



Maja PAŠ, Aleš PODGORNIK, Hrvoje PETKOVIĆ

BIOTEHNOLOŠKI TEHNIKUM: učbenik za vaje

za študente prvostopenjskega študija biotehnologije

Druga, dopolnjena izdaja

Ljubljana, 2026

BIOTEHNOLOŠKI TEHNIKUM: učbenik za vaje za študente prvostopenjskega študija biotehnologije. Druga, dopolnjena izdaja

Avtorji: Maja PAŠ, Aleš PODGORNIK, Hrvoje PETKOVIĆ

Založila: Založba Univerze v Ljubljani

Za založbo: Gregor Majdič, rektor Univerze v Ljubljani

Izdala: Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

Za izdajatelja: Marina Pintar, dekanja Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani

Ljubljana, 2026

Druga dopolnjena e-izdaja

Publikacija je v digitalni obliki prosto dostopna na:

<https://ebooks.uni-lj.si/>

<https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=187355>

DOI 10.14720/9789612978884

Publikacija je brezplačna.



To delo je ponujeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva-Deljenje pod enakimi pogoji 4.0 Mednarodna licenca. / This work is licensed under a Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License.

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v
Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI](https://cobiss.si/)-ID [290457347](https://cobiss.si/290457347)

ISBN 978-961-297-888-4 (PDF)

KAZALO VSEBINE

1	DOLOČANJE ČASA POMEŠANJA V MEŠALNEM BIOREAKTORJU	4
2	DOLOČANJE VOLUMETRIČNEGA KOEFICIENTA PRENOSA KISIKA V BIOREAKTORJU	11
3	LOČEVANJE PROTEINOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO	21
4	PRIPRAVA IN VALIDACIJA ENCIMSKEGA BIOSENZORJA.....	27
5	SPREMLJANJE ŠARŽNEGA BIOPROCESA.....	32
6	DOLOČANJE VEZNE KAPACITETE KROMATOGRAFSKEGA NOSILCA Z LIZOCIMOM	38
7	RAČUNALNIŠKA SIMULACIJA KONTINUIRNEGA BIOPROCESA	43
8	RAČUNSKE NALOGE.....	51
9	LITERATURA	53
10	POROČILO O OPRAVLJENI VAJI	54

1 DOLOČANJE ČASA POMEŠANJA V MEŠALNEM BIOREAKTORJU

Maja Paš

1.1 Teoretične osnove

Tok tekočine lahko predstavimo s tokovnicami, ki pa odražajo le celokupen učinek gibanja tekočine. Čeprav so tokovnice vzporedne in kažejo gladek kontinuiran tok, se lahko molekule v tekočini gibljejo neurejeno. Predstavitev dejanskega gibanja s tokovnicami je realnejša, če je tok tekočine počasnejši – imenujemo ga *laminaren tok*. V hitrem gibanju pa molekule tekočine pogosto prekrizajo tokovnice, oblikujejo se vrtinci – takšen tok tekočine je *turbulenten*.

Pojav vrtinčenja in turbulenten tok je v mešalnih bioreaktorjih zaželen, saj je na ta način mešanje učinkovitejše, prav tako prenos toplote. Prehod iz laminarnega v turbulentni tok ni odvisen le od hitrosti tekočine, ampak tudi od njene viskoznosti in gostote ter od geometrije bioreaktorske posode in mešala. Gostota in viskoznost bioprocesne brozge se med šaržnim bioprosesom spreminjata, saj se spreminja koncentracija celic, lahko pa tudi celična morfologija (velikost, oblika), koncentracija polimernih snovi (substratov ali produktov), osmotski tlak bioprocesne brozge in druge lastnosti.

Brezdimenzijski parameter, s katerim okarakteriziramo tok tekočine, imenujemo *Reynoldsovo število*. Za mešalne posode (bioreaktorje) izrazimo Reynoldsovo število kot:

$$Re_i = \frac{N_i \cdot D_i^2 \cdot \rho}{\eta} \quad (1.1)$$

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

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. Mešanje je v bioprosesništvu potrebno za:

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

Med najpogostejšimi načini mešanja v bioprosesništvu 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, ki so nameščene na stenah mešalnih bioreaktorjev in preprečujejo nastanek lijaka. 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 (ang. „standard type configuration”).

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). Izbira vrste 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).

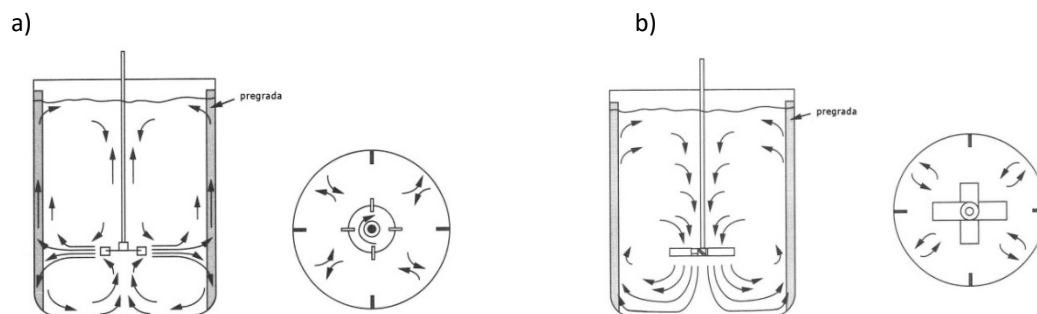


Slika 1.1. Mešala: a) Rushtonova turbina, b) propeler, c) veslo, d) sidro (Csiszar, b.l.)

Tok tekočine v bioreaktorju je odvisen od:

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

Rushtonova turbina na primer usmerja nizkoviskozne tekočine v radialni tok, medtem ko mešanje s propelerjem vodi v aksialno kroženje tekočine v bioreaktorju (slika 1.2).

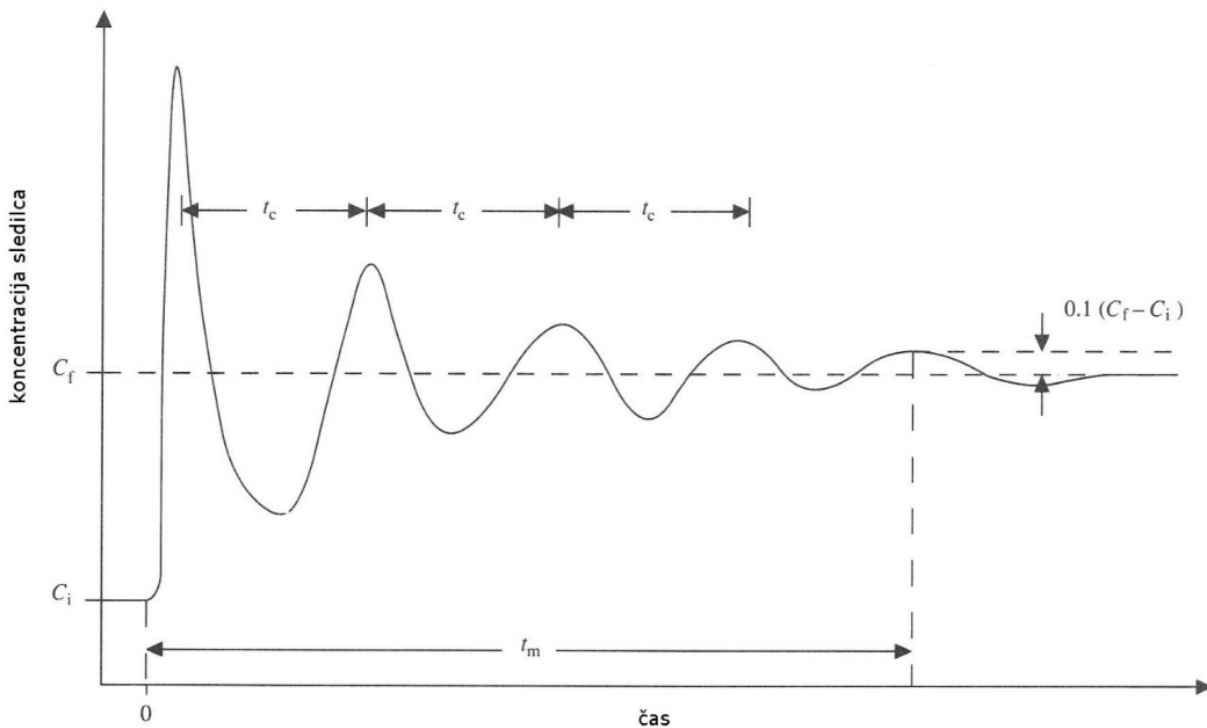


Slika 1.2. Tokovna profila v mešalnem bioreaktorju s pregradami, ki jo povzročata Rushtonova turbina (a) in propeler (b) (prirejeno po Doran, 2013)

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 zupušča 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). Da je mešanje hitro in učinkovito, mora biti čas pomešanja čim manjši. 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, 2013)

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

$$t_m = \alpha \cdot t_c, \quad (1.2)$$

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

Metode za določanje časa pomešanja 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 glede stopnje homogenosti,
- mesta vnosa sledilca,
- lokacije senzorja
- natančnosti določitve homogenosti medija.

Na čas pomešanja v bioreaktorju vplivajo:

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

Industrijski bioreaktorji delovnih volumnov od 1 do 100 m³ imajo čase pomešanja 30 do 120 s.

Odvisnost časa pomešanja od zgoraj naštetih spremenljivk lahko določimo eksperimentalno za različna mešala ali pa izračunamo *brezdimenzijski čas pomešanja* $N_i \cdot t_m$, ki predstavlja število vrtljajev mešala, potrebnih 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:

$$N_i \cdot t_m = \frac{1,54 \cdot V}{D_i^3} \quad (1.3)$$

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.

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:

$$P = P_0 \cdot \rho \cdot N_i^3 \cdot D_i^5 \quad (1.4)$$

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 $P_0 \propto Re^{-1}$.

1.2 Naloga

Eksperimentalna določitev vpliva hitrosti mešanja na čas pomešanja v laboratorijskem STC-bioreaktorju z Rushtonovo turbino z uporabo *pH*-metrične in termične metode ter v stekleni čaši na magnetnem mešalu z metodo razbarvanja. Opredelitev turbulentnosti z izračunom Re_i . Izračun vnosa moči za mešanje. Izračun teoretičnega časa pomešanja ter primerjava z eksperimentalno določenim.

