τμήμα φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.

2. Ξένη Βιβλιογραφία

- Atkinson B., Mavituna F., "Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook", Macmillan 1983.
- Vlaxou A., "Introduction to Proteomics", Crete, March 2006.
- Esakkiraj P., Immanuel G., Sowmya M., Iyapparaj P., Palavesam A., "Evaluation of Ptotease-producing Ability of Fish Gut Isolate *Bacillus cereus* for Aqua Feed", Food Bioprocess Technology, October 2007.
- Polaina J., MacCabe A., "Industrial Enzymes in the 21st Century", Springer 2007.
- Bryan Ph., Pantoliano M., "Biosynthetic Uses of Thermostable Proteases", Patent abstracts.
- Fujiwara N., Masui A. (1993), "Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from an alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp*.", Journal of Biotechnology, vol. 30, p.245-256.
- Yongxiang W., Srivastava K. (1995), "Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841)", Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 79, p. 433-438
- Hartmann A., Trevors J., (1999), "Magnetic capture-hybridization for purification and probing of mRNA for neutral protease of *Bacillus cereus*", Journal of Microbiological Methods, vol.37, p.187-192.

- Sierecka Jadwiga K. (1998), “Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*”, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, vol.30, p.579-595.
- Nilegaonkar S.S., Zambrare V.P., Kanekar P.P., (2007), “Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326”, Bioresource Technology, vol.98, p.1238-1245.
- Bhaskar N., Sudeepa E.S., Rasshmi H.N., (2007), “Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities”, Bioresource Technology, vol.98, p.2758-2764.
- Kanekar P.P., Nilegaonkar S.S.,(2002), “Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India”, Bioresource Technology, vol.85, p.87-93.
- Kotiranta An., Lounatmaa K., Haapasalo M., (2000), “Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections”, Microbes and Infections, vol.2, p.189-195.
- Pauptit R., Karisson R., Picot D., (1987),“Crystal structure of neutral protease from *Bacillus cereus* refined at $3\cdot 0\overset{o}{A}$ resolution and comparison with the homologous but more thermostable enzyme thermolysin”, Journal of Molecular Biology, vol.99, p.525-537.
- Neumarr R., Citri N., (1953), “Repression of protease formation in *Bacillus cereus*”, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 59, p.749-751.
- Feder J., Keya l., Garrett R., (1971), “*Bacillus cereus* neutral protease”, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 25, p.74-78.
- Moktam B., Roy A., Sarkar K., (2006), “Characteristics of *Bacillus cereus* isolates from legume-based Indian fermented foods”, Food Control, vol.18, p.1555-1564.
- Wang San-Lang, Yeh Pei-Yi, (2006), “Production of a surfactant- and solvent-stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell wastes fermented *Bacillus subtilis* TKU007”, Process Biochemistry, vol.41, p. 1545-1552.
- Rosario E. J. Del., Duldulao F.D., (1988), “Preparation and characterization of polysulfone ultrafiltration membranes for concentrating waste tuna broth”, Desalination, vol.70, p.293-298.
- IAEA (International Atomic Energy Agency) (2005), “Determination of human pathogen profiles in food by quality assures microbial assays”.
- Pavasovic M., Richardson N.A., Anderson A.J., (2004), “Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mub crab, *Scylla serrata*”, Aquaculture, vol.242, p.641-654.
- Mejri M., Mathloutin M., (1999), “effect of small carbohydrates on the catalytic activity of protease and two glycohydrolases”, Carbohydrate Polymers, vol.45, p.161-167.
- Stauffer C., (1971), “The effect of pH on thermolysin activity”, Archives of Biochemistry and Biophysics, vol.147, p.568-570.
- Sookkiheo B., Stnchalkul S., (2000), “Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33”, Protein Expression and Purification, vol.20, p.142-151.
- Khodabux K., L’Omelette M., (2007), “Chemical and near-infrared determination of moisture, fat and protein in tuna fishes”, Food Chemistry, vol.102, p.669-675.
- Poupa O., Lindstrom L., (1981), “Cardiac broth, myoglovin, proteins and DNA in developing tuna”, Comp. Biochem. Physio., vol70A, p.217-222.

