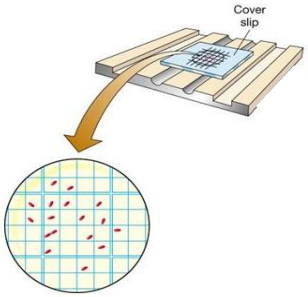
4η Εργαστηριακή Μέρα: Ποσοτικός προσδιορισμός κυτταρικής συγκέντρωσης-Απομόνωση και χαρακτηρισμός DNA από τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae*

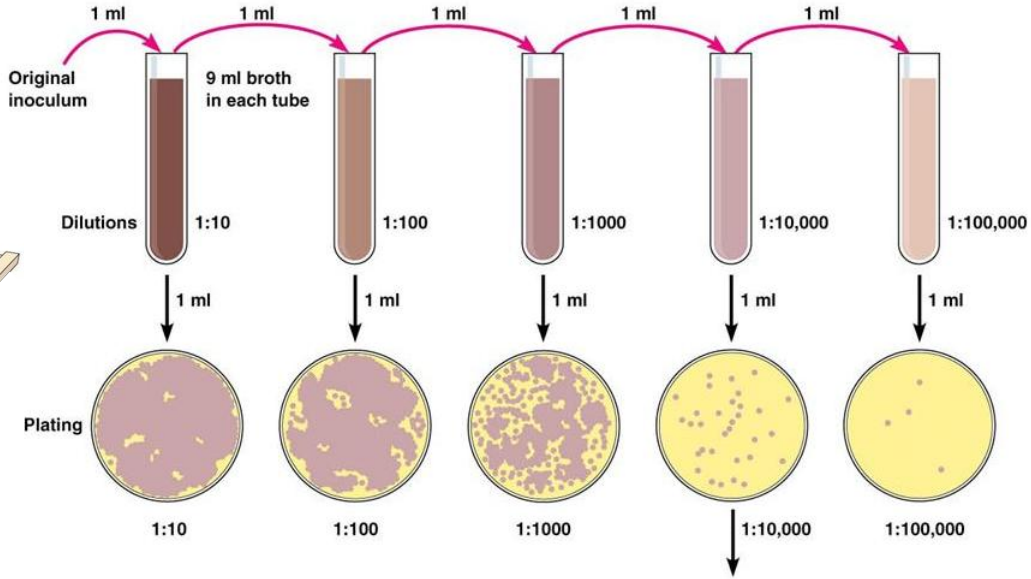
Μέτρηση κυτταρικής συγκέντρωσης

<u>Υπολογισμός αριθμού κυττάρων</u>

✓Αρίθμηση μικροοργανισμών μικροσκόπιο

✓Αρίθμηση μικροοργανισμών σε τρυβλία





Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000 bacteria/ml in sample.)

<u>Υπολογισμός μάζας κυττάρων</u>

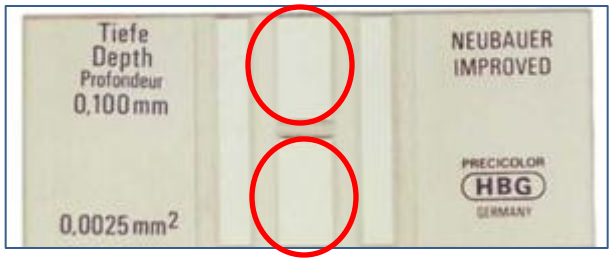
✓Θολερότητα

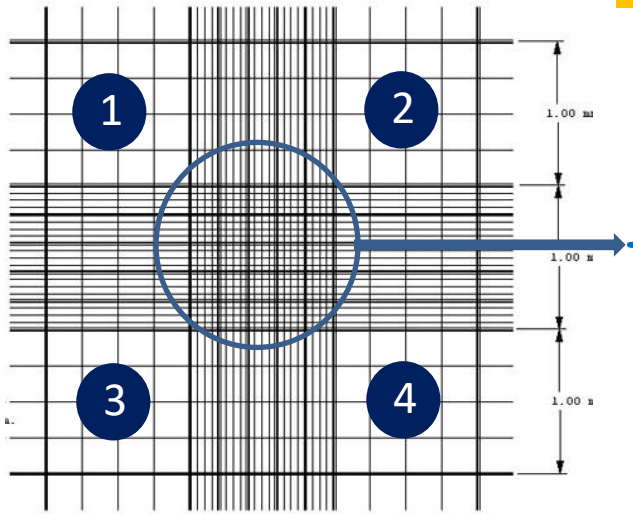
✓Ξηρό βάρος (DCW)

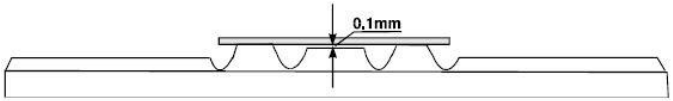
✓Μεταβολική δραστηριότητα (ATP, ρυθμός κατανάλωσης οξυγόνου)

