

# Biotehnologija

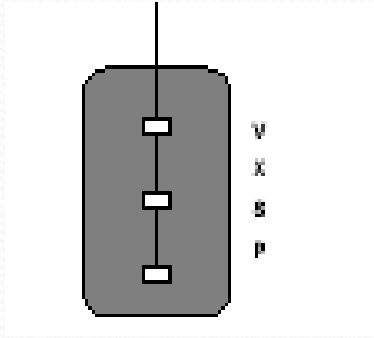
Načini vodenja bioprocessov

Bioreaktorji

Zaključni procesi

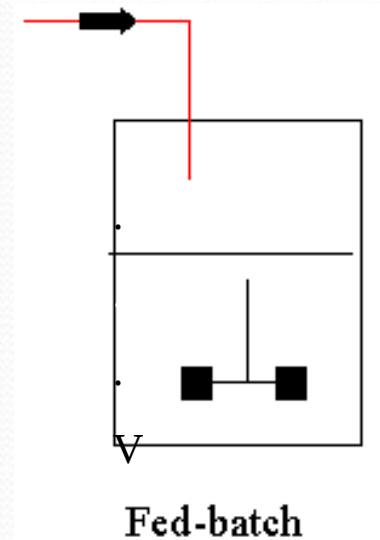
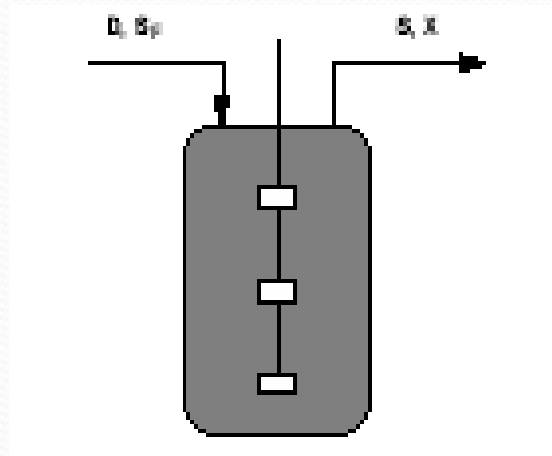
# Načini obratovanja

- Šaržni



- Šaržni z napajanjem substrata ali gojenje z dohranjevanjem

- Kontinuirno gojenje

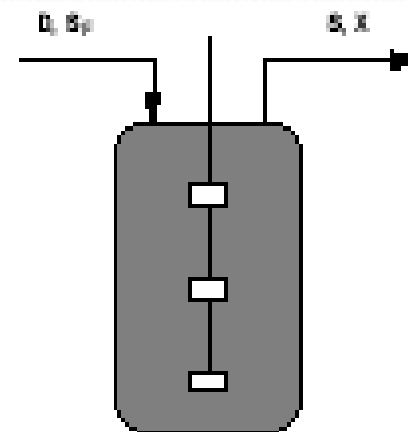


# Načini vodenja bioprocessov

- Šaržni bioproces
  - ni vtoka in iztoka → konstantna delovna prostornina
  - enostaven, zelo razširjen
  - nestacionarni pogoji
  - veliko neproduktivnih faz procesa (priprava vcepka, sterilizacija, čiščenje...)
- Šaržni bioproces z napajanjem
  - vtok → prostornina se povečuje
  - kadar imamo inhibicijo ali deaktivacijo s substratom in/ali neželjene metabolne poti ob visokih koncentracijah substrata (pridobivanje kvasa)

# Načini vodenja bioprocsov

- Kontinuirni bioproces
  - vtok in iztok
  - če sta oba pretoka enaka, imamo konstantno prostornino
  - omogočeni stacionarni pogoji: kemostat
  - dolgotrajno delovanje
  - zelo visoke produktivnosti
  - možnost okužb, mutacij



# Načrtovanje bioprocessov

- Simulacije na osnovi matematičnega modela
- Modeliranje je osnova za fleksibilno, nenevarno in cenovno učinkovito preučevanje obravnavanega procesa in je še zlasti pomembno zato, ker omogoča reševanje problemov z minimalnim obsegom meritev.
- Matematični modeli nam med drugim omogočajo spoznavanje procesov ter vpliv parametrov modela na potek procesnih spremenljivk.
- Z modelom poskušamo opisati realno in praviloma zelo kompleksno dogajanje s poenostavljenimi in razumljivimi fizikalnimi analogijami v obliki matematičnih enačb



# TEMELJI MODELA

## Naravni zakoni

- ohranitvena načela
- termodinamska načela

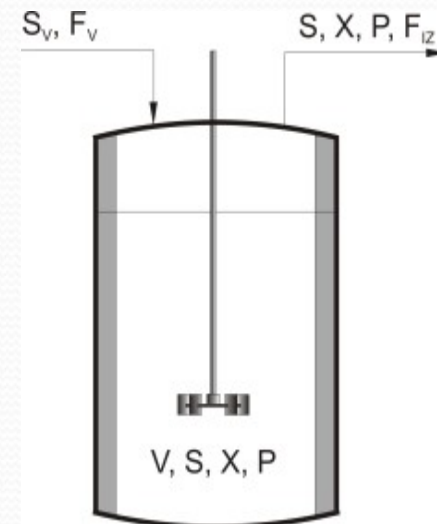
## Konstitutivne zveze

## Obratovalni pogoji

### ➤ Definiranje sistema

- meje sistema in okolje

### ➤ Določitev odvisnih in neodvisnih spremenljivk



Prikaz procesnih spremenljivk pri idealno pomešanem mešalnem bioreaktorju z vtokom in iztokom.

# Masne bilance

## ŠARŽNO GOJENJE

V je konst.

$$V \frac{dX}{dt} = r_x V \quad \text{oz.} \quad \frac{dX}{dt} = r_x$$

$$V \frac{dS}{dt} = r_s V \quad \text{oz.} \quad \frac{dS}{dt} = r_s$$

$$V \frac{dP}{dt} = r_p V \quad \text{oz.} \quad \frac{dP}{dt} = r_p$$

## ŠARŽNO Z NAPAJANJEM

V ni konst.  $dV/dt = F$

$$\frac{d(CV)}{dt} = V \frac{dC}{dt} + C \frac{dV}{dt} = V \frac{dC}{dt} + CF_V(t)$$

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV$$

$$\frac{d(SV)}{dt} = FS_V + r_s V$$

$$\frac{d(PV)}{dt} = r_p V$$

## KONTINUIRNO GOJENJE

V je konst.

$F/V = D$  je konst.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - \frac{FX}{V} = \mu X - DX$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{FS_V}{V} + r_s - \frac{FS}{V} = D(S_V - S) + r_s$$

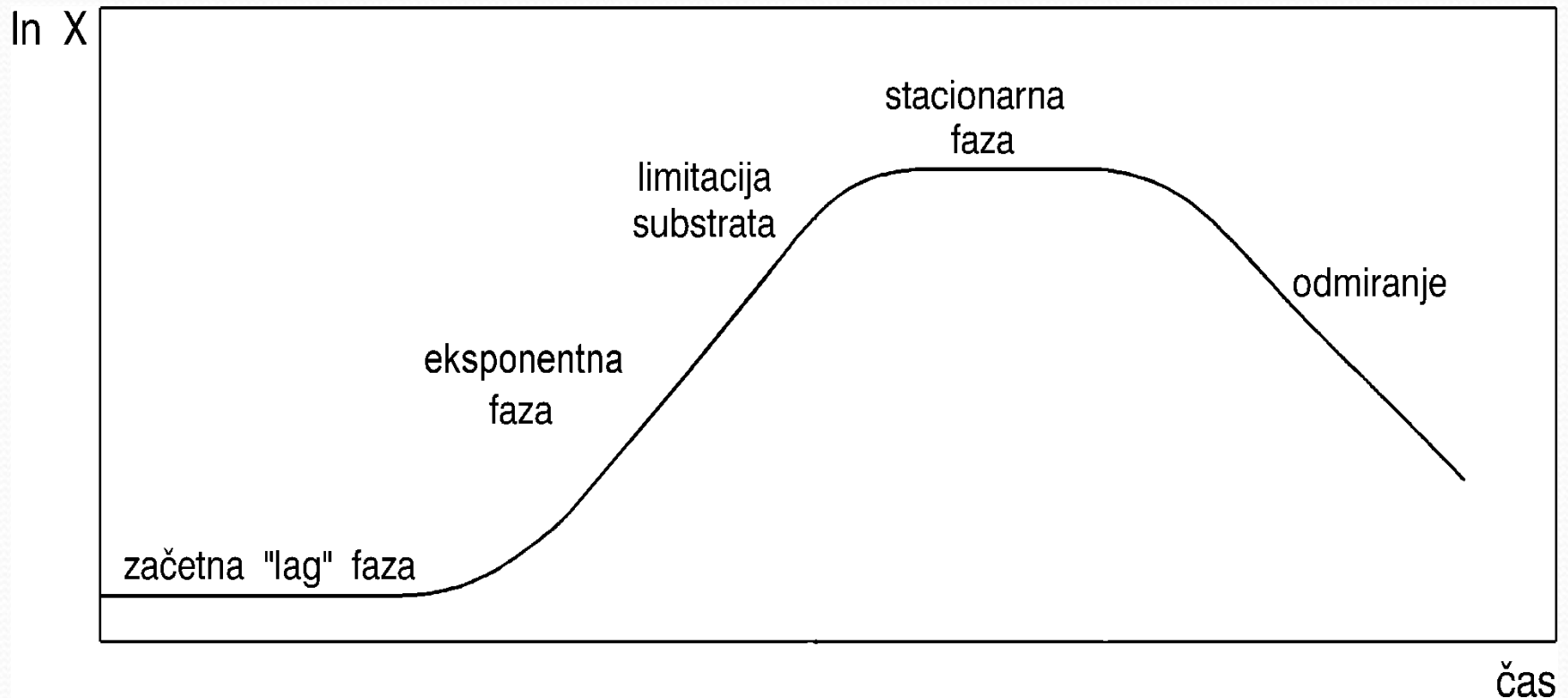
$$\frac{dP}{dt} = r_p - \frac{FP}{V} = r_p - DP$$

BIOMASA  
(X)

SUBSTRAT  
(S)

PRODUKT  
(P)

# Krivulja rasti mikroorganizmov v šaržnem procesu

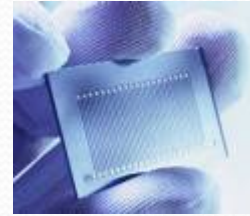




# Bioreaktorska tehnika

- Bioreaktorji
  - laboratorijsko merilo
    - razvoj novih biotehnoloških produktov
    - spremljanje in optimizacija bioprosesov
    - *in vitro* diagnostika
  - industrijska proizvodnja

→ prostornine od nekaj  $\mu\text{L}$  do več 10.000 L
- Instrumentacija za spremljanje in vodenje procesov