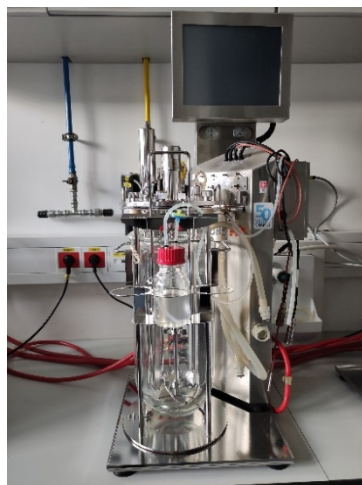
1.3 Potreben material in oprema

pH-metrična metoda:

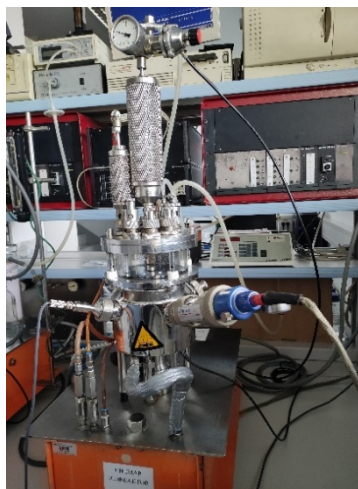
- laboratorijski mešalni bioreaktor Infors ($V_d = 10$ L) z opremo (Rushtonova turbina, gumb za nastavitev hitrosti mešanja, *pH*-elektroda), napolnjen z destilirano vodo (Slika 1.4)
- 1 M NaOH
- 1 M HCl

Termična metoda:

- laboratorijski mešalni bioreaktor Chemap ($V_d = 2,5$ L) z opremo (Rushtonova turbina, temperaturni senzor), napolnjen z destilirano vodo (Slika 1.5)
- mikrovalovna pečica za pripravo vroče destilirane vode ($T = 80$ °C)



Slika 1.4. Laboratorijski bioreaktorski sistem Infors



Slika 1.5. Laboratorijski bioreaktorski sistem Chemap

Metoda razbarvanja:

- *pH*-meter
- magnetno mešalo z mešalčkom (Slika 1.6)
- 0,5 M HCl
- 0,5 M NaOH
- fenolftalein



Slika 1.6. Čaša z vodo in mešalčkom na magnetnem mešalu

1.4 Potek vaje

pH-metrična metoda

Bioreaktor z delovnim volumnom 5 L napolnimo z destilirano vodo. V bioreaktorju je umerjena pH elektroda. Z dodatkom 1 M NaOH uravnamo začetno vrednost pH na 9. Hitrost mešanja nastavimo na 100 min^{-1} . Kot sledilec uporabimo 1 M HCl. Odpipetiramo $300 \mu\text{L}$ 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. 200 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: 300 min^{-1} , 400 min^{-1} , 500 min^{-1} .

Termična metoda

V bioreaktor z delovnim volumnom 2,5 L nalijemo 1 L destilirane vode sobne temperature. V bioreaktorju je že vgrajen in umerjen temperaturni senzor. Hitrost mešanja nastavimo na 10 min^{-1} . Kot sledilec uporabimo vročo vodo ($T = 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$), ki jo pripravimo v mikrovalovni pečici. Z merilnim valjem odmerimo 200 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 ($V = 1 \text{ L}$, sobna temperatura) in nastavimo drugo hitrost mešanja, t.j. 50 min^{-1} . Ponovimo postopek vnosa sledilca, ki smo ga izvedli pri prvi hitrosti mešanja. Isti poskus naredimo še za naslednje hitrosti mešanja: 100 min^{-1} , 200 min^{-1} .

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

Metoda razbarvanja

V stekleno čašo odmerimo 800 mL destilirane vode, vanjo prenesemo mešalček in jo postavimo na magnetno mešalo. Dodamo 1 mL fenolftaleina, v vodo potopimo pH-elektrodo in z dodajanjem 0,5 M NaOH uravnamo vrednost pH na 9,3, da se voda obarva rožnato. pH-elektrodo odstranimo iz vode. Hitrost mešanja nastavimo na 100 min^{-1} . Kot sledilec uporabimo 0,5 M HCl. Odpipetiramo $200 \mu\text{L}$ 0,5 M HCl in jo brizgnemo v čašo. Pazimo, da to naredimo vedno na istem mestu in s

približno enako hitrostjo. Merimo čas, v katerem rožnato obarvanje popolnoma izgine (čas pomešanja). Z dodatkom 200 μL 0,5 M NaOH ponovno uravnamo začetno vrednost pH na 9,3, 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

Predstavitev eksperimentalnih rezultatov:

- Tabela: Prikaz eksperimentalno določenih časov pomešanja (t_m) pri različnih hitrostih mešanja (N_i) za vse uporabljene metode
- Grafični prikaz: Prikaz eksperimentalno določenih časov pomešanja (t_m) pri različnih hitrostih mešanja (N_i) za vse uporabljene metode

Izračuni za pH-metrično metodo:

- Reynoldsovo število mešala (Re_i) pri različnih hitrostih mešanja (N_i)
- teoretični časi pomešanja (t_m) pri različnih hitrostih mešanja (N_i)
- vnos moči (P) pri različnih hitrostih mešanja (N_i)

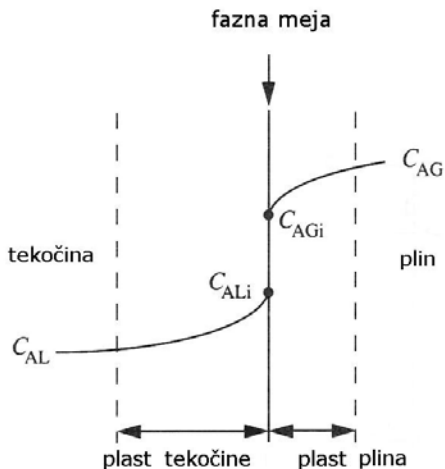
2 DOLOČANJE VOLUMETRIČNEGA KOEFICIENTA PRENOSA KISIKA V BIOREAKTORJU

Maja Paš

2.1 Teoretične osnove

Pomembnost prenosa snovi med plinom in tekočino v bioprocesništvu se kaže predvsem v aerobnih bioprocesih, kjer je potrebno zagotoviti dovolj raztopljenega kisika v bioprocesni brozgi. Med mešanjem mehurčkov zraka, ki vsebujejo kisik, poteka snovni prenos kisika iz plina v tekočino prek mejnega sloja in fazne meje, kar lahko opišemo s *teorijo mejnega sloja*. Ta predpostavlja, da na vsaki strani fazne meje, torej znotraj plinskega mehurčka in v tekočini, obstajata mirujoči plasti plina in tekočine določene debeline, kjer poteka prenos komponente A (kisika) z difuzijo. Prenos snovi povečujejo dejavniki, ki zmanjšujejo debelino mejnega sloja, v bioreaktorju 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 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, 2013)

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 koeficient snovne prestopnosti v tekočini ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), a stična površina med plinom in tekočino na volumensko enoto brozge ($\text{m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$), C_{AL} koncentracija kisika v brozgi ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$), C_{AL}^* koncentracija kisika v brozgi v ravnotežju s plinsko fazo, ki ji pravimo tudi *topnost* kisika v brozgi ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$).

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

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

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

p_{AG} je parcialni tlak komponente A v plinu, H_e pa Henryjeva konstanta, ki je 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, 2013)

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

Teh podatkov ne moremo neposredno uporabiti za bioprocesne sisteme, saj ima - poleg drugih parametrov - pomemben vpliv na topnost kisika tudi sestava medija oziroma v vodi raztopljene snovi. Topnost kisika v tipičnem bioprocesnem gojišču, ki vsebuje različne topljence (sladkorje, anione, katione, protipenilce), je za 5 do 25 % manjša kot v vodi pri enakih razmerah (temperatura, tlak).

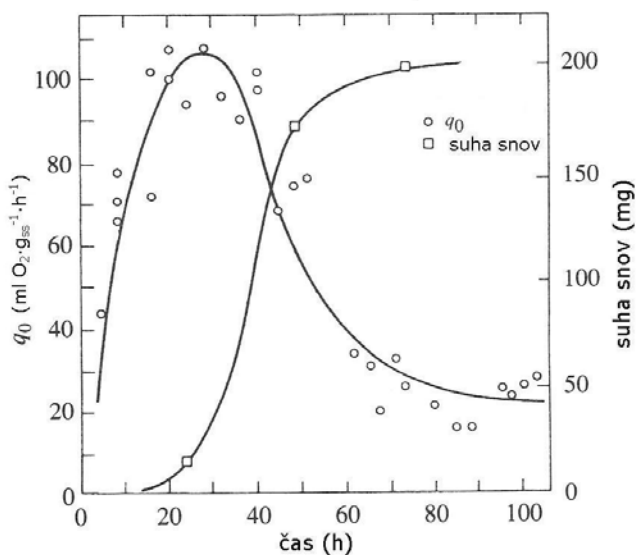
Celice aerobnih organizmov med intenzivno rastjo hitro porabljajo raztopljeni kisik iz bioprocen-
ne brozge, zato ga je potrebno nenehno dovajati s prezračevanjem. Hitrost prenosa kisika iz plina v
tekočino je še posebej pomembna pri visokih koncentracijah celic, saj ne želimo, da bi prišlo do
limitacije rasti zaradi (ne)razpoložljivosti kisika v brozgi. Na potrebe po kisiku vplivajo predvsem
naslednji dejavniki:

- vrsta organizma,
- faza rasti kulture,
- vir ogljika v gojišču (celice na primer najhitreje porabijo glukozo, zato je hitrost porabe kisika
večja, če je vir C v gojišču glukozna).

V šaržnem bioprocusu se hitrost porabe kisika s časom spreminja zaradi:

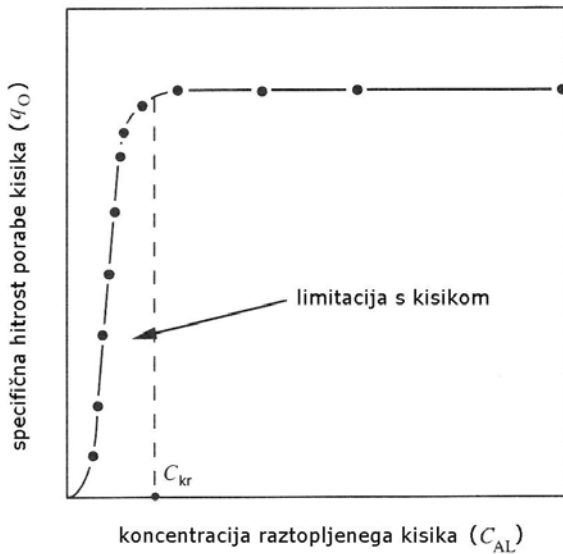
- vedno večje koncentracije celic – skupna hitrost porabe kisika je sorazmerna številu prisotnih
celic,
- spreminjanja *specifične hitrosti porabe kisika* (q_O) ($\text{mol O}_2 \cdot \text{g}_{\text{biomase}}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Specifična hitrost porabe kisika je hitrost porabe kisika na celico in je odvisna predvsem od
biokemijskih lastnosti celice ter njenega okolja. Iz slike 2.2 je razvidno, da je q_O največja v zgodnji
eksponentni fazi rasti.



Slika 2.2. Spreminjanje specifične hitrosti porabe kisika in koncentracije biomase med šaržnim (prirejeno po Doran, 2013)

Ko koncentracija raztopljenega kisika v brozgi pade pod določeno vrednost, to je *kritična koncentracija raztopljenega kisika* (C_{kr}), postane q_O odvisna tudi od koncentracije kisika v brozgi (C_{AL}). Odvisnost q_O od C_{AL} prikazuje slika 2.3.



