

Biotehnologija

Uvod

Pripravljalni procesi

Biotehnologija

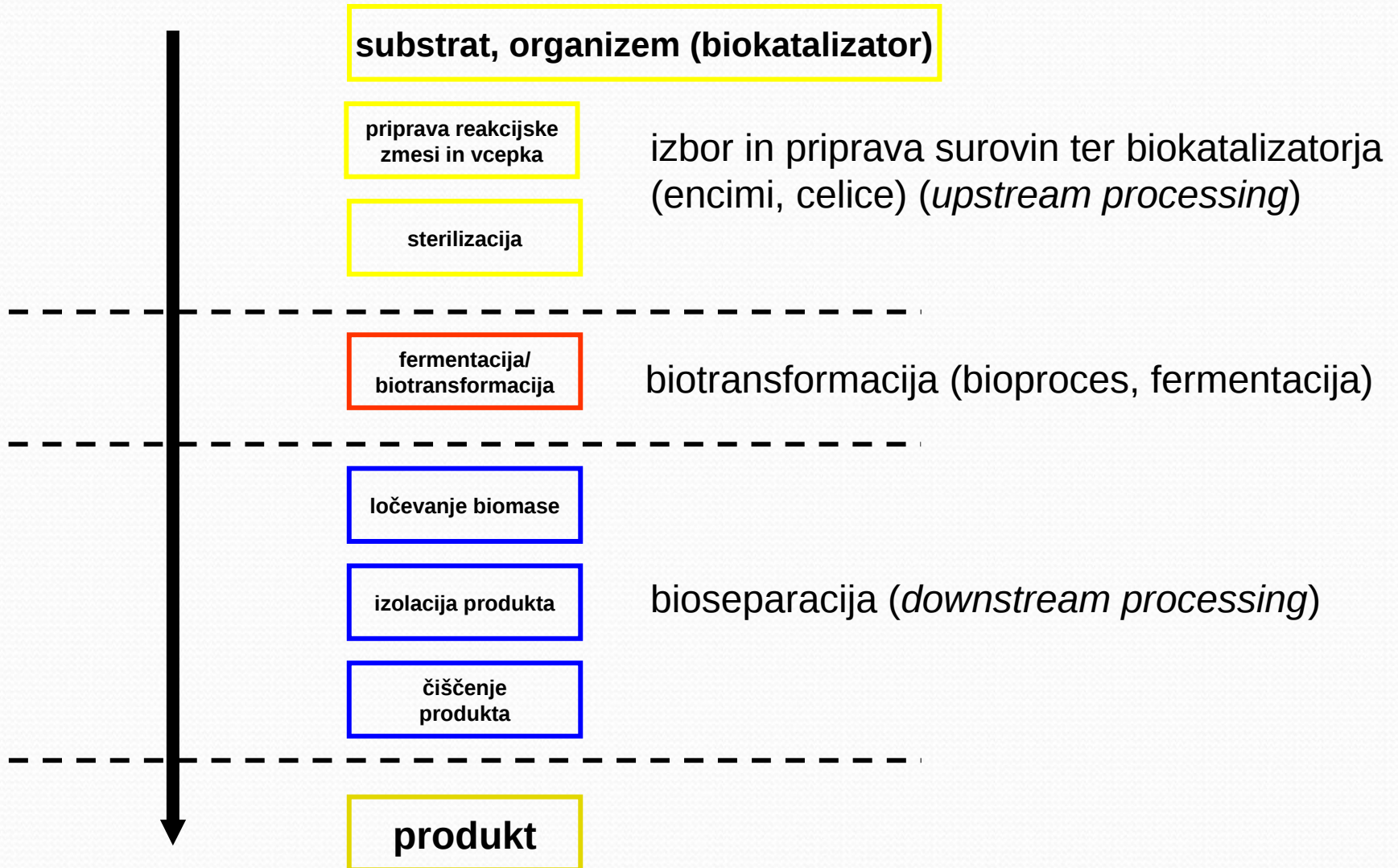
- Več definicij

Proizvodnja produktov z uporabo celic ali njihovih sestavnih delov

- Interdisciplinarno področje, ki združuje znanja biologije, (bio)kemije, kemijskega inženirstva, mikrobiologije, molekularne biologije, ...

- Relativno mlado področje, ki pa izjemno hitro napreduje

Stopnje biotehnoškega procesa



Fermentacije in biotransformacije

Biotehnološki procesi (fermentacije):