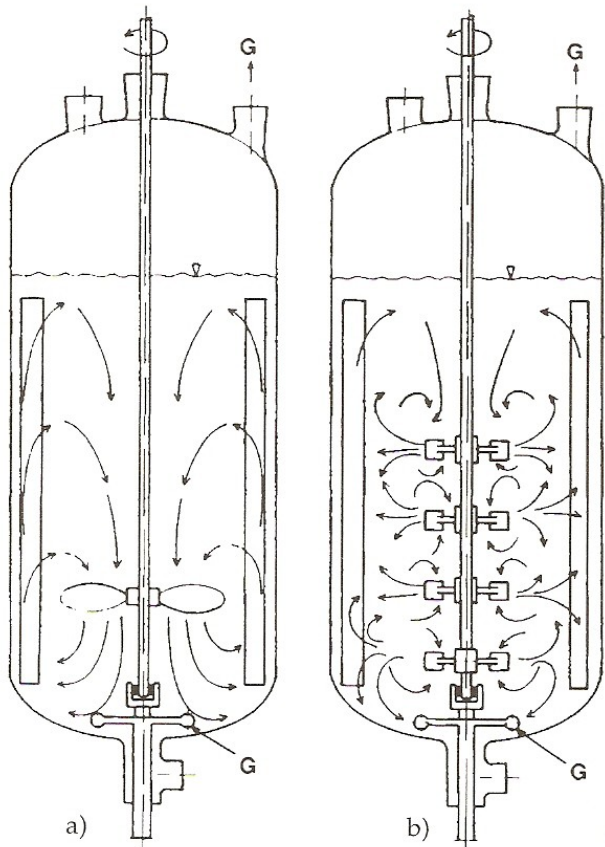


# Bioreaktorska tehnika

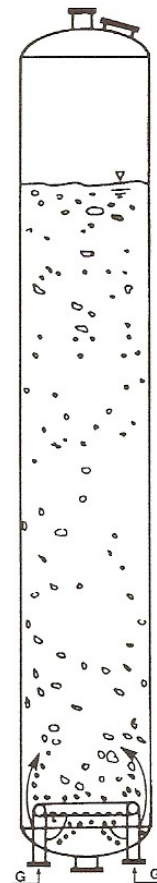
- Bioreaktorji za izvedbo biotransformacij
  - encimski bioreaktorji
  - bioreaktorji za pretvorbe s c
- Bioreaktorji za izvedbo fermentacij
  - aerobni procesi
  - anaerobni procesi
  - fotosintetski procesi
  - submerzno gojenje
  - gojenje na trdnih gojiščih
  - gojenje živalskih in človeških celic
  - čistilne naprave
  - bioplinarne...



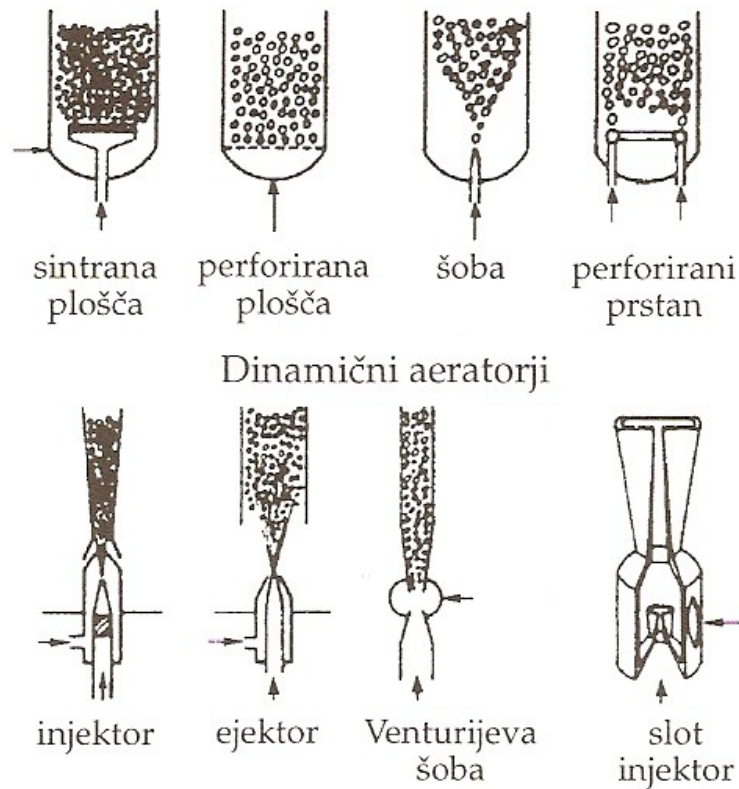
# Bioreaktorji za submerzno gojenje



mešalni bioreaktorji



kolona z mehurčki



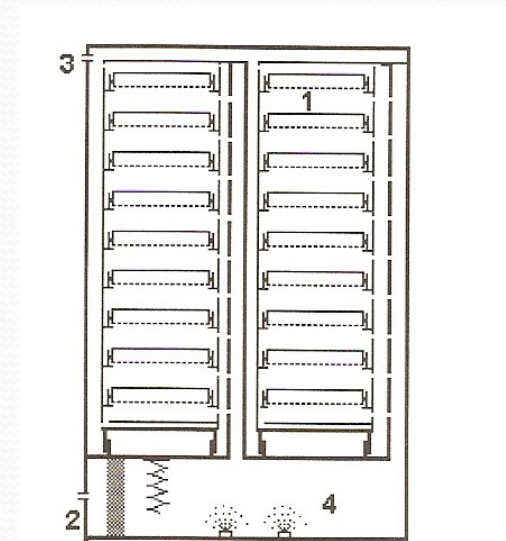
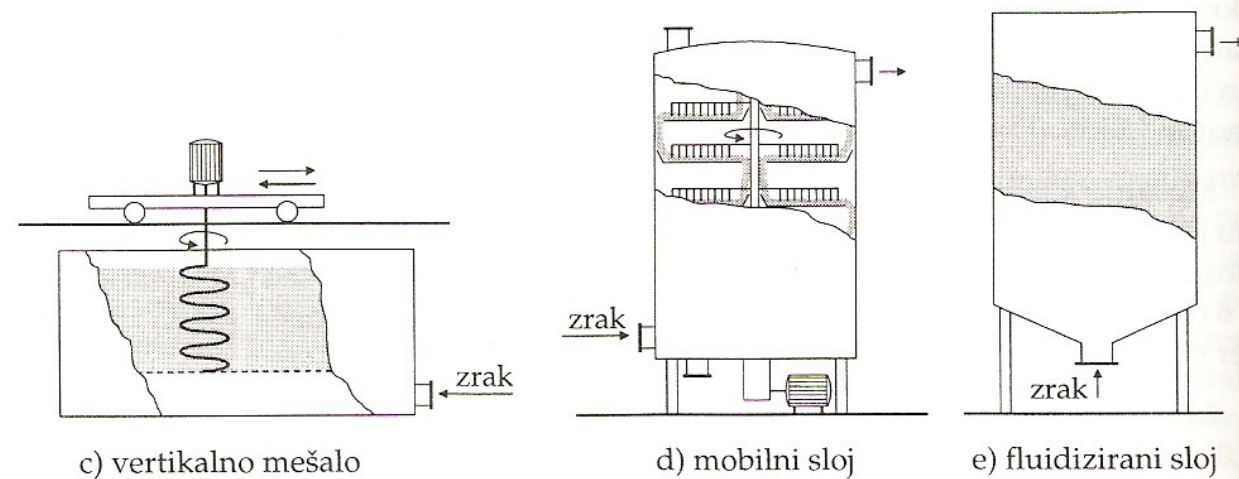
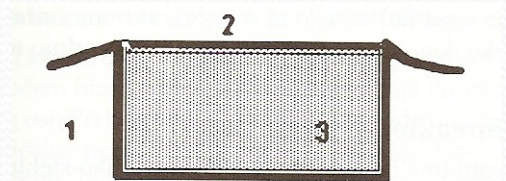
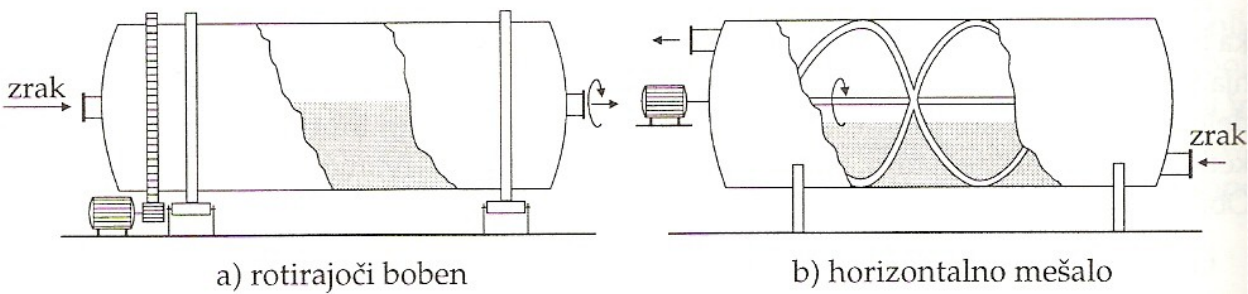
distributorji za pline

# Bioreaktorska tehnika



Prototip mešalnega bioreaktorja podjetja Bia d.o.o. iz leta 1992

# Bioreaktorji s trdnim gojiščem



## Laboratorijska bioreaktorska tehnika danes

### Komercialno dostopni bioreaktorji:

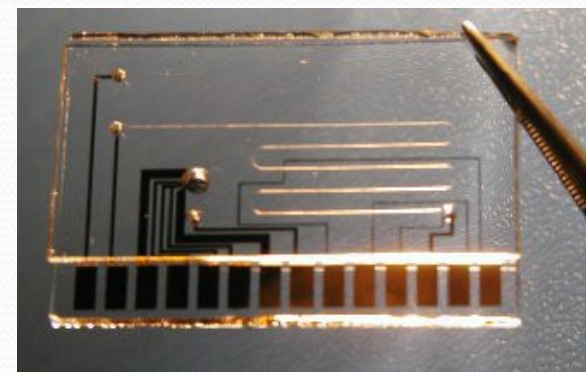
- za gojenje tkivnih kultur
  - za enkratno uporabo (iz različnih trdnih materialov)
  - specifično mešanje
  - od 50 do 2000 L
- za gojenje mikroorganizmov:
  - do 30.000 L,
  - celotne serije za prenos iz



