

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJA

BIOTEHNOLOŠKI TEHNIKUM: učbenik za vaje

Aleš PODGORNIK, Maja PAŠ, Peter RASPOR

Ljubljana, 2013

Naslov: **BIOTEHNOLOŠKI TEHNIKUM: učbenik za vaje**

Avtorji: Aleš PODGORNIK, Maja PAŠ, Peter RASPOR

Založnik: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Recenzenta: prof. dr. Aleksander Pavko, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
prof. dr. Božidar Šantek, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Leto izdaje: 2013

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

602.4(075.8)(076.5)(0.034.2)

PODGORNIK, Aleš

Biotehnološki tehnikum [Elektronski vir] : učbenik za vaje / Aleš Podgornik, Maja Paš, Peter Raspor. - El. knjiga. - Ljubljana : Biotehniška fakulteta, 2013

ISBN 978-961-6908-04-7 (pdf)

1. Paš, Maja 2. Raspor, Peter
269861376

Po sklepu dekana Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani dne 29. 10. 2013 je delo BIOTEHNOLOŠKI TEHNIKUM: učbenik za vaje učbenik za študente prvostopenjskega univerzitetnega študija Biotehnologija pri vajah predmeta Biotehnološki tehnikum.

Vse pravice pridržane. Ponatis (grafični, elektronski ali mehanski, vključno s fotokopiranjem, snemanjem ali prenosom v baze podatkov) celote ali posameznih delov je dovoljen le s pisnim soglasjem nosilca avtorskih pravic.

PREDGOVOR

Vaje na področju biotehnologije predstavljajo zahteven del v procesu pridobivanja znanja in veščin biotehnologa. Vsa teoretična znanja se morajo v procesu praktičnega dela oplemenititi z veščinami dela v biotehnoloških laboratorijih in procesih, da pride učeči do spoznanja o pomembnosti vseh teh elementov, ki združeni omogočajo pridobitev potrebnega znanja za obvladovanje bioprocsov.

Številne definicije, ki jih študent spozna tekom predavanj in iz strokovne literature, dobijo pravi pomen, saj srečajo uporabnost pri delu. To je cilj, h kateremu peljejo vsa študijska naprežanja in spodbujanja učiteljev. Študenti morajo v tej komunikaciji sodelovati na način, da dojamajo definicije in njihovo uporabnost od procesa do biologije delovnih organizmov in naprej do biotehnologije kot področja, ki je sposobno oblikovati produkt, ga izdelati v visoko kontroliranih pogojih ter ga ponuditi zahtevnemu potrošniku kot hrano, zdravilo ali kakovostnejše bivanje v okolju. Slednje je že prešlo meje onesnaženja in ne deluje več v območju sonaravnega in trajnega razvoja, kar bi v zaključnih procesih morali reševati, v načrtovanju procesov pa upoštevati kot pomemben dejavnik in ga preprečevati.

Tako se srečujemo učitelji na eni strani s pritiskom univerzalne stroke, ki komunicira v angleščini, na drugi strani pa moramo kot prenašalci znanja delovati v kulturnem poslanstvu razvoja jezika. Če tega ne bomo storili in prenašali na študirajoče, bo naš jezik le še kortuazna govorica v krogih družin in ne več v odprti strokovni konfrontaciji.

Ker ta učbenik predstavlja novost v smislu postavljanja področja bio-tehniške ekspertize v študijski program biotehnologije, ima tudi poslanstvo oblikovanja pisane besede. Knjige Biotehnologije, ki so izšle pred dvajsetimi leti, so povzele takratno besedišče in pojme, ki so delovali v takratni stroki. Biotehnološki razvoj se intenzivno nadaljuje in danes lahko ocenjujemo, kateri pojmi so primerni in uporabni, kateri so jasni in nedvoumni, in kateri so zavajajoči.

Ko je govora o uporabi biotehnološke opreme, imamo številne naprave iz germanskega sveta, katerih pojme smo privzeli. Ko se srečujemo z sodobnimi metodami molekularne in sistemske biologije, nas preplavljajo pojmi iz angleškega govornega področja, da ne omenjamo informatike, ki s težavo komunicira slovensko. Učitelj pa mora biti tako vešč, da izlušči pravi smisel in posloveni tiste pojmovne zveze, ki jih mora strokovnjak uporabljati ne samo v laboratoriju ali na proizvodnji liniji, pač pa tudi v dnevnem občevanju s potrošnikom, ki mora imeti pregledno informacijo o našem delu, da jo bo razumel, podpiral in užil sadove biotehnološkega dela.

Če se dotaknem nekaterih specifičnih pojmov, ki jih ponuja ta tehnikum, moram ugotoviti, da zaslužijo posebno pozornost bioprocsovno orientirani pojmi. Ko je govora o bioprocsovih, jih danes razumemo kot procese, ki se ne prestopajo odvijajo in procese, ki se ponavljajo, ter procese, ki se zgodijo samo enkrat.

Različni jeziki so tem procesom dali različna imena, skladno s kulturno dediščino v tehniki in jezikovni kulturi naroda. Tako opisujejo bioprocsov ali procese zelo različno, bodisi z vidika dogajanja bodisi z vidika dogodka ali celo okolja, kjer le-ta poteka. Na primer, iz nemščine, oziroma še boljše izhodno, iz francoščine smo iz pojma »Charge« naredili šaržo in šaržni proces. V delovnem pomenu pa to pomeni polnitev. V enem in drugem jeziku. Tako kot to delovno operacijo tudi razumemo v slovenščini. Izhajajoč iz tega lahko rečemo, da je v slovenščini to bioprocsov z enkratnim polnjenjem. V bioprocsov vložimo vse sestavine in mu damo čas, da steče do konca oziroma do zelenega proizvoda.

Nekateri pa razumejo ta proces tudi v smislu masne bilance in ne samo obratovanja. Takrat pa je boljše povedati z vidika sestavin v bioprocsov. Tako govorimo o odprtih in zaprtih bioprocsovih. V prvem primeru v bioprocsov stalno vstopajo sestavine, da bi bile transformirane v proizvod, ki izstopi iz bioprocsova. Tak postopek lahko traja

poljubno dolgo, po navadi tako dolgo dokler ga ne prekinemo. V drugem primeru pa snovi vstopijo in se presnovijo do načrtovanega proizvoda. Ta postopek traja samo določen čas in je s tem zaključen ter se mora ponoviti od začetka.

Drugače poteka pri odprtih, polodprtih procesih, ki so hibridni in vključujejo prvine odprtega in zaprtega bioprocasa. Tako smo za potrebe živilsko-procesne industrije razvili bioprocese z večkratnim polnjenjem. Kar pomeni, da vnesemo v bioreaktor vse sestavine in proces steče kot proces z enkratnim polnjenjem. Ko se doseže načrtovana kakovost proizvoda, se ta delno odvzame in dopolni s svežimi sestavinami in tako se postopek lahko nadaljuje v nedogled, ne da bi bioproces prekinili.

V splošni uporabi pa je tudi bioproces s povratnim tokom bodisi bioprocene brozge, bodisi delovne biokulture, ki ji pogosto rečemo kar biomasa. Ta proces je dosegel množično uporabo pri procesiranju odpadnih voda, saj na ta način lahko uravnavamo pretok in bremenitev, ob zadovoljivem obratovanju bioprocasa.

Če bi želeli sistemsko opredeliti procese, bi jih lahko razdelili po načinu obratovanja, po masni bilanci in mogoče tudi po uporabnih modelih za njihovo vodenje.

Tabela: Pogled na pojmovanje bioprocsov in njihovo obratovanje

Sistemska poimenovanje glede na način obratovanja	Sistemska poimenovanje glede na masno bilanco	Poimenovanje glede na čas trajanja	Primer	Trivialna imena
Z enkratnim polnjenjem	Zaprti	Enkratno	Proizvodnja vina	Šaržni (angleško Batch) (nemško Chargenprozess)
Z enkratnim polnjenjem in dohranjevanjem	Polzaprti	Enkratno	Pekovski kvas	Šaržni z dolivanjem (angleško Fed-batch) (nemško Zulauf-Verfahren)
Z enkratnim polnjenem in večkratnim dohranjevanjem	Polodprti	Ponavljajoče	Proizvodnja kislih kruhov	Polkontinuirni (angleško Repeated fed-batch) (nemško Zulauf-Verfahren)
S povratnim tokom	Polodprti	Neprekinjeno	Obdelava odpadnih voda	Z reciklažo (angleško Recycling) (nemško Rezyklierung)
Z neprestanim polnjenjem in praznjenjem	Odpri	Neprekinjeno	Proizvodnja organskih kislin	Kontinuirni (angleško Continuous) (nemško kontinuierlicher)

Biotehnološki tehnikum: učbenik za vaje predstavlja zbir specifičnih vaj, ki na dovolj zahteven način predstavijo študentu biotehnologije vse potrebne elemente za delo, od postavljanja bioprocasa do postopkov pridobivanja končnih proizvodov. Obsega 7 elementov znanja in veščin, ki so integrirani z računsko inženirsko logiko razmišljanja, kako obvladati delovne organizme in kako od njih pridobiti čim več kakovostnega proizvoda, ki bo koristen za človeka ali njegovo okolje.

Ta koncept daje študentu možnost, da svoje znanje nadgradi in tako so postavljene tudi vaje, ki omogočajo študentu nadgradnjo znanja in pridobivanje veščin dela. Slednje je pomembno za oblikovanje inženirja, ki je

ključni delavec v biotehnološkem podjetju, saj je potrebno izdelek ne le razviti, pač pa predvsem izdelati in ohraniti varnega do izteka njegove uporabe. K temu cilju nas vodita dobra laboratorijska praksa (DLP) in dobra proizvodna praksa (DPP). Sem sodijo vsi prijemi profesionalnega obnašanja in etike, higiene in pisanja laboratorijskih in delovnih dnevnikov, ki sledijo standardnim operativnim postopkom. Vsi ti so nujni v procesu oblikovanja visoko kakovostnega strokovnega kadra za vodenje bioprocsov.

Tudi zato je pomembno, da študent osvoji tisto izrazoslovje, ki je pomembno ne samo v slovenskem, pač pa tudi v angleškem jeziku, ki je trenutno univerzalni strokovni jezik. Prav pa je, da univerzitetno izobražen človek pozna ključni besednjak tudi v jezikih sosednjih narodov, da bo lahko razumel in izmenjeval poglede in stališča, ko bo do komunikacije prišlo. Kot kažejo trendi, se bo to v sedanji globalni družbi gotovo še pogosteje dogajalo. Zato je vaš čas, da berete in razumete, poskusite in naredite praktično tisto, kar lahko in kar je moč narediti v danih razmerah. V glavah pa ustvarite zalogo znanja in nastavke, na katere ga boste zlahka sprejemali in nadgrajevali. Samo tako boste dobri inženirji v bioproceni tehnologiji.

Profesor Peter Raspor

VSEBINA

1	MEŠANJE V BIOREAKTORJIH - DOLOČANJE ČASA POMEŠANJA	8
1.1	Teoretične osnove	8
1.2	Naloga.....	13
1.3	Potreben material in oprema.....	13
1.4	Potek vaje	14
1.5	Meritve, izračuni in rezultati	15
2	PRENOS KISIKA – DOLOČITEV K_LA	16
2.1	Teoretične osnove	16
2.2	Naloga.....	24
2.3	Potreben material	25
2.4	Potek vaje	25
2.5	Meritve, izračuni in rezultati	26
3	LOČEVANJE PROTEINOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRFIJO	28
3.1	Teoretične osnove	28
3.2	Naloga.....	30
3.3	Potreben material	31
3.4	Potek vaje	31
3.5	Meritve, izračuni in rezultati	33
4	PRIPRAVA IN VALIDACIJA ENCIMSKEGA BIOSENZORJA.....	35
4.1	Teoretične osnove	35
4.2	Naloga.....	37

4.3	Potreben material.....	38
4.4	Potek vaje	38
4.5	Meritve in rezultati	40
5	SPREMLJANJE ŠARŽNEGA BIOPROCESA.....	41
5.1	Teoretične osnove	41
5.2	Naloga.....	45
5.3	Potreben material.....	45
5.4	Potek vaje	46
5.5	Meritve in rezultati	47
6	ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNA.....	48
6.1	Teoretične osnove	48
6.2	Naloga.....	50
6.3	Potreben material.....	51
6.4	Potek vaje	51
6.5	Meritve, izračuni in rezultati	53
7	SIMULACIJA KONTINUIRNEGA BIOPROCESA.....	54
7.1	Teoretične osnove	54
7.2	Naloga.....	60
7.3	Potreben material.....	60
7.4	Potek vaje	61
7.5	Meritve, izračuni in rezultati	61
8	RAČUNSKE NALOGE	63

1 MEŠANJE V BIOREAKTORJIH - DOLOČANJE ČASA POMEŠANJA

Maja Paš

1.1 Teoretične osnove

Reologija je veda o deformacijah in toku tekočin. Tok tekočine lahko predstavimo s tokovnicami, ki pa odražajo le celokupen učinek gibanja tekočine (makroskopski opis). Čeprav so tokovnice vzporedne in kažejo gladek kontinuiran tok, se lahko molekule v tekočini gibljejo neurejeno. Počasnejši je tok, realnejša je predstavitev dejanskega gibanja s tokovnicami. Imenujemo ga *laminarni tok*. V hitrem gibanju pa delci tekočine pogosto prekrizajo tokovnice, oblikujejo se vrtinci – takšen tok tekočine je *turbulenten*.

Prehod iz laminarnega v turbulentni tok ni odvisen le od hitrosti tekočine, ampak tudi od njene viskoznosti in gostote ter od geometrije prostora, po katerem se giblje tekočina. Brezdimenzijski parameter, s katerim okarakteriziramo tok tekočine, imenujemo *Reynoldsovo število*. Osborne Reynolds je že leta 1883 objavil številne članke na temo toka tekočin v ceveh. Za tok tekočine po ceveh okroglega preseka velja naslednja enačba:

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot D}{\eta} \quad (1.1)$$

pri čemer je Re Reynoldsovo število, D je premer cevi, v je povprečna linearna hitrost tekočine, ρ je gostota tekočine, η pa dinamična viskoznost tekočine. V gladkih ceveh je tok tekočin laminaren do Re 2100, turbulenten pa pri Re nad 4000. Med 2100 in 4000 je prehodno območje, v katerem je tok lahko laminaren ali turbulenten, odvisno od pogojev na vstopu v cev in drugih spremenljivk.

Za mešalne posode (bioreaktorje) pa izrazimo Reynoldsovo število kot:

$$Re_i = \frac{N_i \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\eta} \quad (1.2)$$

pri čemer je Re_i Reynoldsovo število mešala (i... „impeler“, mešalo), D_i je premer mešala, N_i pa hitrost vrtenja mešala. Za mnoge mešalne sisteme, kateri se največkrat uporabljajo v biotehnologiji, velja, da je tok laminaren, če je $Re_i \leq 10$.

Pojav vrtinčenja in turbulenten tok je v mešalnih bioreaktorjih zaželen, saj je na ta način mešanje učinkovitejše, prav tako prenos toplote. Zato so na stenah mešalnih bioreaktorjev nameščene pregrade (navadno 4), ki preprečujejo nastanek lijaka.

Poleg geometrije reaktorske posode in mešala vplivata na gibanje tekočine tudi njena gostota in viskoznost. Slednja se med šaržnim bioprocesom navadno spreminja, saj se spreminja ena ali več naslednjih lastnosti bioprocesne brozge:

- koncentracija celic
- celična morfologija (velikost, oblika, masa)
- koncentracija polimernih snovi (substratov ali produktov)
- osmotski tlak brozge, ipd.

Mešanje je fizikalna hidrodinamska operacija, ki zmanjša nehomogenost tekočine z odstranitvijo gradientov, npr. koncentracijskega, temperaturnega. Gre za izmenjavo mase med različnimi lokacijami, kar vodi do pomešanja snovi. V bioprocesništvu je mešanje eden izmed najpomembnejših postopkov, saj je potrebno potrebno za:

- doseganje enotne sestave in temperature medija,
- pospešitev prenosa hranil in metabolnih produktov,
- hitrejši prenos toplote,
- suspendiranje trdnih delcev,
- dispergiranje plinske faze v tekočini (aerobni procesi),
- pospešitev prenosa kisika iz plinskih mehurčkov v tekočino (aerobni procesi),
- dispergiranje tekočine v tekočini (npr. dodatek protipenilca).

Mešanje vključuje:

- raztapljanje topnih sestavin gojišča (npr. sladkorjev) v vodi,
- dispergiranje plinov (npr. zraka) v tekočini v obliki malih mehurčkov,
- vzdrževanje suspenzij trdnih delcev (npr. celic),
- dispergiranje tekočin, ki se ne mešajo, in oblikovanje emulzij ali suspenzij,
- pospeševanje prenosa toplote v ali iz tekočine.

Med najpogostejšimi načini mešanja v bioprocesništvu je mehansko mešanje z mešalom.

Mešalni bioreaktorji so navadno cilindrične oblike, dno je zaokroženo, kar preprečuje nastanek nepremešanih področij.

Mešanje v bioreaktorjih dosežemo z vgrajenim mešalom in pregradami. Pri uporabi Newtonskih tekočin (zanje velja, da je viskoznost neodvisna od tokovnih razmer) je razmerje med premerom bioreaktorja in premerom mešala 3: 1. Tak bioreaktor imenujemo mešalni bioreaktor standardne konfiguracije oz. STC-reaktor. V sredini bioreaktorja je os mešala, ki jo poganja motor, nameščen na vrhu ali na dnu bioreaktorske posode. Na osi je pritrjeno eno ali več mešal, ki so lahko različnih konstrukcijskih izvedb (slika 1.1).



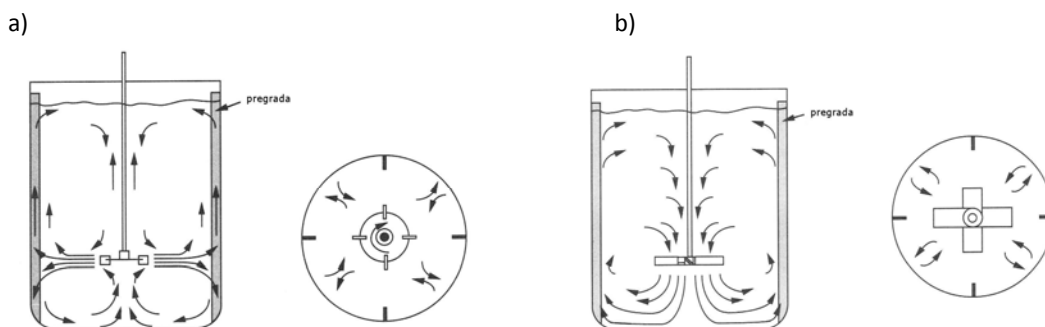
Slika 1.1. Mešala: a) Rushtonova turbina, b) propeler, c) veslo, d) sidro
(<http://www.postmixing.com/mixing%20forum/impellers/rt.htm>)

Izbira izvedbe mešala je odvisna od viskoznosti medija in občutljivosti kulture na mehanski strig (strižne sile), največ pa se uporablja diskasta turbina s šestimi ravnimi lopaticami, t.j. Rushtonova turbina (slika 1.1 a).

Tok tekočine v bioreaktorju je odvisen od:

- konstrukcijske izvedbe mešala,
- lastnosti tekočine,
- velikosti in geometrijskih lastnosti bioreaktorske posode, pregrad, prezračevalnega sistema.

Rushtonova turbina npr. usmerja nizkoviskozne tekočine v radialni tok, medtem ko mešanje s propelerjem vodi v aksialno kroženje tekočine v bioreaktorju (slika 1.2). Turbinska mešala pri vrtenju povzročajo visoke strižne sile in so učinkovita pri dispergiranju, medtem ko so propelerji primerni predvsem za homogeniziranje in suspendiranje trdnih delcev.