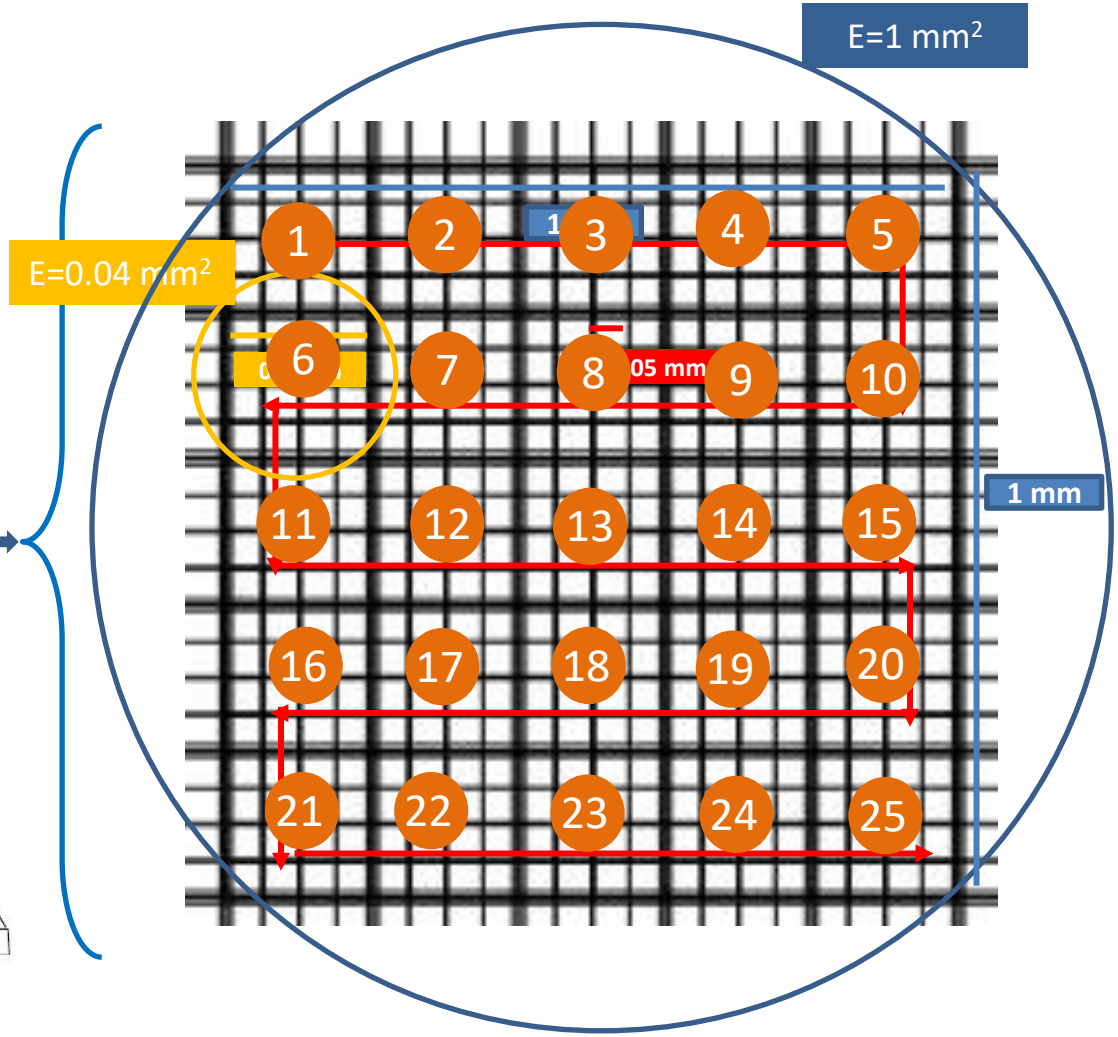
Χαμηλή θολερότητα → Υψηλή θολερότητα

Αιμοκυτόμετρο ή Πλάκα Neubauer





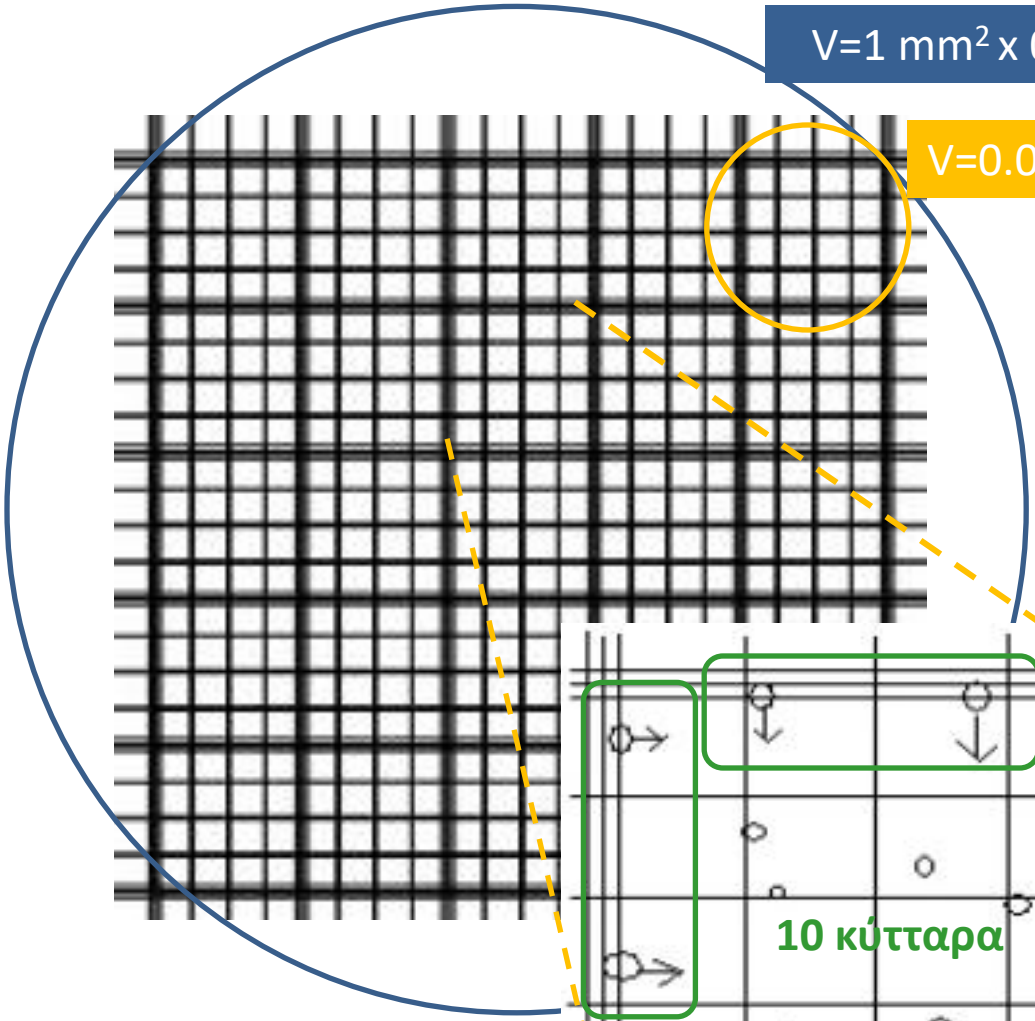




Αιμοκυτόμετρο ή Πλάκα Neubauer

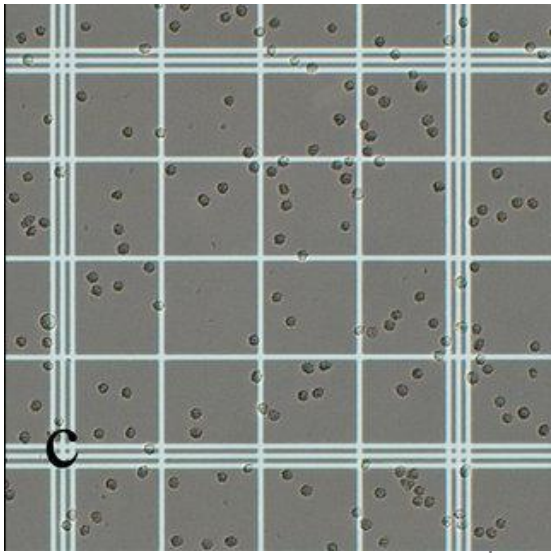
$V=1\ mm^2 \times 0.1\ mm=0.1\ mm^3$