# Miniaturizacija bioreaktorske tehnike

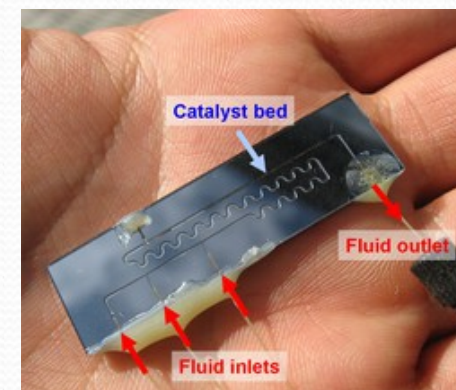


- Biotransformacije v mikroreaktorjih
- homogena in heterogena biokataliza



Lab-on-Chip iz stekla in polimera za pomnoževanje in analizo DNA

ovih substratov

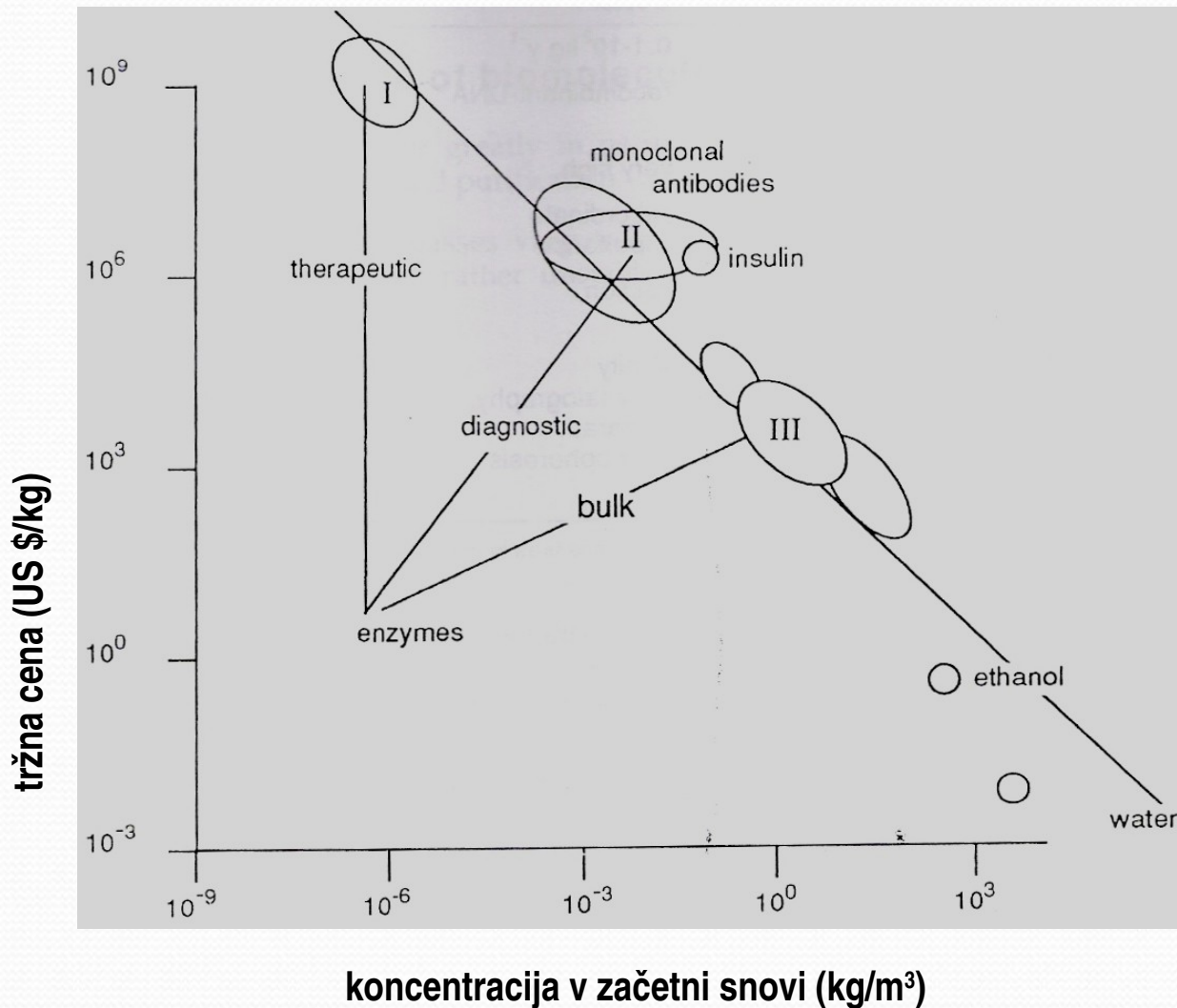


# Koncentracije produktov v reakcijskem mediju

Proces	Koncentracija produkta [ut. %]
200 m <sup>3</sup> šarža	
citronska kislina	10
mlečna kislina	5
etanol	7-12
50 - 200 m <sup>3</sup> šarža	
cefalosporin	3
penicilin	3-5
streptomicin	1
ekstracelularni encimi	0,5-1
50 m <sup>3</sup> šarža	
vitamin B12	0,005
riboflavin	0,1



# 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 bioprocessov po tržnih področjih

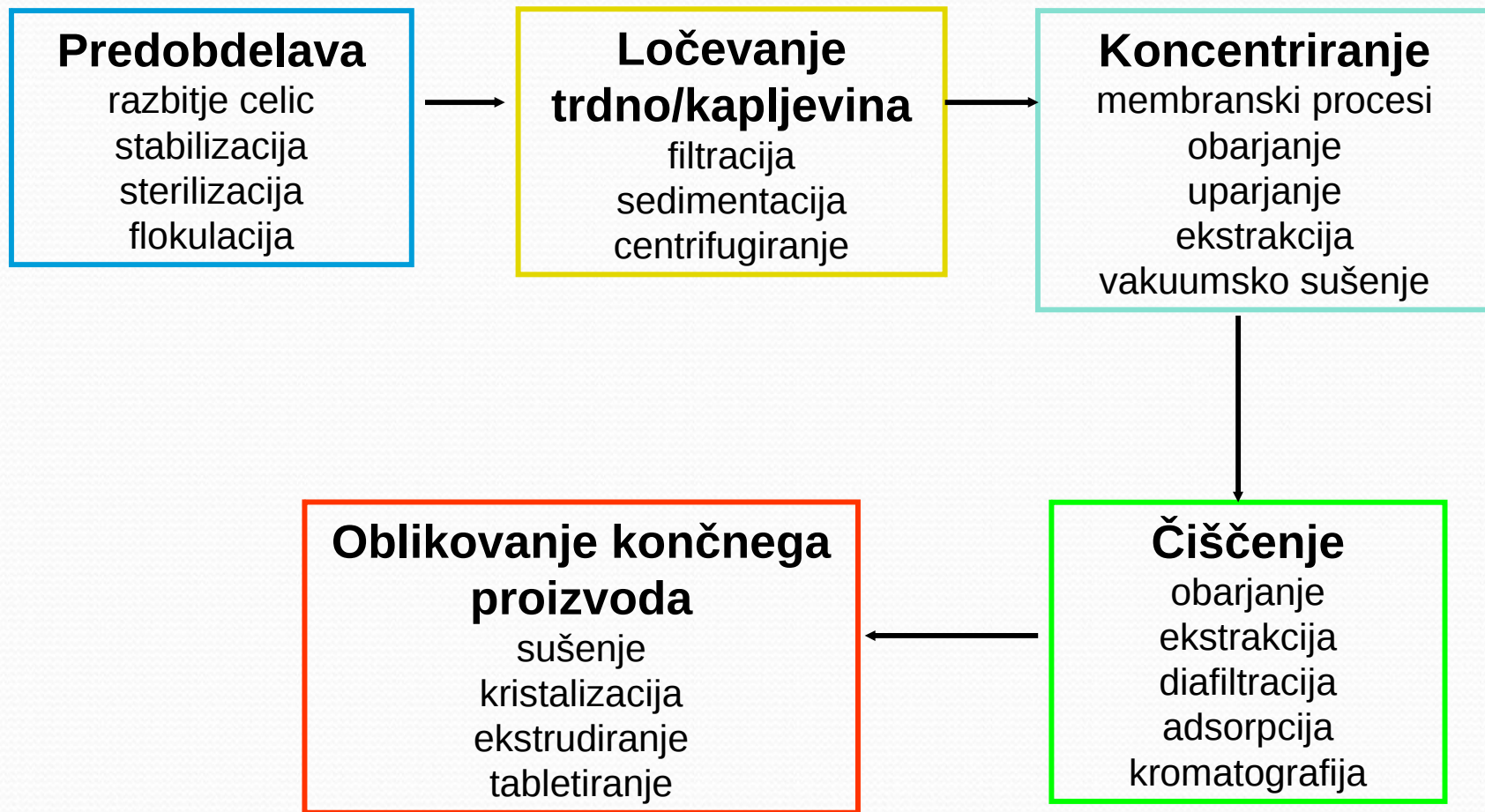
	Področje I	Področje II	Področje III
Velikost proizvodnje	0,1 – 10 <sup>2</sup> kg/leto	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>5</sup> kg/leto	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>9</sup> kg/leto
Produkcijski organizem	rekombinantna DNA	delno rekombinantna DNA	nespremenjeni organizmi ( <i>wild type</i> )
Čistost produkta	zelo 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:

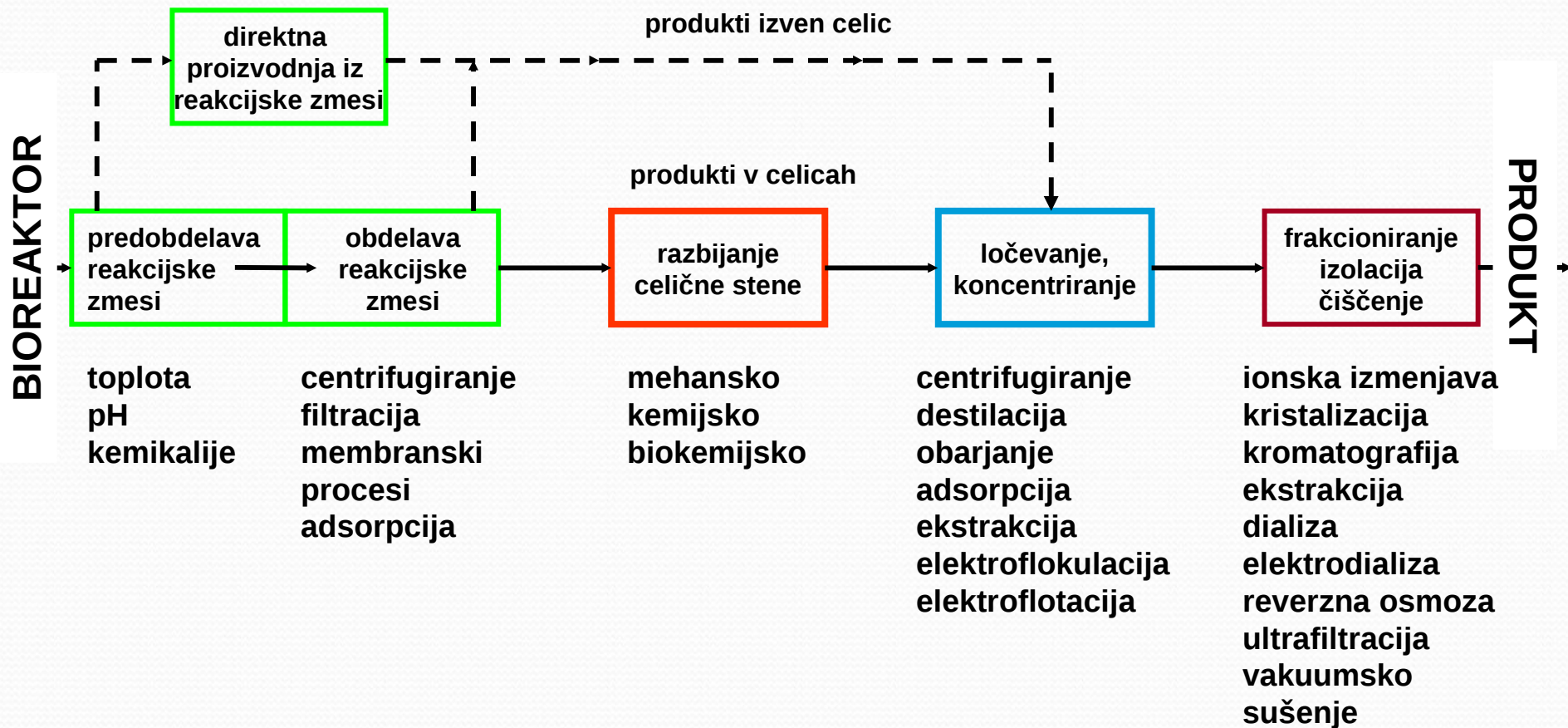
penicilin: 60% proizvodnih stroškov,

rekombinantni proteini, monoklonska protitelesa: 80-90%

# 5 glavnih stopenj pri izolaciji bioproduktov

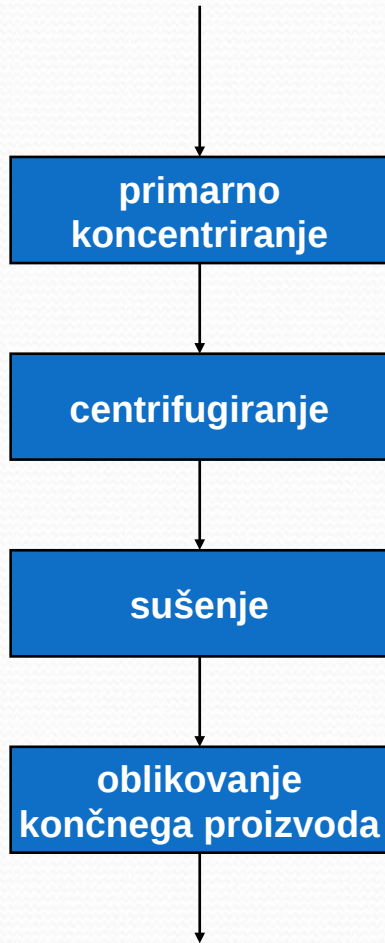


# Bioseparacijski procesi - razdelitev

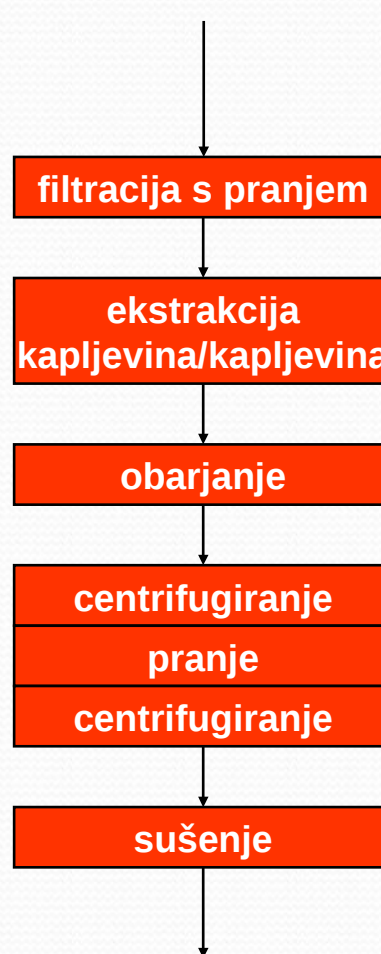


# Bioseparacijski procesi - zaporedje

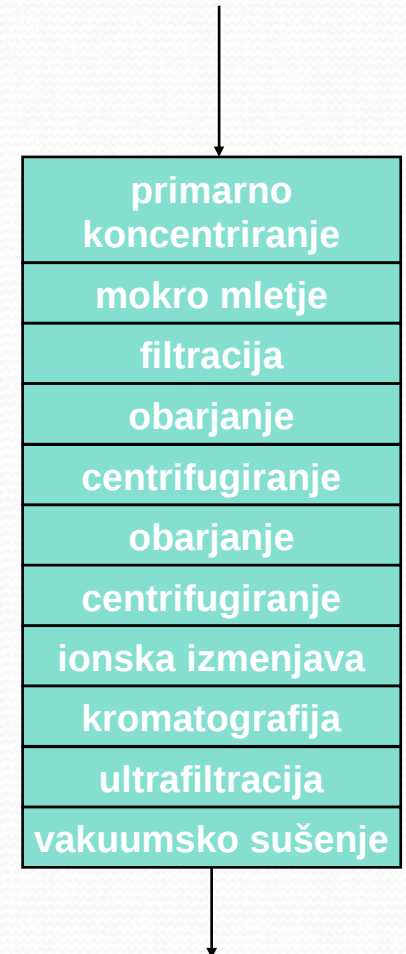
produkt = celica



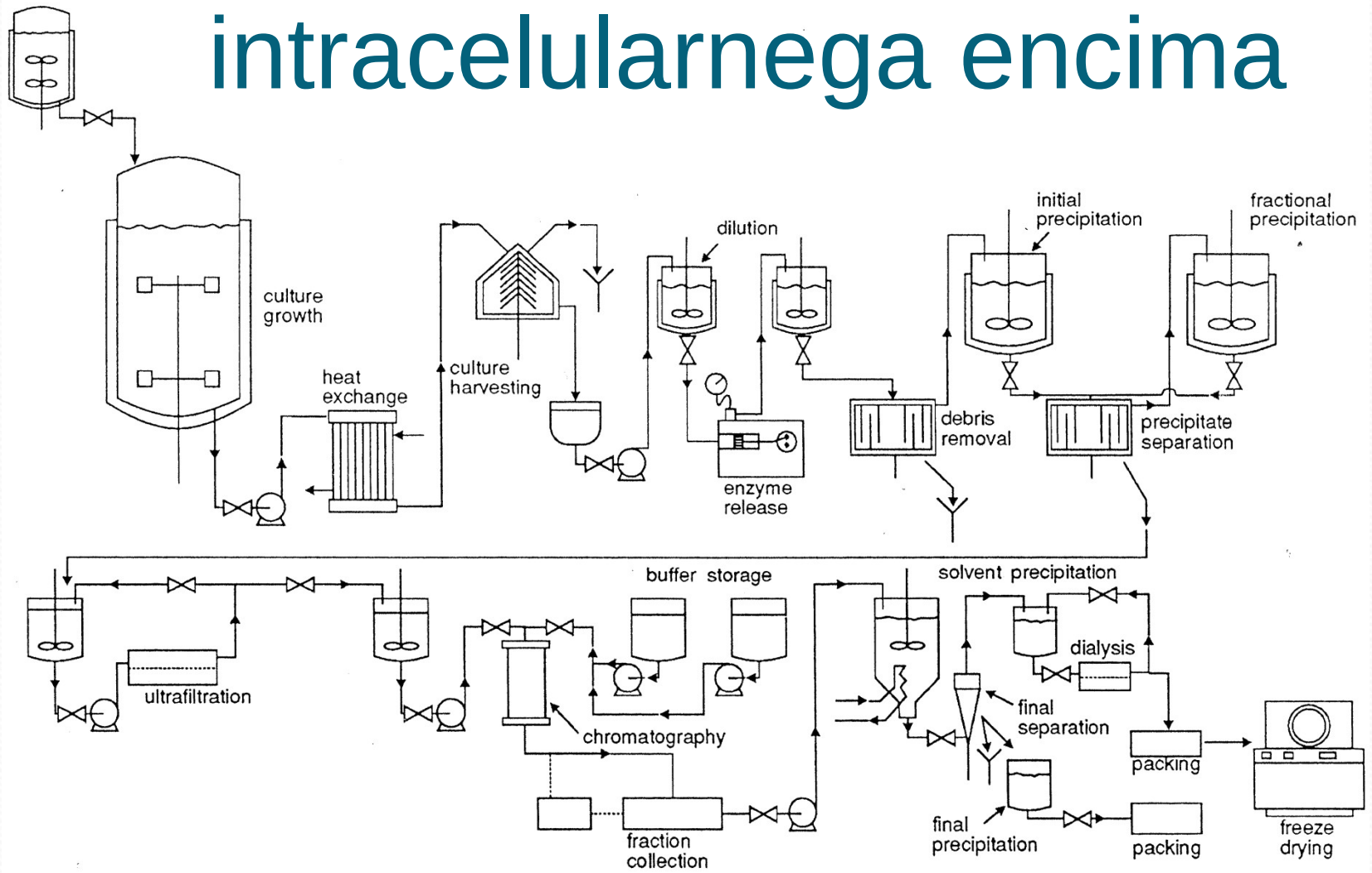
produkt = izvencelični



produkt = intracelularni



# Primer: izolacija in čiščenje intracelularnega encima



# Izkoristek odvisen od števila stopenj izolacije

Primer: 8 stopenj v procesu izolacije, vsak 85 % izkoristek  
→ 27 % končni izkoristek produkta

po 1. stopnji	0,85
po 2. stopnji	0,72
po 3. stopnji	0,61
po 4. stopnji	0,52
po 5. stopnji	0,44
po 6. stopnji	0,37
po 7. stopnji	0,32
po 8. stopnji	0,27

Če bi bil v tem procesu zahtevan 92 % celotni izkoristek, bi morala imeti vsaka od stopenj izolacije 99 % izkoristek!

# Izbira postopka izolacije

- položaj bioprodukta:
  - intracelularni (v celici)
  - ekstracelularni (izven celice)
  - sama celica
- koncentracija produkta v reakcijskem mediju
- kemijske in fizikalne lastnosti produkta
- uporaba produkta
- minimalna zahtevana čistost produkta
- delež nečistoč v reakcijskem mediju
- tržna cena produkta