Slika 1.2. Tokovna profila v mešalnem bioreaktorju s pregradami, ki jo povzročata Rushtonova turbina (a) in propeler (b) (prirejeno po Doran, 1995)

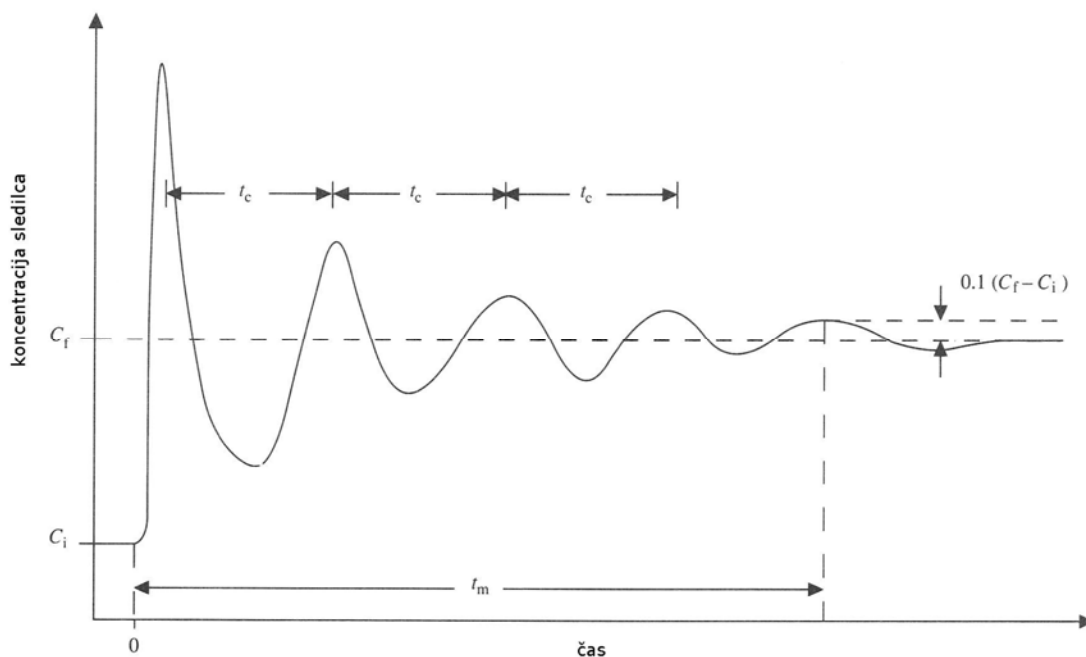
Pri načrtovanju bioprocesa v mešalnem bioreaktorju moramo izbrati ustrezno mešalo in določiti pogoje mešanja tako, da bomo porabili najmanj energije in dosegli največjo učinkovitost mešanja.

Mešanje je učinkovito takrat, ko tekočina, ki jo meša mešalo, zajame celotno mešalno posodo v nekem sprejemljivem času. Poleg tega mora biti hitrost tekočine, ki zapuša mešalo, dovolj

velika, da nosi vse snovi v najbolj oddaljen del bioreaktorja. V bioreaktorju se mora vzpostaviti turbulentno stanje. V takšnih pogojih nastopijo:

- distribucija oz. porazdelitev tekočine po mešalni posodi ter nastanek večjih vrtincev – navadno najpočasnejši korak (*makromešanje*)
- disperzija – nastajanje vedno manjših vrtincev in hiter prenos snovi po mešalni posodi (*makro- ali mikromešanje*, odvisno od količine tekočine in vnosa moči)
- molekularna difuzija znotraj vrtincev.

Učinkovitost mešanja ugotavljamo z določitvijo časa pomešanja (t_m). Čas pomešanja je definiran kot čas, ki je potreben za doseganje določene stopnje homogenosti. Navadno je to čas, v katerem se koncentracija sledilca razlikuje od končne koncentracije (c_f) za manj kot 10 % razlike med tema koncentracijama (slika 1.3).



Slika 1.3. Prikaz gibanja koncentracije sledilca po vnosu v mešalni bioreaktor (prirejeno po Doran, 1995)

naslednja Med časom pomešanja in časom kroženja oz. ciklizacije (t_c) velja naslednja zveza:

$$t_m = \alpha \cdot t_c, \quad (1.3)$$

pri čemer so vrednosti koeficienta α med 3 in 7; za enofazne tekočine v mešalni posodi s pregradami in majhnim mešalom je α 4.

Za določanje časa pomešanja so razvite številne metode, ki temeljijo na pulznem vnosu inertnega sledilca in spremljanju odziva sistema do dosežene enotne sestave medija. Sledilci so navadno kisline, baze, koncentrirane raztopine soli, topla tekočina, barva. Na določenem mestu v bioreaktorju tako merimo naslednje količine: pH, električno prevodnost, temperaturo, fluorescenco, magnetne lastnosti, radioaktivnost. Spremljamo lahko tudi obarvanje ali razbarvanje medija, ki hkrati omogoča vizualizacijo mirujočih con.

Čas pomešanja, ki ga določimo z eno izmed prej omenjenih metod, je odvisen od:

- naših zahtev pomešanja (stopnja homogenosti)
- natančnosti določitve homogenosti medija
- mesta vnosa sledilca
- lokacije senzorja.

Industrijski bioreaktorji delovnih volumnov od 1 do 100 m³ imajo čase pomešanja 30 do 120 s, odvisno od pogojev. Na čas pomešanja v mešalnih posodah vplivajo:

- velikost bioreaktorja,
- velikost mešala,
- lastnosti tekočine (npr. viskoznost),
- hitrost mešanja.

Odvisnost naštetih spremenljivk od časa pomešanja lahko določimo eksperimentalno za različna mešala. Navadno izračunamo brezdimenzijski čas pomešanja $N_i \cdot t_m$, ki predstavlja število vrtljajev mešala, potrebno za homogeniziranje tekočine. V turbulentnem območju pri visokih Re_i ($Re_i > 5000$) se $N_i \cdot t_m$ približuje konstantni vrednosti. Tako velja za Rushtonovo turbino naslednja zveza:

$$N_i \cdot t_m = \frac{1,54 V}{D_i^3} \quad (1.4)$$

pri čemer je V volumen tekočine v bioreaktorju. Pri visokih Re_i je $N_i \cdot t_m$ torej odvisen le od velikosti bioreaktorja in mešala. To pomeni, da lahko v določenem bioreaktorju z izbranim mešalom zmanjšamo čas pomešanja tako, da povečamo hitrost mešanja. Da je mešanje hitro in učinkovito, mora biti namreč čas pomešanja čim manjši.

Doseganje majhnih časov pomešanja je, še posebej v velikih bioreaktorjih, navadno povezano z veliko porabo energije. V industrijskih bioreaktorjih volumna okrog 0,1 m³ je poraba moči na enoto volumna okrog 10 kW·m⁻³, v večjih posodah (okrog 100 m³) pa 1-2 kW·m⁻³.

Moč, ki jo vnesemo v tekočino preko mešanja, je običajno manjša od dejanske moči, potrebne za pogon motorja, saj prihaja do izgub energije na menjalnikih, ipd. V neprezračevanem sistemu jo lahko izračunamo iz enačbe:

$$P = P_0 \cdot \rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5 \quad (1.5)$$

kjer je P_0 brezdimenzijsko število, imenovano število moči. Število moči za posamezno mešalo ima v turbulentnem območju konstantno vrednost, ki ni odvisna od Re_i , ampak le od geometrijske konfiguracije mešala - P_0 za Rushtonovo turbino je 5-6. V laminarnem območju je $P_0 \propto Re_i^{-1}$.

1.2 Naloga

Ekperimentalna določitev časa pomešanja v laboratorijskem STC-bioreaktorju v vodi za Rushtonovo turbino s pH-metrično in termično metodo ter v stekleni čaši z metodo razbarvanja. Določitev vpliva hitrosti mešanja na čas pomešanja in izračun moči potrebne za mešanje.

1.3 Potreben material in oprema

pH-metrična metoda:

- 1 M NaOH
- 1 M HCl
- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 10$ L) z opremo (Rushtonova turbina, gumb za nastavitev hitrosti mešanja, pH-elektroda), napolnjen z vodo (Slika 1.4)



Slika 1.4. Laboratorijski bioreaktorski sistem

Termična metoda:

- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 2,5$ L) z opremo (Rushtonova turbina, gumb za nastavitev hitrosti mešanja, temperaturni senzor), napolnjen z vodo (Slika 1.4)
- vodna kopel z vročo vodo ($T = 90$ °C)
- merilni valj

Metoda razbarvanja:

- steklena čaša z 800 mL vode
- magnetno mešalo z mešalčkom
- štoparica
- 0,1 M HCl
- 0,1 M NaOH
- fenolftalein

1.4 Potek vaje

pH-metrična metoda

Bioreaktor z delovnim volumnom 10 L napolnimo z destilirano vodo. V bioreaktorju je umerjena pH elektroda (v dveh točkah z dvema referenčnima pufroma). Z dodatkom 1 M NaOH uravnamo začetno vrednost pH na 9. Hitrost mešanja nastavimo na 10 min^{-1} . Kot sledilec uporabimo 1 M HCl. Odpipetiramo 5 mL 1 M HCl in jo brizgnemo v vodo v bioreaktorju. Pazimo, da to naredimo vedno na istem mestu in s približno enako hitrostjo. Na monitorju spremljamo spreminjanje vrednosti pH. Ko se vrednost pH ustali, nastavimo drugo hitrost mešanja, t.j. 30 min^{-1} , in ponovno uravnamo začetno vrednost pH ($\text{pH} = 9$). Ponovimo postopek vnosa sledilca, ki smo ga izvedli pri prvi hitrosti mešanja. Isti poskus naredimo še za naslednje hitrosti mešanja: 50 min^{-1} , 100 min^{-1} , 200 min^{-1} .

Termična metoda

V bioreaktor z delovnim volumnom 2,5 L nalijemo 2 L destilirane vode. V bioreaktorju je že vgrajen in umerjen temperaturni senzor. Temperaturo vode uravnamo na 20 °C. Hitrost mešanja nastavimo na 10 min^{-1} . Kot sledilec uporabimo vročo vodo ($T = 90$ °C). Z merilnim valjem odmerimo 500 mL vroče vode in jo vlijemo v bioreaktor. Pazimo, da to naredimo vedno na istem mestu in s približno enako hitrostjo. Na monitorju spremljamo spreminjanje temperature. Ko se temperatura ustali, zamenjamo vodo v bioreaktorju ($V = 2$ L, $T = 20$ °C) in nastavimo drugo hitrost mešanja, t.j. 30 min^{-1} . Ponovimo postopek vnosa sledilca, ki smo ga izvedli pri prvi hitrosti mešanja. Isti poskus naredimo še za naslednje hitrosti mešanja: 50 min^{-1} , 100 min^{-1} , 200 min^{-1} .

Zaradi slabe občutljivosti temperaturnega senzorja in posledično velikega volumna sledilca so rezultati te metode le ocene časov pomešanja.

Metoda razbarvanja

V stekleno čašo odmerimo 800 mL vode. Dodamo 1 mL fenolftaleina in z 0,1 M NaOH uravnamo vrednost pH na 9. V čašo prenesemo mešalček in jo postavimo na magnetno mešalo. Hitrost mešanja nastavimo na 100 min^{-1} . Kot sledilec uporabimo 0,1 M HCl. Odpipetiramo 1 mL 0,1 M HCl in jo brizgnemo v čašo. Pazimo, da to naredimo vedno na istem mestu in s približno enako hitrostjo. Merimo čas, v katerem vijolično obarvanje popolnoma izgine (čas pomešanja). Z dodatkom 1 mL 0,1 M NaOH ponovno uravnamo začetno vrednost pH na 9, spremenimo hitrost mešanja in ponovimo postopek vnosa sledilca ter beleženja časa pomešanja. Uporabimo še naslednje hitrosti mešanja: 200 min^{-1} , 300 min^{-1} , 400 min^{-1} , 500 min^{-1} , 600 min^{-1} .

1.5 Meritve, izračuni in rezultati

Meritve:

- eksperimentalno določeni časi pomešanja (t_m) pri različnih hitrostih mešanja (N_i) za vse uporabljene metode (tabela)

Izračuni za pH-metrično metodo:

- brezdimenzijski časi pomešanja ($N_i \cdot t_m$) iz eksperimentalnih podatkov
- teoretični časi pomešanja (t_m)
- Reynoldsovo število mešala (Re_i)
- vnos moči (P)

Predstavitev rezultatov:

- eksperimentalno določeni t_m proti Re_i (grafični prikaz)
- $N_i \cdot t_m$ proti Re_i (grafični prikaz)

LITERATURA

- Doran, P. M. 1995. Bioprocess engineering principles. London, Academic Press Limited: 129-163.
- Žnidaršič, P., Pavko, A. 2002. Praktikum iz biokemijskega inženirstva. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani: 1-13.

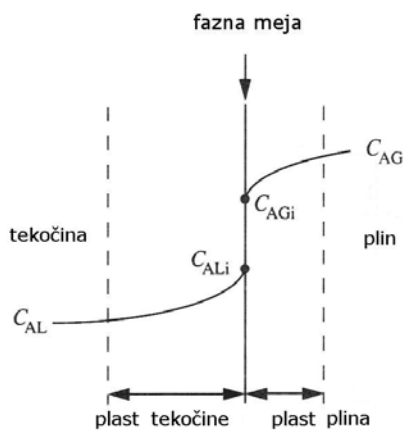
2 PRENOS KISIKA – DOLOČITEV $k_L a$

Maja Paš

2.1 Teoretične osnove

Prenos kisika v bioprocesno brozgo Pomembnost prenosa snovi med plinom in tekočino v bioprocesništvu se kaže predvsem v aerobnih bioprocesih, pri katerih je treba zagotoviti dovolj raztopljenega kisika v bioprocesni brozgi. Med mešanjem mehurčkov zraka, ki vsebujejo kisik, se odvija snovni prenos kisika iz plina v tekočino prek mejnega sloja in fazne meje, ki ga lahko opišemo s *teorijo mejnega sloja*. Ta predpostavlja, da na vsaki strani fazne meje, to je znotraj plinskega mehurčka in v tekočini, obstajata mirujoči plasti plina in tekočine določene debeline, kjer poteka snovni prenos komponente A (kisika) z difuzijo. Snovni prenos tako povečujejo tisti faktorji, ki zmanjšujejo debelino mejnega sloja, predvsem intenzivno mešanje.

Slika 2.1 prikazuje primer porazdelitve komponente A pri snovnem prenosu iz plina v kapljevino. Koncentracija komponente A v tekočini je C_{AL} oziroma C_{ALi} na fazni meji, koncentracija komponente A v plinu pa je C_{AG} oziroma C_{AGi} na fazni meji.



Slika 2.1. Koncentracijska porazdelitev komponente A pri snovnem prenosu iz plina v tekočino (prirejeno po Doran, 1995)

Za hitrost prenosa kisika iz zračnega mehurčka v bioprocesno brozgo lahko uporabimo enačbo 2.1, v kateri je N_A hitrost prenosa kisika na volumensko enoto brozge ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$), k_L je koeficient snovne prestopnosti v tekočini ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), a je stična površina med plinom in

tekočino na volumensko enoto brozge ($\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$), C_{AL} je koncentracija kisika v brozgi ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$), C_{AL}^* pa koncentracija kisika v brozgi v ravnotežju s plinsko fazo, ki ji pravimo tudi *topnost* kisika v brozgi ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$).

$$N_A = k_L \cdot a(C_{\text{AL}}^* - C_{\text{AL}}) \quad (2.1)$$

Razlika med maksimalno možno in dejansko koncentracijo kisika v brozgi ($C_{\text{AL}}^* - C_{\text{AL}}$) je gonilna sila za prenos kisika. Slednja določa parcialni tlak kisika v plinski mešanici, ki ga poleg sestave določa tudi tlak plina, s katerim prepihujemo. Topnost lahko izračunamo preko Henryjevega zakona ravnotežja, ki se glasi:

$$p_{\text{AG}} = H \cdot C_{\text{AL}}^* \quad (2.2)$$

p_{AG} je parcialni tlak komponente A v plinu, H je Henryjeva konstanta, odvisna od temperature.

Tabela 2.1 prikazuje vrednosti Henryjeve konstante in topnosti kisika v vodi v odvisnosti od temperature ter vpliv sestave plina, s katerim prepihujemo vodo, na raztapljanje kisika v vodi.

Tabela 2.1: Henryjeva konstanta pri različnih temperaturah in topnost kisika v vodi v odvisnosti od temperature in parcialnega tlaka kisika v zraku, s katerim prepihujemo (prirejeno po Doran, 1995)

T (°C)	Henryjeva konstanta ($\text{atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$)	Topnost kisika v vodi ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)	
		Prepihovanje s kisikom (tlak je 1 atm)	Prepihovanje z zrakom (tlak je 1 atm)
0	14,2	$7,03 \cdot 10^{-2}$	$1,48 \cdot 10^{-2}$
10	18,2	$5,49 \cdot 10^{-2}$	$1,15 \cdot 10^{-2}$
15	20,2	$4,95 \cdot 10^{-2}$	$1,04 \cdot 10^{-2}$
20	22,2	$4,50 \cdot 10^{-2}$	$9,45 \cdot 10^{-3}$
25	24,2	$4,14 \cdot 10^{-2}$	$8,69 \cdot 10^{-3}$
26	24,6	$4,07 \cdot 10^{-2}$	$8,55 \cdot 10^{-3}$
27	24,9	$4,01 \cdot 10^{-2}$	$8,42 \cdot 10^{-3}$
28	25,3	$3,95 \cdot 10^{-2}$	$8,29 \cdot 10^{-3}$
29	25,7	$3,89 \cdot 10^{-2}$	$8,17 \cdot 10^{-3}$
30	26,1	$3,84 \cdot 10^{-2}$	$8,05 \cdot 10^{-3}$
35	27,9	$3,58 \cdot 10^{-2}$	$7,52 \cdot 10^{-3}$
40	29,7	$3,37 \cdot 10^{-2}$	$7,07 \cdot 10^{-3}$

Seveda teh podatkov ne moremo uporabiti neposredno za bioprocenke sisteme, saj ima poleg drugih parametrov pomemben vpliv na topnost kisika sestava medija oziroma v vodi raztopljene snovi. Tako je topnost kisika v tipičnem bioprocenem gojišču, ki vsebuje različne topljence (sladkorje, anione, katione, protipenilce), za 5 do 25 % manjša od topnosti kisika v vodi pri enakih razmerah (temperatura, tlaki).

Poraba kisika v aerobnih bioprocenih

Celice med aerobno kultivacijo porabljajo raztopljeni kisik iz bioprocenske brozge. Hitrost prenosa kisika iz plina v tekočino je zato zelo pomembna, še posebno pri velikih koncentracijah celic, pri katerih lahko pride do limitacije rasti zaradi (ne)razpoložljivosti kisika v brozgi.

Celice aerobnih organizmov med intenzivno rastjo zaradi slabe topnosti kisika v brozgi hitro porabijo raztopljeni kisik, zato ga je treba nenehno dovajati s prezračevanjem. V brozgi s koncentracijo aktivno dihajočih celic približno $1 \cdot 10^9$ celic·ml⁻¹ je treba vsebnost kisika v brozgi nadomestiti okoli 12-krat na minuto, da pokrijemo potrebe po kisiku.

Hitrost porabe kisika iz bioprocenske brozge določa hitrost, s katero raztapljamo kisik v brozgi. Na potrebe po kisiku vplivajo predvsem naslednji faktorji:

- vrsta organizma
- faza rasti kulture
- vir ogljika v gojišču (celice denimo najhitreje porabijo glukozo, zato so hitrosti porabe kisika večje, če je vir C v gojišču glukoz)

V šaržnem bioprocenu se hitrost porabe kisika spreminja s časom, in sicer zaradi:

- vedno večje koncentracije celic – skupna (celotna) hitrost porabe kisika je sorazmerna številu prisotnih celic
- spreminjanja *specifične hitrosti porabe kisika* (q_0) ($\text{mol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{biomase}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

Specifična hitrost porabe kisika je hitrost porabe kisika na celico in je odvisna predvsem od biokemijske narave (lastnosti) celice in od njenega okolja. Iz slike 2.2 je razvidno, da je q_0 največja v zgodnji eksponentni fazi rasti.