- **številne** katalitske stopnje med substratom in produktom

Biotransformacije

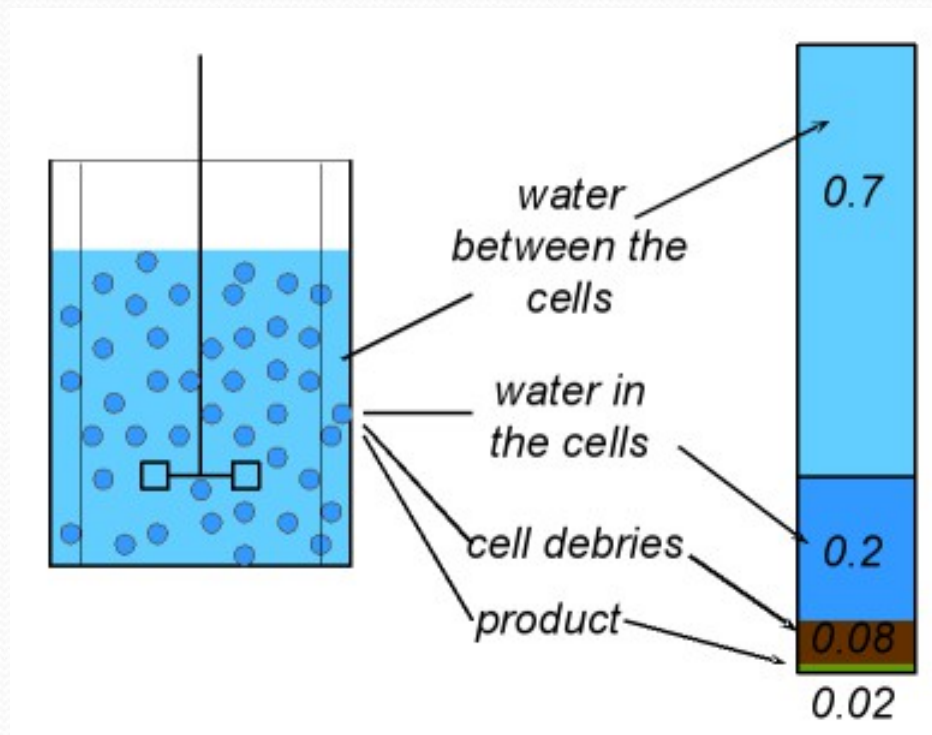
- **ena** ali **nekaj** zaporednih encimskih reakcij
- substrati običajno **kompleksne** organske molekule
- substrati in produkti imajo **podobno kemijsko strukturo**

Sestava fermentacijske brozge

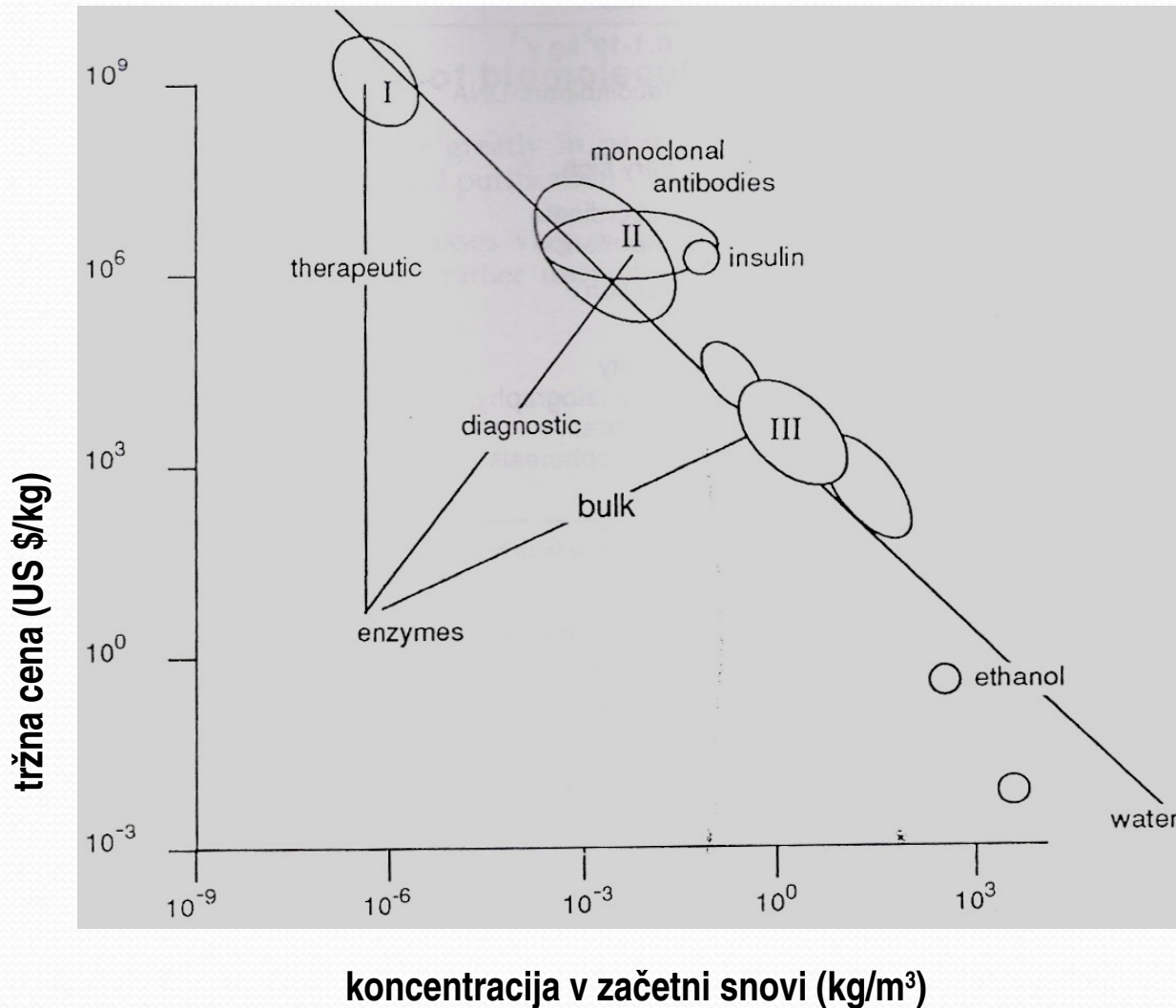
voda:

80% pri proizvodnji etanola

95% pri nekaterih terapevtskih proteinih



Odvisnost tržne cene od koncentracije v osnovnem viru (brozga, krvna plazma...)