Slika 2.3. Odvisnost specifične hitrosti porabe kisika od koncentracije raztopljenega kisika (prirejeno po Doran, 2013)

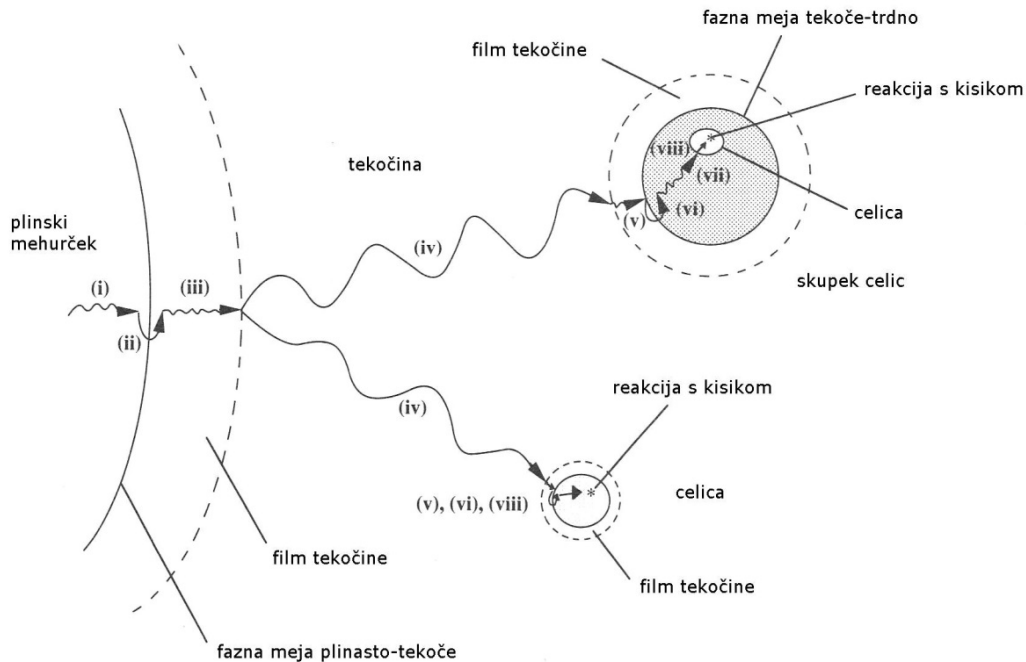
Koncentracija raztopljenega kisika v brozgi mora biti v vsaki točki bioreaktorja večja od C_{kr} , da ne pride do limitacije rasti s kisikom. Vrednost kritične koncentracije raztopljenega kisika je odvisna od organizma, običajno znaša med 5 in 10 %.

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

$$Q_O = q_O \cdot X \quad (2.3)$$

kjer 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 več uporov (prikazanih kot (i) do (viii) na sliki 2.4). Največji upor za prenos kisika predstavlja laminarni sloj tekočine okoli zračnega mehurčka, v katerem poteka prenos snovi z difuzijo (iii). Transport skozi ta film je torej korak, ki limitira celoten proces in določa skupno hitrost prenosa snovi.



Slika 2.4. Koraki pri prenosu kisika iz zračnega mehurčka do celice (prirejeno po Doran, 2013)

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

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

Enačbo (2.4) uporabimo za različne namene:

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

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

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

- Določimo lahko minimalni oziroma kritični $k_L \cdot a$, ki je potreben za vzdrževanje koncentracije raztopljenega kisika v bioprocesni brozgi nad kritično koncentracijo raztopljenega kisika ($C_{AL} > C_{kr}$):

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

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

Kot rezultat številnih 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 in podobno. Kljub temu je le na podlagi korelacij težko napovedati, kakšen bo $k_L \cdot a$ v določenem bioreaktorju, zato koeficient snovne prestopnosti običajno *določamo eksperimentalno*.

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

Če je koncentracija kisika, ki jo merimo med eksperimentom, konstantna, gre za *stacionarno metodo*. Spremljamo vsebnost kisika v vstopnem plinu v bioreaktor in izstopnem iz bioreaktorja. Razlika med njima mora biti enaka hitrosti prenosa kisika iz plina v tekočino. Metodo lahko izvedemo med normalnim obratovanjem bioreaktorjev.

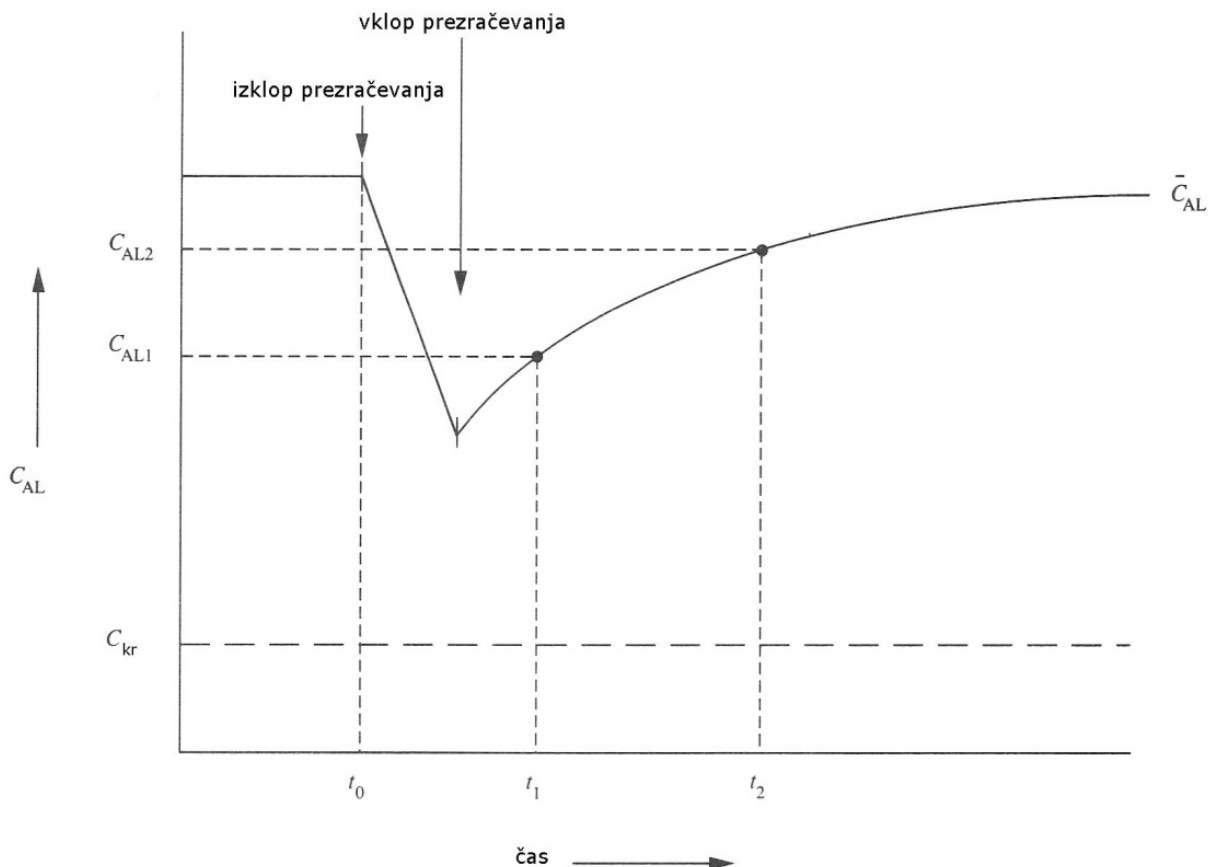
Pri *dinamičnih metodah* se koncentracija kisika s časom spreminja, saj temeljijo na nestacionarnih pogojih. Obstajajo različne različice dinamične metode, med najpogostejšimi sta:

- razplinjevalna metoda
- dinamična metoda z mikroorganizmi.

Pri dinamičnih metodah z mikroorganizmi poteka eksperiment med šaržnim aerobnim bioprocesom v mešalnem bioreaktorju. Koncentracijo raztopljenega kisika v brozgi spremljamo s senzorjem za merjenje kisika (kisikova oziroma pO_2 -elektroda).

Ob določenem 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).

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 (reoksigenacija) 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 reoksigenacijo izmerjeni koncentraciji kisika ob časih t_1 in t_2 .



Slika 2.5. Spreminjanje koncentracije raztopljenega kisika v bioproceni brozgi med dinamično metodo z mikroorganizmi za določanje $k_L \cdot a$ (prirejeno po Doran, 2013)

Med reoksigenacijo sistem ni v stacionarnem stanju, saj potekata tako vnos kisika v brozgo ($k_L \cdot a(C_{AL}^* - C_{AL})$) kot poraba s celicami ($q_O \cdot X$). Zato velja naslednja enačba:

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

Ko se vzpostavi stacionarno stanje, velja $C_{AL} = \bar{C}_{AL}$, $\frac{dC_{AL}}{dt} = 0$, ker se koncentracija raztopljenega kisika s časom ne spreminja. Iz enačbe (2.6) sledi:

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

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

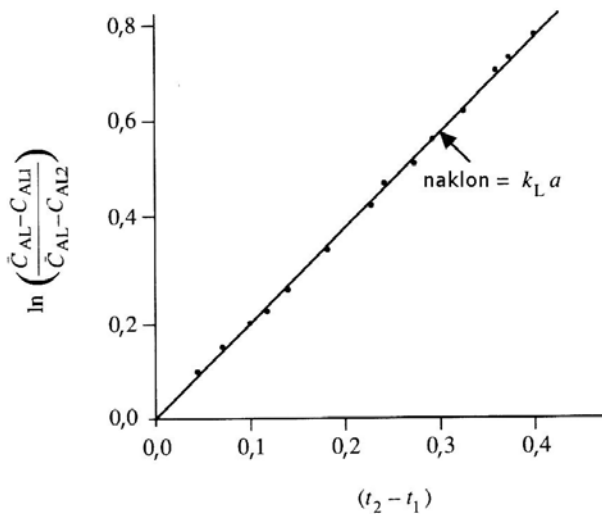
$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L \cdot a(\bar{C}_{AL} - C_{AL}) \quad (2.9)$$

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:

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

$k_L \cdot a$ lahko 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, 2013)

Izraz (2.10) lahko uporabimo tudi za sisteme brez porabe kisika. V tem primeru je $\bar{C}_{AL} = C_{AL}^*$, 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 mešalnem bioreaktorju 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)
Saharoza	10,0
Kvasni ekstrakt	5,0
Destilirana voda	do 1000 mL

Aparature in oprema

- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 10$ L) z opremo, pO_2 -elektroda (Slika 1.4)
- laboratorijski mešalni bioreaktor ($V_d = 2,5$ L) z opremo, pO_2 -elektroda (Slika 1.5)
- jeklenka z N_2
- rotameter
- laboratorijski inventar