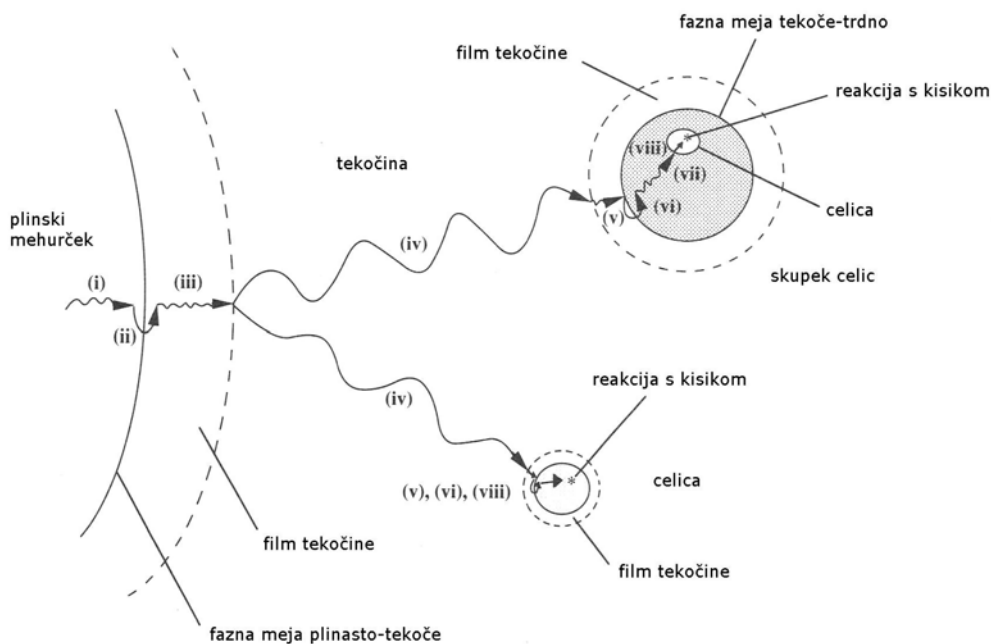
Koncentracija raztopljenega kisika v brozgi mora biti v vsaki točki bioreaktorja večja od C_{kr} , da ne pride do limitacije rasti s kisikom. Vrednost kritične koncentracije raztopljenega kisika je odvisna od organizma, navadno se giblje med 5 in 10 %.

Hitrost porabe kisika na volumensko enoto brozge Q_0 ($\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$) lahko zapišemo kot:

$$Q_0 = q_0 \cdot X \quad (2.3)$$

pri čemer je X koncentracija celic ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$).

Preden se molekula kisika porabi v celici, mora na poti od zračnega mehurčka do mitohondrija premagati številne upore (prikazani kot (i) do (viii) na sliki 2.4). Največji upor za prenos kisika je laminarni sloj (plast) tekočine okoli zračnega mehurčka, v katerem poteka prenos snovi z difuzijo (iii). Transport skozi ta film je torej korak, ki limitira celotni proces ter kontrolira skupno hitrost prenosa snovi.



Slika 2.4. Koraki pri prenosu kisika iz zračnega mehurčka do celice (prirejeno po Doran, 1995)

Stacionarno stanje

V stacionarnem stanju ni akumulacije kisika nikjer v bioreaktorju, torej mora biti hitrost prenosa kisika iz zračnih mehurčkov enaka hitrosti porabe kisika. Zapišemo lahko:

$$k_L \cdot a(C_{AL}^* - C_{AL}) = q_0 \cdot X \quad (2.4)$$

Enačbo (2.4) lahko uporabimo za različne namene:

- Izračunamo lahko maksimalno koncentracijo celic, ki jo dosežemo v določenem sistemu prenosa kisika v bioreaktorju. V določenih razmerah med obratovanjem je hitrost prenosa kisika maksimalna, ko je koncentracijska razlika ($C_{AL}^* - C_{AL}$), tj. gonilna sila za prenos kisika, največja. To pa je takrat, ko je koncentracija raztopljenega kisika (C_{AL}) enaka nič. Maksimalno koncentracijo biomase X_{max} torej zapišemo kot:

$$X_{max} = \frac{k_L \cdot a C_{AL}^*}{q_O} \quad (2.5)$$

Če je X_{max} manjša od tiste koncentracije biomase, ki jo želimo doseči v bioprosesu, moramo izboljšati $k_L \cdot a$.

- Določimo lahko minimalni oziroma kritični $k_L \cdot a$, ki je potreben, da vzdržujemo koncentracijo raztopljenega kisika v bioprosesu nad kritično koncentracijo raztopljenega kisika ($C_{AL} > C_{kr}$):

$$(k_L \cdot a)_{kr} = \frac{q_O \cdot X}{(C_{AL}^* - C_{AL})} \quad (2.6)$$

Ekperimentalno določanje $k_L a$

V realnih sistemih, ki vključujejo prenos snovi, je zelo težko določiti kontaktno medfazno površino (a). Ta je neposredno povezana s številom in z velikostjo plinskih mehurčkov v tekočini, kar pa je odvisno od številnih faktorjev, kot so sestava medija, hitrost mešanja in pretok plina (zraka). Zato v praksi navadno določamo produkt $k_L \cdot a$, volumenski koeficient snovnega prestopa oziroma prenosa kisika.

Kot rezultat mnogih študij so nastale *empirične korelacije* med $k_L \cdot a$ in drugimi pomembnimi procesnimi spremenljivkami, kot so premer mehurčkov, hitrost tekočine, gostota, viskoznost, difuzivnost kisika idr. Kljub temu je le na podlagi korelacij težko napovedati, kakšen bo $k_L \cdot a$ v določenem bioreaktorju, zato koeficient snovne prestopnosti navadno *določamo eksperimentalno*.

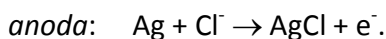
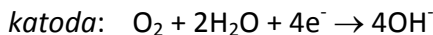
Metode za določanje $k_L \cdot a$ so zelo različne, pri vseh pa moramo zagotoviti enake eksperimentalne pogoje, kot so med obratovanjem v bioreaktorju.

Če je koncentracija kisika, ki jo merimo med eksperimentom, konstantna, je metoda *stacionarna*. Spremljamo vsebnost kisika v vstopnem plinu v bioreaktor in izstopnem plinu iz bioreaktorja. Razlika med njima mora biti enaka hitrosti prenosa kisika iz plina v tekočino. Metodo je mogoče izvesti med normalnim obratovanjem bioreaktorjev.

Pri *dinamičnih metodah* se koncentracija kisika s časom spreminja. Temeljijo torej na nestacionarnih pogojih. Obstajajo različne različice dinamične metode. Med najpogostejšimi sta:

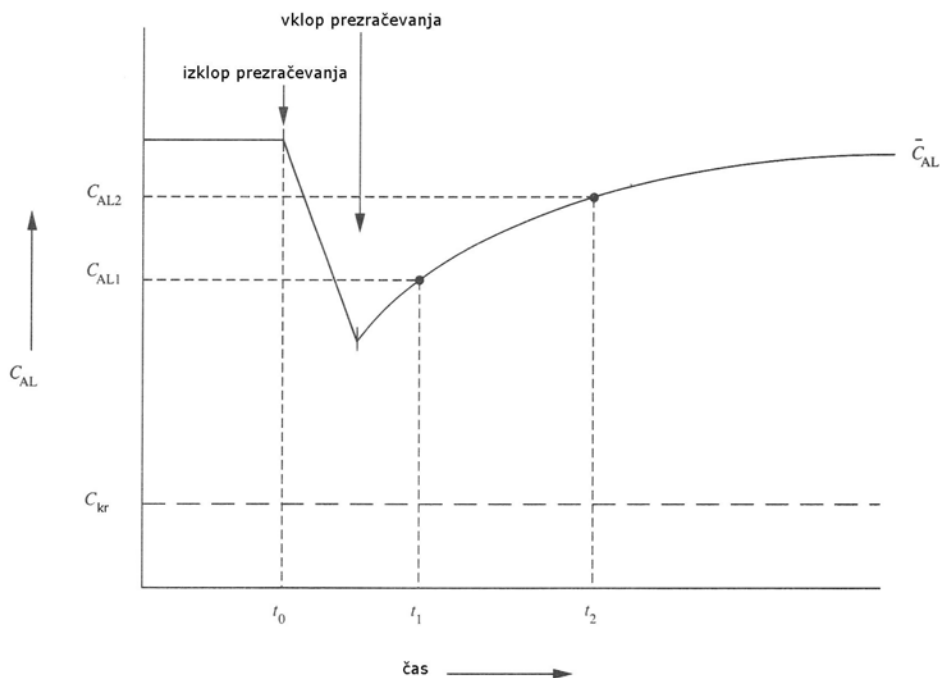
- razplinjevalna metoda (modificirana po Wiseju)
- dinamična metoda z mikroorganizmi (modificirana po Taghuchiju in sodelavcih)

Eksperiment poteka med šaržnim aerobnim bioprosesom v mešalnem bioreaktorju. Koncentracijo raztopljenega kisika v brozgi spremljamo s senzorjem za merjenje kisika (kisikova oziroma pO_2 -elektroda). Kisikov senzor je zgrajen iz ohišja s polprepustno membrano, skozi katero difundira kisik. Na notranji strani senzora je elektrolit, v katerem sta potopljeni anoda in katoda. Kisik difundira skozi film tekočine na zunanji strani tik ob membrani ter nato skozi polprepustno membrano v notranjost senzora, kjer sodeluje pri hitri elektrokemijski reakciji:



Izhodni električni tok je proporcionalen snovnemu toku kisika do katode, torej njegovi aktivnosti oziroma parcialnemu tlaku, zato izraz koncentracija kisika pravzaprav pomeni parcialni tlak kisika. Snovni tok kisika do katode je tako odvisen od dveh uporov: upora membrane in upora filma na zunanji strani senzora. Na rezultate meritev lahko vplivajo tudi mehurčki, ki se med merjenjem »lepijo« na membrano oziroma ostajajo v raztopini, če uporabimo dinamično metodo s prepihanjem. Tako se lahko v določenem trenutku vrednost koncentracije kisika, ki jo kaže elektroda, in dejanska vrednost razlikujeta v primeru, ko senzor ne more slediti hitrim spremembam koncentracije v tekočini oziroma takrat, ko medij, v katerem merimo, povzroča kakšne nezaželene pojave. Zato imajo stacionarne metode celo nekatere prednosti pred dinamičnimi.

V nekem času ($t = 0$) začnemo izpodrivati kisik iz brozge (deoksigenacija), tako da izklopimo prezračevanje in zmanjšamo hitrost mešanja na minimum, da še ne pride do posedanja mikroorganizmov, hkrati pa preprečimo površinsko aeracijo. Koncentracija raztopljenega kisika v brozgi (C_{AL}) začne padati, saj ga celice porabljajo (slika 2.5). Za ta del krivulje velja enačba (2.3).



Slika 2.5. Spreminjanje koncentracije raztopljenega kisika v bioproceni brozgi med dinamično metodo določanja $k_L \cdot a$ (prirejeno po Doran, 1995)

Prezračevanje moramo ponovno vklopiti, preden koncentracija raztopljenega kisika v brozgi doseže C_{kr} , saj je pomembno, da hitrost porabe kisika ni odvisna od koncentracije raztopljenega kisika. Po vklopu prezračevanja sledi ponovno raztapljanje kisika in povečevanje koncentracije raztopljenega kisika v brozgi (reoksigencija) do *ravnotežne koncentracije raztopljenega kisika* (\bar{C}_{AL}), ki je odraz ravnotežja med vnosom in porabo kisika. C_{AL1} in C_{AL2} na sliki 2.5 sta med reoksigencijo izmerjeni koncentraciji kisika ob časih t_1 in t_2 . Med reoksigencijo sistem ni v stacionarnem stanju, ker gre tako za vnos kisika v brozgo ($k_L \cdot a(C_{AL}^* - C_{AL})$) kot za porabo s celicami ($q_O \cdot X$). Tako velja naslednja enačba:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L \cdot a(C_{AL}^* - C_{AL}) - q_O \cdot X \quad (2.7)$$

Ko pa se vzpostavi stacionarno stanje, je $C_{AL} = \bar{C}_{AL}$, $\frac{dC_{AL}}{dt} = 0$, saj se koncentracija raztopljenega kisika s časom ne spreminja. Iz enačbe (2.7) torej sledi:

$$q_O \cdot X = k_L \cdot a(C_{AL}^* - \bar{C}_{AL}) \quad (2.8)$$

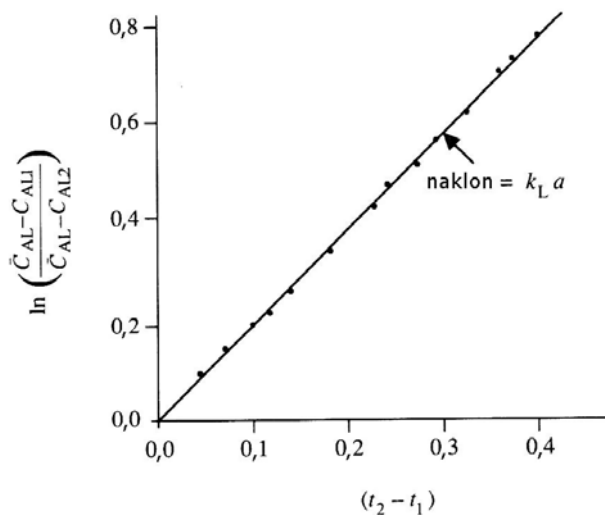
Če izraz (2.8) vnesemo v enačbo (2.7), dobimo:

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L \cdot a (\bar{C}_{AL} - C_{AL}) \quad (2.9)$$

Predpostavimo, da se $k_L \cdot a$ s časom ne spreminja in zapis (2.9) integriramo med časoma t_1 in t_2 . Rezultat je naslednji:

$$k_L \cdot a = \frac{\ln \left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL2}} \right)}{t_2 - t_1} \quad (2.10)$$

$k_L \cdot a$ lahko tako izračunamo iz dveh točk na sliki 2.5. Rezultat je natančnejši, če izberemo več točk, izračunamo $\ln \left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL2}} \right)$ in vrednosti naneseemo na ordinato, $t_2 - t_1$ pa na absciso (slika 2.6). Naklon premice predstavlja $k_L \cdot a$.



Slika 2.6. Grafična določitev $k_L \cdot a$ z dinamično metodo (prirejeno po Doran, 1995)

Izraz (2.10) lahko uporabimo tudi za sisteme brez porabe kisika. V tem primeru je $\bar{C}_{AL} = \bar{C}_{AL}^*$, metodi za določanje $k_L \cdot a$ pa pravimo razplinjevalna metoda.

2.2 Naloga

Določitev volumenskega koeficienta snovnega prestopa kisika ($k_L \cdot a$) pri različnih hitrostih mešanja in pretokih zraka v laboratorijskem bioreaktorju standardnih dimenzij z dvema dinamičnima metodama: razplinjevalno in dinamično metodo z mikroorganizmi.

2.3 Potreben material in oprema

Kultura

Čista kultura kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (pekovski kvas).

Gojišče

Sestava gojišča za aerobno submerzno kultivacijo kvasovk v šaržnem bioprocesu je podana v tabeli 2.2. Gojišče je bilo sterilizirano v avtoklavu 20 min pri 121 °C in tlaku 1,2 bar.

Tabela 2.2: Sestava gojišča za aerobno submerzno kultivacijo kvasovk v šaržnem bioprocesu

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt	5,0
saharoza	10,0
destilirana voda	do 1000 mL

Aparature in oprema:

- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 10$ L) z opremo, pO_2 -elektroda
- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 2,5$ L) z opremo, pO_2 -elektroda (Slika 1.4)
- jeklenka z N_2
- rotameter
- laboratorijski inventar za inokulacijo: gorilnik, lij

2.4 Potek vaje

Razplinjevalna metoda

Vodo v bioreaktorju (10 L) prepihujemo z inertnim plinom N_2 tako dolgo, da izpodrinemo ves raztopljeni kisik iz vode. Pretok dušika uravnamo z rotametrom na $10,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Vsebnost kisika v vodi merimo s prej umerjeno pO_2 -elektrodo in na monitorju spremljamo grafični prikaz spreminjanja pO_2 (v %) v odvisnosti od časa. Ko je vrednost pO_2 enaka nič, prekinemo dotok dušika, nastavimo 1. kombinacijo eksperimentalnih parametrov (hitrost mešanja in pretok zraka), pri katerem bomo določali $k_L \cdot a$, ter vklopimo prezračevanje. Spremljamo ponovno raztapljanje kisika v vodi (*reoksigencija*). Ko pO_2 doseže 100 %, ponovimo postopek izpodrinjanja kisika iz vode in nastavimo 2. kombinacijo parametrov. Eksperiment izvedemo pri štirih različnih eksperimentalnih pogojih, prikazanih v tabeli 2.3.

Tabela 2.3: Prikaz eksperimentalnih pogojev pri razplinjevalni metodi

Kombinacija parametrov	Hitrost mešanja (min^{-1})	Pretok zraka ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)
1.	100	5,0
2.	100	10,0
3.	200	10,0
4.	200	5,0

Dinamična metoda z mikroorganizmi

Inokulum pripravimo tako, da v 125 mL sterilnega gojišča (tabela 2.2) zatehtamo 2,5 g pekovskega kvasa. Inokulum aseptično (ob gorilniku, skozi sterilen lij) prenesemo v 2,375 L sterilnega prezračenega gojišča v bioreaktorju in tako zaženemo šaržen aeroben submerzen bioproces. Kultivacija kvasovk poteka pri temperaturi 28 °C, hitrosti mešanja 200 min^{-1} in pretoku zraka 5,0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ (2 vvm). Tako zagotovimo, da je koncentracija kisika v brozgi čim bližje nasičenju.

Čez približno 15 minut izklopimo prezračevanje in mešanje zmanjšamo na minimum, da preprečimo površinsko aeracijo ter zagotovimo dober odzivni čas elektrode, hkrati pa dosežemo, da se mikroorganizmi ne posedajo. Spremljamo linearno padanje koncentracije raztopljenega kisika v brozgi. Ko $p\text{O}_2$ doseže 40 %, prezračevanje in mešanje ponovno uravnamo na zelene proučevane vrednosti. Če je hitrost dovajanja kisika večja od hitrosti njegove porabe, začne $p\text{O}_2$ naraščati. Spreminjanje $p\text{O}_2$ v brozgi ponazarja slika 2.5.

Eksperiment izvedemo pri kombinacijah parametrov, prikazanih v tabeli 2.4.

Tabela 2.4: Prikaz eksperimentalnih pogojev pri dinamični metodi z mikroorganizmi

Kombinacija parametrov	Hitrost mešanja (min^{-1})	Pretok zraka ($\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$)
1.	100	5,0
2.	100	2,5
3.	200	2,5

2.5 Meritve, izračuni in rezultati

Meritve

Grafični prikaz: $p\text{O}_2$ (v %) v odvisnosti od časa za razplinjevalno metodo in dinamično metodo z mikroorganizmi; na grafih naj bodo označeni različni eksperimentalni pogoji.

Izračuni

Volumenski koeficienti snovnega prestopa kisika ($k_L \cdot a$) pri različnih hitrostih mešanja in pretokih zraka, določeni z razplinjevalno metodo in dinamično metodo z mikroorganizmi - izračuni vključujejo tudi grafične prikaze (sliki 2.5 in 2.6).

Predstavitev rezultatov:

Tabela: koeficienti $k_L \cdot a$ pri različnih hitrostih mešanja in pretokih zraka, določeni z razplinjevalno metodo in dinamično metodo z mikroorganizmi.

LITERATURA

- Doran, P. M. 1995. Bioprocess engineering principles. London, Academic Press Limited: 196-213.
- Raspor, P., Smole-Možina, S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA: 109-115.
- Žnidaršič, P., Pavko, A. 2002. Praktikum iz biokemijskega inženirstva. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani: 14-29.