- I:** terapevtski proteini (faktor VIII, urokinaza)
- II:** diagnostični encimi, monoklonska protitelesa, inzulin, luciferaza, glicerofosfat dehidrogenaza
- III:** industrijska proizvodnja v velikih količinah (antibiotiki, proteaze, amilaze, organske kisline, etanol)

Vir: J.L. Dwyer, 1984, *Bio/Technology* 2, 957-964.

Značilnosti bioprocesov po tržnih področjih

	Področje I	Področje II	Področje III
Velikost proizvodnje	0,1 – 10 ² kg/leto	10 ³ – 10 ⁵ kg/leto	10 ⁶ – 10 ⁹ kg/leto
Produksijski organizem	rekombinantna DNA	delno rekombinantna DNA	nespremenjeni organizmi (<i>wild type</i>)
Čistost produkta	zelo visoka	visoka/zelo visoka	relativno nizka
Izkoristek procesa	ni pomemben	nizek/ni pomemben	zelo visok
Stroški surovin	majhen delež	20 – 50 % cene	50 – 90 % cene
Tehnike izolacije in čiščenja	afinitetna kromatografija, preparativna elektroforeza	adsorpcija, kromatografija, membranski procesi	filtracija, ekstrakcija, adsorpcija, obarjanje, uparjanje, membranski procesi

Cena izolacije in čiščenja:

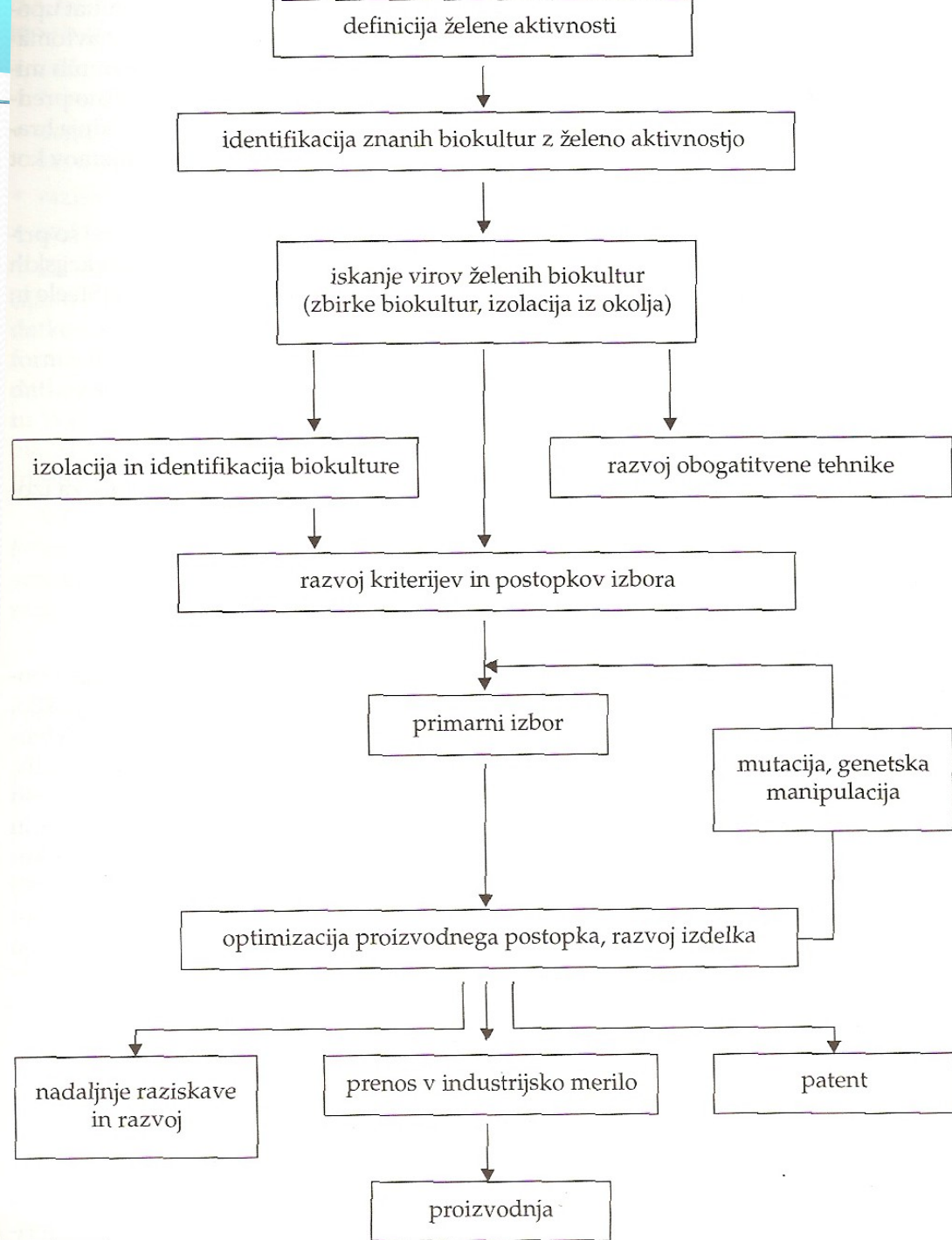
penicilin: 60% proizvodnih stroškov,

rekombinantni proteini, monoklonska protitelesa: 80-90%

Pripravljalni procesi v biotehnologiji

- Izbor in priprava industrijskih biokultur
- Izbor in priprava substratov
- Sterilizacija substratov in opreme