2.4 Potek vaje

Razplinjevalna metoda

Vodo v bioreaktorju (10 L) prepihujemo z inertnim plinom N_2 dokler ne izpodrinemo vsega raztopljenega kisika iz vode. Pretok dušika nastavimo z rotametrom na 10,0 L·min⁻¹. Vsebnost kisika v vodi merimo s predhodno umerjeno pO_2 -elektrodo in na monitorju spremljamo grafični prikaz spreminjanja pO_2 (v %) glede na čas. Ko pO_2 doseže nič, prekinemo dotok dušika, nastavimo prvo kombinacijo eksperimentalnih parametrov (hitrost mešanja in pretok zraka), pri kateri bomo določali $k_L \cdot a$, ter vklopimo prezračevanje. Spremljamo ponovno raztapljanje kisika v vodi (*reoksigencijo*). Ko pO_2 doseže 100 %, ponovimo postopek izpodrivanja kisika iz vode in nastavimo drugo 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 (L·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 šaržni aeroben submerzni bioproces. Kultivacija kvasovk poteka pri temperaturi 28 °C, hitrosti mešanja 200 min⁻¹ in pretoku zraka 5,0 L·min⁻¹ (2 vvm). Po približno 10 minutah izklopimo prezračevanje in mešanje zmanjšamo na minimum, da preprečimo površinsko aeracijo ter zagotovimo dober odzivni čas elektrode, hkrati pa preprečimo posedanje mikroorganizmov. Spremljamo linearno padanje koncentracije raztopljenega kisika v brozgi. Ko pO_2 doseže 40 %, prezračevanje in mešanje ponovno nastavimo na želene proučevane vrednosti. Če je hitrost dovajanja kisika večja od hitrosti njegove porabe, začne pO_2 naraščati. Spreminjanje pO_2 v brozgi prikazuje 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 (L·min ⁻¹)
1.	100	5,0
2.	100	2,5
3.	200	2,5

2.5 Meritve, izračuni in rezultati

- Grafična prikaza 1 in 2: pO_2 (v %) v odvisnosti od časa za (1) razplinjevalno metodo in (2) dinamično metodo z mikroorganizmi; na grafih naj bodo označeni različni eksperimentalni pogoji.
- Grafični prikazi 3–9: grafična določitev koeficientov $k_L \cdot a$ (slika 2.6) pri različnih eksperimentalnih pogojih razplinjevalne in dinamične metode z mikroorganizmi; na grafih naj bo prikazana enačba premice.
- Tabela z rezultati: koeficienti $k_L \cdot a$ pri različnih hitrostih mešanja in pretokih zraka, določeni z razplinjevalno in dinamično metodo z mikroorganizmi.

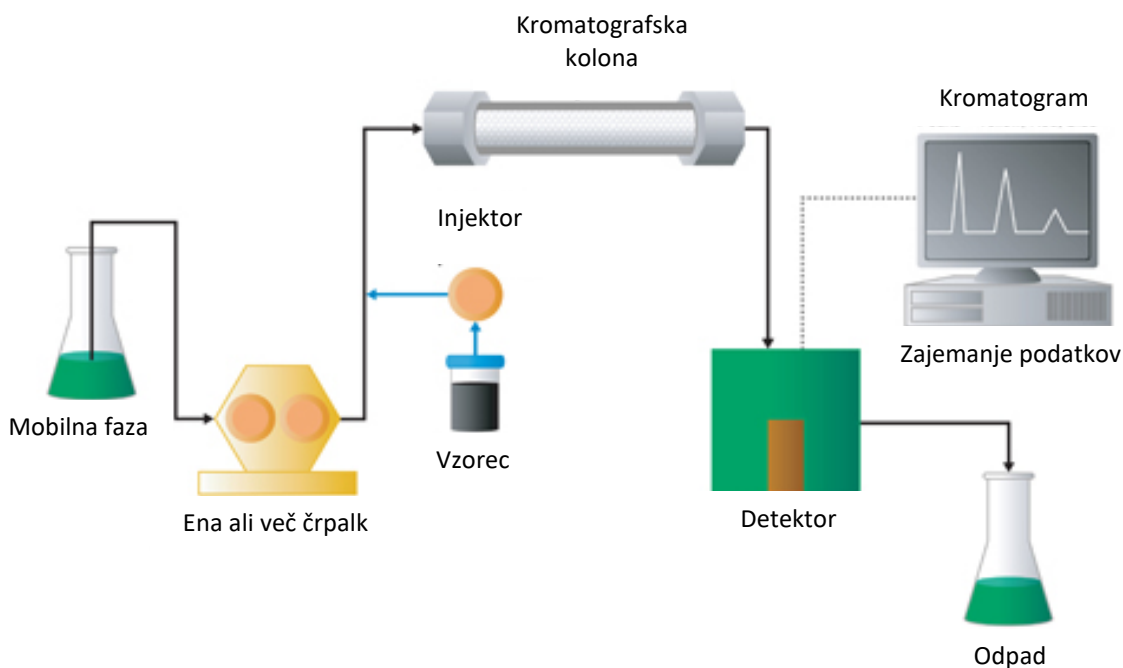
3 LOČEVANJE PROTEINOV Z VISOKOTLAČNO TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO

Aleš Podgornik

3.1 Teoretične osnove

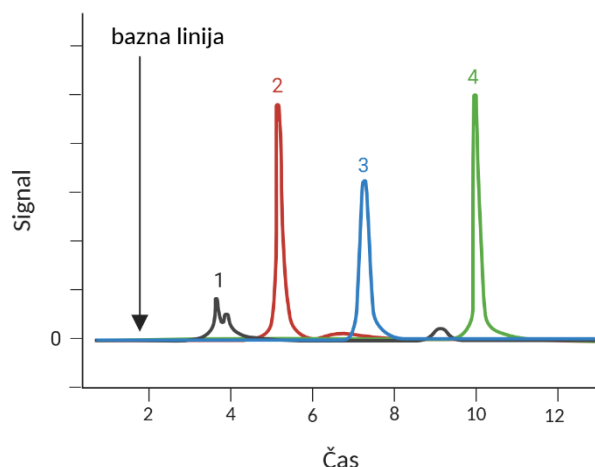
Visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Pressure Liquid Chromatography ali s kratico HPLC) predstavlja eno izmed pomembnih analitskih metod kot tudi eno izmed najpomembnejših metod čiščenja in izolacije substanc. To še posebej velja v primerih, ko je zahtevana visoka stopnja čistosti ciljne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

Pri kromatografiji temelji ločevanje substanc na osnovi njihove različne afinitete do določene vrste kemijskih skupin, ki so navadno kemijsko vezane 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. Podatke beležimo na računalnik in jih prikažemo v obliki kromatograma. Primer kromatografskega sistema je prikazan na sliki 3.1.



Slika 3.1. Slika HPLC sistema (prirejeno po Waters, b.l.)

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 puščico

Idealno je, če se snovi med seboj popolnoma ločijo, to pomeni, da sta vrhova ločena do bazne linije (Slika 3.2, vrhovi 2, 3, 4). *Bazna linija* imenujemo kromatogram, ki ga posnamemo, 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, vrh 1), 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. koncentracije soli ali pH vrednosti) ali z uporabo drugega trdnega nosilca. Prav slednje omogoča izjemno fleksibilnost kromatografskih metod, saj obstaja 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 se najpogosteje uporablja tehnika kromatografije na reverzni fazi, medtem ko je pri čiščenju velikih molekul navadno potrebno več kromatografskih postopkov, ki 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 jih 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, tipično 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 moč interakcije in posledično 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 spreminjanje naklona gradienta.

3.2 Naloga

Seznanitev z delovanjem gradientnega HPLC sistema. Preučitev vpliva gradienta na ločevanje testnih proteinov. Ločba lizocima od ostalih proteinov prisotnih v jajčnem beljaku. Določanje količine lizocima 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 (pufer z nizko ionsko močjo)
- 20 mM Tris-HCl; pH = 8,0 + 1,5 M NaCl (pufer z visoko ionsko močjo)

Aparature in oprema

- tekočinski kromatograf (HPLC) s CIM disk SO₃ monolitno kolono
- spektrofotometer
- pH meter
- tehnica

3.4 Potek vaje

Razdelimo se v dve skupini. Ena najprej pripravlja nabor pufrov, druga pa začne delo na HPLC sistemu. Po polovici časa se skupini zamenjata. Vsaka skupina opravi oba dela vaje.

Priprava pufrov in vzorcev

Pripravimo 500 mL pufr z nizko ionsko močjo in 300 mL pufr z dodanim NaCl (visoka ionska moč). Po 1 mL pufr z nizko ionsko močjo, pH 8,0 prenesemo v tri Eppendorf vial in v prvo zatehtamo 1 mg proteina mioglobina, v drugo 1 mg proteina citokroma C, v tretjo pa 1 mg lizocima. Stresamo, dokler se proteini ne raztopijo. Iz vsake Eppendorf vial odpipetiramo 600 µL in jih zmešamo v ločeni Eppendorf viali. S tem smo pripravili vzorec mešanice različnih proteinov.

Odpipetiramo 1 mL pufr z visoko ionsko močjo, pH 8,0 v Eppendorf vialo in vanjo zatehtamo 5 mg proteina lizocima. Stresamo, dokler se protein ne raztopi, nato raztopino prefiltriramo skozi 0,22 µm filter v drugo vialo. Iz raztopine lizocima naredimo še 4 raztopine različnih koncentracij z redčitvami s pufr z visoko ionsko močjo, vsako v svoji Eppendorf viali. Pri pripravi upoštevamo, da potrebujemo vsake raztopine okoli 0,5 mL.

Vzorec jajčnega beljaka je bil pripravljen tako, da smo ga raztopili v fosfatnem pufru, pH 5,0, ga pustili preko noči v hladilniku in oborino odfiltrirali. Vzamemo tako pripravljeno raztopino jajčnega beljaka in po zgledu raztopin lizocima naredimo še 2 raztopini z različnima koncentracijama, vsake naj bo 1 mL. Vsebinsko Eppendorf vial s srednjo redčitvijo razdelimo v dva dela, vsakega v svojo Eppendorf vialo in v eno dodamo 0,5 mg lizocima ter dobro premešamo, 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.

Ponovljivost metode in določanje umeritvene krivulje

Vzamemo predpripravljene raztopine lizocima različnih koncentracij. Vzorec injiciramo v HPLC sistem preko 20 µL zanke, pri čemer skozenj teče mobilna faza visoke ionske moči. Vsako izmed

različnih pripravljenih koncentracij lizocima v pufru visoke ionske moči injiciramo v HPLC sistem vsaj dvakrat, da preverimo ponovljivost. Izmerimo višine in površine vrhov in jih zabeležimo.

Vpliv naklona gradienta na ločbo proteinov

Uporabimo gradientno kromatografsko metodo, pri kateri koncentracijo NaCl v mobilni fazi spreminjamo od 0 M do maksimalno 1,5 M. Zaženemo kromatografsko metodo, ločeno injiciramo različne proteine (mioglobin, citokrom C in lizocim, pripravljen v pufru nizke ionske moči) 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 višino posameznih vrhov in širino. Eksperiment ponovimo s kromatografsko metodo, ki ima drugačen naklon gradienta NaCl in injiciramo le mešanico proteinov. Ponovno zabeležimo zadrževalni čas, višino in širino vrhov.