$V=0.04\ mm^2 \times 0.1\ mm=0.004\ mm^3$

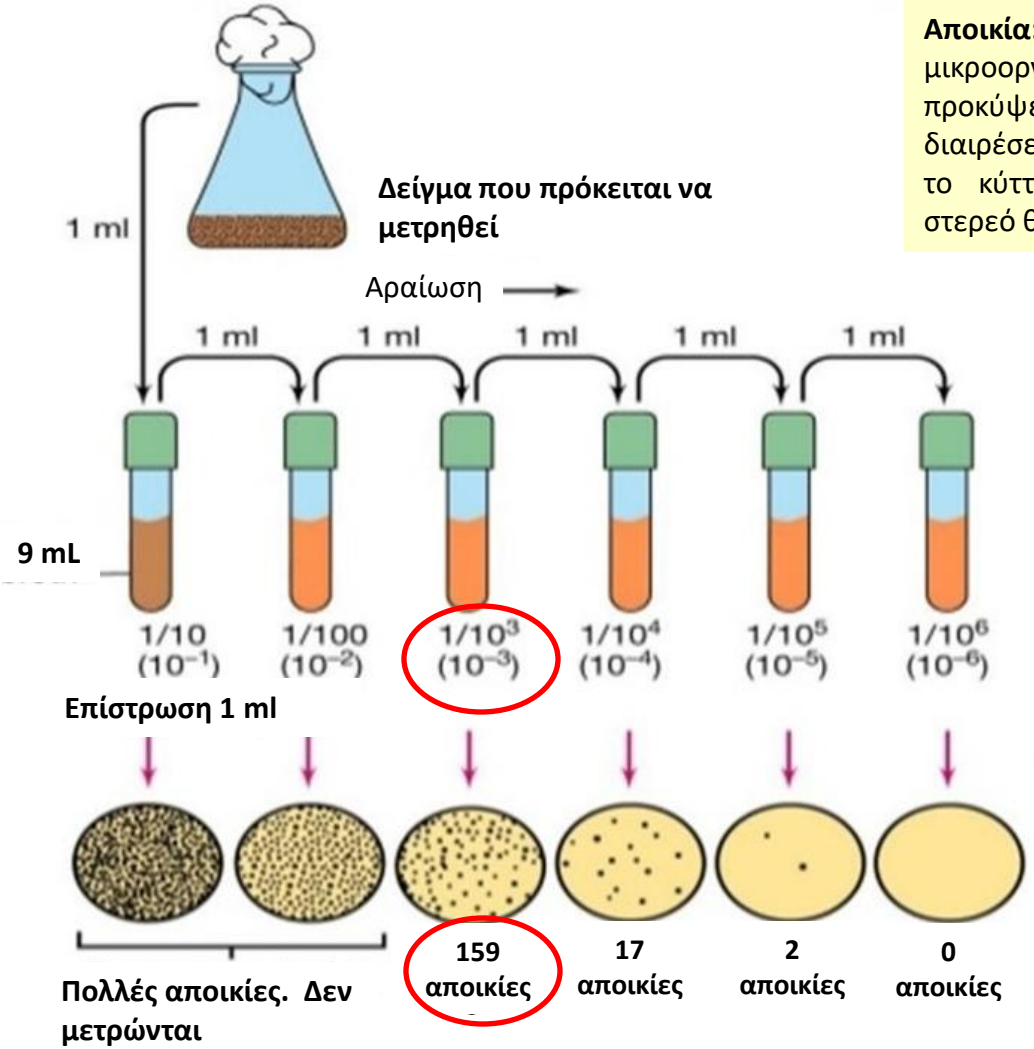


Συγκέντρωση κυττάρων (cells/mL)=

$$= \frac{\text{Αριθμός κυττάρων x Αραίωση}}{\text{Συνολικός όγκος}}$$



Αρίθμηση μικροοργανισμών σε τρυβλία



Αποικία: ένα σύνολο από μικροοργανισμούς που έχει προκύψει από τις διαδοχικές διαιρέσεις ενός κυττάρου, όταν το κύτταρο αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό υλικό

Η εκτίμηση του ζωντανού μικροβιακού πληθυσμού με τη χρήση στερεών υποστρωμάτων βασίζεται στην παραδοχή ότι κάθε μικροβιακό κύτταρο αναπτύσσεται στο άγαρ και σχηματίζει μια ορατή αποικία