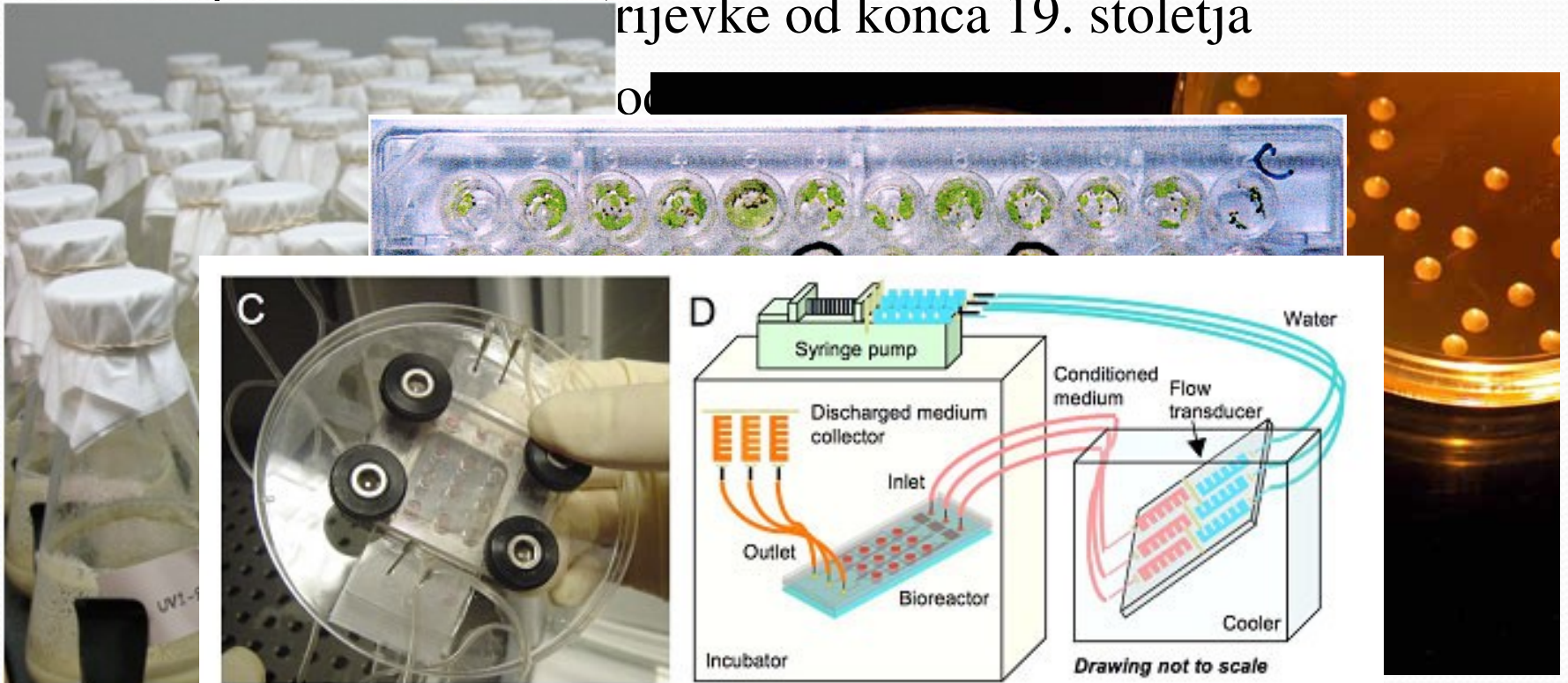
Splošna shema izbora novih industrijskih biokultur



Razvoj bioreaktorske tehnike

- laboratorijsko merilo:

rijevke od konca 19. stoletja



Laboratorijska bioreaktorska tehnika danes

- laboratorijsko merilo – razvoj bioprosesov:
 - 0,5 do 10 L mešalni bioreaktorji, učinkovit nadzor
 - sistemi paralelnih reaktorjev 0,2 do 0,5 L z avtomatiziranim odvzemom vzorcev in nadzorom temperature, pH, pO_2 , mešanja, zračenja in dohranjevanja
 - problem: za večje število poskusov potrebno več časa za pripravo sterilne opreme, velika poraba kemikalij



Miniaturizacija bioreaktorske tehnike

- močan trend bioprocenane industrije
- inovativne poti za prihranek časa, dela in materiala
- zmanjševanje naprav v zgodnjih fazah
 - selekcija organizmov
 - optimizacija gojišč
 - definiranje pogojev procesa
- tradicionalna uporaba erlenmajeric
 - zelo slaba ponovljivost
 - neprimerljivost z mešalnimi reaktorji
 - slabo mešanje in prenos plinov v kapljevino