Analiza lizocima v jajčnem beljaku

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 eno od gornjih kromatografskih metod in isto kromatografsko kolono kot za predhodno ločevanje proteinov, na katero 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 in višino vrhov, tokrat pa tudi površino vrhov.

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

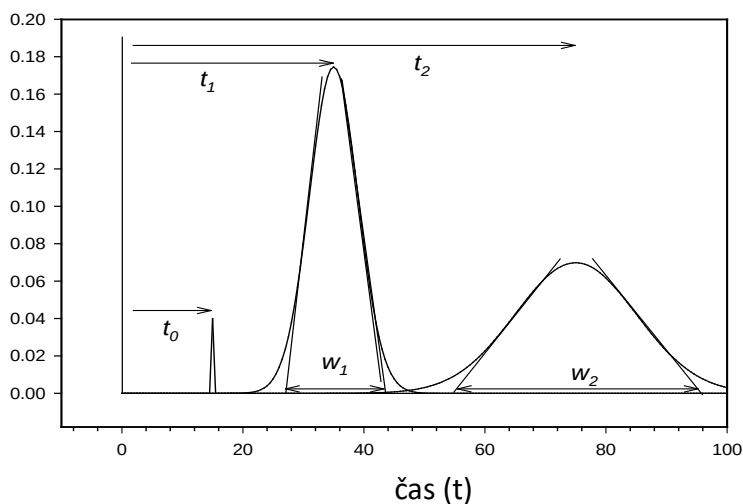
Narišemo graf odvisnosti povprečne višine in površine od injicirane koncentracije za vse pripravljene koncentracije lizocima. Nizu podatkov prilagodimo premico, zapišemo njeno enačbo in korelacijski indeks (R^2). Rezultate komentiramo.

Vpliv naklona gradienta na ločbo proteinov

Na izmerjenih kromatogramih določimo resolucijo med vrhovi posameznih proteinov. Resolucijo izračunamo 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.

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

Analiza lizocima v jajčnem beljaku

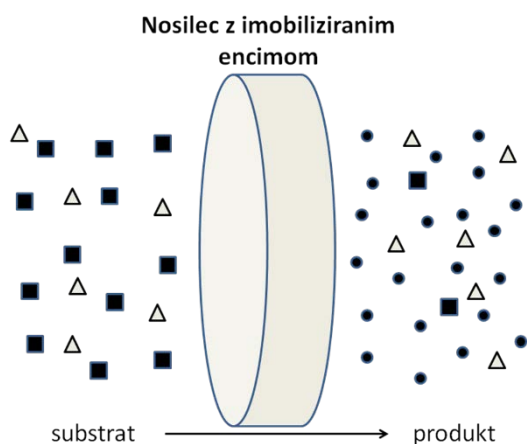
S pomočjo podatkov v tabeli 3.1 skušamo sklepati, kateri proteini pripadajo posameznim vrhovom. Za vsakega izmed različnih injiciranih vzorcev jajčnega beljaka izračunamo, na osnovi višine in površine vrha, koncentracijo lizocima v vzorcu, pomagamo si z umeritveno krivuljo. Rezultate komentiramo.

4 PRIPRAVA IN VALIDACIJA ENCIMSKEGA BIOSENZORJA

Aleš Podgornik

4.1 Teoretične osnove

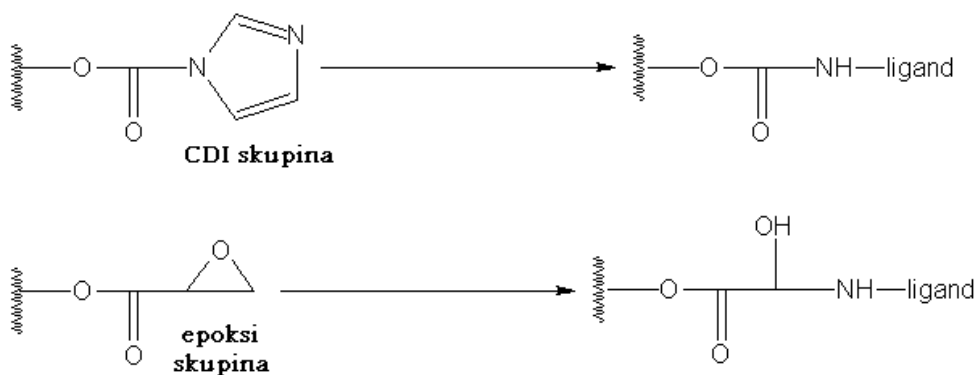
Biosenzor navadno definiramo kot analitsko opremo, ki vključuje biološko komponento in sistem za prenos signala. Biološka komponenta je imobilizirana na površino, s čimer se ohranja njena konstantna količina. Kadar je biološka komponenta encim, lahko uporabimo različne načine imobilizacije, v praksi 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 blagimi reakcijskimi 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. aldehydne, epoksidne, sukcinimidne, hidrazidne, karbonildiimidazolne (CDI) in nekatere druge. Potek reakcije imobilizacije na epoksidno in CDI skupino je prikazan na sliki 4.2.

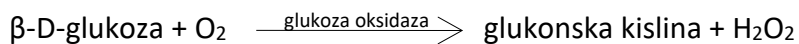


Slika 4.2. Shematski potek imobilizacije liganda na karbonildiimidazolno (CDI) skupino (zgoraj) in epoksi skupino (spodaj). Ker imobilizacija navadno poteka preko aminske skupine, je le-ta pri ligandu še posebej označena.

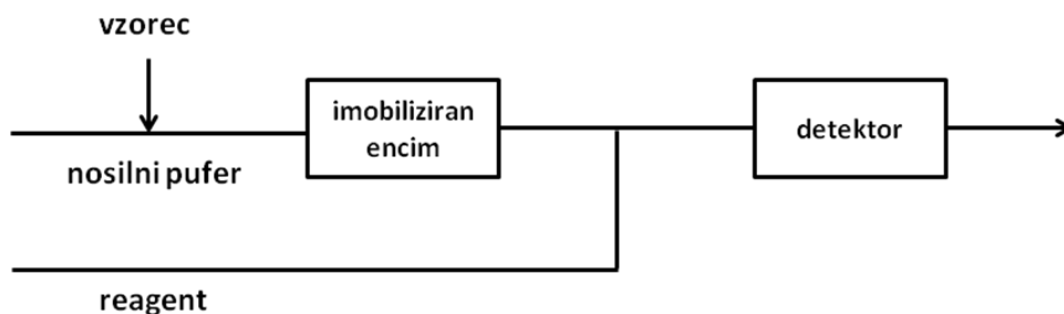
Poleg narave nosilca in samega encima so pomembni tudi pogoji, pri katerih imobilizacija poteka. Znano je, da večina kemijskih reakcij hitreje poteka pri višji temperaturi, kar velja tudi za reakcijo imobilizacije, vendar moramo pri tem upoštevati, da lahko pride med imobilizacijo do spremembe konformacije 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. Usvojitev koncepta delovanja meritve glukoze z encimom glukoza oksidaza. Priprava raztopin glukoze. Vpliv imobilizacijskega pufr in narave skupine nosilca na občutljivost biosenzorja. Določitev umeritvene krivulje.

4.3 Potreben material in oprema

Encimi in reagenti

glukoza oksidaza (EC 1.1.3.4)

hrenova peroksidaza (EC 1.11.1.7)

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

fenol

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

Aparature in oprema

- tekočinski kromatograf prirejen za delovanje kot FIA sistem
- CIM ohišje

- CIM epoksi monolitni disk
- CIM CDI monolitni disk
- pH meter
- brizga
- laboratorijski inventar

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. pH vrednost raztopine umerimo na 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 pufru ter vse raztopimo v 250 mL destilirane vode. Uporabimo predhodno pripravljen reagent.

Imobilizacija glukoza oksidaze na nosilec

V imobilizacijskem pufru 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.

Preverjanje delovanja biosenzorja

V CIM ohišje vstavimo CIM disk z imobilizirano glukozo 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. Preverimo ponoljivost s ponovnim injiciranjem, dokler nista površina in višina vrha zaporednih injiciranj primerljivi.

Določanje umeritvene krivulje in vpliv pretoka

Na CIM disk z imobilizirano glukozo oksidazo injiciramo raztopine različnih koncentracij glukoze, začnemo z najnižjo. Z vsako koncentracijo izvedemo vsaj 2 injiciranja. Beležimo višino in površino vrha. Nato spremenimo pretok in postopek ponovimo. Eksperimente izvedemo pri 2 različnih pretokih.

4.5 Meritve, izračuni in rezultati

Poročilo vsebuje primerjavo rezultatov dela obeh skupin.

FIA sistem

Shematsko prikažemo delovanje FIA sistema in komentiramo njegovo delovanje.

Določanje umeritvene krivulje in vpliva pretoka na površino vrhov

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

5 SPREMLJANJE ŠARŽNEGA BIOPROCESA

Aleš Podgornik

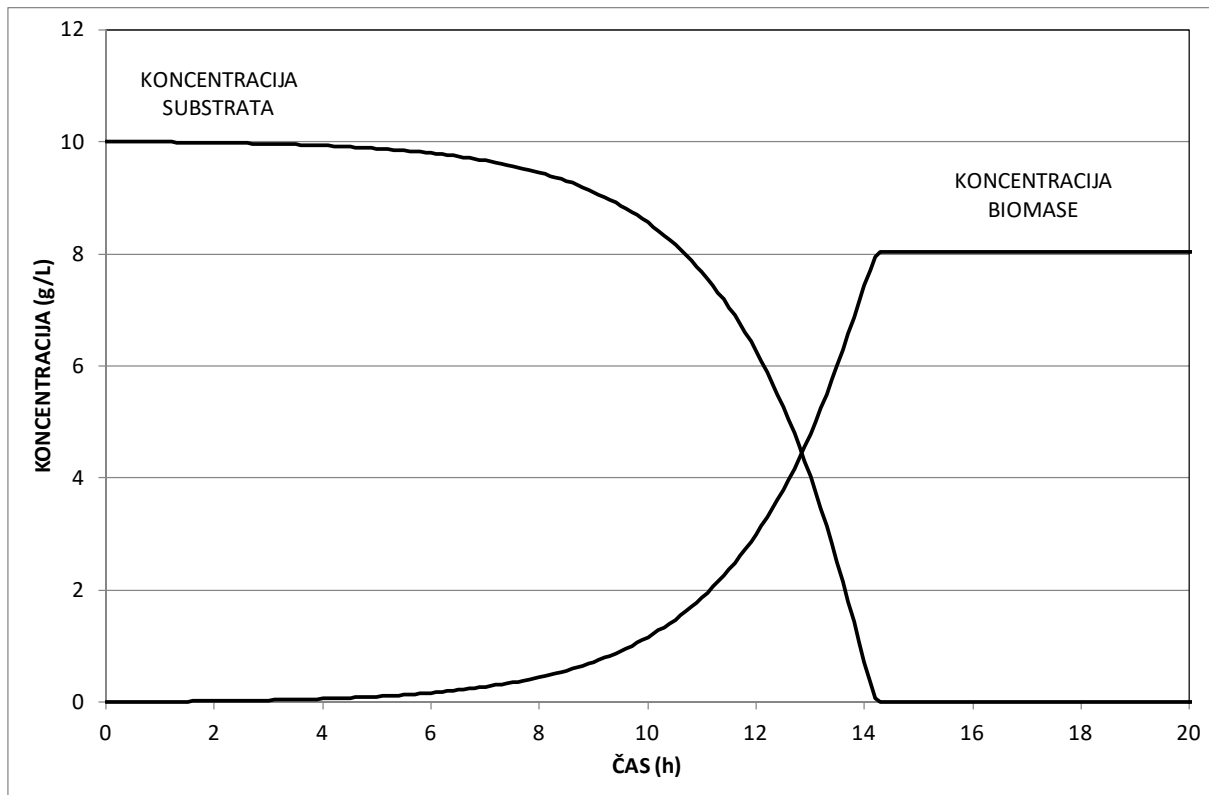
5.1 Teoretične osnove

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 nek ciljni produkt (npr. antibiotiki ali monoklonska protitelesa). Ker je naš cilj pridobiti čim več produkta v čim krajšem času, moramo nuditi mikroorganizmom pogoje, ki jih spodbudijo 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 bioprocesa mikroorganizem nahaja in da znamo, kadar je to potrebno, na te pogoje tudi vplivati. Predpogoj je torej, da znamo ključne bioprocenjske spremenljivke meriti, saj lahko na osnovi tega reguliramo proces na način, ki omogoča doseganje maksimalne produktivnosti.