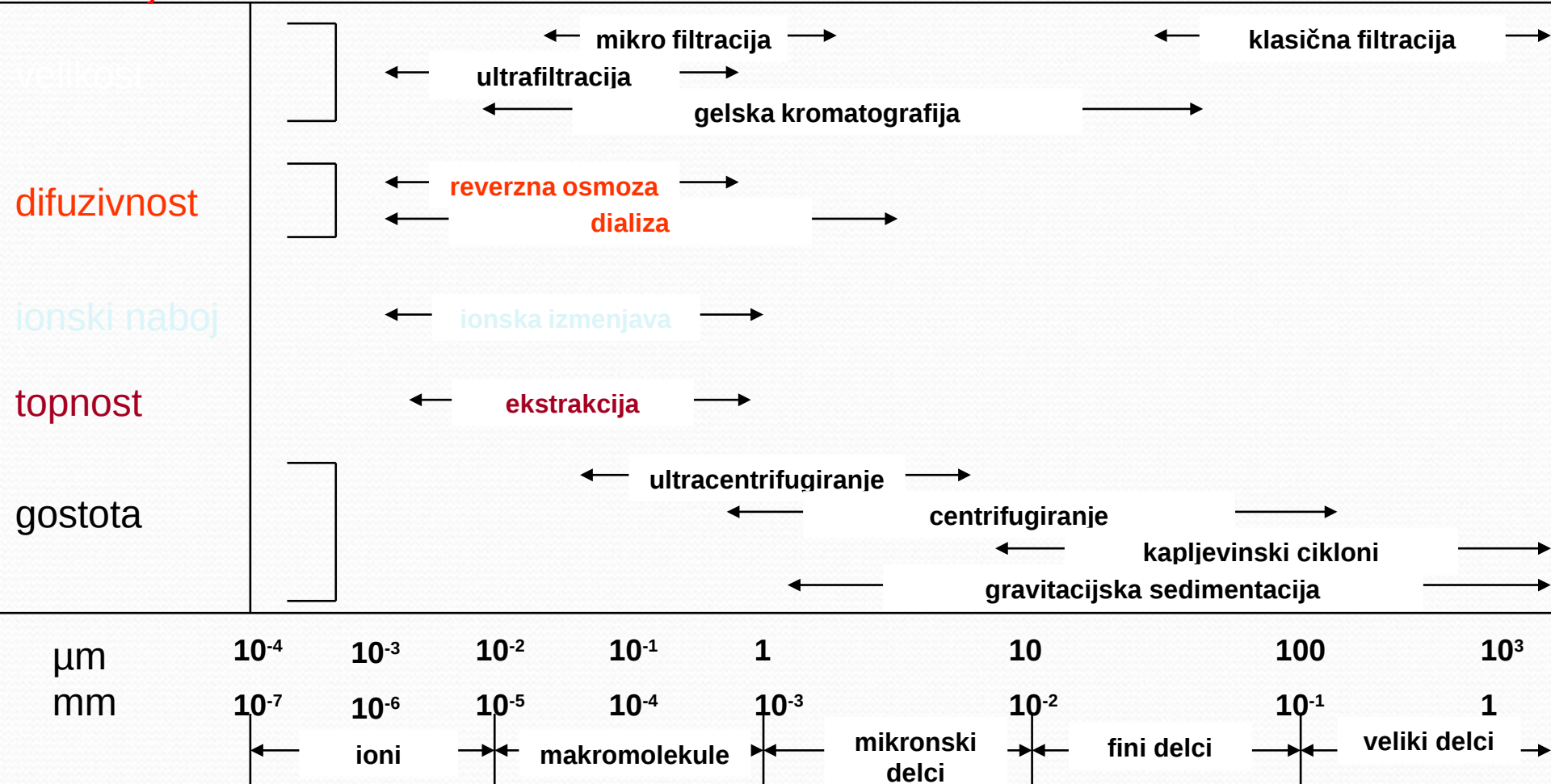


# Značilnosti bioproduktov

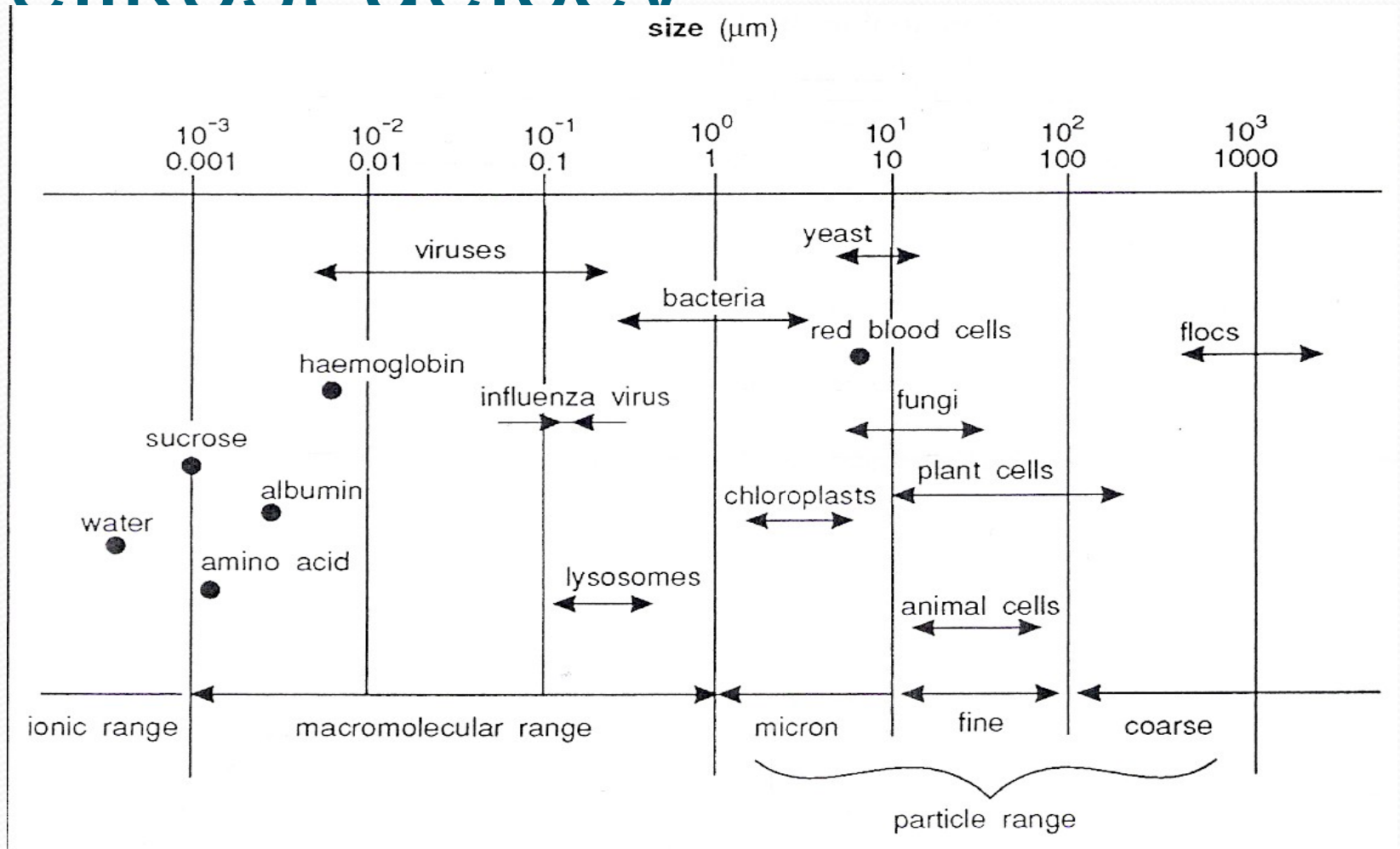
- molske mase od 60 – 2.000.000 g/mol (Da)
- stabilnost bioproduktov funkcija:
  - pH
  - temperature
  - ionske moči
  - vrste uporabljenega topila
  - prisotnosti površinsko aktivnih snovi
  - prisotnosti kovinskih ionov
- številne biomolekule so občutljive na strig
- številne biomolekule so hidrofobne
- male koncentracije produktov

# Ločevanje glede na lastnosti snovi

osnovni  
parameter  
ločevanja



# Velikost delcev



# Karakteristike fermentacijske brozge

Odvisne od:

- vrste mikroorganizma
- velikosti in oblike celic (morfologija)
- reoloških lastnosti
- gostote
- koncentracije celic, produktov in stranskih produktov

# Koncentracija biomase

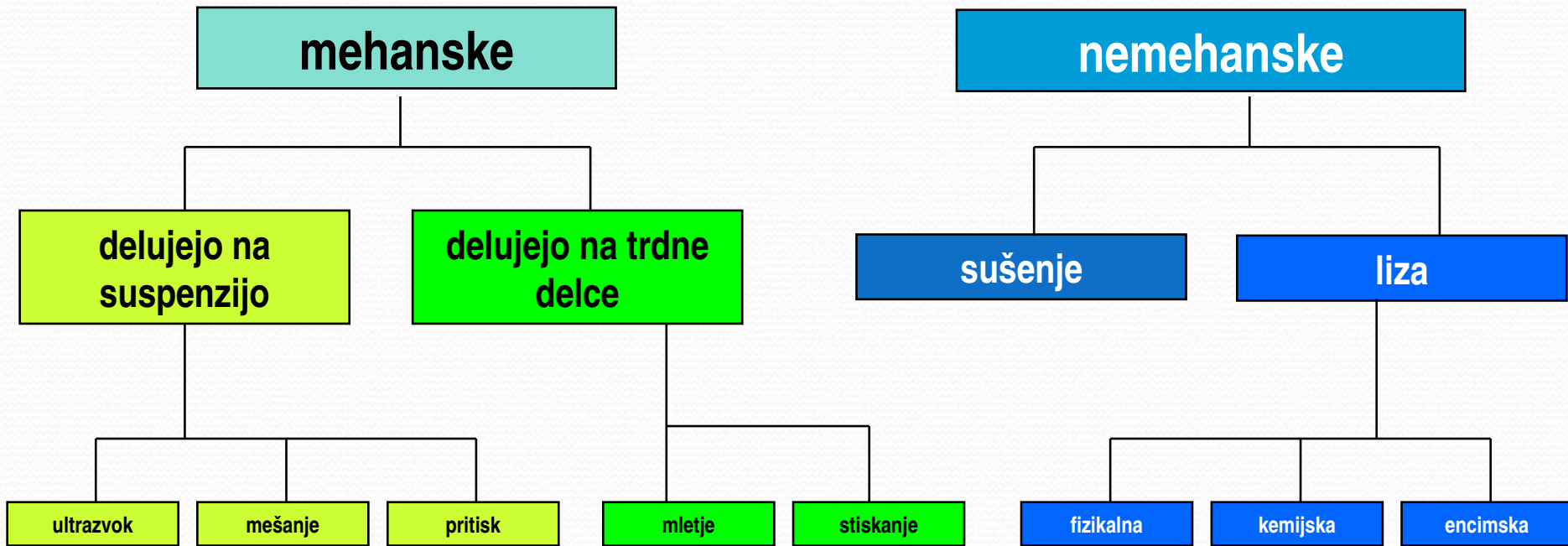
vrsta celic	produkt	koncentracija (% suhe snovi)
bakterije/kvasovke	proteini (single-cell)	3-6
glive	citronska kislina	2-3
glive	penicilin	2-4
bakterije	encimi	3-5
živalske celice		0,05-0.02
rastlinske celice		0,1-5

# Zahteve preparatov za medicinsko uporabo

<b>Kriterij</b>	<b>Zahteva</b>
<b><i>Čistost</i></b>	
Vsebnost proteina	> 99.9 %
Vsebnost di- in oligomerov	< 1.0
Izluževanje liganda	navadno > 1 ppm
Vsebnost virusov	odsotnost z verjetnostjo <10 <sup>-9</sup>
Vsebnost DNA	< 10 pg/dozo
Vsebnost endotoksinov	1 E.U./dozo
Vsebnost prionov	odsotnost z verjetnostjo <10 <sup>-9</sup>
<b><i>Konsistenca</i></b>	
mikroheterogenost	dovoljena, a konsistentna
nečistoče	dovoljene, a konsistentne
<b><i>Aktivnost</i></b>	
zvitje	pravilno zvit
mutacije	pravilna ekspresija, nobenih mutacij
procesiranje	pravilno procesiranje

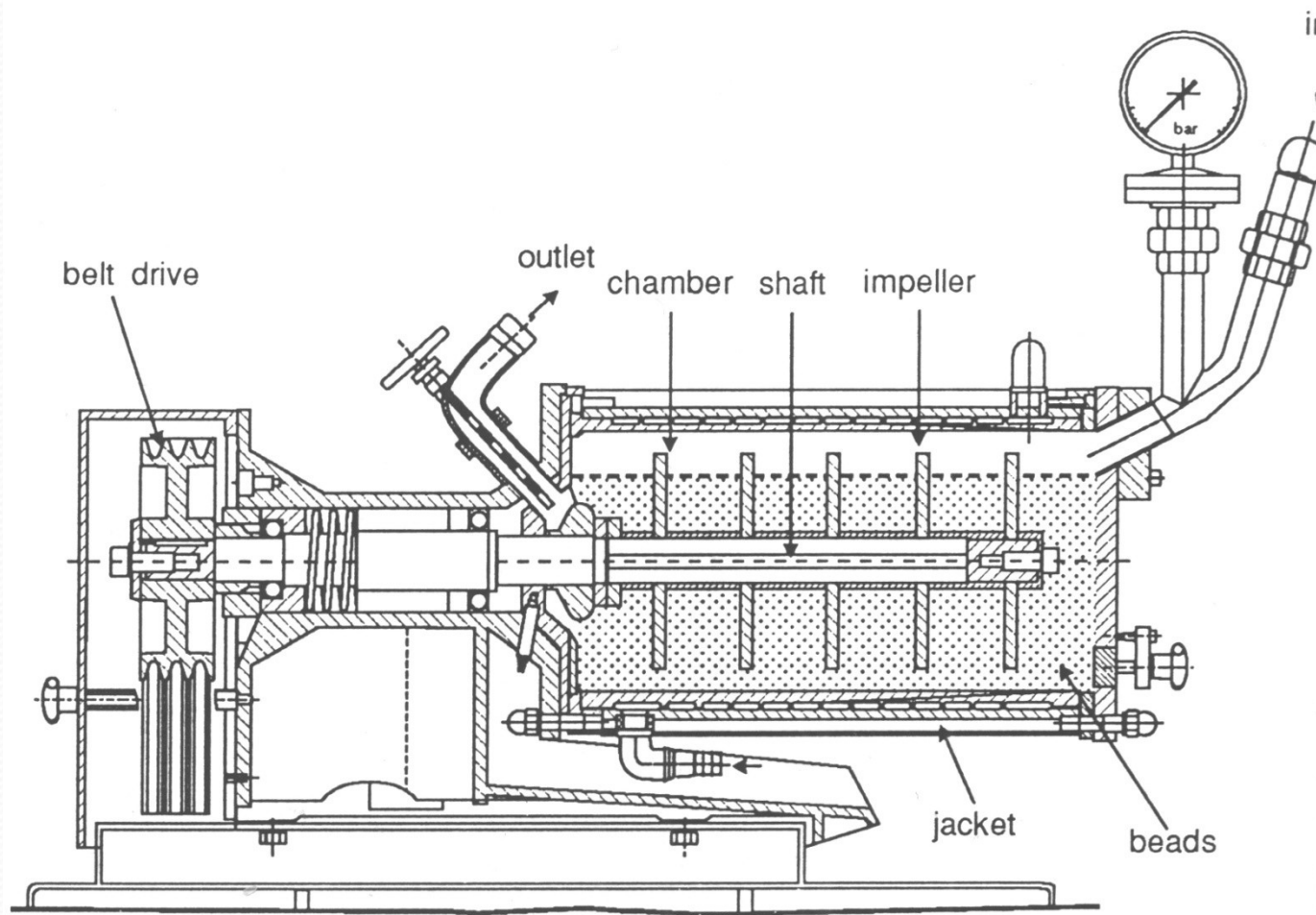
Kromatografija je trenutno edina metoda, ki omogoča očiščenje ciljne makromolekule do stopnje, ki je potrebna za uporabo v medicini.