Miniaturizacija bioreaktorske tehnike

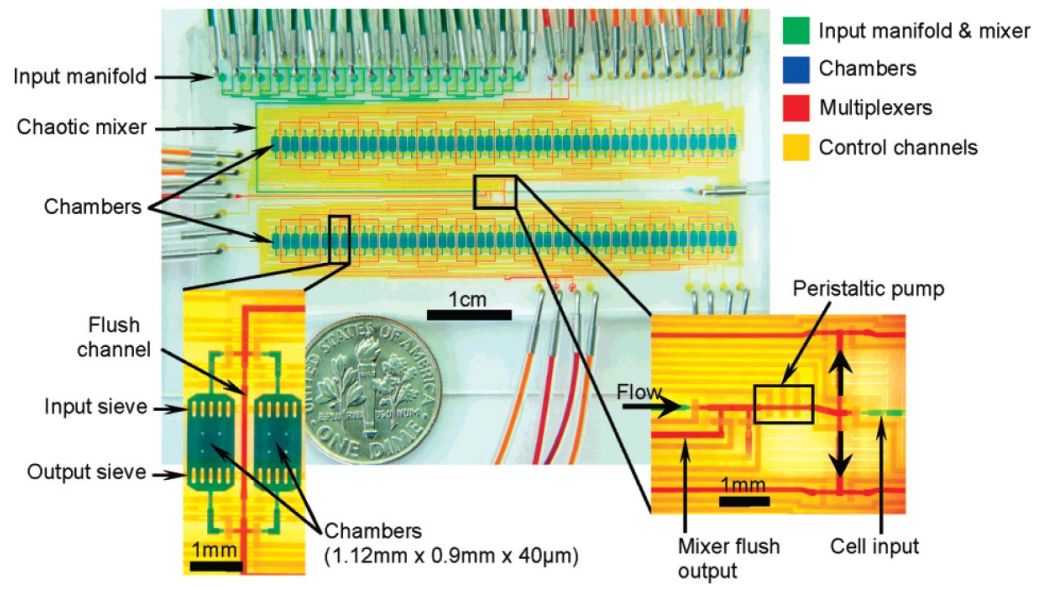
Mikrotitrne plošče – iz kombinatorne kemije

- zelo hitra izvedba bistveno večjega števila vzporednih poskusov ob manjši porabi kemikalij
- avtomatizirano neodvisno spremljanje in kontrola posameznih miniaturiziranih reaktorjev (vdolbinic)
 - optične meritve biomase
 - pH
 - pO_2
 - fluorescenca



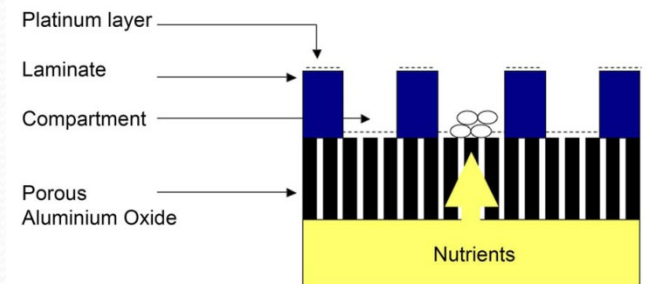
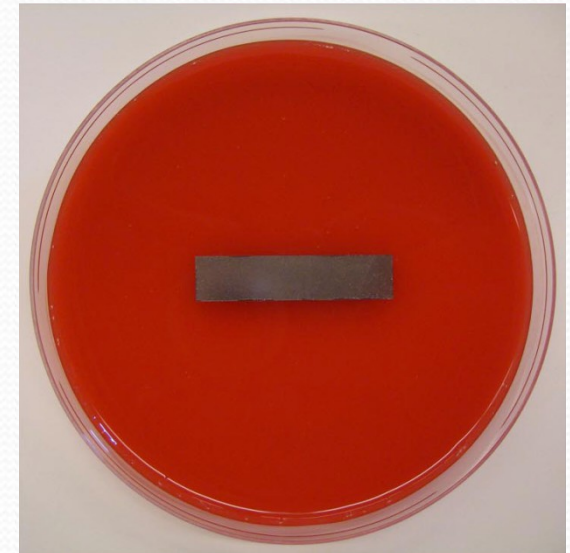
Miniaturizacija bioreaktorske tehnike