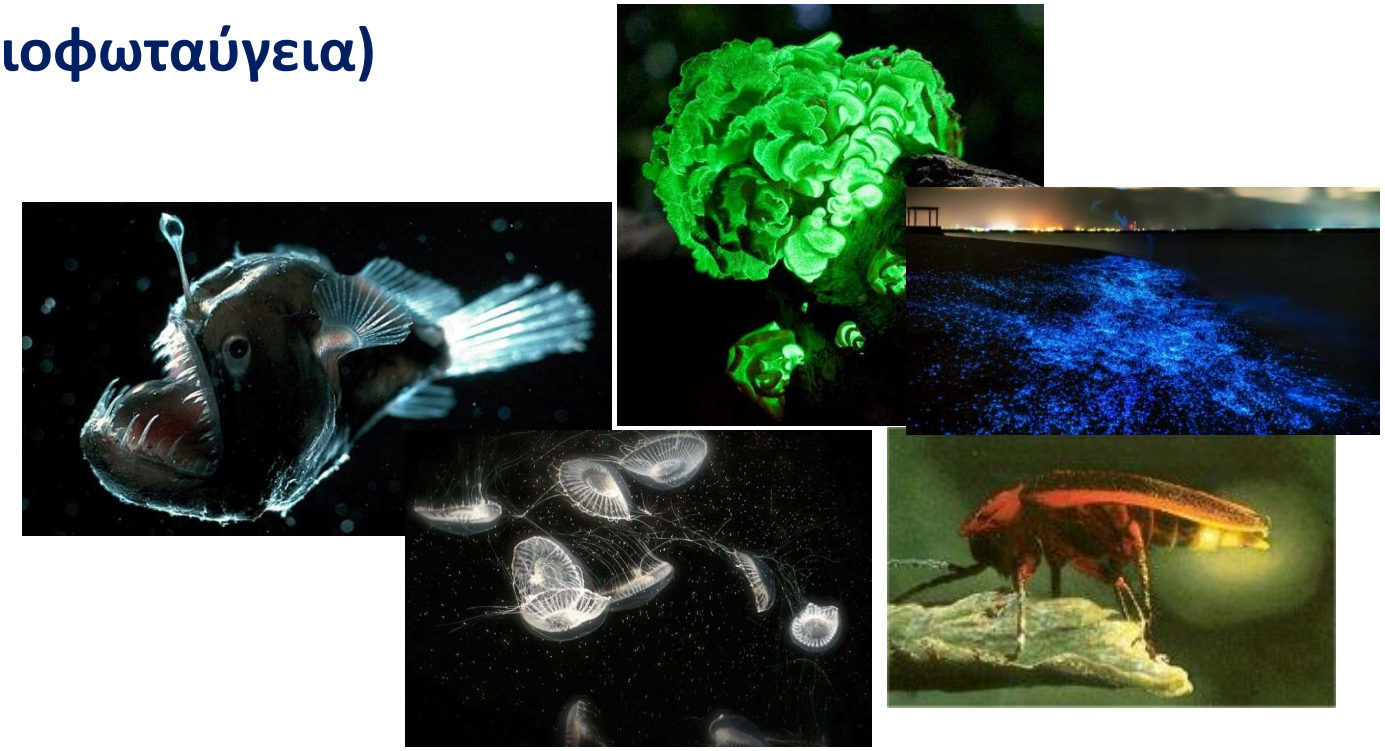
30<Αριθμός αποικιών<300

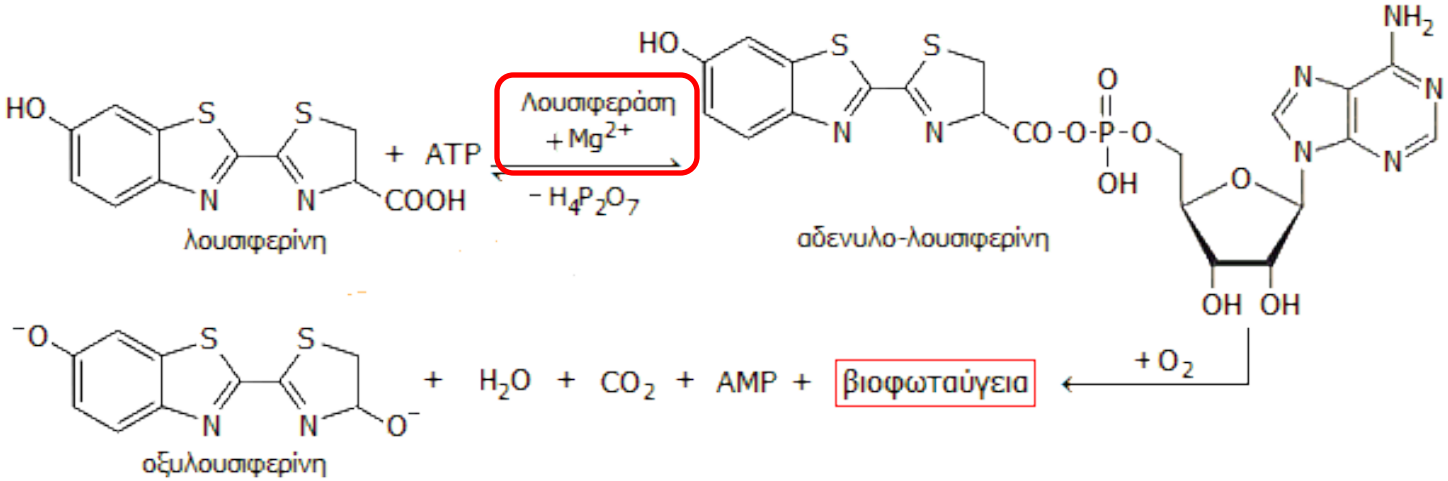
Colony forming Units (CFU)/ml = Αριθμός αποικιών στο τρυβλίο x (αραίωση)$^{-1}$

Π.χ. 159 x 10^3 = 1.59 x 10^5 CFU/ml

Μέτρηση ATP (βιοφωταύγεια)