- Jae-Young Je, Zhong-Ji Qian, (2007), “Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis”, Process Biochemistry, vol.42, p.840-846.
- Guerard F., Guimas L., Binet A., (2002), “Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol.19&20, p.489-498.
- Guerard F., Binet A., Dufosse L., (2001), “Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase”, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol.11, p.1051-1059.
- Marquez M.C., Vazquez M.A., (1999), “Modeling of enzymatic protein hydrolysis”, Process Biochemistry, vol.35, p.111-117.
- Kumar K., Tatineni R., (2007), “Purification and characterization of a solvent and detergent-stable novel protease from *Bacillus cereus*”, Microbiological Research.
- Banik R., Prakash M., (2004), “Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*”, Microbiological Research, vol.159, p.135-140.
- Hofman M., Thonart O., (2001), “Enzymatic solubilization of proteins from tropical tuna using alcalase and some biological properties of the hydrolysates”, Engineering and Manufacturing for Biotechnology, p.39-50.
- Kang Kil-Yoon, Ahn Dong-Hyun, (2005), “Separation of protein and fatty acids from tuna viscera using supercritical carbon dioxide”, Biotechnology and Bioprocess Engineering, vol.10, p.315-321.
- Orhan E., Omay D., (2005), “Partial purification and characterization of protease enzyme from *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*”, Human Press Inc., p.183-194.
- Debashish G., Malay S., (2005), “Marine Enzymes”, Advantages of Biochemical Engineering and Biotechnology, vol.95, p.189-218.
- Raab M., Tyo K., (2005), “Metabolic Engineering”, Advantages of Biochemical Engineering and Biotechnology, vol.100, p.1-17.
- Prakash >, BAnic R., (2005), “Purification and characterization of *Bacillus cereus* protease suitable for detergent industry”, Human Press Inc., p.143-155.
- Patel R., Dodia M., (2005), “Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.*: Production and optimization”, Process Biochemistry, vol.40, p.3569-3575.
- Bornscheuer U., (2005), “Trends and challenges in enzyme technology”, Advantages of Biochemical Engineering and Biotechnology, vol.100, p.181-203.
- Quax J. Wim, (2006), “Bacterial enzymes”, Prokaryotes, vol.1, p.777-796.
- Shetty K., Paliyath G., Pometto A., Levin R., (2006), “Food Biotechnology”, second edition.
- Waterborg J., (1985), “The Proteins Protocols Handbook”, Human Press Inc, vol.2, p.7-9.
- Grass G., Schierhorn A., Sorkau E., (2004),“Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus*”, American Society of microbiology, p.219-228.
- Fricke B., Drobler K., Willhardt I., (2001),“The cell envelope-bound metalloprotease (camelysin) from *Bacillus cereus* is a possible pathogenic factor”, Biochimica et Biophysica Acta, p.132-146.
- Sidler W., Kumpf B., (1986), “A neutral proteinase produced by *Bacillus cereus* with high sequence homology to thermolysin: Production, isolation and characterization”, Applied Microbiological Biotechnology, vol.25, p.18-24.

- Klingeberg M., Hashwa F., (1991),“Properties of extremely thermostable proteases from anaerobic hyperthermophilic bacteria”, Applied Microbiological Biotechnology, vol.34, p.715-719.
- Silder W., Zuber H., (1980), “Isolation procedures for thermostable neutral proteinases produced by *Bacillus stearothermophilus*”, European Journal Applied Microbiology, vol.10, p.197-209.
- Petrides D., Intelligen Inc., (2000), “Bioprocess Design”.
- Kleijntjens R., Luyben K., (2002), “Bioreactors”, vol.14. p.329-342.
- Keramat Amirkolaire A., (2008),“Enviromental impact of nutrient discharged by aquaculture waste water on the Haraz river“, Journal of Fisheries and Aquatic Science, vol.3, p.275-279.

3. Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

- http://www.eufic.org/
- http://eng.auth.gr/
- http://hellas.teipir.gr/
- http://www.bio.cmu.edu/
- http://www.springerlink.com/
- http://books.google.gr/
- http://www.ydad.teimes.gr/
- http://en.wikipedia.org/
- http://www.afssociety.org/
- http://www.valutechinc.com/
- http://www.disco.co.jp/
- http://irfanchemist.wordpress.com/
- http://slohs.slcusd.org/
- http://info.scopus.com/
- http://www.sciencedirect.com/
- http://www.foodauthority.nsw.gov.au/
- http: //merops.sanger.ac.uk/
- http://www.ebi.ac.uk/
- http://www.intelligen.com/
- http://www.amano-enzyme.co.jp/
- http://www.aquamedia.org/