mikrofluidni čipi s komorami za gojenje celic



vsaka komora prostornina 60 nL

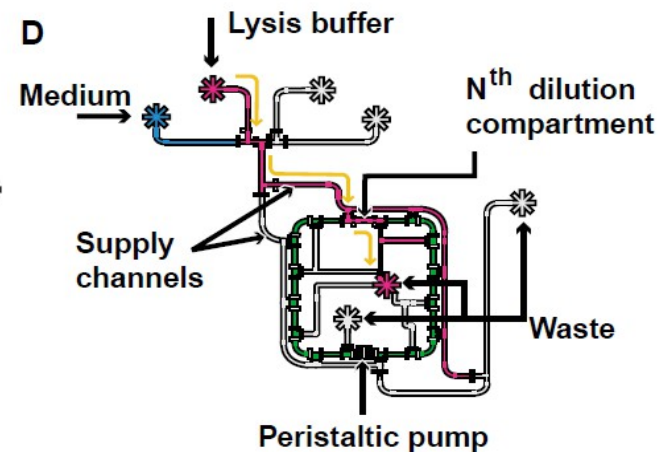
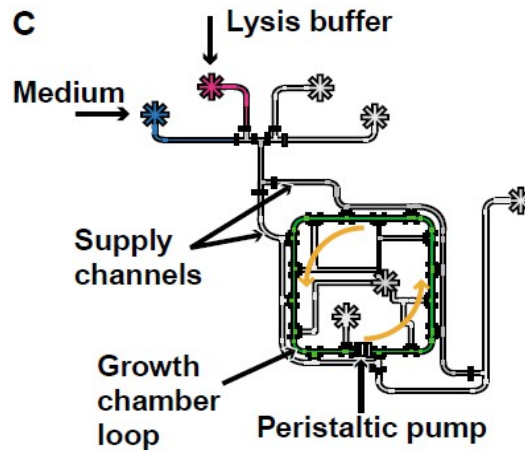
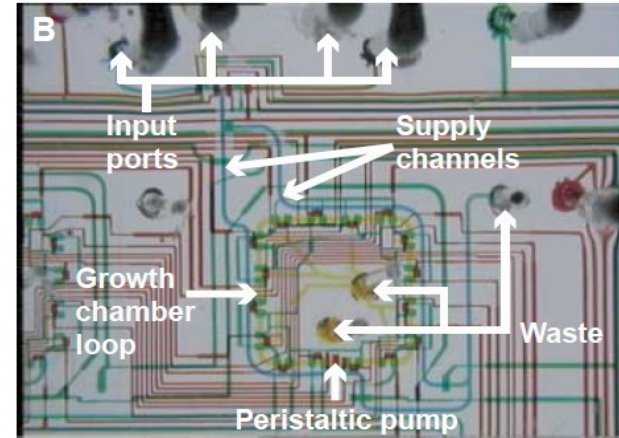
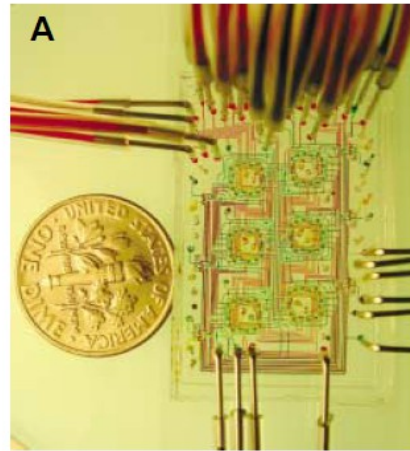
mikro Petrijeve plošče



Miniaturizacija bioreaktorske tehnike: mikrokemostat

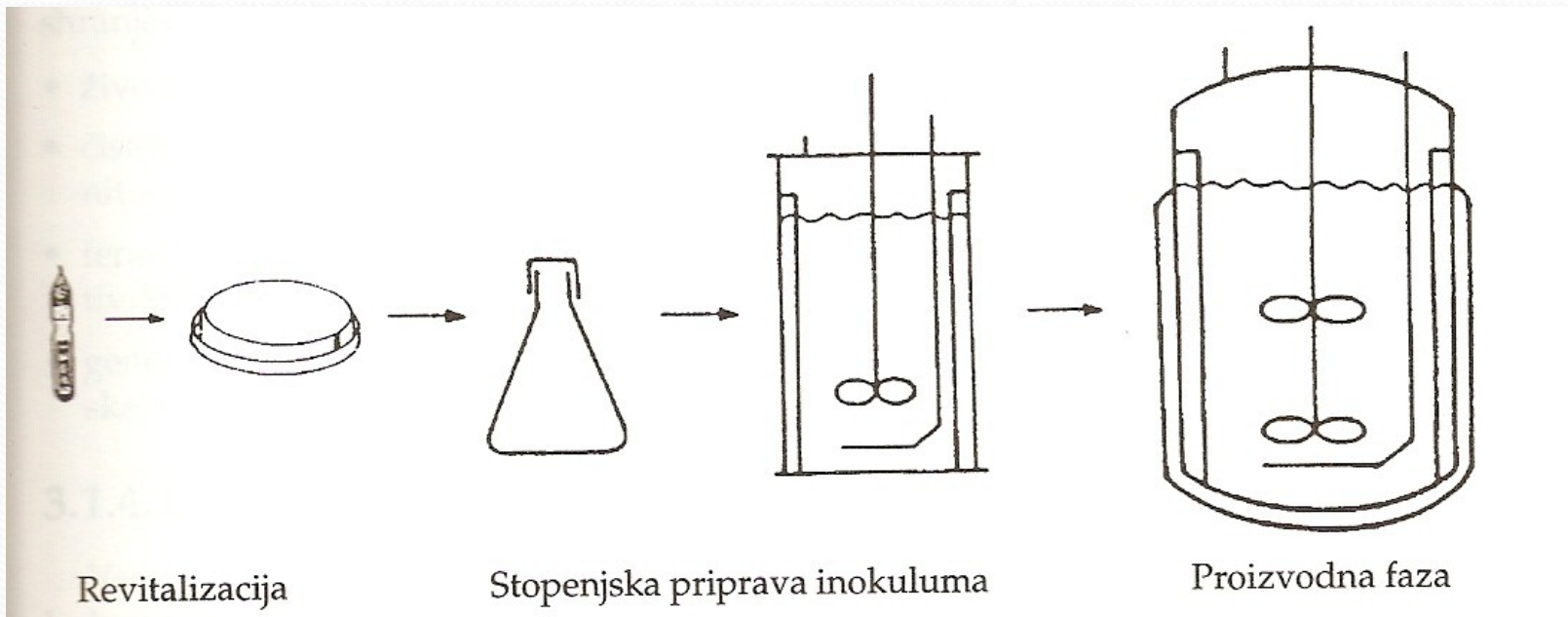
6 ločenih komor, vsaka 16 nL

možnost on-line spremljanja pH, T, pO_2 , koncentracije celic



Balagaddé FK, You L, Hansen CL, et al. (2005) Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 309: 137-140