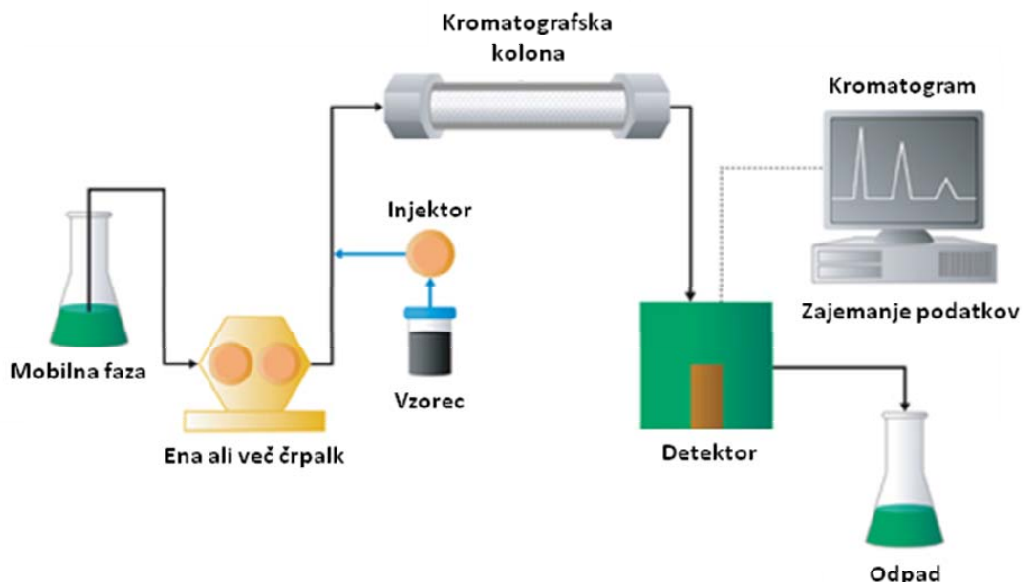
3 LOČEVANJE PROTEINOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO

Aleš Podgornik

3.1 Teoretične osnove

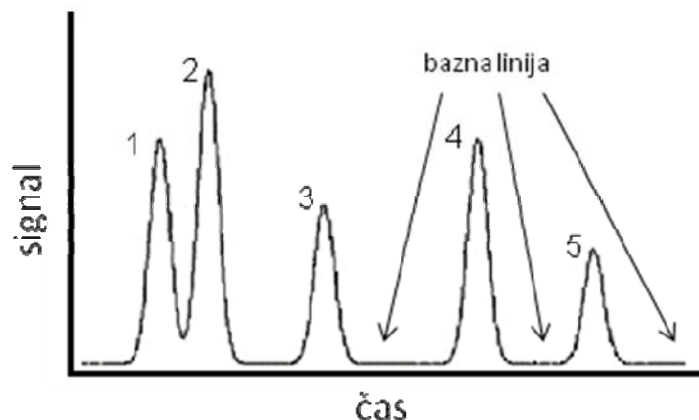
Visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Pressure Liquid Chromatography ali s kratico HPLC) predstavlja danes eno izmed pomembnih analitskih metod kot tudi eno izmed najpomembnejših metod čiščenja in izolacije substanc. To še posebej velja v primerih, ko je zahtevana visoka stopnja čistosti ciljne molekule.

Pri kromatografiji temelji ločevanje substanc na osnovi njihove različne afinitete do določene vrste kemijskih skupin, ki so navadno pričvrščene na trdnem nosilcu. Ta proces poteka v t.i. kromatografski koloni. Običajno je kromatografska kolona cev (kovinska, steklena ali plastična) napolnjena s trdnim nosilcem fiksiranim znotraj cevi, na katerem se nahajajo kemijske skupine. Skozi kromatografsko kolono s pomočjo črpalk potiskamo mobilno fazo, v kateri se nahajajo snovi, ki jih želimo ločevati. Ker imajo snovi raztopljene v mobilni fazi različno afiniteto do kemijskih skupin na trdnem nosilcu, se na njem zadržijo različno dolgo, kar povzroči njihovo ločevanje. Na izhodu iz kolone se nahaja detektor, s katerim detektiramo snovi, ki prihajajo iz kolone. Primer kromatografa je prikazan na sliki 3.1.



Slika 3.1. Slika HPLC sistema (prirejeno po Waters - <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055>)

Ker ima pod danimi pogoji vsaka snov svoj značilen čas zadrževanja v koloni, prihajajo snovi iz kolone v določenih pulzih, kar se kaže v obliki značilnih vrhov na detektorju, kot je prikazano na sliki 3.2.



Slika 3.2. Tipičen kromatogram - številčne oznake kažejo vrhove, bazna linija pa je označena s puščicami

Idealno je, če se snovi med seboj popolnoma ločijo, to pomeni, da sta vrhova ločena do bazne linije (Slika 3.2, vrhovi 3, 4, 5). *Bazna linija* imenujemo kromatogram, ki ga dobimo, če posnamemo kromatogram ne da bi v HPLC sistem injicirali vzorec. Žal ločba do bazne linije ni vedno mogoča in pogosto dobimo vrhove, ki se med seboj prekrivajo (Slika 3.2, vrhova 1, 2), zaradi česar ne moremo pridobiti željene snovi v čisti obliki z visokim izkoristkom. Če želimo ločbo izboljšati, moramo spremeniti pogoje ločevanja. To lahko naredimo s spreminjanjem sestave mobilne faze (npr. sprememba pH vrednosti) ali z uporabo drugega trdnega nosilca. Prav slednje omogoča izjemno fleksibilnost kromatografskih metod, saj obstoja praktično neomejeno število kemijskih skupin, ki povzročajo različne interakcije s ciljnim molekulami. Na osnovi tega tudi ločimo različne vrste kromatografije, med katerimi so glavne:

- ionsko izmenjevalna kromatografija
- kromatografija na osnovi hidrofobnih interakcij
- kromatografija na reverzni fazi
- afinitetna kromatografija
- gelska filtracija.

Vse navedene vrste kromatografij se uporabljajo tako za analizo spojin v vzorcih kot tudi za izolacijo ciljnih snovi iz kompleksne mešanice. Za manjše molekule je najpogosteje uporabljena tehnika kromatografija na reverzni fazi, medtem ko je pri čiščenju velikih molekul navadno potrebno več kromatografskih postopkov, ki pa v skoraj vseh primerih vključujejo ionsko izmenjevalno kromatografijo, zato bomo le-to tudi podrobneje opisali in jo uporabili na vaji.

Za ionsko izmenjevalno kromatografijo (ang. Ion Exchange Chromatography ali s kratico IEX) je značilno, da so na trdnem nosilcu pričvrščene skupine, ki imajo naboj. Le-ta je lahko pozitiven (ang. Anion Exchange Chromatography - AEX) ali negativen (ang. Cation Exchange Chromatography - CEX) in na osnovi tega skupine privlačijo oziroma odbijajo molekule prisotne v mobilni fazi, kar povzroča njihovo različno dolgo zadrževanje v koloni. Kot mobilna faza se najpogosteje uporabljajo različni, če je le mogoče biološko kompatibilni pufri, kot so npr. fosfatni pufer, Tris, citratni pufer in drugi. Le-ti zagotavljajo, da se pH vrednost mobilne faze ne spreminja, kar zagotavlja konstantno moč interakcij med skupinami na trdnem nosilcu in snovmi, ki ji ločujemo ter s tem ponovljivost ločevanja. Glede na območje pH vrednosti, znotraj katere so skupine na trdnem nosilcu nabite, ločimo šibke in močne ionske izmenjevalce. Močni ionski izmenjevalci so skupine, ki so nabite v zelo širokem območju pH vrednosti, tipčno med 2 in 12. Primer so pozitivno nabiti kvarterni amini (QA) in negativno nabite SO_3 skupine. Zanje je značilno, da se njihov naboj znotraj tega območja praktično ne spreminja, zaradi česar je enaka tudi moč interakcij. Za šibke ionske izmenjevalce pa je značilno, da se njihov naboj spreminja glede na pH vrednost mobilne faze, zaradi česar se spreminja tudi moč interakcije. Posledično se zaradi tega spreminja tudi ločba molekul.

V biotehnologiji moramo pogosto izolirati relativno velike molekule, kot so peptidi, proteini, DNA ali celo virusni delci. Večini se, podobno kot ionsko izmenjevalnim skupinam na trdnem nosilcu, spreminja naboj glede na pH vrednost mobilne faze, v kateri se nahajajo, lahko tudi iz pozitivnega v negativnega in obratno. Pri proteinih poznamo izoelektrično točko, to je pH vrednost, pri kateri je celotni naboj proteina 0, nad to vrednostjo postane negativno nabit pod njo pa pozitiven. Na osnovi tega lahko sklepamo, da spreminjanje pH vrednosti ključno vpliva na način ločevanja.

Velike molekule se navadno zaradi večjega števila veznih mest zelo močno vežejo na kemijske skupine prisotne na trdnem nosilcu in se z njih ne sperejo pri konstantni sestavi mobilne faze. Da se desorbirajo, moramo navadno spremeniti sestavo mobilne faze, kar lahko naredimo s spremembo pH vrednosti ali, bolj pogosto, z višanjem koncentracije soli (tipično NaCl). V primeru slednjega pride do vezave ionov soli na aktivne skupine prisotne na trdnem nosilcu, ki zato izrinejo prej vezano molekulo. Ker so različne snovi različno močno vezane, se sperejo iz kolone pri različni koncentraciji soli. Kvaliteto ločbe lahko torej spreminjamo s hitrostjo spreminjanja sestave mobilne faze, čemur pravimo tudi z naklonom gradienta.

3.2 Naloga

Seznanitev z delovanjem gradientnega HPLC sistema. Preučitev vpliva gradienta na ločevanje testnih proteinov. Ločba proteinov v jajčnem beljaku. Določanje količine proteina v vzorcu.

3.3 Potreben material in oprema

Proteinski vzorci:

- testni proteini: mioglobin, citokrom C, lizocim
- vzorec jajčnega beljaka

Mobilne faze:

- 20 mM Tris-HCl; pH = 8,0
- 20 mM Tris-HCl; pH = 8,0 + 1,5 M NaCl

Kromatografske kolone:

- CIM disk SO₃ monolitna kolona

Oprema:

- tekočinski kromatograf (HPLC) z vezano CIM disk SO₃ monolitno kolono
- spektrofotometer
- tehtnica
- pH meter

3.4 Potek vaje

Razdelimo se v dve skupini. Ena pripravlja nabor pufrov druga pa začne delo na HPLC sistemu. Po polovici časa se skupini zamenjata.

Priprava pufrov in vzorcev

Razdelimo se na dve skupini, vsaka skupina pripravi oba pufra ter izvede umerjanje vrednosti pH. Pripravi 500 mL pufra z nizko ionsko močjo in 300 mL pufra z dodano NaCl (visoka ionska moč). Po 1 mL pufra z nizko ionsko močjo, pH 8,0 prenesi v tri Eppendorf viale in v prvo zatehtaj 1 mg proteina mioglobina, v drugo 1 mg proteina citokroma C, v tretjo pa 1 mg lizocima. Stresaj, dokler se proteini ne raztopijo. Iz vsake Eppendorf viale odpipetiraj 600 µL in jih zmešaj v svoji Eppendorf viali. S tem si pripravil mešanico različnih proteinov.

Odpipetiraj 1 mL pufra z visoko ionsko močjo, pH 8,0 v Eppendorf vialo in vanjo zatehtaj 5 mg proteina lizocima. Stresaj, dokler se protein ne raztopi, nato raztopino prefiltriraj skozi 0,45 µm filter v drugo vialo. Iz raztopine lizocima naredi še 4 raztopine različnih koncentracij z redčitvami s pufrom z visoko ionsko močjo, vsako v svoji Eppendorf viali. Pri pripravi upoštevaj, da potrebuješ vsake raztopine okoli 0,5 mL.

Vzorec jajčnega beljaka je bil pripravljen tako, da smo ga raztopili v fosfatnem pufu, pH 5,0, ga pustili preko noči v hladilniku in oborino odfiltrirali. Vzemi tako pripravljeno raztopino

jajčnega beljaka in po zgledu raztopin lizocima naredi še 2 raztopini z različnimi koncentracijama, vsake naj bo 1 mL. Izmeri absorbanco vseh treh raztopin pri 280 nm in podatek zabeleži, saj nam podaja približno koncentracijo celokupnih proteinov. Vsebino Eppendorf viala s srednjo redčitvijo razdeli v dva dela, vsakega v svojo Eppendorf vialo in v eno dodaj 0,5 mg lizocima ter dobro premešaj, da se protein raztopi. Gre za t.i. metodo standardnega dodatka, s katero bomo določili lego in količino lizocima v jajčnem beljaku.

HPLC sistem

Pred pričetkom eksperimentalnega dela pregledamo HPLC sistem in se pogovorimo o njegovem delovanju.

Določanje umeritvene krivulje

Vzamemo predpripravljene raztopine lizocima različnih koncentracij. Vzorec injiciramo v HPLC sistem preko 20 μ L zanke. Vsak vzorec injiciramo 4-krat, s čemer ugotavljamo ponovljivost. Izmerimo višine in površine vrhov in si jih zabeležimo.

Vpliv naklona gradienta na ločbo proteinov

Napišemo gradientno kromatografsko metodo tako, da koncentracijo NaCl v mobilni fazi spreminjamo od 0 M do 1,5 M. Ločeno injiciramo različne proteine (mioglobin, citokrom C in lizocim) in si beležimo zadrževalni čas vsakega. Nato injiciramo mešanico proteinov in primerjamo njihove zadrževalne čase glede na injiciranja posameznih proteinov. Poleg zadrževalnega časa si zabeležimo tudi površino in širino posameznih vrhov. Eksperiment ponovimo s kromatografsko metodo, ki ima nižji naklon gradienta NaCl in ponovno injiciramo mešanico proteinov. Ponovno zabeležimo zadrževalni čas, površino in širino vrhov. Na osnovi zadrževalnih časov ocenimo koncentracijo soli, pri kateri se posamezen protein spere.

Analiza jajčnega beljaka

Za analizo realnega vzorca bomo uporabili jajčni beljak. Le-ta vsebuje 90 % vode, preostalo pa so proteini, maščobe, vitamini, glukoza in minerali. Povprečni jajčni beljak vsebuje okoli 4,5 g proteinov s sestavo navedeno v Tabeli 3.1. Uporabimo kromatografsko metodo in kromatografsko kolono iz prejšnjega eksperimenta in injiciramo raztopine z različno koncentracijo jajčnega beljaka, ki smo jih predhodno pripravili. Prav tako injiciramo raztopino, ki smo ji dodali lizocim. Podobno kot pri injiciranju mešanice standardnih proteinov si zabeležimo zadrževalni čas, površino in širino vrhov. Na osnovi ugotovitev prejšnje vaje poskusimo razložiti rezultate. Nato spreminjamo naklon gradienta NaCl s ciljem, da dobimo čim boljšo ločbo proteinov.

Tabela 3.1: Proteinska sestava jajčnega beljaka z deleži, molekulskimi masami in izoelektričnimi točkami proteinov (Yamamoto s sod., 1996)

Protein	Delež (%)	Mw (Da)	pI
ovalbumin	54	45000	4,5
ovotransferin	12	77700	6,0
ovomukoid	11	28000	4,1
ovoglobulin G2	4	47000	4,9-5,3
ovoglobulin G3	4	50000	4,8
ovomucin	3,5	0,22-270x10 ⁶	4,5-5,0
lizocim	3,4	14300	10,7
ovoglikoprotein	1	25000	3,9
ovoflavoprotein	0,8	32000	4,0
ovomakroglobulin	0,5	7,6-9,0x10 ⁵	4,5-4,7
avidin	0,05	68300	10,0
cistatin	0,05	12000	5,1

3.5 Meritve, izračuni in rezultati

Določanje umeritvene krivulje

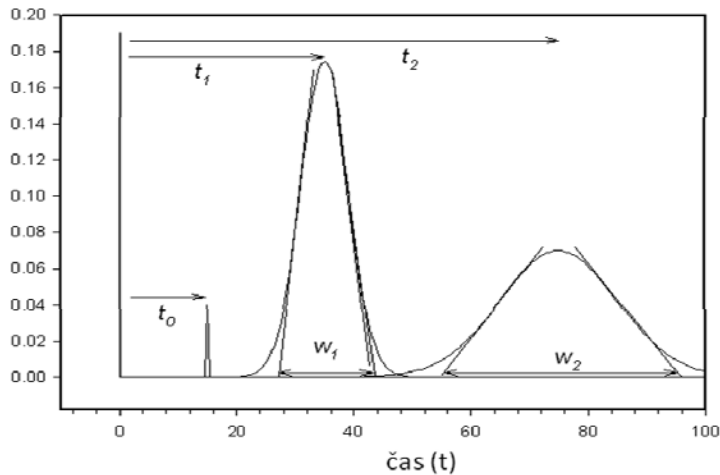
Izračunamo povprečno vrednost in relativno standardno deviacijo (RSD) štirih zaporednih injiciranj. Narišemo graf odvisnosti povprečne višine in površine v odvisnosti od injicirane koncentracije proteina. Vsakemu nizu podatkov prilagodimo premico, zapišemo njeno enačbo in korelacijski indeks (R^2). Rezultate komentiramo.

Vpliv naklona gradienta na ločbo proteinov

Izračunaj resolucijo po naslednji enačbi:

$$R = \frac{t_2 - t_1}{\frac{w_1 + w_2}{2}} \quad (3.1)$$

R je resolucija, t zadrževalni čas in w širina vrha na bazni liniji (glej tudi sliko 3.3)



Slika 3.3. Retencijska časa (t) ter širini vrhov (w), na osnovi katerih izračunamo resolucijo po enačbi 3.1.

Komentiraj vpliv naklona na zadrževalni čas, površino, širino in na resolucijo vrhov.

Analiza jajčnega beljaka

S pomočjo podatkov v tabeli 3.1 poskušaj sklepati, kateri proteini pripadajo posameznim vrhovom. Izračunaj koncentracijo lizocima v jajčnem beljaku na osnovi razlike površine vrha lizocima pri raztopini, kateri smo dodali lizocim in tisti brez lizocima, na osnovi injiciranja vzorca jajčnega beljaka z različno koncentracijo in na osnovi umeritvene krivulje. Rezultate komentiraj.

LITERATURA

Carta, G., Jungbauer, A. 2010. Protein Chromatography: Process Development and Scale-Up, Weinheim, Wiley-VCH: 364 str.

Raspor, P. 1996. Biotehnologija. Osnovna znanja, Ljubljana, BIA: 815 str.

Yamamoto, S., Nakanishi, K., Matsuno, R. 1988. Ion-exchange chromatography of proteins, New York, Marcel Dekker: 401 str.

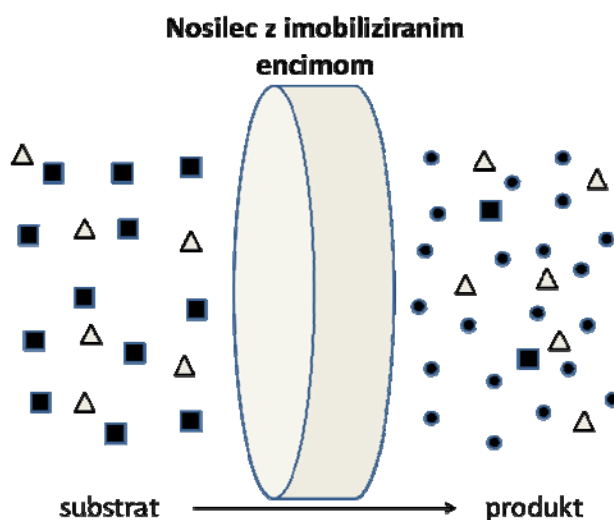
Žorž, M. 1991. HPLC, Ljubljana, Samozaložba: 154 str.