# Metode razbijanja celične stene



- prevzete iz prehranske industrije (homogenizacija mleka), kemijske industrije (drobljenje pigmentov) ipd.

# Mehansko razbijanje celic – mlin s polnilom (kroglice)



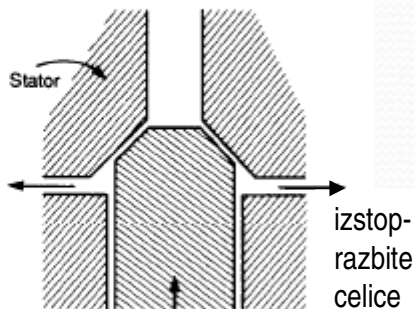
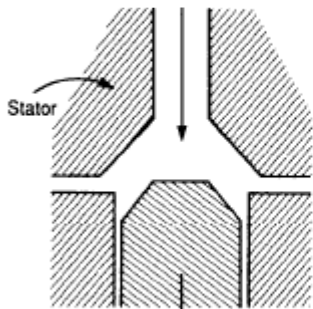
Horizontalni mlin s kroglicami



# Mehansko razbijanje celic – homogenizator

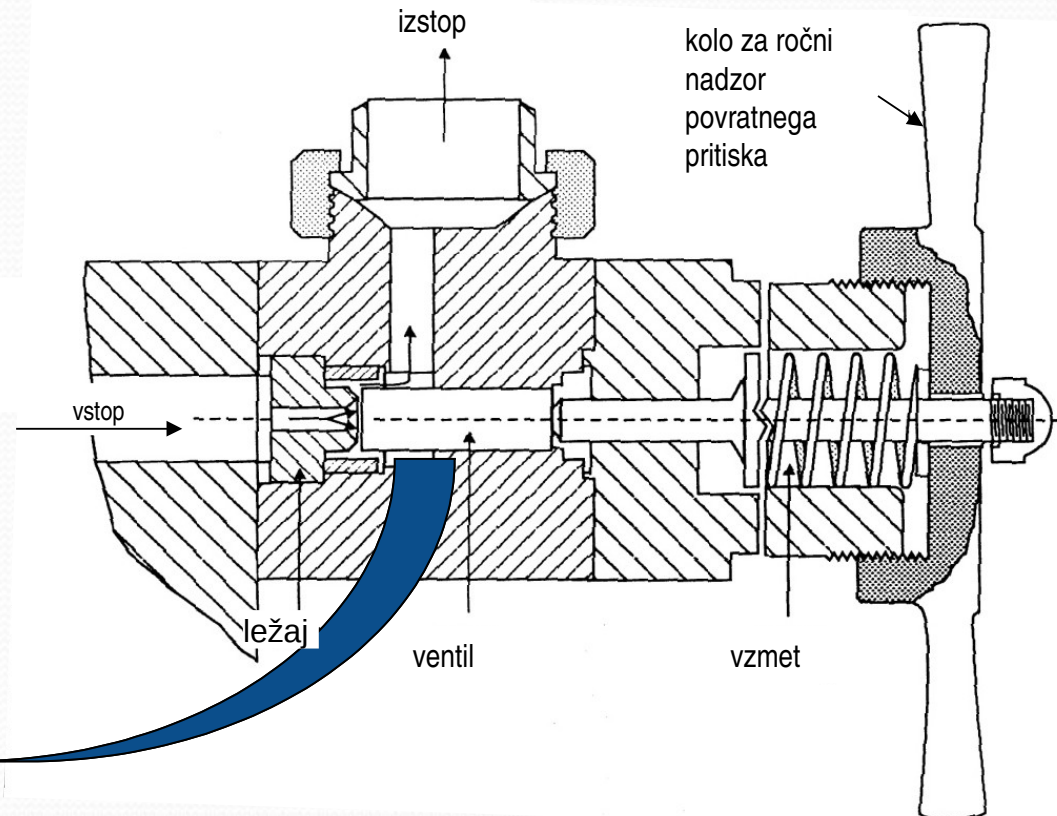
- visokotlačna iztisna črpalka, ki črpa suspenzijo celic skozi nastavljivo odprtino izpušnega ventila
- tlak od 200 do 1000 bar, odvisno od vrste in koncentracije suspenzije celic

vstop suspenzije celic



bat navzdol

bat navzgor



# Nemehanske metode razbijanja celic - temperaturni šok

- temperaturni šok – termoliza
- enostavna in cenena metoda
- uporabna samo za termostabilne produkte
- dvig temperature deaktivira celico in razbije celično steno
- učinkovitost termolize odvisna od: pH, ionske moči, prisotnosti različnih kemijskih komponent ( $Mg^{2+}$  stabilizira celično steno)
- skupna učinkovitost termolize od 60-80 %

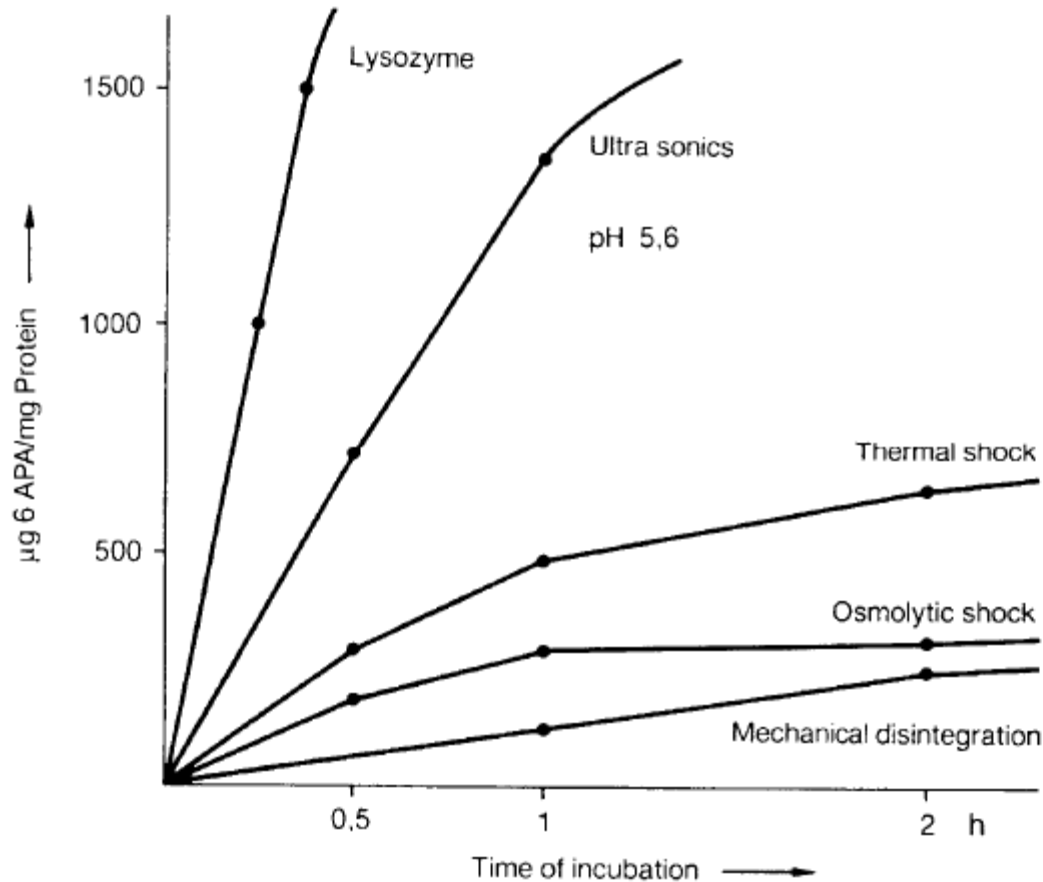
# Kemijske tehnike razbijanja celic

tehnika	princip	vpliv na produkt	cena	primeri
osmotski šok	osmotsko preluknjanje membran	majhen	poceni	rdeče krvne celice
encimska razgradnja	celična stena razgrajena	majhen	draga	<i>Micrococcus lysodeikticus</i> obdelan z jajčnim lizocimom
solubilizacija	detergenti raztopijo celične membrane	majhen	zmerna -draga	suspenzije celic v majhnem merilu
raztapljanje maščob	organska topila se razopijo v celično steno in jo destabilizirajo	zmeren	poceni	toluen - kvasovke
obdelava z bazami	saponifikacija maščob raztaplja membrane	močan	poceni	proizvodnja L-asparaginaze

# Nemehanske metode razbijanja celic – uporaba encimov

- reakcija suspenzije encimov s celično steno  
raztapljanje, razgradnja
- mala poraba energije
- selektivna metoda
- minimalen vpliv na intracelularne produkte
- metoda sprejemljiva za okolje
- pomanjkljivosti:
  - visoka cena encimov
  - nezmožnost izvedbe procesa v večjem merilu (laboratorijska metoda)
  - inhibicija encimov s komponentami reakcijskega medija
  - optimalni pogoji (pH, temperatura, koncentracija kovinskih ionov)  
povsem drugačni od optimalnih pogojev procesa biotransformacije

# Primerjava različnih metod razbitja celic na dobiček produkta

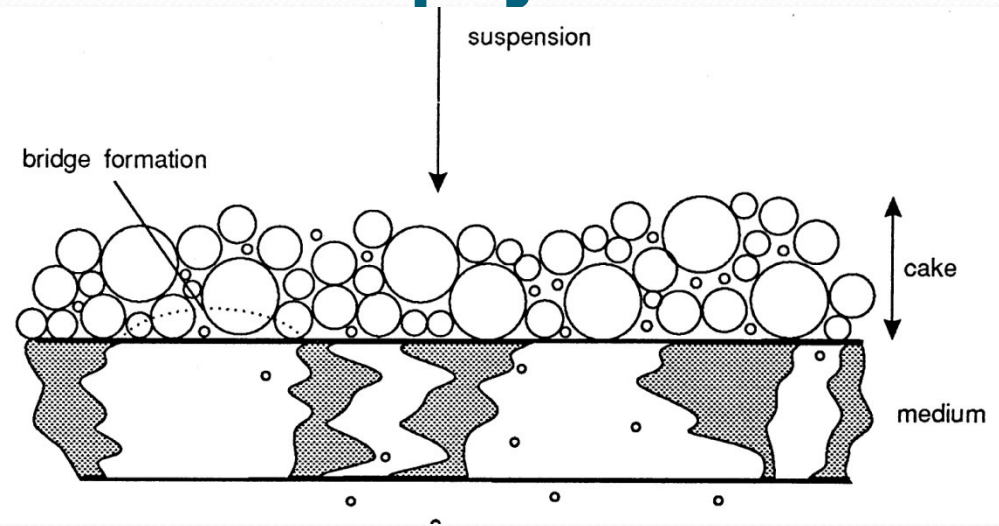


Disintegration of cells of *Erwinia aroidea* by various methods.