Pri naši vaji bomo kot modelni mikroorganizem uporabili pekovski kvas *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasovka je fakultativni anaerob, kar pomeni, da jo lahko gojimo pod anaerobnimi ali aerobnimi 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 kvasovko, prepihovati z zrakom, hkrati pa tudi premešavati, da zagotovimo zadostno raztapljanje kisika v mediju (vaji »Določanje časa pomešanja v mešalnem bioreaktorju« ter »Določanje volumetričnega koeficienta prenosa kisika v bioreaktroju«). 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 bioprocesa. 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 kvasovka, dober pokazatelj koncentracije biomase. Poleg koncentracije kisika je drugi limitni parameter bioprocesa koncentracija hranil, v našem primeru koncentracija glukoze, ki jo bomo spremljali z biosenzorjem, vključenim v FIA sistem, in smo ga pripravili v vaji »Priprava in validacija encimskega biosenzorja«. Za rast je potrebno tudi zagotavljanje optimalne temperature medija, zaradi česar moramo imeti ustrezno regulacijo.

Ker gre za šaržni bioprocenjs, se koncentraciji substrata in biomase spreminjata, kot je to prikazano na sliki 5.1.



Slika 5.1. Shematski prikaz spreminjanja koncentracije substrata in biomase tekom šaržnega bioprocesa

Dogajanje v šaržnem bioprocesu lahko zapišemo z masnimi bilancami. Ker se koncentraciji biomase in substrata tekom bioprocesa 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:

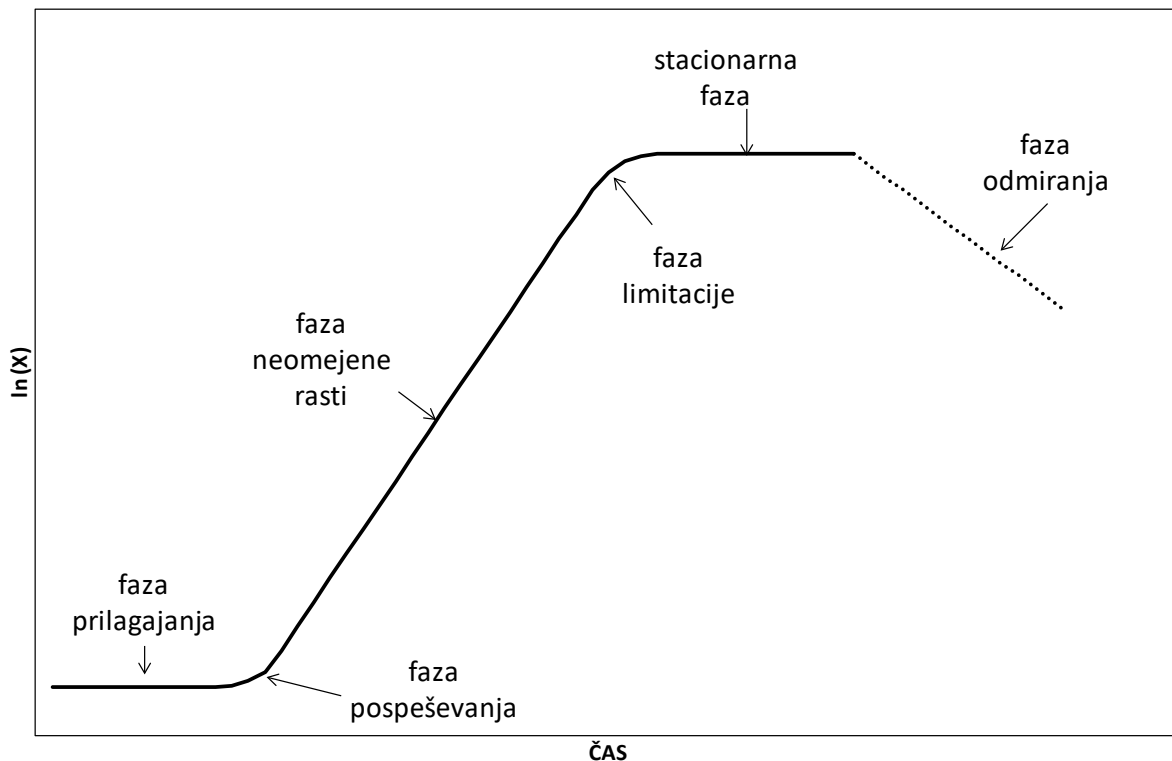
$$X = X_0 \cdot e^{\mu t} \quad (5.2)$$

oziroma po logaritmiranju:

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

Vidimo torej, da lahko določimo območje konstantne specifične hitrosti rasti, to je na delu, kjer je naklon konstanten, če narišemo $\ln X$ proti procesnemu času. Del s konstantnim naklonom, ki je najbolj strm, predstavlja maksimalno specifično hitrost rasti. Na sliki 5.2 je prikazan tipičen primer poteka koncentracije biomase tekom šaržnega procesa, izrisanega na takem grafu.

Iz slike 5.2 lahko zaključimo, da se tekom celega procesa specifična hitrost rasti s časom spreminja. Konstantna vrednost specifične hitrosti rasti se na sliki 5.2 odraža v ravnih delih. V primeru, ko je krivulja vzporedna s 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 fazo pojemanja oziroma fazo limitacije.



Slika 5.2. Posamezne faze rasti mikroorganizma med šaržnim procesom

Faza limitacije zasluži poseben poudarek in 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 (vaja 7; »Računalniška simulacija kontinuirnega bioprocesa«).

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 bioprocesom 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 bioprocesne 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 bioprocesnih parametrov, izračun maksimalne specifične hitrosti rasti (μ_{max}), izkoristka in produktivnosti bioprocesa.

5.3 Potreben material in oprema

Kultura

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

Gojišče

Za namnoževanje *S. cerevisiae* uporabimo gojišče YPD (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Sestava gojišča YPD

Sestavina	Masa (g)
Glukoza	20
Pepton	20
Kvasni ekstrakt	10
Destilirana voda	do 1000 mL

Aparature in oprema

- Oprema za pripravo gojišča in inokuluma: analitska tehnica, brezprašna komora, stresalnik, pH meter
- Bioreaktorski sistem Chemap za izvedbo bioprocesa (Slika 1.5)
 - laboratorijski bioreaktor volumna 3 L ($V_D = 2,5 \text{ L}$) z opremo:
 - pH in pO_2 elektroda
 - senzor za spremljanje temperature
 - turbinsko mešalo ($0\text{--}600 \text{ vrt.}\cdot\text{min}^{-1}$)
 - dovod komprimiranega zraka
 - filter za zrak
 - hladilnik in filter 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, tehnica, sušilnik, pH meter, eksikator, FIA sistem

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:

- $T = 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$
- pretok zraka = $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$
- hitrost mešanja = 300 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 kvasne kulture

Predhodno v bioreaktor z gojiščem YPD inokuliramo kulturo kvasovke *S. cerevisiae*. Spremljamo potek vrednosti pH in pO_2 ter optično gostoto (absorbanco). Vrednosti si zabeležimo vsakih 5 minut. Na približno 20 minut vzorčimo okoli 20 mL bioprocesne brozge (pazimo na mrtvi volumen pri odvzemanju) za določitev koncentracije glukoze (podrobneje v vaji »Priprava in validacija encimskega biosenzorja«), suhe ter mokre biomase. Odvzetemu vzorcu izmerimo vrednost pH. Proces razmnoževanja traja, zaradi visoke koncentracije vcepka, le nekaj ur.

Priprava vzorcev za določanje koncentracije glukoze

Vzorec iz bioreaktorja pretočimo v centrifugirko in ga centrifugiramo 5 min pri $4000 \text{ vrt.}\cdot\text{min}^{-1}$. Supernatant odlijemo, ga prefiltriramo skozi filter $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ in po potrebi 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 μL ali 100 μL). Rezultate zabeležimo.

Določanje koncentracije mokre in suhe biomase

10 mL bioprocesne 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. Preverimo motnost vzorca in po potrebi ponovno centrifugiramo. Če imamo dovolj vzorca, delamo v dveh paralelkah. Sediment (mokra biomasa) v centrifugirkah stehtamo. Razlika v masi stehtane centrifugirke in njeni začetni masi (prazna centrifugirka) predstavlja maso mokre biomase. Rezultat izrazimo kot g mokre biomase $\cdot \text{L}^{-1}$ bioprocesne brozge (upoštevamo centrifugirani volumen brozge). Nato mokro biomaso sušimo 2 uri pri $T = 105^\circ \text{C}$, nakar jih prenesemo v eksikator, da se ohladijo. Centrifugirke ponovno stehtamo in odštejemo maso prazne centrifugirke. Razlika v masi predstavlja suho biomaso (upoštevamo centrifugirani volumen brozge), ki jo izrazimo kot g suhe biomase $\cdot \text{L}^{-1}$ bioprocesne brozge.

5.5 Meritve, izračuni in rezultati

- Narišemo umeritveno krivuljo za glukozo. V obeh primerih upoštevamo, da gre premica skozi izhodišče.
- Grafično prikažemo meritve »on-line« pH vrednosti, »off-line« pH vrednosti in »on-line« pO_2 vrednosti in komentiramo trende.
- Na ločen graf narišemo vrednosti meritev optične gostote, suhe in mokre biomase in komentiramo trende – po potrebi uporabimo dve različni Y osi.
- Grafično določimo maksimalno specifično hitrost rasti (μ_{max}) iz najbolj natančnih podatkov biomase.
- Izračunamo izkoristek (Y_{XS}) za celoten bioproces.