Priprava aktivne biokulture



Priprava substratov

- Izbor substratov določajo:
 - Sestava mikroorganizmov
 - Metabolizem
 - Tehnološki preizkus
 - Ekonomika procesa
- Kemijsko definirana gojišča (podrobno poznamo sestavo)
- Kompleksna gojišča (mešanice različnih snovi)

Sestava gojišča

- Voda
- Vir C:
 - ogljikovi hidrati (monosaharidi, disaharidi, oligosaharidi, polisaharidi)
 - Ogljikovodiki (alkani, metanol,...)
- Vir N:
 - Amonijeve spojine, nitrati, sečnina
 - Aminokisljine in proteini
 - Ekstrakti in hidrolizati

Kompleksna gojišča

Okvirna sestava koruznega sirupa

Sestavina	Vsebnost (%)
voda	45–55
skupni dušik	3–4
aminski dušik	1–2
sladkorji	1–6
mlečna kislina	5–20
hlapne kisline	0,1–0,3
pH	3,9–5,1
pepel	9–10
P	2–3
K	1–2
***aminokisline	Ala > Arg > Glu > His > Leu > Thr > Pro > Lys > Val > Ile > Phe > Asp > Cys > Met...

Sestava gojišča

- Vir P (med 0,1 in 500 mM)
 - fosforjeva (V) kislina ali njene soli
- Viri drugih elementov – mikronutrienti (celo pod 10^{-6} ali celo 10^{-9} M)
 - S: sulfat
 - Fe
 - Mg,...
- Viri drugih organskih snovi (med 10^{-6} in 10^{-12} M):
 - Vitamini (v kompleksnih substratih)

Sestava gojišča

Tabela 3.2-6: Vsebnost vitaminov v nekaterih surovinah

Vitamin ($\mu\text{g/g}$)	Moka			Melasa	
	koruzna	ječmenova	sojina	pesna	trsna
tiamin	4,5	6,5	13,5	0,8	0,8
riboflavin	0,9	1,2	3,5		
nikotinat	23	115	25	35	15
pantotenat	4,6	4,4	26	50	20
piridoksal	6,9	11,5	8,5		
biotin	0,1		0,7	0,1	1,5
inozitol			3850	5000	2000
holin		1100	2880		

Sterilizacija substratov in opreme

- Običajno v procesu monokulture: zahteva po zagotavljanju sterilnega obratovanja
- Sterilizacija: postopki, v katerih odstranjujemo ali uničujemo mikroorganizme
- Kontaminacija: vdor drugih mikroorganizmov → izjemne izgube

Načini sterilizacije v laboratorijskem merilu

- Kemijska sterilizacija
 - etilen oksid, ozon, formaldehid,...
- Sterilizacija z uporabo radiacije
- Filtracija (membranski filtri)
- Toplotna sterilizacija (mokra, suha)