# Ločevanje trdno-kapljevina

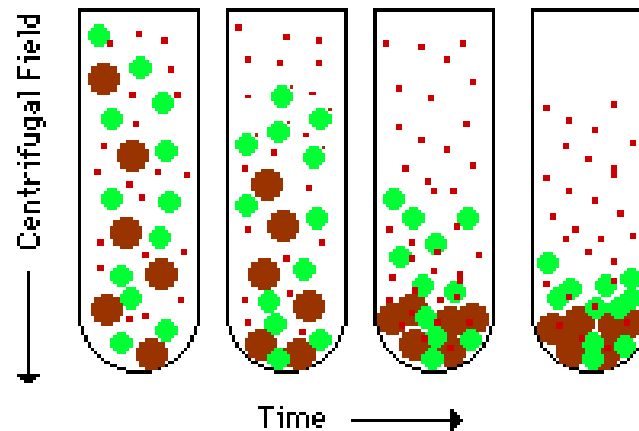
## Filtracija

zadrževanje delcev na poroznem sredstvu, ki zadržuje eno komponento in prepušča drugo



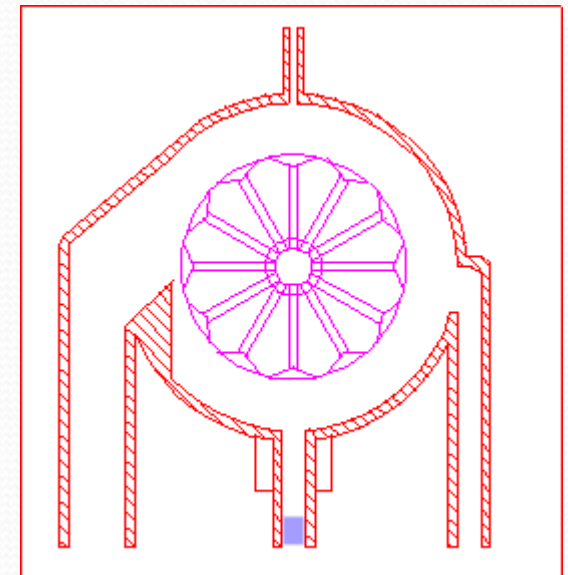
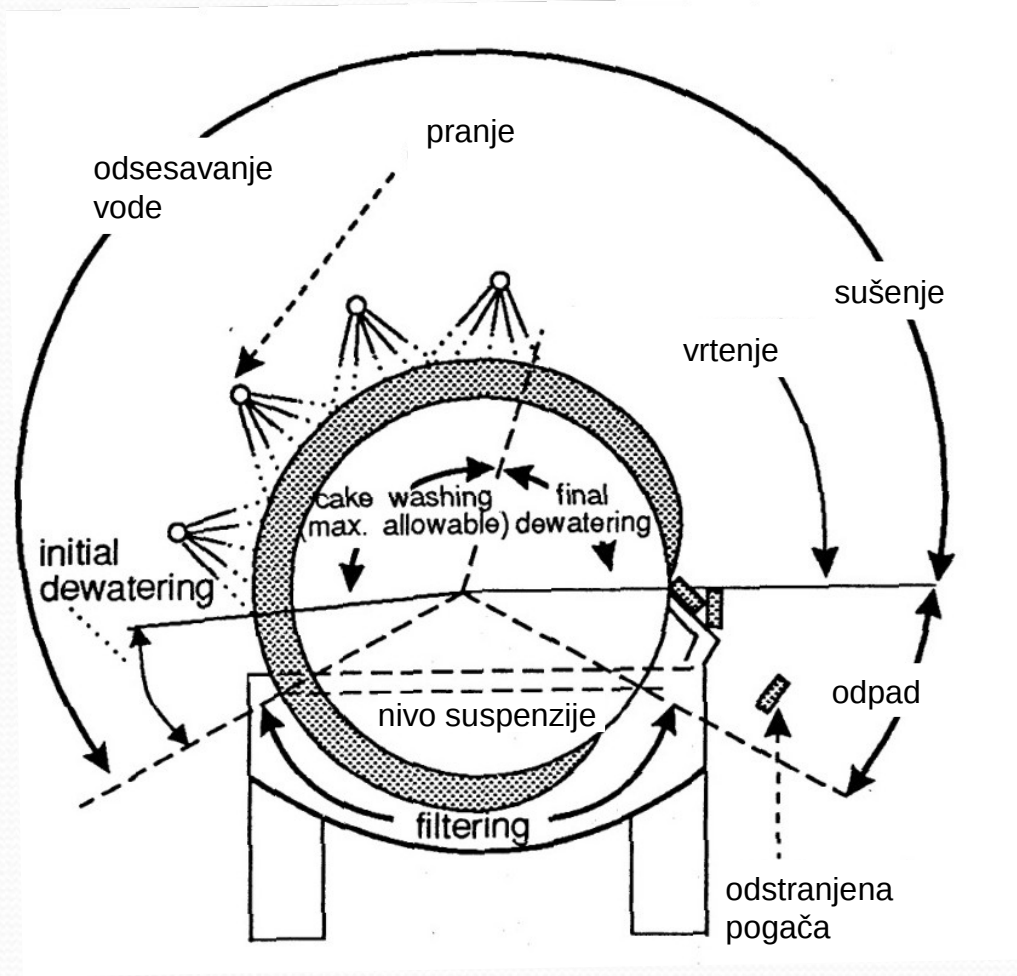
## Sedimentacija in centrifugiranje

izkoriščanje različne sedimentacijske hitrosti delcev, ki se gibljejo s kapljevino



# Industrijska filtracija – vakuumski filter

delovanje vakuumskega filtra



hitrost vrtenja bobna:  
0,3 do 3 min<sup>-1</sup>

# Koncentriranje produkta

- po odstranitvi celic produkt vsebuje 85 – 98 % **vode**
- delo z velikimi količinami vode je drago – potrebna oprema velikih prostornin
- odstranjevanje vode – obvezen korak po separaciji trdno-kapljevina
- procesi:
  - uparjanje (evaporacija)
  - membranski procesi
  - ekstrakcija kapljevina-kapljevina
  - obarjanje (precipitacija)
- uparjanje – enostavna in razširjena, a energetska zahtevna metoda
- membranski procesi – cenejši, manjši stroški energije



# Membranski procesi - delitev

## - glede na gonilno silo:

- razlika (hidrostatskega) pritiska: mikrofiltracija, ultrafiltracija, hiperfiltracija (reverzna osmoza)
- električno polje (razlika potenciala): elektrodializa
- razlika koncentracij: dializa

## - glede na velikost por filtrirnega sredstva:

- mikrofiltracija – odstranjevanje velikih delcev
- ultrafiltracija – odstranjevanje makromolekul (proteini, encimi)
- nanofiltracija – odstranjevanje večjih molekul
- hiperfiltracija (reverzna osmoza) – manj zastopana v biotehnoloških procesih

# Membranski procesi

## **prednosti membranskih procesov:**

- brez dodatka pomožnih sredstev
- delo pri sobni temperaturi
- možnost izvedbe šaržnega in kontinuirnega procesa
- enostavno povečevanje procesne opreme

## **pomanjkljivosti membranskih procesov:**

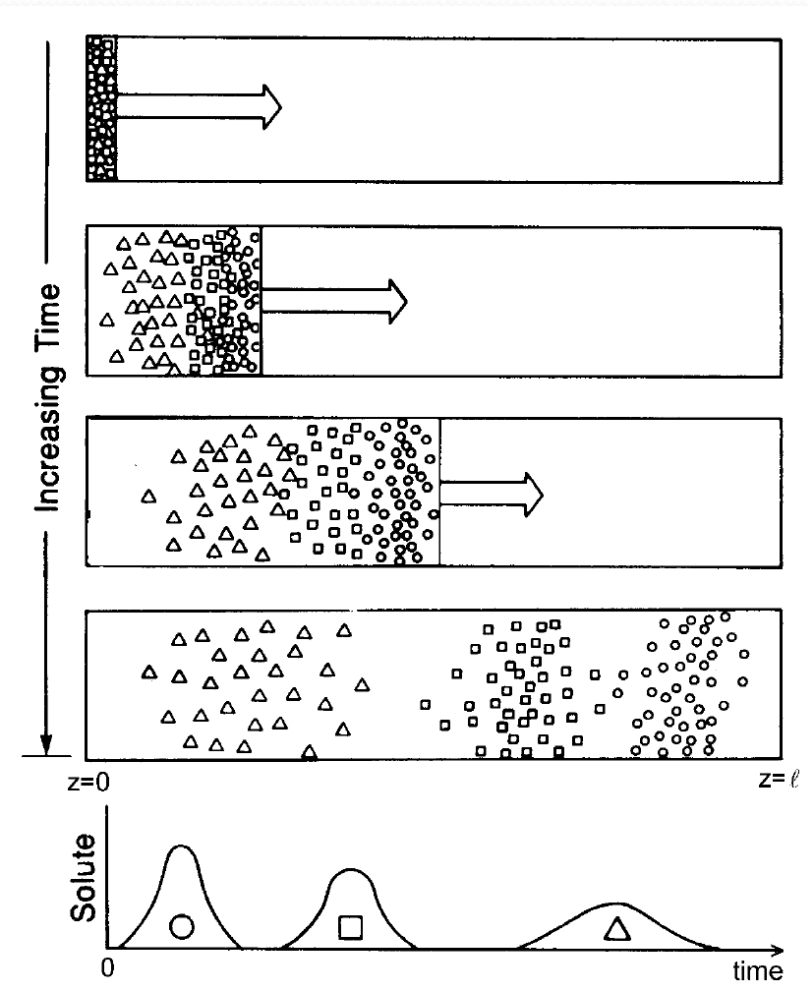
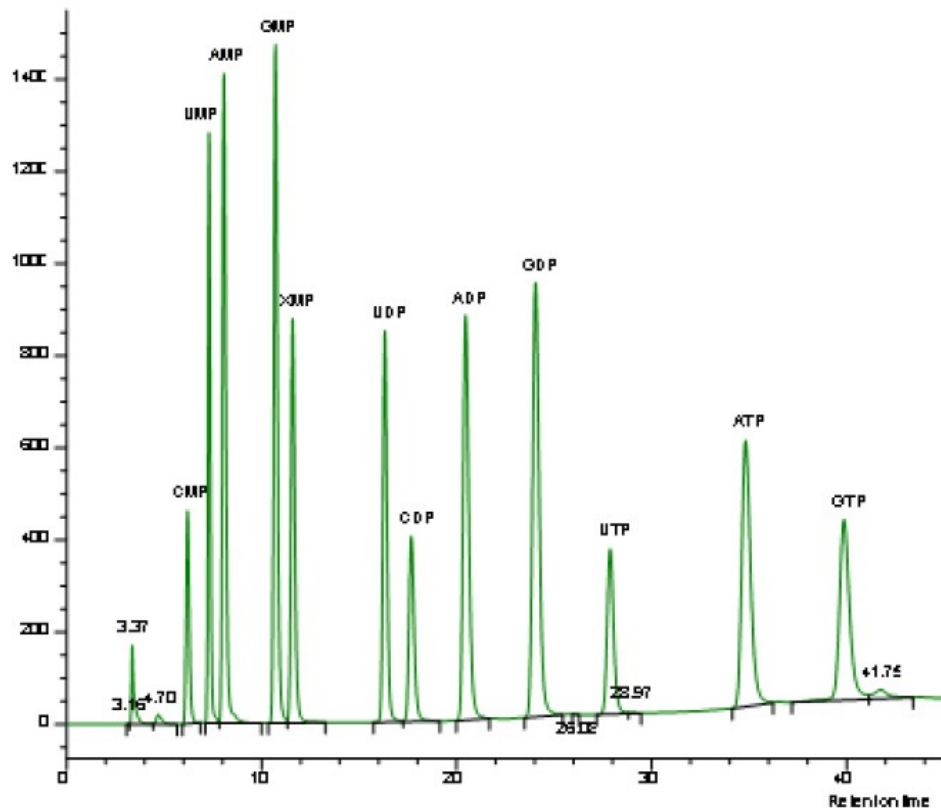
- mala odpornost na nizek/visok pH in temperaturo
- težka izvedba čiščenja in sterilizacije
- problemi pri nalaganju - zamašitev por membrane z organskimi molekulami