6 DOLOČANJE VEZNE KAPACITETE KROMATOGRFSKEGA NOSILCA Z LIZOCIMOM

Aleš Podgornik

6.1 Teoretične osnove

Visokotlačna tekočinska kromatografija (HPLC) je izjemno pomembna analitska tehnika, ki pa, zaradi svoje fleksibilnosti pri pripravi kromatografskih kolon, omogoča tudi izolacijo znatnih količin ciljne molekule. V tem primeru govorimo o preparativni kromatografiji. Še posebej se uporablja, ko je pri izolaciji ciljne molekule zahtevana visoka stopnja čistosti.

Kot smo se naučili že med vajo »Ločevanje proteinov z visokotlačno tekočinsko kromatografijo«, lahko za izolacijo molekul uporabimo različne interakcije, ki omogočijo ločevanje po različnih molekulskih lastnostih. Na osnovi tega tudi ločimo različne vrste kromatografije, med katerimi so glavne:

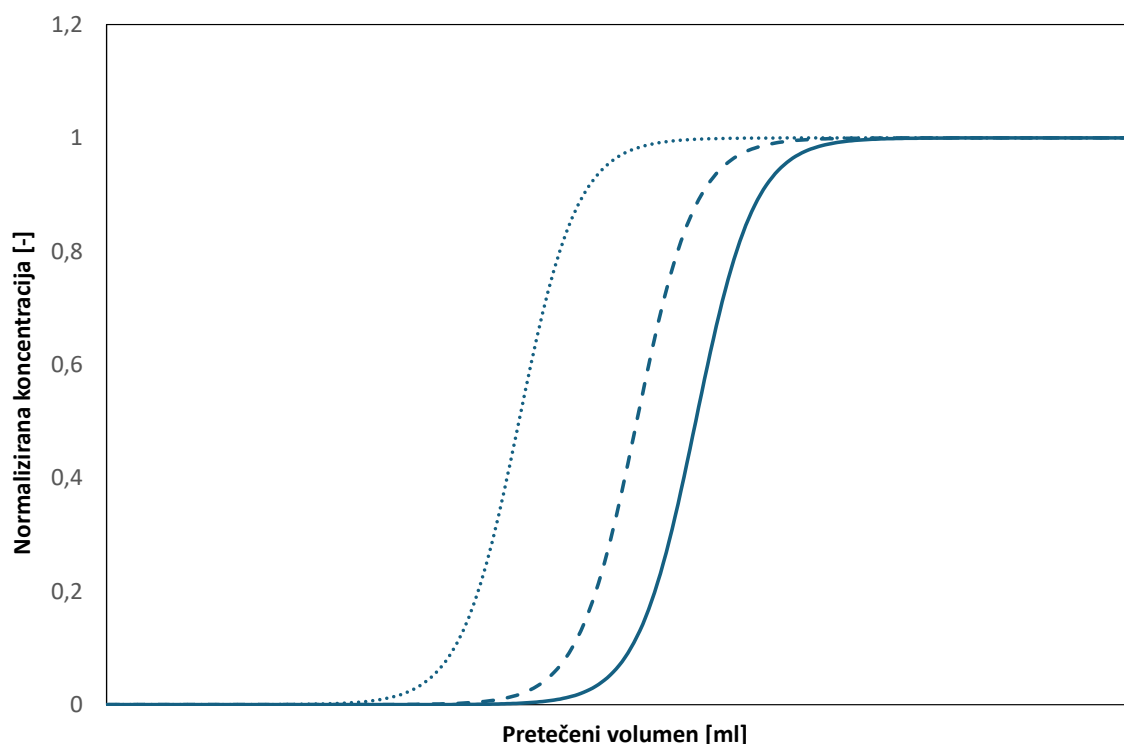
- ionsko-izmenjevalna kromatografija
- kromatografija na osnovi hidrofobnih interakcij
- kromatografija na reverzni fazi
- afinitetna kromatografija
- gelska filtracija.

Če smo pri manjših molekulah prosti pri izbiri narave interakcij, pa smo pri bioloških makromolekulah pogosto omejeni z izbiro mobilnih faz in s tem tudi naravo interakcij, saj lahko v makromolekuli neprijaznem okolju (ekstremne pH vrednosti, zelo visoka koncentracija soli, prisotnost organskih topil) pride do spremembe konformacije makromolekule, agregacije ali celo obarjanja, kar vodi do spremembe biološke aktivnosti in s tem neustreznosti take makromolekule za nadaljnjo uporabo. To še posebej velja za preparativno kromatografijo, kjer dosegamo višje koncentracije ciljne molekule, kar dodatno pospeši agregacijo ter spremeni biološko aktivnost in posledično tudi uporabnost izolirane makromolekule. Zaradi tega se pri izolaciji makromolekul najpogosteje poslužujemo ionsko-izmenjevalne kromatografije, saj pri teh interakcijah uporabljamo pufre zmerne pH vrednosti in relativno nizke ionske moči, kar je primerljivo naravnemu okolju mnogih makromolekul.

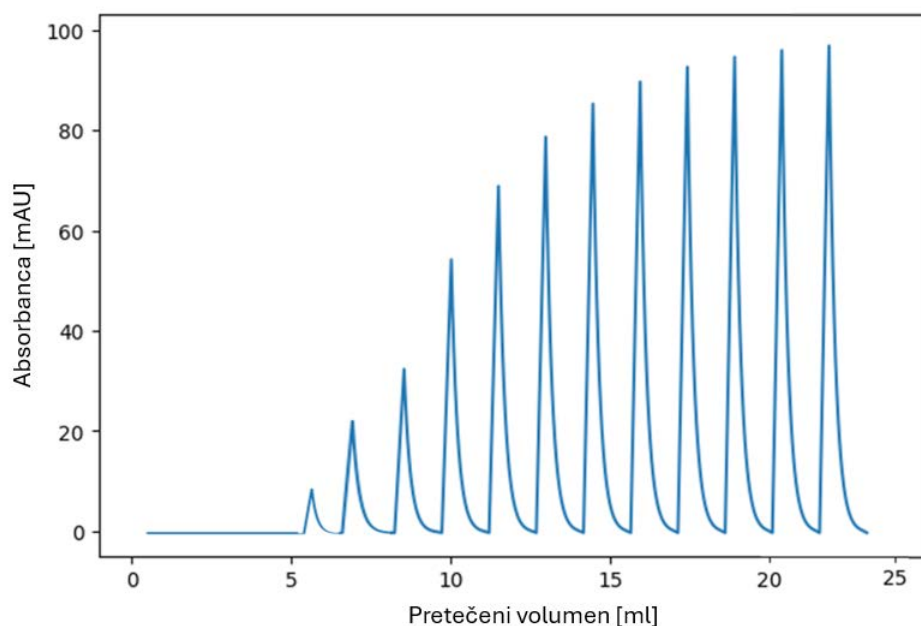
Za razliko od uporabe kromatografije v analitske namene, kjer želimo izvesti analizo na čim manjšem vzorcu, naložimo v primeru izolacije na kromatografsko kolono čim večjo količino vzorca pri enkratnem nalaganju, saj le-to omogoča pridobitev velikih količin ciljne molekule z visoko koncentracijo in posledično visoko učinkovitost procesa izolacije. Količina, ki jo lahko naložimo na kromatografsko kolono, ni enolično določena, pač pa je pogojena z več dejavniki, kot so npr. narava stacionarne faze v kromatografski koloni, narava interakcij, sestava mobilnih faz, koncentracija makromolekule v vzorcu pa tudi koncentracija in narava nečistoč v realnem vzorcu.

Prav zaradi tega je potrebno količino vzorca, ki ga lahko naložimo v konkretnem primeru, eksperimentalno določiti.

To naredimo tako, da vzorec nalagamo na kolono dokler se kromatografska kolona ne nasiči, kar pomeni, da so vsa vezna mesta zasedena in se zato ciljna molekula nanjo več ne more vezati pač pa nemoteno prepotuje kolono. Preliminarne eksperimente navadno izvedemo s čisto makromolekulo, ki jo želimo izolirati iz kompleksnega vzorca. V tem primeru lahko določamo njeno koncentracijo na izhodu iz kromatografske kolone spektrofotometrično, kadar gre za proteine, pri valovni dolžini 280 nm. Na začetku nalaganja se vse molekule proteina vežejo na kromatografsko kolono in je koncentracija na izhodu nič, po določenem času, ko so vsa vezna mesta zasedena, pa koncentracija proteina na izhodu kromatografske kolone naraste na vrednost v nalagalnem vzorcu. Graf, ki ga pri tem dobimo (Slika 6.1), imenujemo prebojna krivulja. Kadar vzorca ne nalagamo kontinuirno, ampak ga zaporedno injiciramo preko injekcijske zanke, pa dobimo značilno krivuljo prikazano na Sliki 6.2.



Slika 6.1. Spremljanje koncentracije pri kontinuirnem nalaganju vzorca ciljne makromolekule. Zaradi oblike, iz katere razberemo, kdaj je kromatografska kolona nasičena, jo imenujemo prebojna krivulja. Na osnovi takega grafa lahko določimo kapaciteto kromatografske kolone – količino makromolekule, ki jo je sposobna vezati pod različnimi pogoji. Polna prebojna krivulja predstavlja najvišjo vezno kapaciteto kolone, črtkani pa nižjo, kar je navadno posledica sestave vzorca, ki lahko vsebuje molekule, katere tekmujejo za vezna mesta na kromatografskem nosilcu.



Slika 6.2. Spremljanje absorbance pri zaporednem injiciranju vzorca ciljne makromolekule. Namesto značilne oblike prebojne krivulje, dobimo zaporedne vrhove, ki predstavljajo del injiciranih molekul, ki se niso vezale na kromatografsko kolono.

6.2 Naloga

Priprava raztopine lizocima v pufru. Določitev kapacitete kromatografske kolone na lizocim raztopljen v raztopinah z dvema različnima koncentracijama soli.

6.3 Potreben material in oprema

Proteinski vzorci

- testni proteini: lizocim

Mobilne faze

- 20 mM Tris-HCl $pH = 8,0$
- 20 mM Tris-HCl $pH = 8,0 + 0,1 \text{ M NaCl}$
- 20 mM Tris-HCl $pH = 8,0 + 2 \text{ M NaCl}$

Kromatografske kolone

- disk SO_3 monolitna kolona

Aparature in oprema

- tekočinski kromatograf (HPLC)
- tehnica
- pH meter

- centrifuga
- 50 mL vial
- 2 mL Eppendorf vial
- filtri

6.4 Potek vaje

Razdelimo se v dve skupini. Ena skupina pripravlja pufre in raztopini lizocima. Medtem druga skupina določa kapaciteto kromatografske kolone na lizocim v različnih mobilnih fazah na HPLC sistemu. Skupini se nato zamenjata.