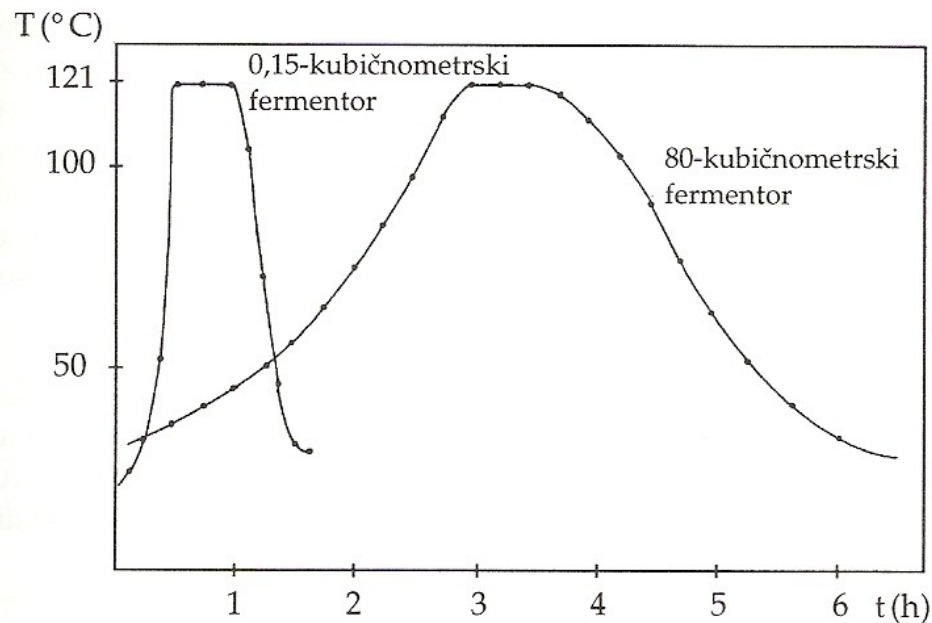
Načini sterilizacije

- Sterilizacija s filtracijo (membrane)
 - Sterilizacija plinov in kapljev
 - Pore membran za sterilizacijo običajno med 0,1 in 0,45 μm
 - Membranski filtri s slojem vlaken: možno odstranjevanje delcev do 0,01 μm
 - Materiali za membrane:
 - Hidrofilni polimeri (celulozni estri, PC, PA)
 - Hidrofobni polimeri (PTFE, PP)
 - Keramika (Al_2O_3 , ZrO_2)



Načini sterilizacije v industriji

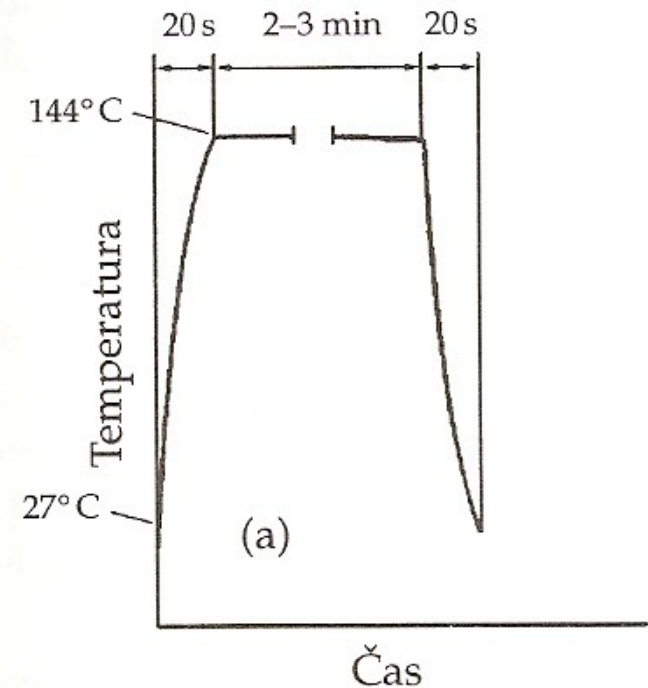
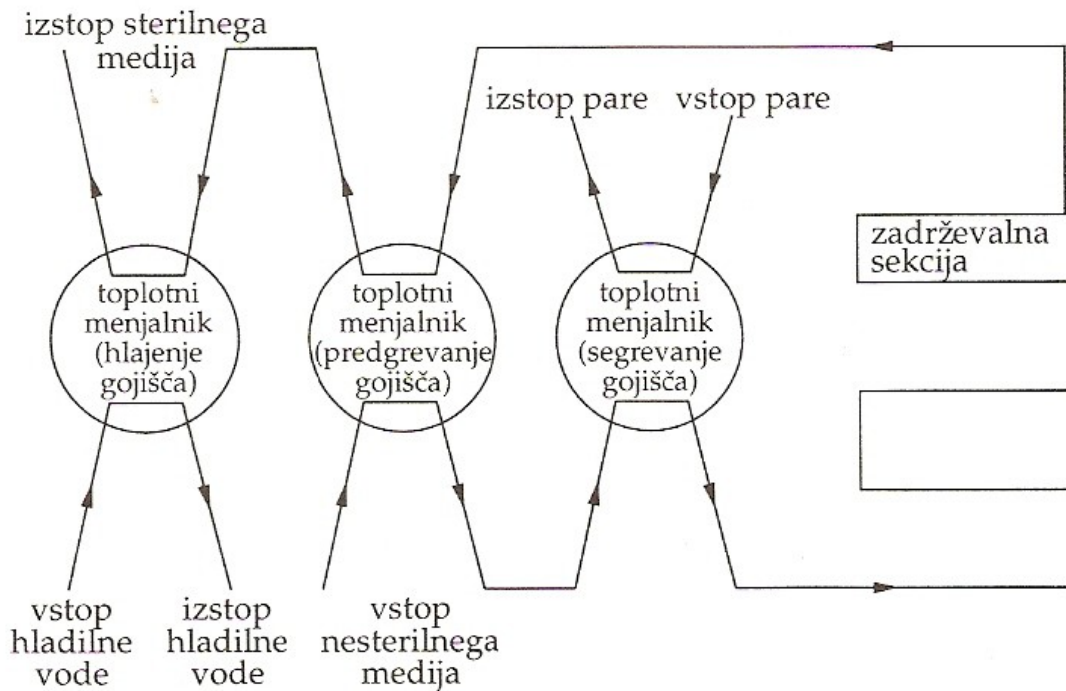
- Toplotna sterilizacija
 - Šaržna sterilizacija



Slika 3.3-4: Časovni potek temperature pri šaržni sterilizaciji v pilotnem ($0,15 \text{ m}^3$) in industrijskem (80 m^3) fermentorju

Načini sterilizacije v industriji

- Kontinuirna toplotna sterilizacija: v namensko izdelanih sterilizatorjih



Primer: kontinuirni sterilizator s ploščnim (ali spiralnim) toplotnim izmenjevalnikom