4 PRIPRAVA IN VALIDACIJA ENCIMSKEGA BIOSENZORJA

Aleš Podgornik

4.1 Teoretične osnove

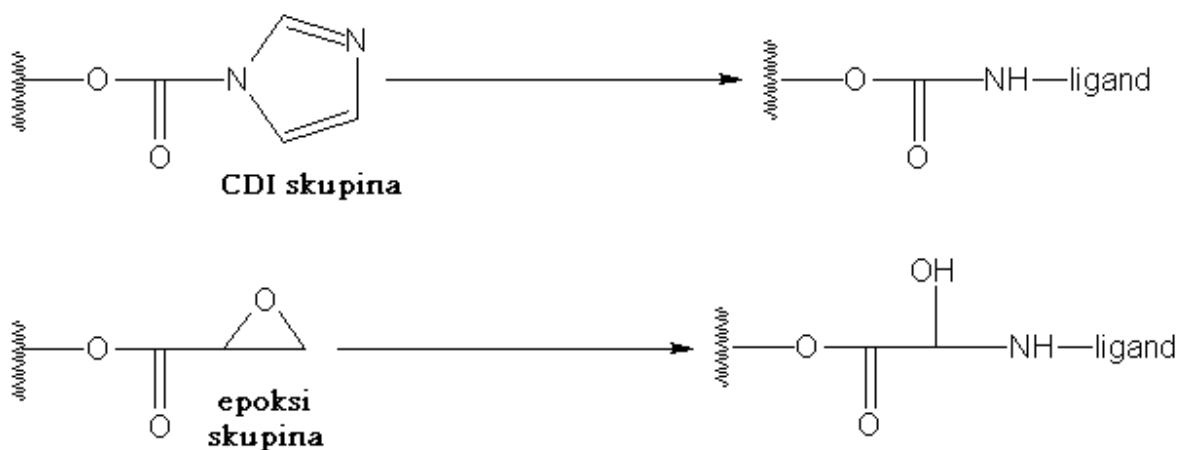
Biosenzor navadno definiramo kot analitsko opremo, ki vključuje biološko komponento in sistem za prenos signala. Biološka komponenta je imobilizirana na površino, s čemer se ohranja njena konstantna količina. Kadar je biološka komponenta encim, lahko uporabimo različne načine imobilizacije, v praksi pa se najpogosteje uporablja kovalentna vezava, katere prednost je visoka stabilnost in trajnost.



Slika 4.1. Shematski prikaz encimskega biosenzorja: substrat (■) črpamo skozi nosilec s kovalentno imobiliziranim encimom, ki ga pretvarja v produkt (●), medtem ko ostanejo ostale molekule nespremenjene (Δ). Produkt nato detektiramo na različne načine.

Za nastanek kovalentne vezi je poleg aktivne skupine na nosilcu bistvenega pomena, da ima ustrezno reaktivno skupino tudi izbrani encim. Raziskave so pokazale, da od dvajsetih aminokislin le osem aminokislin vsebuje aktivne skupine, ki so dovolj reaktivne pod milimi pogoji. To so: guanidilna skupina arginina, γ - in β - karboksilni skupini glutaminske in asparaginske kisline, sulfhidrilna skupina cisteina, imidazolna skupina histidina, ϵ -amino skupina lizina, tioeterska skupina metionina, indolna skupina triptofana in fenolno hidroksilna skupina tirozina.

Med njimi je najpogosteje na površini proteinov prisotna amino skupina lizina, zato je tudi večina reakcij imobilizacije načrtovanih za kovalentno vezavo na to skupino. To je tudi razlog, da imajo nosilci namenjeni imobilizaciji encimov kemijske skupine, ki lahko reagirajo z amino skupino. Take skupine so npr. aldehidne, epoksidne, sukcinimidne, hidrazidne, karbonildiimidazolne (CDI) in še nekatere druge. Potek reakcije imobilizacije na epoksidno in CDI skupino je prikazan na sliki 4.2.



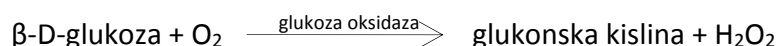
Slika 4.2. Shematski potek imobilizacije liganda na karbonildiimidazolno (CDI) skupino (zgoraj) in epoksi skupino (spodaj). Ker imobilizacija navadno poteka preko aminske skupine, je le-ta pri ligandu še posebej označena.

Poleg narave nosilca in samega encima, so pomembni tudi pogoji, pri katerih imobilizacija poteka. Znano je, da večina kemijskih reakcij hitreje poteka pri višji temperaturi, kar velja tudi za reakcijo imobilizacije, vendar moramo pri tem upoštevati, da lahko pride med imobilizacijo do spremembe konformacije ali celo razpada encima, kar bistveno vpliva na njegovo biološko aktivnost. Prav tako je pomemben pH raztopine, v kateri imobilizacija poteka, saj le-ta določa nabitost tako skupin na nosilcu kot tudi encima (pomembna je pI). Tudi v tem primeru moramo paziti, da poteka imobilizacija v območju, kjer ne pride do deaktivacije encima, saj lahko v nasprotnem primeru dobimo visoko količino vezanega encima, ki pa nima biološke aktivnosti.

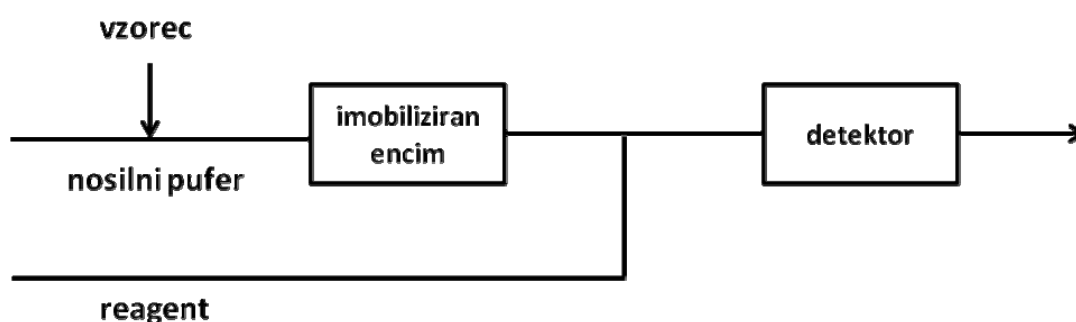
Ključna vloga encima v biosenzorju je selektivna pretvorba substrata v produkt, ki jo moramo biti sposobni zaznati. Poznamo različne vrste prenosa signalov kot so npr. amperometrični (prenos električnega toka), termični (sprememba temperature) in optični, kjer spremembo koncentracije, mase ali števila molekul povežemo s svetlobno spremembo. Povezavo merjene komponente in signala naredimo s t.i. umeritveno krivuljo, ki je specifična za

preučevani sistem. S tem ugotovimo občutljivost biosenzorja, območje linearnosti ter določimo mejo detekcije. Med našo vajo bomo zaznavali spremembo obarvanosti, ki jo povzroča nastali produkt in za detekcijo uporabili princip pretočne injekcijske analize (ang. Flow Injection Analysis - FIA) z merjenjem absorbance.

Kot modelni encim bomo uporabili glukoza oksidazo. Merjenje aktivnosti poteka po sledeči shemi in temelji na sproščanju vodikovega peroksida pri oksidaciji glukoze v glukonsko kislino:



Aktivnost biosenzorja z imobilizirano glukoza oksidazo določamo na FIA sistemu tako, da v nosilni tok (v našem primeru fosfatni pufer) vbrizgamo vzorec (npr. 100 μL glukoze s koncentracijo 70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Ko teče vzorec skozi biosenzor, glukoza oksidaza oksidira glukozo in sprošča vodikov peroksid. Za biosenzorjem se nosilni tok z vzorcem združi s tokom reagenta in nastaja obarvan produkt, ki ga detektiramo pri 505 nm. Površina vrha je merilo encimske aktivnosti. Shema zgradbe FIA sistema je prikazana na spodnji sliki.



Slika 4.3. Shematski prikaz encimskega biosenzorja vključenega v FIA sistem

4.2 Naloga

Kalibracija pH metra. Priprava imobilizacijskih pufrov. Imobilizacija encima na nosilec. Osvojitev koncepta delovanja meritve glukoze z encimom glukoza oksidaza. Priprava raztopin glukoze. Vpliv imobilizacijskega pufrin in narave skupine nosilca na občutljivost biosenzorja. Določanje stabilnosti biosenzorja. Določitev umeritvene krivulje.

4.3 Potreben material in oprema

Encimi in reagenti

glukoza oksidaza (EC 1.1.3.4)

1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-5-pirazolon

fenol

hrenova peroksidaza (EC 1.11.1.7)

Imobilizacijski pufer

referenčni pufri z različno vrednostjo pH

20 mM citratni pufer; pH=4

Nosilec

CIM Epoksi disk monolitna kolona

CIM CDI disk monolitna kolona

Nosilni pufer

0,1 M fosfatni pufer; pH = 7

Vzorci

vodne raztopine glukoze različnih koncentracij

Oprema

- tekočinski kromatograf prirejen za delovanje kot FIA sistem
- pH meter
- čaše
- avtomatska pipeta
- brizga
- Eppendorf vial
- CIM ohišje
- CIM epoksi monolitni disk
- CIM CDI monolitni disk

4.4 Potek vaje

Priprava vodnih raztopin glukoze

V destilirani vodi pripravimo raztopino glukoze s koncentracijo $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in redčitve s faktorjem 2 do koncentracije pod $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Za vajo uporabimo raztopino glukoze, ki je bila predhodno pripravljena, saj mora raztopina stati 24 ur. Iz tako pripravljene raztopine pripravimo po 1,5 mL raztopine glukoze različnih koncentracij.

Kalibracija pH metra

Za kalibracijo pH metra uporabimo dva referenčna pufra. Kalibracijo izvedemo v dveh točkah po dobljenih navodilih. Ustreznost kalibracije preverimo s tretjim referenčnim pufrom.

Priprava imobilizacijskega pufra

Pripravimo 100 mL imobilizacijskega pufra. Izračunamo potrebno količino soli natrijevega citrata in ga zatehtamo v čašo ter dolijemo ustrezno količino destilirane vode.

Priprava nosilnega pufer

Pripravimo 1 L nosilnega pufra s koncentracijo 0,1 M. Pufer pripravimo iz natrijevega ali kalijevega fosfata. Pri določitvi potrebne zatehte preverimo, ali ima le-ta vezano kristalno vodo in to upoštevamo pri izračunu. Raztopino umerimo na pH vrednost 7,0.

Priprava reagenta

Reagent pripravimo tako, da zatehtamo 0,585 g fenola in 0,25 g 1-fenil-2,3-dimetil-4-amino-5-pirazolona ter odmerimo 2,5 mL 0,1 M fosfatnega pufra in 1,25 mL predhodno pripravljene 2 % raztopine hrenove peroksidaze v 0,1 M fosfatnem puftru ter vse raztopimo v 250 mL destilirane vode. Uporabimo predhodno pripravljen reagent.

Imobilizacija glukoza oksidaze na nosilec

V imobilizacijskem puftru pripravimo raztopino encima glukoza oksidaza s koncentracijo $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. CIM disk vstavimo v CIM ohišje in z brizgo potisnemo skozenj 5 mL raztopine glukoza oksidaze, pri čemer raztopino iz ohišja lovimo nazaj v 5 mL čašo, v kateri se je nahajala raztopina glukoza oksidaze. Pri tem smo pozorni na vrsto skupine na CIM disku. CIM disk vzamemo iz ohišja in ga potopimo v raztopino glukoza oksidaze tako, da sta obe strani monolita dostopni za raztopino. Nato pustimo CIM diske v raztopini 24 ur na sobni temperaturi.

FIA sistem

Pred začetkom izvajanja eksperimentov se seznanimo z načinom delovanja glukoznega biosenzorja in z delovanjem FIA sistema.

Določitev vpliva narave skupine nosilca na občutljivost biosenzorja in njegovo stabilnost

V CIM ohišje vstavimo CIM disk z imobilizirano glukoza oksidazo in ga priključimo na FIA sistem. CIM disk temeljito speremo s pufrom in počakamo, da se bazna linija ustali. Injiciramo 100 μL raztopine glukoze s koncentracijo $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ in merimo površino nastalega vrha. Ponovimo več iniciranj, da dobimo konstantne vrednosti. Nato izvedemo 10 zaporednjih injiciranj z najvišjo koncentracijo glukoze in ugotovimo stabilnost biosenzorja. Vsaka skupina izvede eksperimente s svojim CIM nosilcem.

Določanje umeritvene krivulje in vpliv pretoka

Na CIM disk z imobilizirano glukoza oksidazo injiciramo raztopine različnih koncentracij glukoze. Začnemo z najnižjo, nadaljujemo do najvišje in se vrnemo na najnižjo. Z vsako koncentracijo izvedemo vsaj 2 injiciranja. Nato spremenimo pretok in postopek ponovimo. Eksperimente izvedemo pri 2 različnih pretokih. Vsaka skupina izvede eksperimente s svojim CIM nosilcem.

4.5 Meritve, izračuni in rezultati

Poročilo mora vsebovati rezultate dela obeh skupin, torej rezultate imobilizacije glukoza oksidaze tako na epoksi kot na CDI skupine.

FIA sistem

Shematično prikaži delovanje FIA sistema in komentiraj njegovo delovanje.

Stabilnost biosenzorja

Beležimo površine vrhov. Narišemo graf površine vrhov kot funkcijo števila injiciranja ter podatke povežemo z linearno regresijo ter na grafu podamo enačbo premice in korelacijski indeks (R^2). Kaj pove smerni koeficient premice? Rezultate komentiramo.

Določanje umeritvene krivulje in vpliv pretoka na površino vrhov

Beležimo površine vrhov. Narišemo graf odvisnosti površine vrha od koncentracije glukoze za vsak pretok in določimo območje linearnosti. Linearnemu območju priredimo premico in njemo enačbo ter korelacijski indeks (R^2) podamo na grafu. Primerjamo smerni koeficient premic pri različnih pretokih. Rezultate komentiramo.

Določitev vpliva narave skupine nosilca na občutljivost biosenzorja

Primerjamo rezultate stabilnosti in umeritvene krivulje za biosenzor, kjer je encim imobiliziran na epoksi skupine in biosenzor, kjer je encim imobiliziran na CDI skupine. Rezultate komentiramo.

LITERATURA

Hermanson G. T., Mallia A. K., Smith P. K. 1992. Immobilized Affinity Ligand Techniques, California, Academic Press, Inc.: 454 str.

Raspor P. 1996. Biotehnologija. Osnovna znanja, Ljubljana. BIA: 815 str.

Taylor R.F. (ur.) 1991. Protein Immobilization: Fundamentals and Applications, New York, M. Dekker: 377 str.

5 SPREMLJANJE ŠARŽNEGA BIOPROCESA

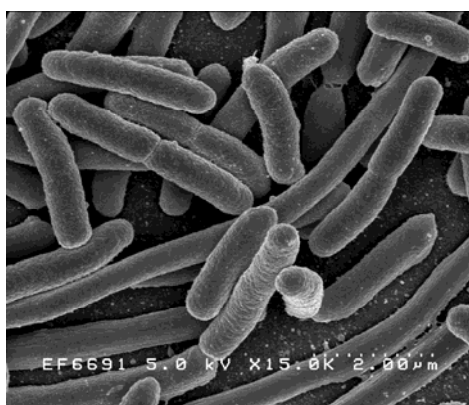
Aleš Podgornik

5.1 Teoretične osnove

Mikroorganizmi so v biotehnologiji »hollywoodske zvezde«, katerim se je potrebno podrediti. Sposobni so namreč tvorbe produkta, ki ga želimo pridobiti, pa naj bo to sama biomasa (npr. pridobivanje pekovskega kvasa) ali ciljnega produkta (npr. antibiotiki). Ker je naš cilj pridobiti čim več produkta v čim krajšem času, moramo nuditi mikroorganizmom pogoje, ki ga bodo spodbudili k njegovi tvorbi. V primeru primarnih metabolitov, ki so sorazmerni količini biomase, ali v primeru, ko je sama biomasa produkt, je zaželjena čim višja specifična hitrost rasti, ki se odraža v visoki koncentraciji biomase pridobljene v kratkem času. Tudi v primeru sekundarnih produktov, to so produkti, ki so rezultat odziva mikroorganizma na neugodne razmere (npr. pomanjkanje hrane ali obramba) želimo privedi čim večje število celic v stanje željene produktivnosti, kar se odraža v visoki koncentraciji ciljnega produkta.

Kakšni pogoji gojenja bodo vodili do maksimalne tvorbe ciljnega produkta, je odvisno od vrste mikroorganizma in tipa produkta, zato splošnih napotkov ni. Bistvenega pomena pa je, da vemo, v kakšnem okolju se med potekom bioprocasa mikroorganizem nahaja in da znamo, kadar je to potrebno, na te pogoje tudi vplivati. Predpogoj je torej, da znamo ključne bioprocasne spremenljivke meriti, saj lahko na osnovi tega reguliramo proces na način, ki omogoča doseganje maksimalne produktivnosti.

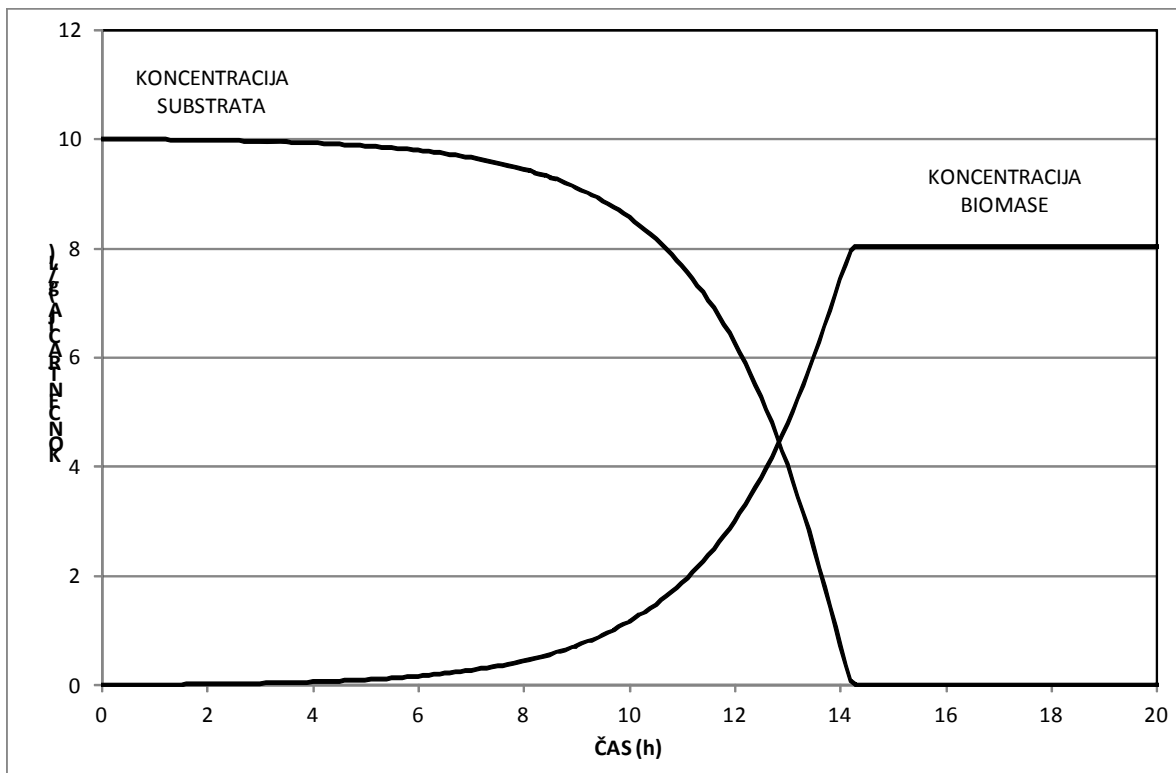
Pri naši vaji bomo kot modelni mikroorganizem uporabili gram negativno bakterijo *Escherichia coli* (*E. coli*).



Slika 5.1. Bakterija *Escherichia coli* pod elektronskim mikroskopom (http://www.google.si/imgres?imgurl=http://www.universityofcalifornia.edu/everyday/agriculture/images/e_coli.jpg&imgrefurl=http://www.universityofcalifornia.edu).

E. coli je fakultativni anaerob, kar pomeni, da jo lahko gojimo tudi pod anaerobnimi pogoji, v našem primeru pa bomo uporabili aerobne pogoje, saj je rast hitrejša. Da bi zagotovili zadostno koncentracijo kisika, je potrebno medij, v katerem gojimo bakterijo, prepihovati z zrakom, hkrati pa tudi premešavati, da zagotovimo zadostno raztapljanje kisika v mediju (glej vaji »Mešanje in določitev časa pomešanja« ter »Prenos kisika - določanje $k_L a$ «). Seveda je potrebno koncentracijo kisika v mediju spremljati, da jo ohranjamo na vrednosti, ki še ni limitna, hkrati pa ne previsoko, saj to pomeni dražje obratovanje bioprocasa. Poleg tega je smiselno spremljati tudi druge procesne spremenljivke, kot sta vrednost pH , ki nam daje informacije o metabolizmu in optično gostoto, ki je v primeru enoceličnih mikroorganizmov, kot je naša bakterija, dober pokazatelj koncentracije biomase. Poleg koncentracije kisika je drugi limitni parameter bioprocasa koncentracija hraniv, v našem primeru koncentracija glukoze, ki jo bomo spremljali z biosenzorjem vključenim v FIA sistem, in smo ga pripravili v vaji »Priprava in validacija biosenzorja«. Za rast je potrebno tudi zagotavljanje optimalne temperature medija, zaradi česar moramo imeti ustrezno regulacijo.