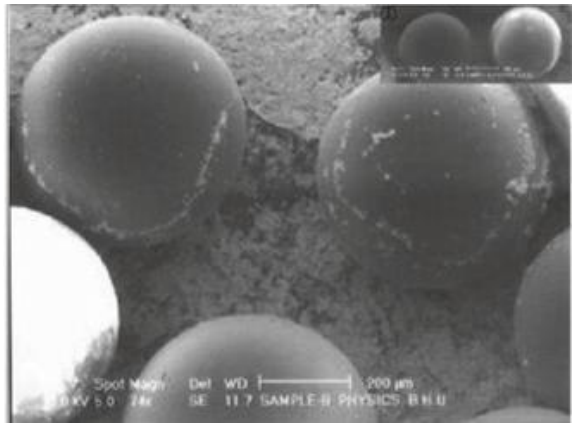
<u>Βιοφωταύγεια:</u>
παραγωγή και εμπομπή φωτός από ζωντανούς οργανισμούς





6η Εργαστηριακή Μέρα: Ακινητοποίηση βιοκαταλυτών

Ακινητοποίηση βιοκαταλυτών



Ακινητοποίηση ή καθήλωση βιοκαταλυτών (κυττάρων ή ενζύμων) ονομάζεται ο περιορισμός τους σε τεχνητή στερεή φάση η οποία διακρίνεται από την κύρια υγρή φάση.

Πρώτη βιομηχανική χρήση ακινητοποιημένου ενζύμου (1966): αμινοακυλάση από *Aspergillus oryzae* διαχωρισμός ρακεμικού μίγματος D-L αμινοξέων (Tanabe Seiyaku Company/Japan)

Γιατί ακινητοποίηση των ενζύμων ?

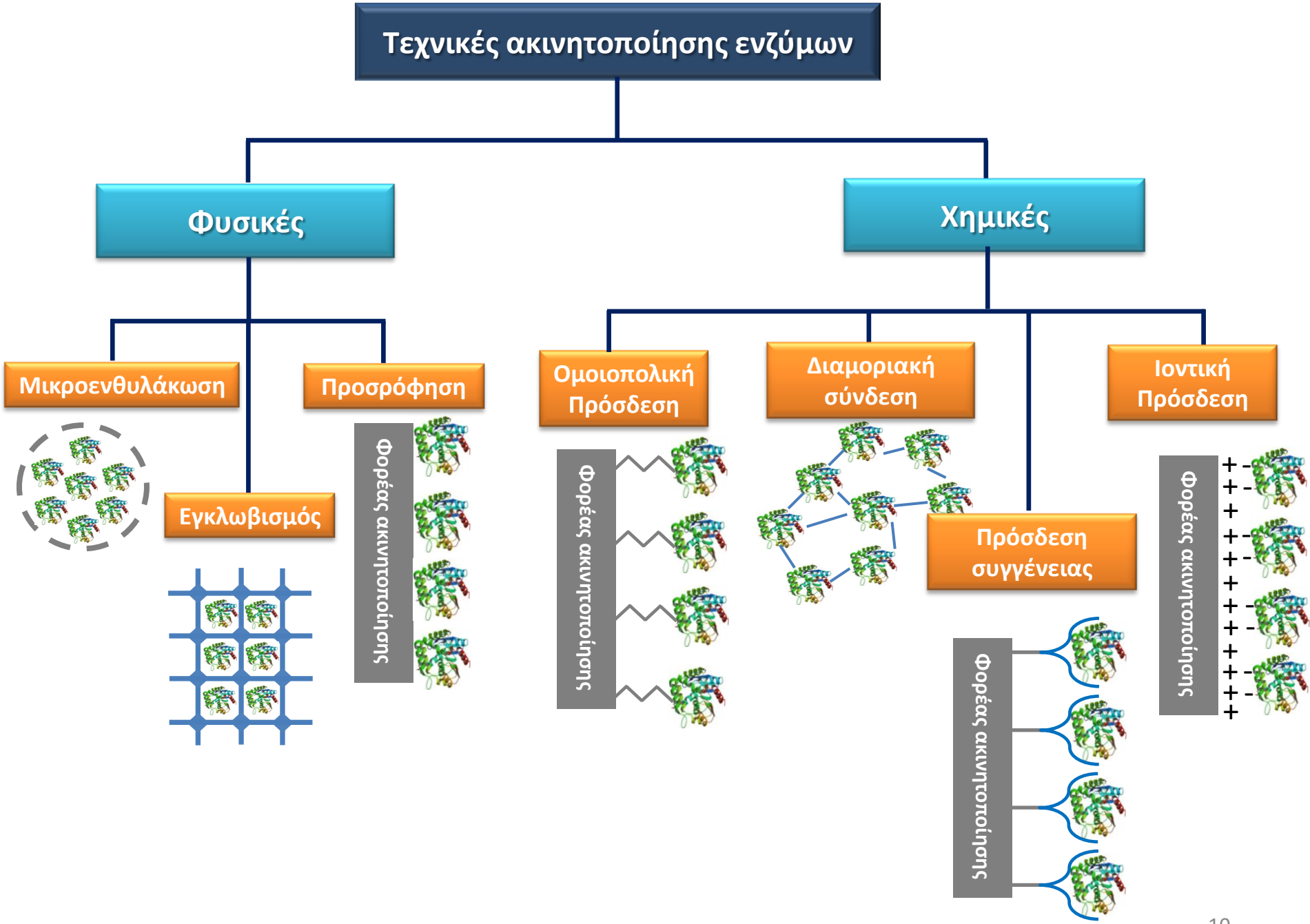
Προστασία του ενζύμου από την απενεργοποίηση → Αυξημένη σταθερότητα

Επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου για πολλούς κύκλους αντίδρασης, γεγονός που οδηγεί σε μείωση του συνολικού κόστους παραγωγής

Δυνατότητα τερματισμού της αντίδρασης απομακρύνοντας τον βιοκαταλύτη από το μίγμα της αντίδρασης

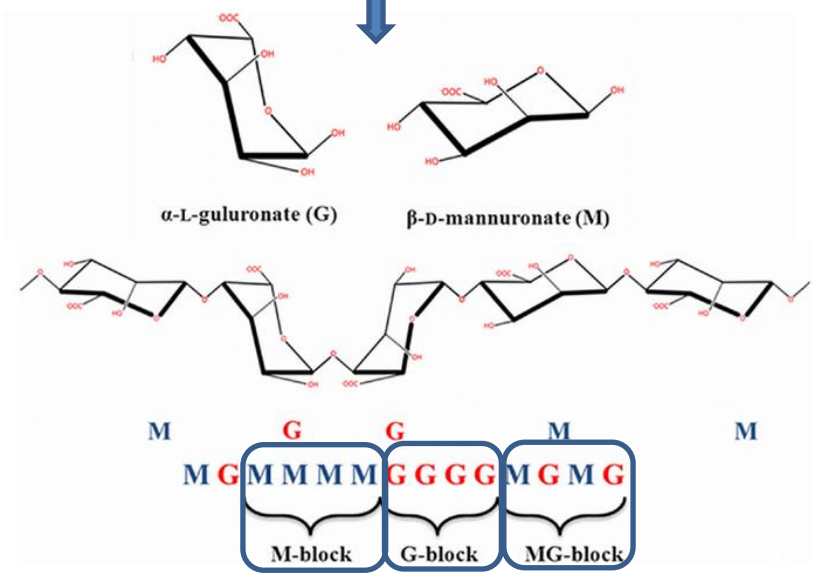
Ευκολία απομάκρυνσης του προϊόντος από το μίγμα της αντίδρασης