# Kromatografija: analizna in preparativna

- Preparativna: za izolacijo posamezne molekule (produkt ločino od ostalih, frakcije zbiramo)
- Analizna:
  - kvalitativna analiza
    - »slepa« tehnika, dokažemo lahko prisotnost neke substance, ne moremo pa neposredno ugotoviti, za katero substanco gre. Iz primerjave retencijskih časov za standardne substance določimo identiteto analita
  - kvantitativna analiza
    - Računanje koncentracij
    - a) Umeritev s standardom (eksterni standard)
    - b) Umeritev z internim standardom
    - c) Normalizacija površin vrhov

# Kolonska kromatografija

kromatografija: fizikalno-kemijski proces ločevanja zmesi v posamezne komponente



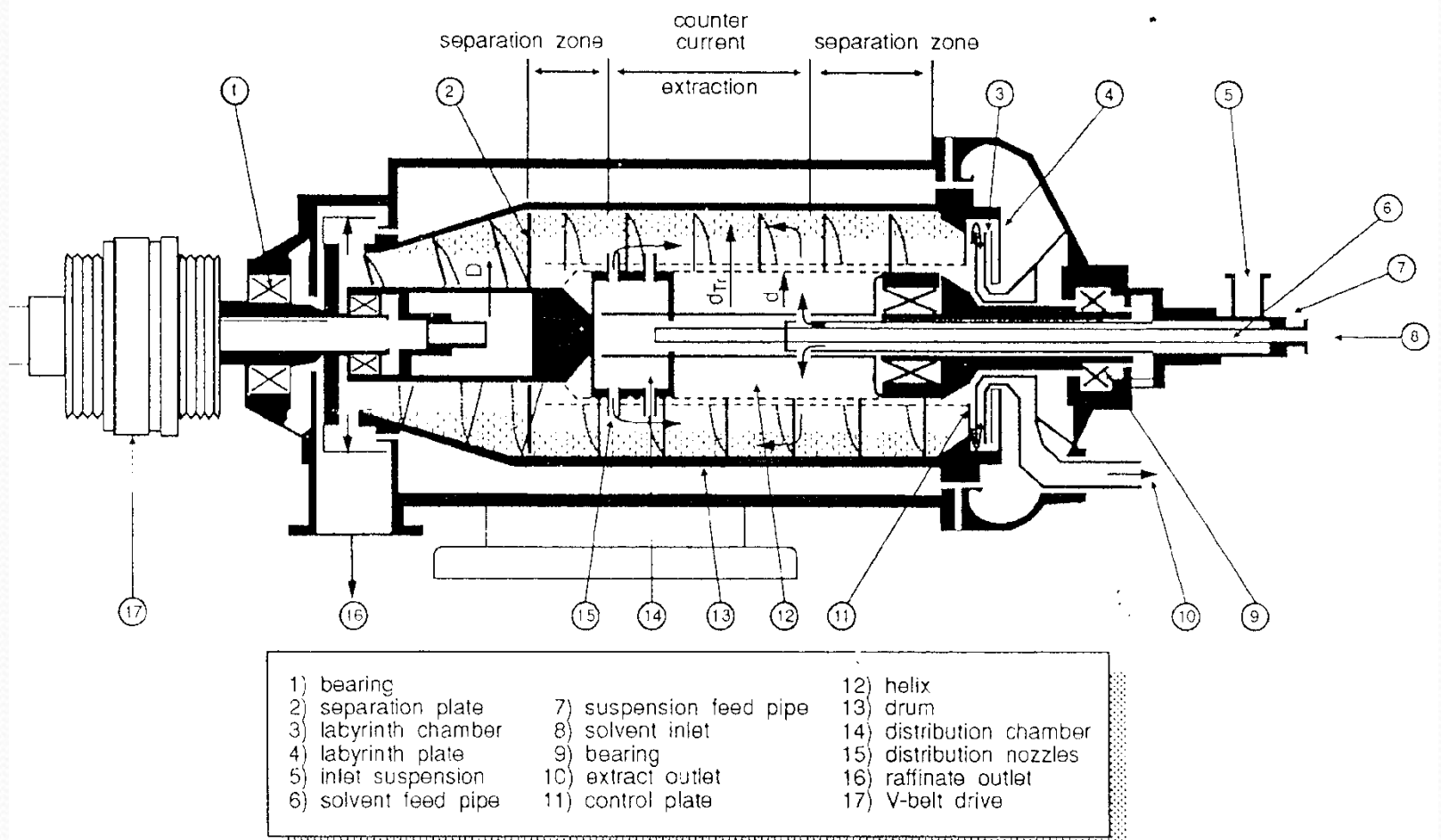
# Integrirani procesi

- povezava biotransformacije ali fermentacije s procesom izolacije in čiščenja
- integrirani bioreaktorji

2 možnosti integracije procesov:

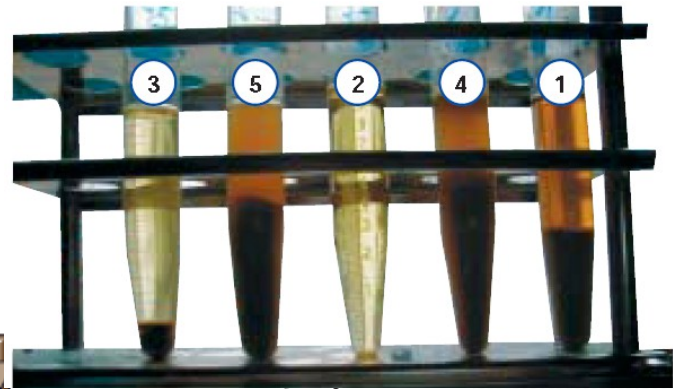
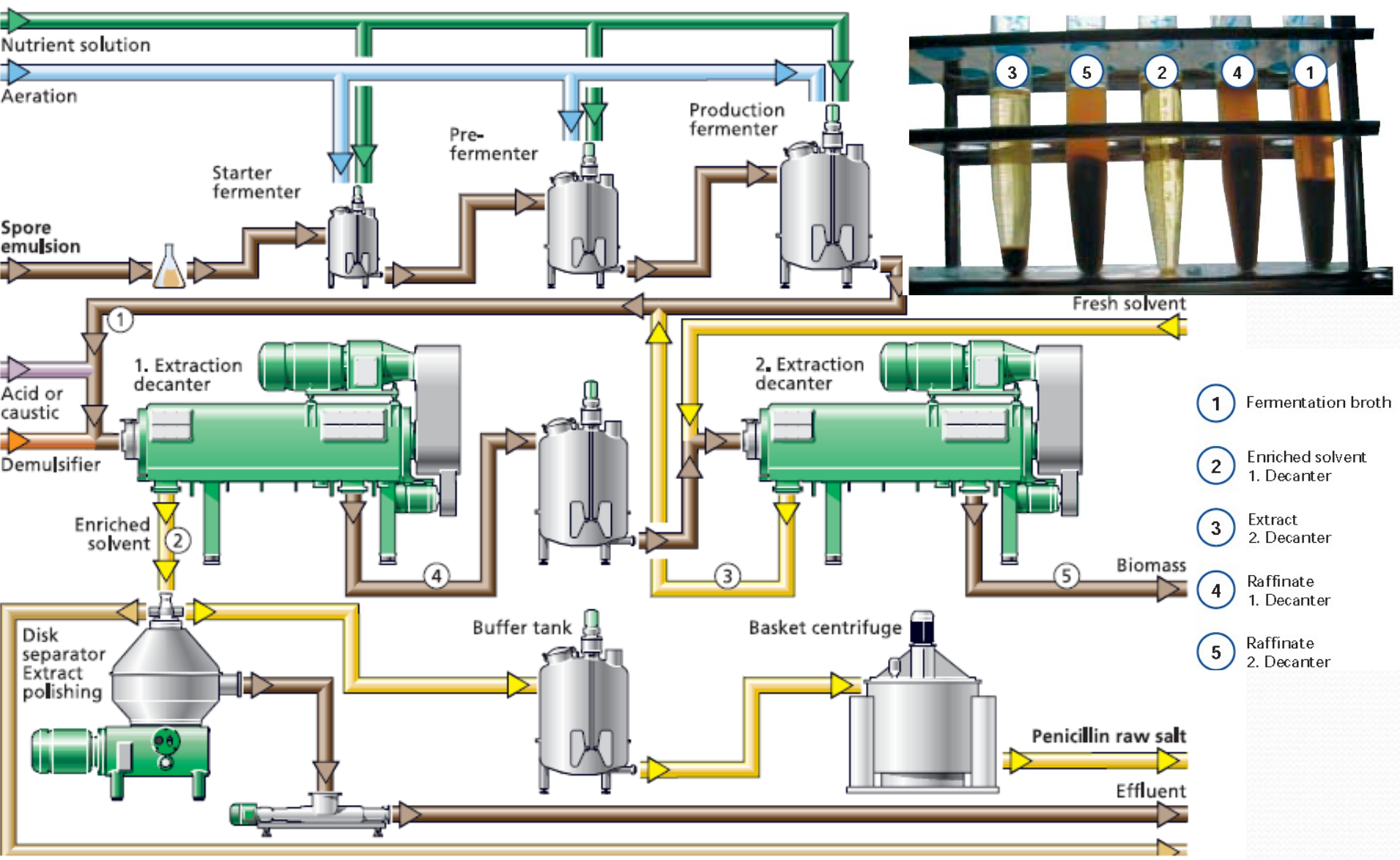
1. obdelava celotne fermentacijske brozge: ni ločevanja trdno-kapljevina – takoj ekstrakcija
2. *in situ* izolacija produkta ali “ekstraktivna biokonverzija”
  - proizvodnja antibiotikov: *in situ* ekstrakcija produkta že od l. 1960

# Ekstrakcija celotne brozge



modifikacija standardnega dekanterja, ki dopušča uvajanje ločene faze (topila)

# Integrirana proizvodnja penicilina



# Formulacija produkta

Formulacijo optimiramo po naslednjih parametrih:

- videz,
- trdnost,
- razpadnost,
- tališče,
- prenosljivost,
- stabilnost,
- sproščanje učinkovine (reološke lastnosti taline, omočljivost, velikost delcev učinkovine).