Ker gre za šaržni bioprocasa, se koncentraciji substrata in biomase spreminjata, kot je to prikazano na sliki 5.2.



Slika 5.2. Shematičen prikaz spreminjanja koncentracije substrata in biomase tekom šaržnega bioprocasa.

Dogajanje v šaržnem bioprocesu lahko zapišemo z masnimi bilancami. Ker se koncentraciji biomase in substrata tekom bioprocasa spreminjata, za to uporabimo diferencialne masne bilance.

Tako lahko bilanco za spreminjanje koncentracije biomase v bioreaktorju opišemo z enačbo:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad (5.1)$$

kjer je X koncentracija biomase, t je procesni čas, μ pa specifična hitrost rasti.

V primeru, ko je specifična hitrost rasti konstanta, lahko enačbo 5.1 integriramo in dobimo:

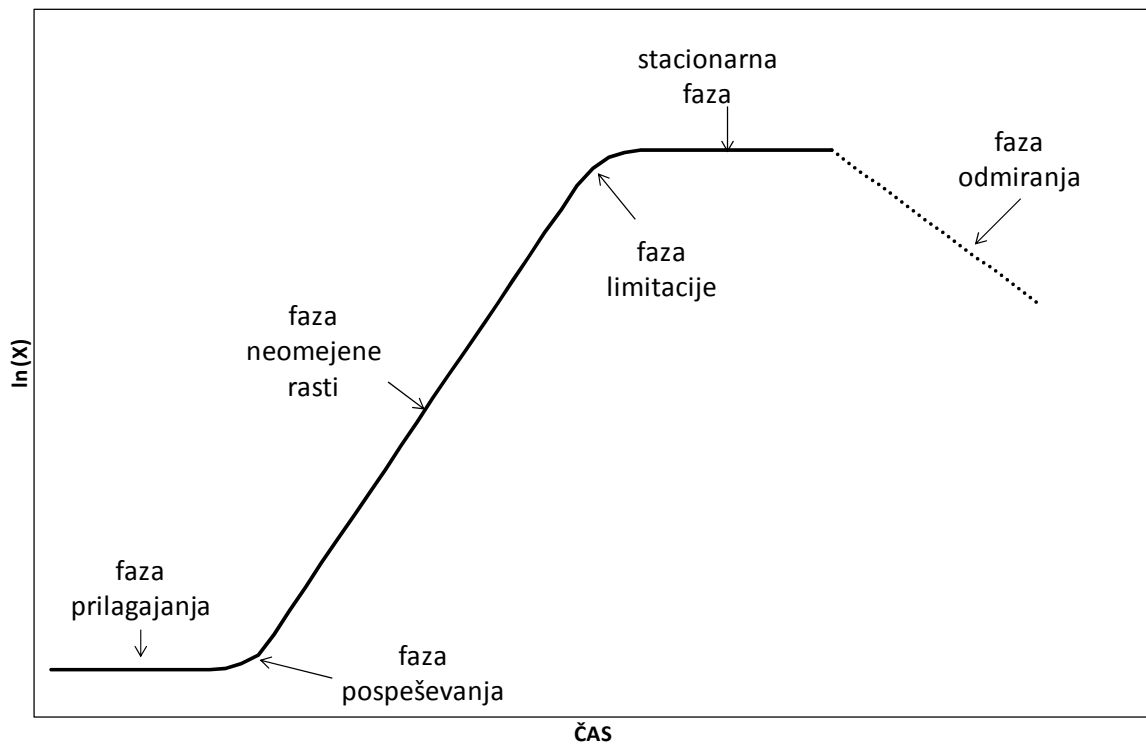
$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (5.2)$$

oziroma po logaritmiranju:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t \quad (5.3)$$

Vidimo torej, da lahko določimo območje maksimalne specifične hitrosti rasti, če narišemo $\ln X$ proti procesnemu času. Na sliki 5.3 vidimo tipičen primer realnega šaržnega procesa.

Iz slike 5.3 lahko zaključimo, da se specifična hitrost rasti spreminja po času. Konstantna vrednost specifične hitrosti rasti se na sliki 5.3 odraža v ravnih delih. V primeru, ko je črta vzporedna z časovno osjo, je specifična hitrost rasti enaka 0, pri čemer gre na začetku za fazo prilagajanja, kasneje pa za stacionarno fazo. Faza neomejene rasti se odraža s konstantnim naraščanjem $\ln X$, faza odmiranja pa s konstantnim padanjem $\ln X$. Prehajanje iz faze prilagajanja v fazo neomejene rasti imenujemo fazo pospeševanja, prehajanje iz neomejene faze rasti v stacionarno fazo pa faza pojecanja.



Slika 5.3. Posamezne faze rasti mikroorganizma med šaržnim procesom

Poseben poudarek zasluži faza pojemanja, imenova tudi faza limitacije, ki je navadno posledica nizke koncentracije substrata v gojišču. Opišemo jo lahko s t.i. imenovano Monodovo kinetiko:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad (5.4)$$

Ta korelacije je še posebej pomembna pri kontinuirnih procesih, saj določa ravnotežne koncentracije (glej vajo 7; Simulacija kontinuirnega bioprocasa).

Poleg bilance za biomaso zapišemo tudi podobno bilanco za substrat:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{XS}} \cdot \mu \cdot X \quad (5.5)$$

Y_{XS} imenujemo izkoristek (ang. Yield), ki določa, kolikšen je prirast koncentracije biomase glede na porabo substrata. Izkoristek se lahko med bioprocenom spreminja, v fazi neomejene rasti pa je navadno konstanten.

Šaržno gojenje izvajamo v bioreaktorju, ki je opremljen s sistemom za regulacijo temperature, za regulacijo premešavanja in vnos zraka ter s senzorji, ki omogočajo sprotne meritve ključnih biotehnoloških spremenljivk kot so pH , pO_2 , temperatura in optična gostota. Ostale spremenljivke navadno merimo "off-line", kar pomeni, da je potrebno odvzeti reprezentativen vzorec bioprocenčne brozge in ga analizirati z različnimi metodami.

5.2 Naloga

Inokulacija gojišča. Nastavitve procesnih parametrov (regulacija temperature, hitrost mešanja, vnos kisika, itd.). Kalibracija metode za določanje glukoze. Spremljanje pH , pO_2 , optične gostote in koncentracije glukoze. Grafični prikaz poteka bioprocenčnih parametrov, izračun maksimalne specifične hitrosti rasti (μ_{max}) in produktivnosti. Izračun izkoristka.

5.3 Potreben material in oprema

Mikroorganizem

Escherichia coli

Rastno gojišče

Za namnoževanje *E. coli* uporabimo LB bujon (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Sestava gojišča (LB bujon)

Sestavina	Masa (g)
kvasni ekstrakt	5,0
glukoza	0,5
NaCl	10,0
pepton	10,0

Oprema

- Oprema za pripravo gojišča in inokuluma: analitska tehtnica, pH meter
- Biorektorski sistem (Slika 1.4) - kultivacija v bioreaktorju
 - 30-L laboratorijski bioreaktor ($V_D = 20$ L) z opremo:
 - pH in pO_2 elektroda
 - senzor za spremljanje temperature
 - turbinsko mešalo ($0-600 \text{ vrt} \cdot \text{min}^{-1}$)
 - dovod komprimiranega zraka

- filter za zrak
- hladilnik izstopnih plinov
- podnožje
- sistem za spremljanje optične gostote
 - peristaltična črpalka
 - spektrofotometer
- vmesnik za prenos in pretvorbo signalov
- avtomatičen sistem zajemanja podatkov
- Oprema za "off-line" analize: centrifuga, tehtnica, sušilnik, pH meter, eksikator, FIA

5.4 Potek vaje

Bioreaktorski sistem

Pred pričetkom eksperimentalnega dela pregledamo bioreaktorski sistem in se pogovorimo o njegovem delovanju. Nastavimo vrednosti za temperaturo, pretok zraka in hitrost mešanja (št. vrt. \cdot min⁻¹) in sicer:

- T = 37 °C
- pretok zraka: 1vvm
- hitrost mešanja: 400 vrt. \cdot min⁻¹

Vrednosti ostajajo konstantne skozi celoten bioproces. Določimo, katere spremenljivke bomo beležili. Zaradi hitrosti bioprocesa (visoke koncentracije celic v inokulumu in visoke specifične hitrosti rasti) bomo delali pod nesterilnimi pogoji.

Gojenje bakterijske kulture

V bioreaktor z LB bujonom inokuliramo 200 mL kulture bakterije *E. coli* s koncentracijo $2 \cdot 10^9$ celic \cdot mL⁻¹. Spremljamo potek vrednosti pH in pO_2 ter optično gostoto (absorbanco). Vrednosti si zabeležimo vsakih 5 min. Na približno 20 min vzorčimo okoli 20 mL bioprocene brozge (pazi na mrtvi volumen pri odvzemanju) za določitev koncentracije glukoze (za podrobnosti glej vajo »Priprava in kalibracija biosenzorja«), suhe ter mokre biomase. Odvzetemu vzorcu izmerimo vrednost pH. Proces razmnoževanja traja zaradi visoke koncentracije vcepka le nekaj ur.

Priprava vzorcev za določanje glukoze

Vzorec iz bioreaktorja pretočimo v centrifugirko in ga centrifugiramo 5 min pri 4000 vrt. \cdot min⁻¹. Supernatant odlijemo in ga redčimo, da pridemo v območje linearnosti umeritvene krivulje za glukozo (za oceno uporabimo redčitve potrebne za določitev začetne koncentracije glukoze v bioreaktorju), medtem ko usedlino uporabimo za določanje suhe in mokre biomase. Injiciramo enako količino vzorca, kot smo jo uporabili pri določanju umeritvene krivulje (npr. 20 μ L). Rezultate zabeležimo.

Določanje koncentracije mokre in suhe biomase

10 mL bioprocene brozge centrifugiramo v stehanih in označenih centrifugirkah 5 min pri $4000 \text{ vrt.}\cdot\text{min}^{-1}$ in biomaso dobro speremo z destilirano vodo, da odstranimo preostanke gojišča. Delamo v dveh paralelkah. Sediment (mokra biomasa) v steklenih centrifugirkah stehamo. Razlika v masi stehane centrifugirke in njene začetne mase (prazna centrifugirka) predstavlja maso mokre biomase. Rezultat izrazimo kot $\text{g mokre biomase}\cdot\text{L}^{-1}$ bioprocene brozge (upoštevaj centrifugirani volumen brozge). Nato centrifugirke sušimo 2 uri pri $T = 105 \text{ }^\circ\text{C}$, nakar jih prenesemo v eksikator, da se ohladijo. Centrifugirke ponovno stehamo in odštejemo maso prazne centrifugirke. Razlika v masi predstavlja suho biomaso, ki jo izrazimo kot $\text{g suhe biomase}\cdot\text{L}^{-1}$ bioprocene brozge (upoštevaj centrifugirani volumen brozge).

5.5 Meritve, izračuni in rezultati

Nariši umeritveno krivuljo za glukozo. V obeh primerih upoštevaj, da gre premica skozi izhodišče.

Na prvi graf nariši meritve "on-line" $p\text{H}$ vrednosti, "off-line" $p\text{H}$ vrednosti in "on-line" $p\text{O}_2$ vrednosti in komentiraj trende.

Na drugi graf nariši vrednosti meritev optične gostote, suhe in mokre biomase in komentiraj trende.

Izračunaj korelacijo med optično gostoto in številom celic v bioreaktorju (namig: upoštevaj optično gostoto na začetku bioprocena, ko smo inokulirali določeno količino inokuluma z znano koncentracijo celic in dejstvo, da je bila optična gostota medija pred inokulacijo postavljena na vrednost 0) ter med optično gostoto in koncentracijo mokre biomase (namig: za izračun uporabi podatke s konca bioprocena, ko je koncentracija biomase visoka). V obeh primerih upoštevaj, da gre premica skozi izhodišče.

Na tretji graf nariši vrednosti meritev "on-line" $p\text{H}$ meritve, "on-line" $p\text{O}_2$ meritve in izračunane vrednosti koncentracij biomase v $\text{mg mokre biomase}\cdot\text{L}^{-1}$ medija dobljene iz merjenja optične gostote. Izračunaj maksimalno specifično hitrost rasti (μ_{max}) in ter produktivnost procesa za biomaso. Določi, v katerem trenutku bi morali bioprocen zaključiti, da bi bila produktivnost maksimalna. Izračunaj izkoristek Y_{XS} za fazo rasti do porabe glukoze.

LITERATURA

Raspor, P. 1996. Biotehnologija in razvoj. V: Raspor, P (ur.). Biotehnologija, Osnovna znanja. Ljubljana, BIA: 815 str.

6 ČIŠČENJE PLAZMIDNE DNA

Aleš Podgornik, Franc Smrekar, Mateja Ciringer

6.1 Teoretične osnove

Gensko zdravljenje je v svoji osnovi oblika tehnologije rekombinantne DNA, ki združuje dognanja molekularne biologije in medicinskih znanosti za zdravljenje obolenj pri človeku. Pomeni popolnoma nov način zdravljenja, saj gre pri tem za poskus popravljanja bolezenskega fenotipa prek vnosa funkcionalnih genov v somatične celice. Najuspešnejše so terapije monogenih dednih bolezni (bolezen je posledica mutacije ali več mutacij v enem genu), kot je primer cistične fibroze, hude kombinirane imunska pomanjkljivosti (SCID), nevrodegenerativnih obolenj, diabetesa in drugih. Genska zdravila se uveljavljajo tudi pri zdravljenju kompleksnih poligenih disfunkcij (bolezen je posledica mutacij v več različnih genih), kot so rak, starostne demence in imunske disfunkcije. Osnovni pogoj pri načrtovanju genskega zdravila je dobro razumevanje molekularnih osnov bolezni.

Za vnos v celice se poslužujemo dveh splošnih metod:

Vnos z virusi: Uporabljajo se rekombinantni virusni delci, ki so sposobni vnesti gene v celice z infekcijo, pri čemer se poslužujejo svojih visoko razvitih mehanizmov vstopa v celice in vcepitve svojega genskega materiala v gostiteljski genom. Rekombinantne virusne delce sestavijo tako, da njihove gene, ki kodirajo patogene virusne funkcije, zamenjamo s terapevtičnimi geni.

Fizikalne metode vnosa DNA: DNA injiciramo neposredno v celična jedra v celični kulturi (mikroinjiciranje). Celice lahko tudi bombardiramo z DNA, vezano na mikroprojektele (mikroskopske delce žlahtne kovine, prevlečene z DNA), ki predirajo celično in jedrno membrano. DNA se lahko vnaša vgrajena v liposome, kapljicaste tvorbe iz polarnih lipidov, ki vstopijo v celice z endocitozo, ali s fuzijo s celično membrano. DNA se lahko tudi veže v specifični proteinski kompleks DNA, ki ga prepoznajo določeni celični membranski receptorji in tako DNA vstopi v celico prek mehanizma z receptorji posredovane endocitoze.

Pri uporabi fizikalnih metod je potrebna večja količina dobro očiščene plazmidne DNA (pDNA). Običajna doza za zdravljenje pacientov z melanomom je okoli 0,3 µg pDNA, medtem ko je potrebno za celotno terapijo nekaj miligramov čiste pDNA. Zaradi majhne vsebnosti pDNA v bakteriji (npr. v bakteriji *Escherichia coli* predstavlja pDNA le nekaj nad 3 % mase celice) je potrebno razviti postopke, ki so uporabni tudi v večjem merilu (1000 L brozge). Poleg tega morajo postopki pridobivanja pDNA zagotoviti ponovljivost, učinkovitost in čistost pDNA, ki zadosti vsem regulatornim pogojem.

Plazmidna DNA se običajno proizvaja v bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*) in po svoji naravi spada med primarne produkte, saj je proizvedena količina sorazmerna s količino biomase. Večina tako pridobljene pDNA je v superzviti obliki (sc pDNA), ki ima višjo učinkovitost pri zdravljenju kot delno razgrajena krožna pDNA (oc pDNA) oziroma linearna pDNA. Poleg tega so lahko prisotne še ostale oblike kot so dimeri pDNA in denaturirana pDNA, ki so prav tako nezaželjene.

Cilj pri čiščenju pDNA je odstranjevanje celične stene, bakterijskih proteinov, lipidov, lipopolisaharidov in nukleinskih kislin z izjemo ciljne sc pDNA. Največji izziv pri čiščenju pDNA predstavljajo fragmenti genomske DNA (gDNA), visoko molekularna RNA in različne oblike razgrajene pDNA, zaradi podobnosti v fizikalnih in kemijskih lastnostih. Tipična sestava bakterijskega lizata je navedena v Tabeli 6.1

Tabela 6.1: Sestava bakterijskega lizata

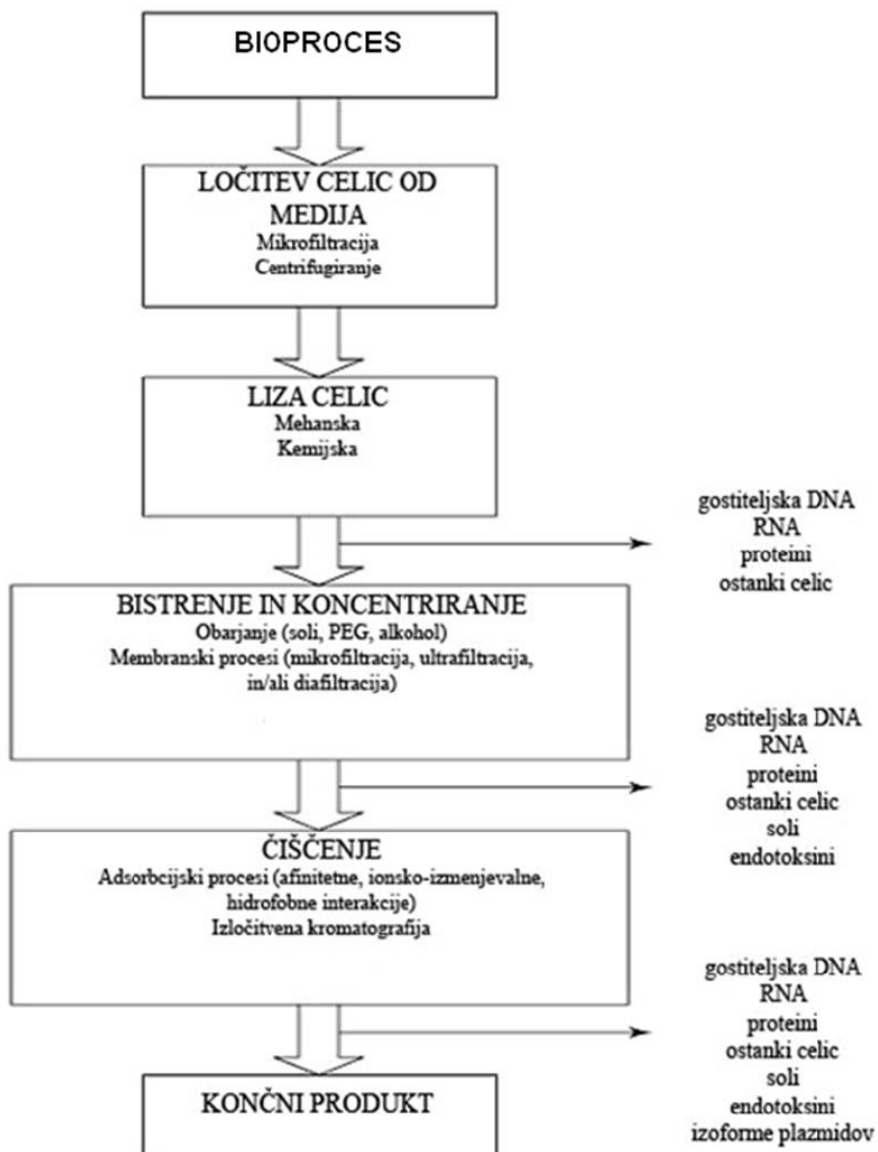
Sestava bakterijskega lizata
55 % proteinov
21 % RNA
3 % gDNA
>3 % pDNA
15 % ostalo

Postopki čiščenja morajo zagotoviti odstranitev 99,9 % vseh nečistoč. Plazmidna DNA namenjena humani uporabi mora ustrezati kriterijem navedenim v Tabeli 6.2.