Το προϊόν δεν «μολύνεται» από το ένζυμο

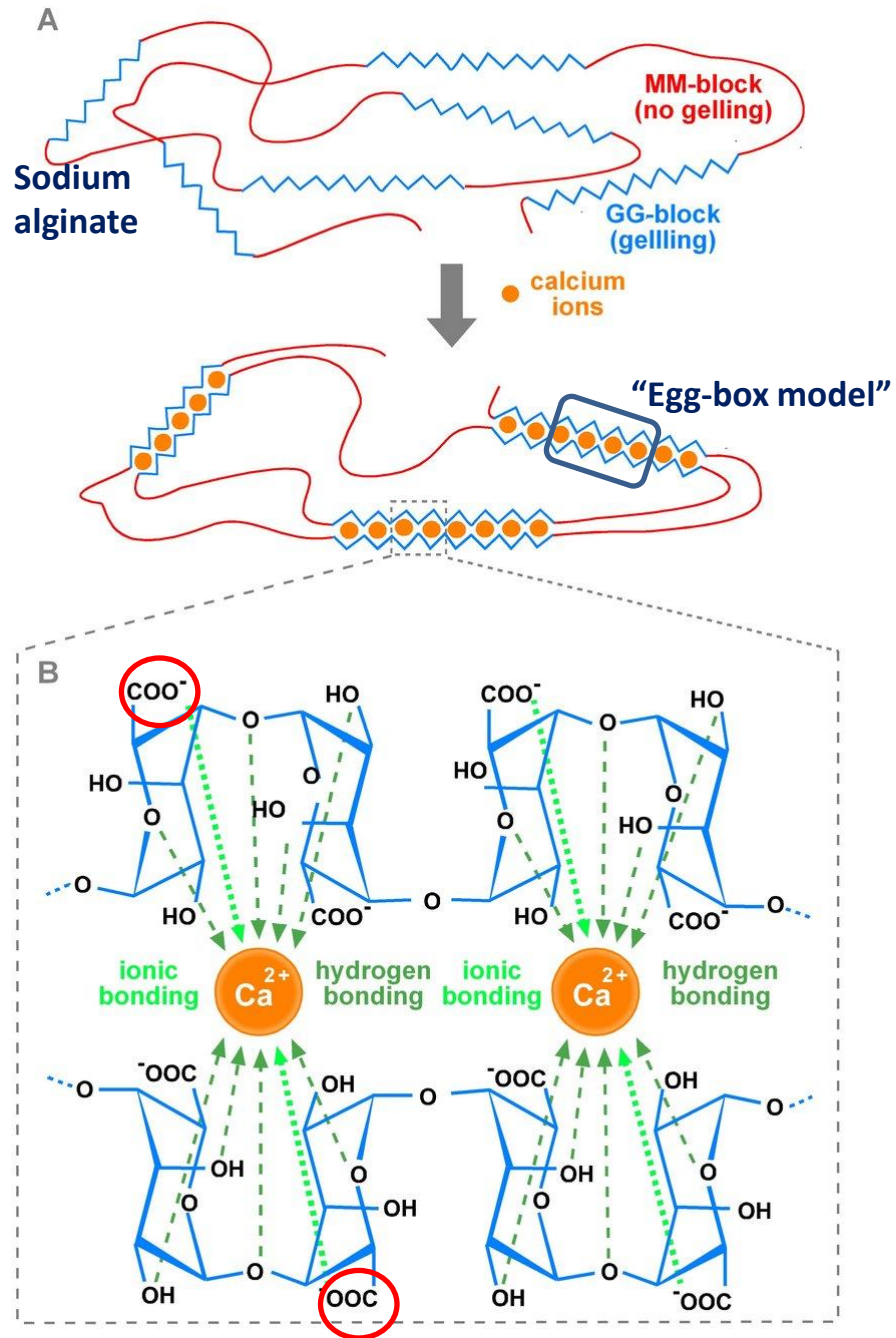

Τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμων
Φυσικές
Χημικές
Μικροενθυλάκωση
Εγκλωβισμός
Προσρόφηση
Φορέας ακινητοποίησης
Ομοιοπολική Πρόσδεση
Φορέας ακινητοποίησης
Διαμοριακή σύνδεση
Πρόσδεση συγγένειας
Φορέας ακινητοποίησης
Ιοντική Πρόσδεση
Φορέας ακινητοποίησης

Δομή αλγινικού οξέος

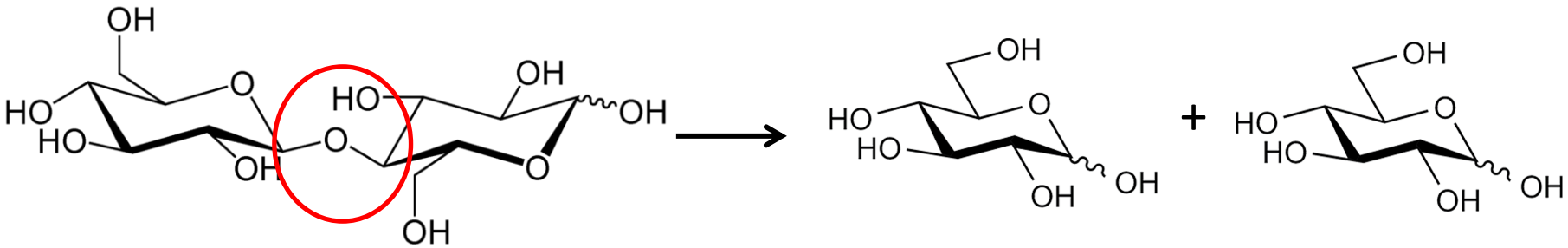
Seaweeds ή kelps (*Macrocystis, Laminaria, Ascophullum, κ.α.*)



Σχηματισμός γέλης



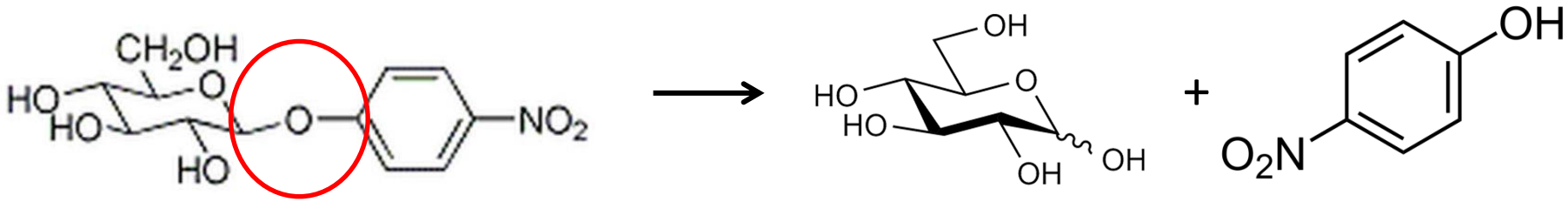
β-γλυκοζιδάση



Κελλοβιόζη
(υπόστρωμα)

β-γλυκοζιδάση

Γλυκόζη + Γλυκόζη
(Προϊόντα)



p-νιτροφαίνυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίδιο

Γλυκόζη

pNP