Tabela 6.2: Sestava bakterijskega lizata

Nečistoča	Meja sprejemljivosti	Metoda določitve
enotoksini (LPS)	<10 E.U.·mg ⁻¹ pDNA	LAL test
gDNA	<2 µg·mg ⁻¹ pDNA	PCR
RNA	<0,2 µg·mg ⁻¹ pDNA	HPLC
proteini	<3 µg·mg ⁻¹ pDNA	BCA test
delež sc glede na oc izoobliko	>97 %	CGE

Obstaja več načinov čiščenja plazmidne DNA kot sta npr. filtracija in precipitacija, vendar lahko dosežemo zahtevano stopnjo čistosti le z uporabo več tehnik med njimi tudi kromatografije, kar bomo izvedli tudi pri vaji. Značilna shema čiščenja je prikazana na spodnji sliki (6.1).



Slika 6.1. Tipičen postopek čiščenja plazmidne DNA iz bakterije *E. coli*

6.2 Naloga

Centrifugiranje. Razbijanje celic z alkalno lizo in obarjanje. Čiščenje lizata z ionsko izmenjevalnim kromatografskim nosilcem. Postavitev HPLC analitske metode za spremljanje čiščenja pDNA.

6.3 Potreben material in oprema

Bakterijski sev

nepatogeni sev bakterije *Escherichia coli*

Plazmidi

pEGFP 4,1 kb

Kemikalije za alkalno lizo

- 50 mM Tris, 10 mM EDTA; pH 8,0
- 10 % SDS
- 1 M NaOH
- 3 M kalijev acetat
- 4 M CaCl₂

Analitska HPLC metoda

- standardi čiste sc pDNA, oc pDNA, RNA in gDNA
- 50 mm Tris, 10 mM EDTA; pH 7,2 (1 L)
- 50 mm Tris, 10 mM EDTA, 1,5M NaCl; pH 7,2 (1 L)

Kromatografsko čiščenje pDNA

- 50 mm Tris, 10 mM EDTA; pH 7,2 (1 L)
- 50 mm Tris, 10 mM EDTA, 0,6M NaCl; pH 7,2 (1 L)
- 50 mm Tris, 10 mM EDTA, 1.0M NaCl; pH 7,2 (1 L)

Kromatografske kolone

2 CIM disk DEAE monolitni koloni

Oprema

- 2 1-L čaši
- tekočinski kromatograf (HPLC)
- centrifuga (mora omogočati vsaj 12000 rpm)
- peristaltična črpalka
- vibromix
- avtomatska pipeta
- spektrofotometer

6.4 Potek vaje

Bakterijska kultura

Uporabimo bakterijsko kulturo, ki smo jo nagojili pri vaji »Spremljanje bioprocasa«.

Centrifugiranje

Gojišče z bakterijsko kulturo prenesemo v centrifugirke (količina je odvisna od volumna centrifugirk) in centrifugiramo 10 min na 12000 rpm. Supernatantu izmerimo absorbanco pri

600 nm, kot kontrolo uspešnosti centrifugiranja in ga nato zavržemo, bakterijsko biomaso iz vseh centrifugirk pa prenesemo v 1000 mL čašo. Ko scentrifugiramo 10 L bakterijske kulture začnemo s pridobljeno biomaso alkalno lizo, pri čemer predhodno stehtamo količino pridobljene biomase. Sočasno nadaljujemo s centrifugiranjem dokler ne sprocesiramo vse bioprocenke brozge pri čemer pridobljeno biomaso dajamo v drugo 1000 mL čašo. Nato tudi to biomaso stehtamo in izvedemo alkalno lizo.

Alkalna liza in obarjanje

Alkalno lizo izvedemo na podlagi naslednjega protokola. Čašo v kateri se nahaja predhodno scentrifugirana biomasa postavimo na led. Nato dolijemo v čašo na vsak gram biomase 10 mL raztopine Tris pufer (50 mM) in EDTA (10 mM), pH = 8,0 (npr. za 5 g biomase dodamo 50 mL pufra), predhodno ohlajenega na 4 °C. Čašo postavimo na magnetno mešalo in mešamo dokler ne dobimo homogene suspenzije. Medtem pripravimo svežo raztopino 0,2 M NaOH in 1 % SDS. Nato odstranimo čašo z magnetnega mešala, jo postavimo na led, in ob mešanju s stekleno palčko (da zmanjšamo morebitne poškodbe pDNA) dodamo 10 mL·g⁻¹ biomase sveže pripravljene raztopine NaOH (0,2 M) in SDS (1 %) ter pustimo stati natančno 5 min. Ob mešanju s stekleno palčko nato dodamo še 10 mL·g⁻¹ biomase 3 M raztopine kalijevega acetata s pH vrednostjo 5,5, ki je bil predhodno v zmrzovalniku. Mešamo 3 minute in dodamo raztopino CaCl₂ do koncentracije 0,5 M (dodaj 1/7 volumna lizata). Čašo damo v hladilnik za 15 minut. Nato vsebino čaše prelijemo v centrifugirke in centrifugiramo pol ure na 12000 rpm. Plazmid se nahaja v supernatantu, ki ga odlijemo in ga prefiltriramo skozi 0,45 µm filter.

HPLC analitska metoda za analizo pDNA

Uporabimo predhodno razvito gradientno kromatografsko metodo za ločbo oc pDNA, sc pDNA, RNA in gDNA. Vzorec čiste sc pDNA znane koncentracije redčimo v ustreznih razmerjih in injiciramo. Izračunamo in zabeležimo površino vrhov na osnovi česar izračunamo umeritveno krivuljo (glej tudi vajo »Ločevanje proteinov z visokotlačno tekočinsko kromatografijo«). Na podlagi predhodno razvite metode analiziramo lizat dobljen po alkalni lizi in frakcije zbrane pri čiščenju pDNA na DEAE monolitni kromatografski koloni.

Čiščenje pDNA na DEAE CIM monolitni kromatografski koloni

Filtriran lizat pred nalaganjem na DEAE CIM monolitno kromatografsko kolono redčimo s 3 volumni destilirane vode na 1 volumen lizata (tako zagotovimo dovolj nizko prevodnost, ki omogoča vezavo plazmida na ionski izmenjevalec). Razredčen lizat nalagamo na kolono s peristaltično črpalko in lovimo frakcije, ki jih analiziramo na HPLC sistemu z drugo DEAE CIM monolitno kromatografsko kolono in tako preverjamo, ali je dosežen preboj DNA. Prav tako izmerimo absorbanco polovljenih frakcij na spektrofotometru pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm. Na koncu nalaganja preko kolone prečrpamo pufra TE z brez NaCl in 0,6 M NaCl. pDNA se s kolone spere s pufrom, ki vsebuje 1 M NaCl. Vse frakcije zbiramo. Koncentracijo eluirane pDNA (frakcija z 1 M NaCl) ovrednotimo tudi s spektrofotometrom pri 260 nm.

6.5 Meritve, izračuni in rezultati

Centrifugiranje

Beleži motnost supernatanta po centrifugiranju in komentiraj rezultate. Na osnovi meritev biomase po centrifugiranju določi koncentracijo biomase v začetnem vzorcu. Primerjaj rezultate z oceno količine pridobljene biomase na vaji »Spremljanje bioprocesa«.

HPLC analitska metoda za analizo pDNA

Na podlagi rezultatov injiciranja različnih koncentracij plazmidne DNA na DEAE CIM monolitno kolono narišemo graf ter izračunamo umeritveno krivuljo ter podatke uporabimo za izračun koncentracije pDNA v posameznih frakcijah.

pDNA s DEAE kromatografskim nosilcem

Narišemo krivuljo koncentracije sc pDNA (podatki pridobljeni s HPLC metodo) na izhodu DEAE monolitne kolone kot funkcijo pretočenega volumna vzorca. Določimo točko, ko je kolona nasičena in izračunamo kapaciteto DEAE kolone (mg sc pDNA). Oceni produktivnost procesa čiščenja (količina pridobljene sc pDNA na časovno enoto).

LITERATURA

- Harrison R.G., Todd P., Rudge S.R., Petrides D.P. 2003. Bioseparation Science and Engineering. New York, Oxford University Press: 406 str.
- Raspor, P. 1996. Biotehnologija in razvoj. V: Raspor, P. (ur.). Biotehnologija, Osnovna znanja. Ljubljana, BIA: 815 str.
- Smrekar, F., Podgornik, A., Ciringer, M., Kontrec, S., Raspor, P., Štrancar, A., Peterka, M. 2010. Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns. *Vaccine*, 28: 2039-2045.
- Subramanian G. (ur.) 2012. Biopharmaceutical Production Technology, Volumen 1, Weinheim, Wiley-VCH: 444 str.

7 SIMULACIJA KONTINUIRNEGA BIOPROCESA

Maja Paš

7.1 Teoretične osnove

V kontinuirnem bioprocesu bioreaktor obratuje z določenim pretokom medija v bioreaktor in bioprocesne brozge iz njega. Če je vsebina bioreaktorja dobro premešana, ima izstopni tok enako sestavo kot bioprocesna brozga v bioreaktorju. Iz bioreaktorja izločene celice se nadomestijo z novonastalimi.

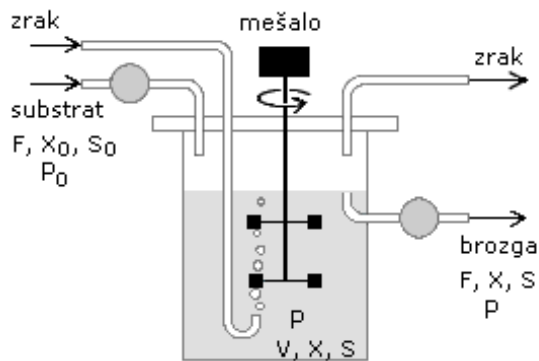
Mešalne kontinuirne bioreaktorje navadno imenujemo CSTR («continuous stirred-tank reactor«).

Običajno kontinuirni bioproces začnemo kot šaržen bioproces (glej vajo 5; Spremljanje šaržnega bioprocesa) in po pridobitvi ustrezne količine biomase nadaljujemo s kontinuirnim obratovanjem. Po določenem času, ki je odvisen od zadrževalnega časa ($\tau = \frac{1}{D}$; h), dosežemo stacionarno oziroma ustaljeno stanje (angleško »steady state«), v katerem se nobena lastnost sistema s časom ne spreminja, torej ni spremembe mase v sistemu ($\frac{dm}{dt} = 0$).

Ustaljeno stanje lahko dosežemo na več načinov:

- V *kemostatu* sta vstopni (F_v) in izstopni (F_{iz}) tok enaka in na tak način vzdržujemo konstanten volumen tekočine v bioreaktorju. Posledično je konstantno razmerje $\frac{F}{V} = D$ (h^{-1}), tako imenovana hitrost redčenja oziroma razredčevanja. Koncentracije snovi v bioreaktorju se prilagodijo nastavljeni hitrosti redčenja in čez čas se vzpostavi ustaljeno stanje. Hitrost nadomeščanja porabljenega substrata s svežim je enaka specifični hitrosti rasti mikroorganizmov. V laboratorijskem merilu je to idealen način za študij kinetike bioprocesov, saj lahko procesne spremenljivke proučujemo v odvisnosti od hitrosti redčenja in s tem rasti mikroorganizma.
- Tudi v *turbidostatu* vzdržujemo konstanten volumen tekočine, tako da nastavimo enaka pretoka na vstopu in izstopu iz bioreaktorja. Vendar pa hitrost redčenja (D), in s tem oba pretoka (F_v in F_{iz}), ni konstantna, ampak se prilagaja (spreminja) glede na nastavljeno koncentracijo biomase. Ker je spremljanje in kontrola teh sistemov dokaj kompleksna, se turbidostati ne uporabljajo v večjem merilu.
- *Auksostat* (nutristat, nustat) je sistem, v katerem nastavimo vrednost določenega parametra, denimo pH , pO_2 , koncentracijo etanola ipd. Glede na nastavljeno vrednost se spreminjata vtok in iztok, torej hitrost redčenja (D) ni konstantna. Takšne bioreaktorske sisteme imenujemo pH -auksostat, pO_2 -auksostat ipd.

V nadaljevanju bomo obravnavali le kemostat, pri katerem sta vtok (F_v) in iztok (F_{iz}) enaka ($F_v = F_{iz} = F$; $m^3 \cdot h^{-1}$), v vstopnem toku je le substrat s koncentracijo S_0 , v izstopnem toku pa nastala biomasa, neporabljen substrat in nastali produkt, torej bioprocesna brozga. Takšen primer kemostata je prikazan na sliki 7.1.



Slika 7.1. Shematski prikaz kemostata (prirejeno po <http://content.answers.com/main/content/img/McGrawHill/Encyclopedia/images/CE128700FG0010.gif>)

Ob predpostavki, da je brozga v bioreaktorju popolnoma pomešana, lahko zapišemo enačbe masne bilance za katero koli komponento, ki zapušča meje sistema (bioreaktorsko posodo).

Masno bilanco za biomaso (X) v ustaljenem stanju zapišemo kot:

$$F \cdot X_0 - F \cdot X + \mu \cdot X \cdot V - k_D \cdot X \cdot V = 0 \quad (7.1)$$

pri čemer je μ specifična hitrost rasti (h^{-1}), k_D pa konstanta odmiranja oziroma specifična hitrost odmiranja (h^{-1}).

Navadno je napajalni tok sterilen in dovajamo le limitni substrat, zato je $X_0 = 0$. Poleg tega lahko zanemarimo odmiranje celic, saj je kultura v eksponentni fazi rasti, torej je $k_D \ll \mu$. Enačba se tako glasi:

$$\mu \cdot X \cdot V = F \cdot X \quad (7.2)$$

Če enačbo (7.2) delimo z X in z V ter upoštevamo, da je $\frac{F}{V} = D$, dobimo naslednji izraz:

$$\mu = D \quad (7.3)$$

Specifična hitrost rasti mikroorganizmov v kemostatu je torej enaka hitrosti redčenja, ali drugače: celice se razmnožujejo z enako hitrostjo, kot jim dovajamo limitni substrat.

Enačbo (7.3) lahko vstavimo v Monodov izraz (glej vajo 5; Spremljanje šaržnega bioprocesa), ki opisuje odvisnost specifične hitrosti rasti mikroorganizmov (μ) od koncentracije limitnega substrata (S), in se glasi:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \quad (7.4)$$

K_S v enačbi (7.4) je konstanta zasičenja, ki pomeni tisto koncentracijo limitnega substrata ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), pri kateri je specifična hitrost rasti enaka polovici maksimalne specifične hitrosti rasti (μ_{\max}).

Dobimo enačbo, ki velja za koncentracijo limitnega substrata v kemostatu v ustaljenem stanju:

$$S = \frac{D K_S}{\mu_{\max} - D} \quad (7.5)$$

Masno bilanco za limitni substrat (S) v ustaljenem stanju pa zapišemo kot:

$$F \cdot S_0 - F \cdot S - \frac{\mu \cdot X \cdot V}{Y_{XS}} - m_S \cdot X \cdot V - \frac{q_P \cdot X \cdot V}{Y_{PS}} = 0 \quad (7.6)$$

pri čemer je Y_{XS} izkoristek substrata za proizvodnjo biomase (glej vajo 5; Spremljanje šaržnega bioprocesa), m_S je koeficient vzdrževanja oziroma specifična hitrost porabe substrata za vzdrževanje (h^{-1}), q_P je specifična hitrost nastanka produkta P (h^{-1}), Y_{PS} pa izkoristek substrata za nastanek produkta P.

Celotno enačbo delimo z V , upoštevamo, da je $\frac{F}{V} = D$ in μ zamenjamo z D ($\mu = D$). Tako dobimo izraz za koncentracijo biomase v kemostatu v ustaljenem stanju:

$$X = \frac{D(S_0 - S)}{\frac{D}{Y_{XS}} + m_S + \frac{q_P}{Y_{PS}}} \quad (7.7)$$

Zapis (7.7) lahko še poenostavimo, v primeru, da se produkti ne sintetizirajo, torej nastaja le biomasa ($\frac{q_P}{Y_{PS}} = 0$).

Poleg tega zanemarimo vzdrževanje, saj je poraba substrata za rast in razmnoževanje mikroorganizmov v eksponentni fazi rasti mnogo večja od porabe substrata za vzdrževanje ($m_S = 0$).

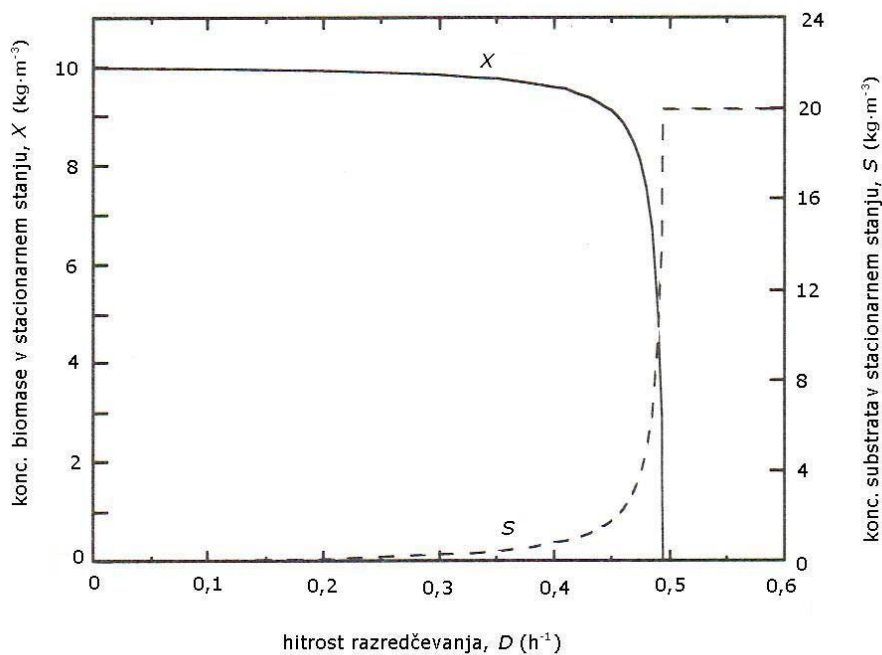
Ob upoštevanju obeh predpostavk dobi enačba (7.7) naslednjo obliko:

$$X = Y_{XS}(S_0 - S) \quad (7.8)$$

Nazadnje lahko v enačbo (7.8) vstavimo še izraz (7.5) in dobimo končni zapis za koncentracijo biomase v ustaljenem stanju:

$$X = Y_{XS} \left(S_0 - \frac{DK_S}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (7.9)$$

Enačbi (7.5) in (7.9) lahko grafično predstavimo tako, kot prikazuje slika 7.2.



Slika 7.2. Koncentraciji biomase in substrata v odvisnosti od hitrosti razredčevanja v ustaljenem stanju v kemostatu. Pri izračunu podatkov za izris krivulj so bili upoštevani naslednji parametri: $\mu_{\max} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $S_0 = 20 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (prirejeno po Doran, 1995)

Pri majhnih hitrostih razredčevanja ($D \rightarrow 0$) se v ustaljenem stanju porabi skoraj ves substrat, zato iz enačbe (7.8) sledi, da je $X \approx Y_{XS} \cdot S_0$.

Z naraščanjem D počasi narašča tudi S , ko se D bliža μ_{\max} , pa S hitreje narašča. Skladno s tem X pada ($X \rightarrow 0$), ko gre $D \rightarrow \mu_{\max}$. Stanje pri zelo velikih hitrostih razredčevanja ($D \approx \mu_{\max}$), ko je $X = 0$, imenujemo **izpiranje**. Do izpiranja celic iz bioreaktorja pride torej takrat, ko je hitrost odstranitve celic z izstopnim tokom iz bioreaktorja večja od hitrosti nastajanja celic (hitrosti rasti). Hitrost redčenja, pri kateri pride do izpiranja, imenujemo **kritična hitrost redčenja oziroma razredčevanja** (D_{kr} ; h^{-1}). Izračunamo jo tako, da v enačbo (7.9) vstavimo $X = 0$ in dobimo naslednji izraz:

$$D_{kr} = \frac{\mu_{max} \cdot S_0}{K_s + S_0} \quad (7.10)$$

V večini primerov je $K_s \ll S_0$, tako sledi, da je $D_{kr} \approx \mu_{max}$.

Hitrost redčenja, pri kateri obratuje kemostat, mora biti torej manjša od kritične hitrosti redčenja, da se izognemo izpiranju celic iz bioreaktorja. Okoli D_{kr} je sistem zelo občutljiv, saj že najmanjše spremembe D povzročijo relativno velike spremembe X in S .

Hitrost proizvodnje biomase v mešalnem kontinuirnem bioreaktorju je enaka hitrosti, s katero celice zapuščajo bioreaktor, tj. $F \cdot X$. **Volumenska produktivnost** oziroma volumenska hitrost proizvodnje biomase (Q_x ; $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) je torej enaka:

$$Q_x = \frac{F \cdot X}{V} = D \cdot X \quad (7.11)$$

V izraz (7.11) vnesemo enačbo (7.9) in dobimo naslednji zapis:

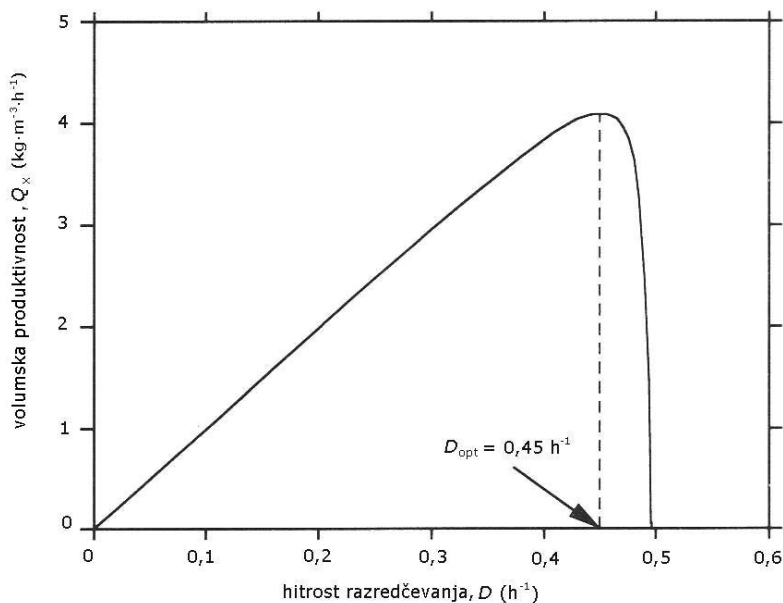
$$Q_x = D \cdot Y_{XS} \left(S_0 - \frac{D K_s}{\mu_{max} - D} \right) \quad (7.12)$$

Povezavo med Q_x in D iz enačbe (7.12) lahko predstavimo grafično, kot je prikazano na sliki 7.3.

Iz slike 7.3 je razvidno, da ima volumenska produktivnost maksimum, ki je dosežen pri **optimalni hitrosti redčenja** (D_{opt} ; h^{-1}). Pri D_{opt} je naklon krivulje $\frac{dQ_x}{dD} = 0$. Tako izpeljemo iz enačbe (7.12) izraz za D_{opt} :

$$D_{opt} = \mu_{max} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}} \right) \quad (7.13)$$

Ker je D_{opt} zelo blizu D_{kr} , kemostat navadno obratuje pri hitrosti redčenja, ki je še nekoliko manjša od D_{opt} .



Slika 7.3. Volumenska produktivnost kot funkcija hitrosti redčenja v ustaljenem stanju v kemostatu. Pri izračunu podatkov za izris krivulje so bili upoštevani naslednji parametri: $\mu_{\text{max}} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,2 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $S_0 = 20 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ (prirejeno po Doran, 1995)

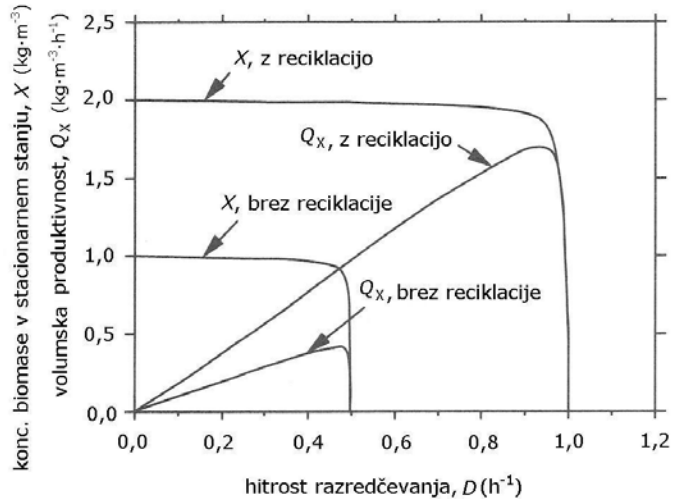
Koncentracijo celic v kemostatu lahko povečamo tudi z recikliranjem biomase iz nastale bioprocenke brozge. Takšen bioreaktorski sistem imenujemo **kemostat z reciklacijo**.

Biomaso lahko recikliramo na več načinov, najpogostejša sta:

- Z usedalnikom ali centrifugo zunaj bioreaktorja skoncentriramo biomaso oziroma ločimo celice od tekočega dela bioprocenke brozge, nato pa del biomase kontinuirno vračamo nazaj v bioreaktor. Takšen sistem imenujemo kemostat s povratnim tokom. lahko obratujejo v ustaljenem stanju. Najpogosteje se uporabljajo za biološko čiščenje odpadnih vod.
- Celice zadržimo v bioreaktorju, tako da iz bioreaktorja teče brozga z manjšo koncentracijo celic. To naredimo z uporabo posebnih mehanskih naprav, denimo filtrov. Takšni sistemi (perfuzijski bioreaktorji) se pogosto uporabljajo pri gojenju sesalskih celic. Drug način zadrževanja celic v bioreaktorju je imobilizacija na ustrezne nosilce (na primer v proizvodnji kisa).

Z reciklacijo biomase dosežemo večje hitrosti porabe substrata ter večje količine nastalega produkta. Poleg tega lahko uporabimo večje hitrosti redčenja ($D > \mu_{\text{max}}$), saj je D_{kr} , pri kateri pride do izpiranja, večja kot v običajnem kemostatu.

Tipične razlike med kemostatoma brez reciklacije in z njo v poteku značilnih parametrov bioprocesa (X , S , Q_x) prikazuje slika 7.4.



Slika 7.4. Koncentraciji biomase in substrata v odvisnosti od hitrosti redčenja v ustaljenem stanju v kemostatu brez reciklacije in z njo. Pri izračunu podatkov za izris krivulj so bili upoštevani naslednji parametri: $\mu_{\max} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,01 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $S_0 = 2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $\alpha = 0,5$, $\beta = 2,0$ (prirejeno po Doran, 1995)

7.2 Naloga

Simulacija kontinuirnega bioprocesa z uporabo računalniškega programa SIMKE. Od 5 vhodnih parametrov (μ_{\max} , K_S , Y_{XS} , S_0 , M oziroma m_S) spreminjamo enega in spremljamo potek značilnih parametrov bioprocesa z neprestanim polnjenjem in praznjenjem – X , S , Q_x . V bioprocesu z reciklacijo spreminjamo reciklacijski factor r .

7.3 Potreben material in oprema

Računalnik z računalniškim programom SIMKE.

7.4 Potek vaje

Kemostat

- Po zagonu programa SIMKE izberemo simulacijo kemostata brez reciklacije biomase in možnost »trije grafi«.
- Vhodne parametre bioprocesa določimo v naslednjih območjih:
 $\mu_{\max} = 0,1-1,4 \text{ h}^{-1}$
 $K_S = 0,2-5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $Y_{XS} = 0,2-0,8 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$
 $S_0 = 1-500 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $M(m_S) = 0,001-0,2$.
Spreminjamo enega od parametrov, tako da izberemo 3 različne vrednosti. Drugi pogoji (parametri) ostanejo nespremenjeni.
- Na osnovi primerjave grafičnih izpisov določimo vpliv spreminjanja posameznih vhodnih parametrov na koncentraciji biomase in limitnega substrata v ustaljenem stanju, volumensko produktivnost in stabilnost sistema (točka izpiranja).

Kemostat s povratnim tokom

- Izberemo simulacijo kemostata z reciklacijo biomase in možnost »trije grafi«.
- Vhodne parametre bioprocesa določimo v naslednjih območjih:
 $\mu_{\max} = 0,1-1,4 \text{ h}^{-1}$
 $K_S = 0,2-5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $Y_{XS} = 0,2-0,8 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$
 $S_0 = 1-500 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$
 $M(m_S) = 0,001-0,2$
 $r(\alpha) = 0-1$.
Spreminjamo le reciklacijski faktor r , tako da izberemo 3 različne vrednosti.
- Na osnovi primerjave grafičnih izpisov določimo vpliv spreminjanja reciklacijskega faktorja r na koncentraciji biomase in limitnega substrata v ustaljenem stanju, volumensko produktivnost in stabilnost sistema (točka izpiranja).

7.5 Meritve, izračuni in rezultati

Predstavitev rezultatov (grafični prikazi, primer prikazuje slika 7.6)

Odvisnost osnovnih kinetičnih parametrov kontinuirnega bioprocesa (X , S , Q_X) od hitrosti redčenja (D) za:

- kemostat (spreminjanje μ_{\max} , K_S , Y_{XS} , S_0 , M oziroma m_S)
- kemostat s povratnim tokom (spreminjanje r)

8 RAČUNSKE NALOGE

1. Za biotehnološko proizvodnjo treonina uporabljamo bakterijo *Serratia marcescens*. Maksimalna specifična hitrost respiracije te bakterije v šaržnem bioprocesu je $5 \text{ mmol O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Bioproces poteka v aerobnem mešalnem bioreaktorju, bakterije pa želimo namnožiti do končne koncentracije $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Pri obratovalni temperaturi in tlaku je topnost kisika v bioprocesni brozgi $0,008 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $k_L a$ pod temi pogoji je $0,15 \text{ s}^{-1}$.

Ali prenos kisika limitira hitrost celičnega metabolizma?

2. V bioreaktorju z volumnom $2,7 \text{ m}^3$ poteka šaržen bioproces, v katerem proizvajamo bakterijsko biomaso. Na stenah bioreaktorske posode so nameščene pregrade, kot mešalo pa služi Rushtonova turbina s premerom $0,5 \text{ m}$. Bioprocesno brozgo mešamo s hitrostjo 1 s^{-1} . Viskoznost bioprocesne brozge je $10^{-2} \text{ Pa} \cdot \text{s}$, gostota pa $1000 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$. Koncentracija biomase v bioprocesni brozgi takoj po inokulaciji znaša $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, ob koncu bioprocesa pa $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

a) Določite čas pomešanja.

b) Kolikšen vnos moči je potreben za mešanje?

c) Kolikšna mora biti koncentracija substrata v gojišču, če je izkoristek pretvorbe substrata v biomaso 45% , bakterije pa med bioprocesom porabijo ves substrat?

3. Za biotehnološko proizvodnjo etanola s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* smo izbrali anaeroben kemostat.

a) Produktivnost kontinuirnega bioprocesa glede na biomaso je bila $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pri hitrosti razredčevanja $0,10 \text{ h}^{-1}$. Izračunajte porabljeno količino substrata za tvorbo biomase, če je bil izkoristek pretvorbe substrata v biomaso $0,20$. Koncentracija limitnega substrata v napajalnem toku je bila $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

b) Izračunajte koncentracijo etanola v izhodni brozgi, če se je preostali sladkor porabil za tvorbo etanola in je bil izkoristek pretvorbe substrata v etanol $0,45$.

4. V bioreaktorju z delovnim volumnom 10 m^3 poteka odprt bioproces proizvodnje mikrobne biomase. S predhodnimi eksperimenti smo določili vrednosti naslednjih parametrov: $\mu_{\max} = 0,45 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0,55$.

Izračunajte pretok napajalnega toka s koncentracijo limitnega substrata $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, če je vsebnost preostalega substrata v izhodni brozgi $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

5. Za umeritveno krivuljo proteina na HPLC smo dobili naslednje rezultate:

Koncentracija ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Površina ($\text{mV}\cdot\text{min}$)
0	0
0,5	1
1,0	2
4,0	8

Vzorec, ki smo ga predhodno 4x redčili, je imel površino $2,8 \text{ mV}\cdot\text{min}$. Kolikšna je koncentracija ciljnega proteina v originalnem vzorcu?

6. V HPLC injiciramo $200 \mu\text{l}$ vzorca. Površina vrha albumina je znašala 50 enot. Da bi določili njegovo koncentracijo, smo enemu volumskemu delu vzorca dodali 3 volumske dele standarda s koncentracijo albumina $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ter ponovno injicirali $100 \mu\text{l}$. Površina dobljenega vrha je bila 20 enot. Kolikšna je koncentracija albumina v začetnem vzorcu?

SEZNAM SIMBOLOV

simbol	pomen	enota
A_{540}	absorbanca pri valovni dolžini 540 nm	-
t	čas	h
t_d	čas podvojevanja, delitveni čas, generacijski čas	h
t_1	čas potreben za pripravljalne postopke	h
t_2	čas potreben za zaključne postopke	h
V_d	delovni volumen bioreaktorja	m^3, dm^3
V_d	delovni volumen bioreaktorja	m^3, dm^3
$\log N$	desetiški logaritem koncentracije celic	-
He	Henryjeva konstanta	-
Q_O	hitrost porabe kisika na volumsko enoto brozge	$mol O_2 \cdot m^{-3} \cdot s^{-1}$
r_S	hitrost porabe substrata	$kg \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$
r_X	hitrost rasti mikroorganizmov	$kg \cdot m^{-3} \cdot h^{-1}$
D	hitrost razredčevanja (redčenja)	h^{-1}
Y_{XS}	izkoristek substrata za nastanek biomase	$kg \cdot kg^{-1}$
Y_{EtOHs}	izkoristek substrata za nastanek etanola	$kg \cdot kg^{-1}$
Y_{Ps}	izkoristek substrata za nastanek produkta P	$kg \cdot kg^{-1}$
F_{iz}	izstopni (pre)tok	$m^3 \cdot h^{-1}$
k_G	koeficient snovnega prestopa (snovna prestopnost) v plinski fazi	$m \cdot s^{-1}$
m_S	koeficient vzdrževanja vzdrževanja (specifična hitrost porabe substrata za vzdrževanje)	$kg_{substrata} \cdot kg_{biomase}^{-1} \cdot h^{-1}$
X	koncentracija biomase	$kg \cdot m^{-3}$
X_r	koncentracija biomase v reciklacijskem toku (?)	$kg \cdot m^{-3}$
N	koncentracija celic	$celic \cdot ml^{-1}$
$C_{glukoze}$	koncentracija glukoze	$g \cdot l^{-1}$
C_{ALi}	koncentracija komponente A na fazni meji	$g \text{ ali } mol \cdot m^{-3}$
C_{AGi}	koncentracija komponente A na fazni meji	$g \text{ ali } mol \cdot m^{-3}$
C_{AG}	koncentracija komponente A v plinu	$g \text{ ali } mol \cdot m^{-3}$
C_{AL}	koncentracija komponente A v tekočini	$g \text{ ali } mol \cdot m^{-3}$
S	koncentracija limitnega substrata	$kg \cdot m^{-3}$
S	koncentracija limitnega substrata	$kg \cdot m^{-3}$

P	koncentracija produkta	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
P_0	koncentracija produkta v vstopnem toku v bioreaktor	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
β	koncentracijski faktor za biomaso	-
K_S	konstanta nasičenja (zasičenja)	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
k_D	konstanta odmiranja oz. specifična hitrost odmiranja	h^{-1}
D_{kr}	kritična hitrost razredčevanja (redčenja)	h^{-1}
C_{kr}	kritična koncentracija raztopljenega kisika	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
X_{\max}	maksimalna koncentracija biomase	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
μ_{\max}	maksimalna specifična hitrost rasti	h^{-1}
m	masa	kg
a	medfazna površina	$\text{m}^2\cdot\text{m}^{-3}$
$(k_L\cdot a)_{kr}$	minimalni oz. kritični $k_L\cdot a$	s^{-1}
D_{opt}	optimalna hitrost razredčevanja (redčenja)	h^{-1}
p_{O_2}	parcialni tlak kisika	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
p_{AG}	parcialni tlak komponente A v plinu	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
m	porazdelitveni (distribucijski) faktor	-
m	porazdelitveni (distribucijski) faktor	-
F	pretok	$\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$
F_r	pretok reciklacijskega toka (?)	$\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$
P	produktivnost	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$
P_X	produktivnost bioprocesa za biomaso kot produkt	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$
P_{EtOH}	produktivnost bioprocesa za etanol kot produkt	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$
P_{Xsistema}	produktivnost sistema za biomaso kot produkt	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$
C_{AG}^*	ravnatežna koncentracija (topnost) komponente A v plinu	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
C_{AL}^*	ravnatežna koncentracija (topnost) komponente A v tekočini	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
\bar{C}_{AL}	ravnatežne koncentracije raztopljenega kisika	$\text{g ali mol}\cdot\text{m}^{-3}$
α	reciklacijsko razmerje, reciklacijski faktor, koeficient reciklacije, separacijska konstanta	-
r	reciklacijsko razmerje, reciklacijski faktor, koeficient reciklacije, separacijska konstanta	-
R	resolucija	-
Re	Reynoldsovo število	-
Re_1	Reynoldsovo število mešala	-
D	premer cevi	m

V	povprečna linearna hitrost tekočine	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
η	dinamična viskoznost tekočine	$\text{Pa}\cdot\text{s}$
ρ	gostota tekočine	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
D_i	premer mešala	m
N_i	hitrost vrtenja mešala	min^{-1}
t_m	čas pomešanja	s
c_f	končna koncentracija sledilca	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
c_i	začetna koncentracija sledilca	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
t_c	čas ciklizacije	s
P	moč	W
P_0	število moči	-
pH		-
W	širina kromatografskega vrha	h
$K_G\cdot a$	snovna prehodnost v plinski fazi	s^{-1}
$K_L\cdot a$	snovna prehodnost v tekočini	s^{-1}
k_L	snovna prestopnost v tekočini	$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$
N_A	snovni tok (fluks) komponente A	g ali $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
N_{AG}	snovni tok (fluks) komponente A skozi plast plina	g ali $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
N_{AL}	snovni tok (fluks) komponente A skozi plast tekočine	g ali $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
q_P	specifična hitrost nastanka produkta P	h^{-1}
β	specifična hitrost odmiranja	h^{-1}
q_O	specifična hitrost porabe kisika	$\text{mol O}_2\cdot\text{g}_{\text{biomase}}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
μ	specifična hitrost rasti	h^{-1}
T	temperatura	$^{\circ}\text{C}$
V	volumen	m^3
Q_x	volumenska produktivnost	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$
$k_L\cdot a$	volumenski koeficient snovnega prestopa	s^{-1}
F_v	vstopni (pre)tok	$\text{m}^3\cdot\text{h}^{-1}$
X_0	začetna koncentracija biomase	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
τ	zadrževalni čas	h

POROČILO O OPRAVLJENI VAJI

Poročilo o opravljeni vaji pišemo na bele liste formata A4.

Poročilo vsebuje naslednje podatke:

Ime in priimek študenta

Skupina

Datum opravljanja vaje

in je zgrajeno iz naslednjih osnovnih poglavij:

1. Naslov vaje
2. Namen vaje
3. Meritve, izračuni in rezultati
4. Diskusija
5. Literatura