Priprava pufrov in vzorcev

Razdelimo se na dve skupini, vsaka skupina pripravi ustrezno zatehto soli ter izvede umerjanje pH vrednosti. Pripravimo 500 mL Tris-HCl pufra z nizko ionsko močjo (20 mM Tris-HCl $pH = 8,0$), 500 mL Tris-HCl pufra s srednjo ionsko močjo (20 mM Tris-HCl $pH = 8,0 + 0,1$ M NaCl) in 300 mL Tris-HCl pufra z visoko visoko ionsko močjo (20 mM Tris-HCl $pH = 8,0 + 2$ M NaCl).

Zatehtamo dvakrat po 30 mg proteina lizocima in ga 30 mg raztopimo v 60 mL Tris-HCl pufra z nizko ionsko močjo (20 mM Tris-HCl $pH = 8,0$) in 30 mg v 60 mL pufra s srednjo ionsko močjo (20 mM Tris-HCl $pH = 8,0 + 0,1$ M NaCl). Oboje stresamo, dokler se ves lizocim ne raztopi, raztopini nato filtriramo skozi filter 0,22 μm .

HPLC sistem

Pred pričetkom eksperimentalnega dela pregledamo, ali je HPLC sistem ustrezno povezan in imamo na sistemu ustrezne mobilne faze. Na HPLC sistem je že vezana CIM disk SO_3 monolitna kolona.

Določanje prebojne krivulje lizocima raztopljenega v dveh različnih mobilnih fazah

Določanje kapacitete izvedemo na HPLC sistemu. Kromatografsko kolono temeljito speremo, najprej s Tris-HCl pufrom visoke ionske moči, nato pa s Tris-HCl pufrom nizke ionske moči. Vzamemo predpripravljeno raztopino lizocima z nizko ionsko močjo in jo preko 1 mL injekcijske zanke nalagamo na kolono z zaporednim injiciranjem. Beležimo število injiciranj. To je še posebej pomembno v začetnih injiciranjih, kjer pričakujemo, da se bo celotna injicirana količina vezala na kromatografsko kolono in zato samo injiciranje ne moremo določiti iz kromatograma. Nalagamo dokler se višina vrhov, ki pridejo iz kromatografske kolone po injiciranju, ne ustali. Zabeležimo višine in površine vseh vrhov (za vsa injiciranja).

Nato začnemo skozi kromatografsko kolono črpati Tris-HCl pufer visoke ionske moči. Takoj ko začne absorbanca na izhodu naraščati (začetek spiranja lizocima iz kolone), lovimo iztok v 50 mL vialo dokler absorbanca spet ne pade na začetno vrednost in zabeležimo volumen zbrane raztopine v viali. Pufer črpamo skozi kolono še nekaj časa, da se le-ta temeljito spere, nato preklopimo na Tris-HCl pufer z nizko ionsko močjo in spiramo dokler se absorbanca ne ustali popolnoma.

Zamenjamo pufer z nizko ionsko močjo s pufrom, ki vsebuje 0,1 M NaCl. Celoten eksperiment ponovimo z z lizocimom raztopljenim v pufru s srednjo ionsko močjo (20 mM Tris-HCl $pH = 8,0 + 0,1$ M NaCl), spran lizocim pa lovimo v svojo 50 ml vialo in prav tako zabeležimo volumen. Taka raztopina je bolj podobna raztopinam, v katerih se nahajajo druge makromolekule in gojišča.

Analiza koncentracije lizocima v spranih vzorcih – določanje vezane količine lizocima

Za analizo obeh vzorcev, spranih iz kromatografske kolone (morda je zaradi visoke koncentracije potrebno redčenje s pufrom visoke ionske moči), uporabimo metodo, ki smo jo pri vaji »Ločevanje proteinov z visokotlačno tekočinsko kromatografijo« uporabili za določanje umeritvene krivulje, le injekcijska zanka ostane 1 ml. Pri tej analizi smo namreč uporabljali le pufer z visoko ionsko močjo, kar je potrebno tudi v tem primeru, saj se sprane frakcije nahajajo v pufru z visoko koncentracijo soli. Če višina vrha injiciranega vzorca višja od 1500 mAU moramo vzorec dodatno redčiti s pufrom visoke ionske moči in injiciranje ponovimo z redčenim vzorcem. Višino in površino vrha si zabeležimo.

6.5 Meritve, izračuni in rezultati

Izris prebojne krivulje lizocima v različnih koncentracijah pufra

Izrišemo prebojni krivulji za vzorec lizocima v odvisnosti od pretečenega volumna, tako da na Y os rišemo višino vrhov absorbance po zaporednem injiciranju vzorca (poglavje Določanje prebojne krivulje lizocima raztopljenega v dveh različnih mobilnih fazah). Narišemo obe prebojni krivulji na isti graf. Nato na enak način narišemo tudi graf, na katerega nanašamo površine vrhov v odvisnosti od pretečenega volumna. Rezultate primerjamo in komentiramo.

Določitev kapacitete kromatografske kolone

Kapaciteto kromatografske kolone za raztopino lizocima določimo na dva načina: iz prebojne krivulje in iz količine spranega lizocima iz kolone. Za določitev količine lizocima iz prebojne krivulje upoštevamo volumen preboja, ki ga odčitamo pri 50 % končne koncentracije (določene iz višine ali površine injiciranih vrhov) in ga pomnožimo s koncentracijo lizocima v nalagalni raztopini. Količino naloženega lizocima, spranega iz kolone, pa določimo iz zmnožka koncentracije spranega vzorca lizocima v viali (upoštevamo morebitne redčitve) in volumna nalovljenega vzorca. Enak postopek uporabimo na obeh vzorcih lizocima in izračunamo izkoristek spiranja, torej razmerje med količino spranega in naloženega lizocima. Primerjamo vrednosti izkoristka in količine vezanega lizocima obeh vzorcev. Prav tako določimo dinamično vezno kapaciteto za oba vzorca. Dinamično vezno kapaciteto izračunamo tako, da količino naloženega oziroma spranega lizocima delimo z volumnom kromatografskega nosilca, ki zanaša 0,3 ml. Kapacitete primerjamo med sabo in komentiramo razlike.

7 RAČUNALNIŠKA 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.

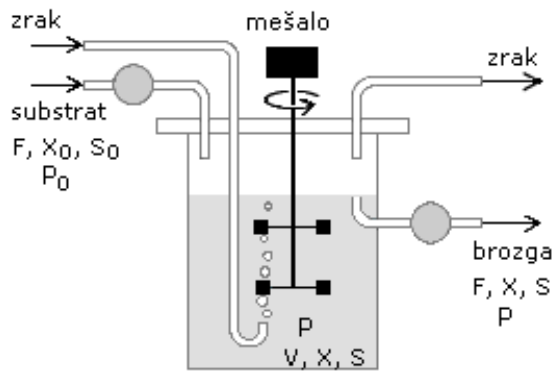
Mešalne kontinuirne bioreaktorje imenujemo CSTR (ang. continuous stirred-tank reactor).

Kontinuirni bioproces začnemo navadno kot šaržni 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** (ang. 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, s čimer 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 mikroorganizmov.
- Tudi v *turbidostatu* vzdržujemo konstanten volumen tekočine, tako da nastavimo enaka pretoka na vstopu in izstopu iz bioreaktorja. Vendar hitrost redčenja (D), in s tem oba pretoka (F_v in F_{iz}), nista konstantna, ampak se prilagajata 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 ($F_v = F_{iz} = F$; $\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$), 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 (Podgornik in sod., 2013)

Ob predpostavki, da je brozga v bioreaktorju popolnoma premešana, lahko zapišemo enačbe masne bilance za katero koli komponento, ki zapušča mejo 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 oziroma: celice se razmnožujejo s takšno hitrostjo, kot jim dovajamo limitni substrat.

Enačbo (7.3) lahko vstavimo v Monodov izraz (vaja 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 označuje tisto koncentracijo limitnega substrata ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), pri kateri je specifična hitrost rasti enaka polovici maksimalne specifične hitrosti rasti ($\mu_{\max}$).

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

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

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 (vaja 5; »Spremljanje šaržnega bioprocesa«), m_S koeficient vzdrževanja oziroma specifična hitrost porabe substrata za vzdrževanje (h^{-1}), q_P 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, če 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 ($m_S = 0$).

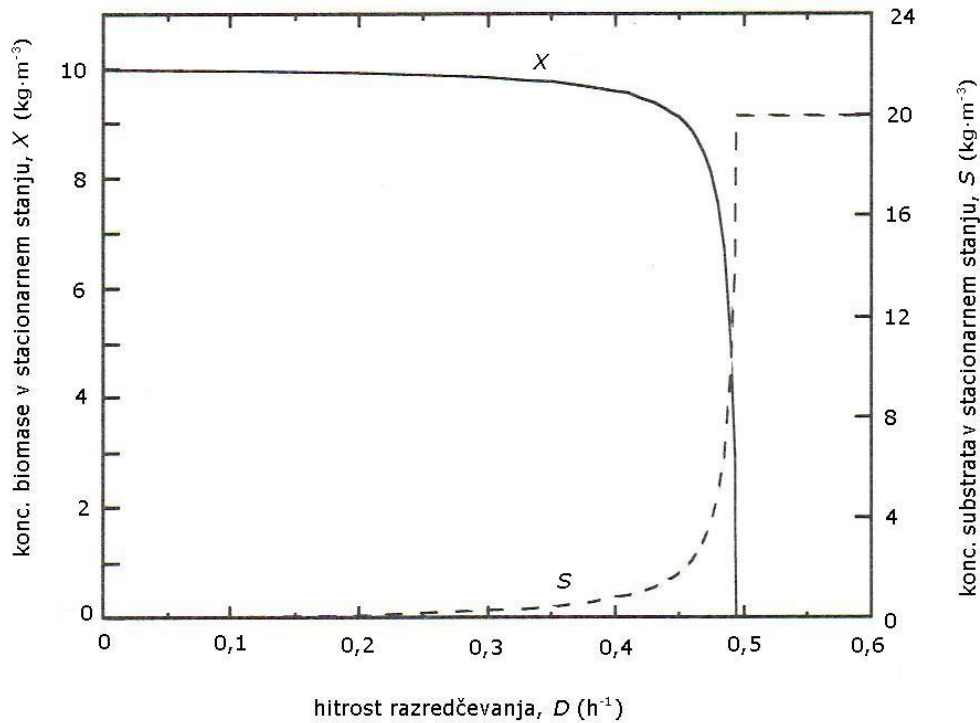
Ob upoštevanju obeh predpostavk dobi enačba (7.7) naslednjo obliko:

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

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

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

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



Slika 7.2. Koncentraciji biomase in substrata v odvisnosti od hitrosti redčenja 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, 2013)

Pri majhnih hitrostih redčenja ($D \rightarrow 0$) 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 $\mu_{\max}$, pa S hitreje narašča. Skladno s tem X pada ($X \rightarrow 0$), ko gre $D \rightarrow \mu_{\max}$. Stanje pri zelo velikih hitrostih redčenja ($D \approx \mu_{\max}$), ko je $X = 0$, imenujemo **izpiranje**. Do izpiranja celic iz bioreaktorja pride, 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** ($D_{kr}; \text{h}^{-1}$). 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 $K_S \ll S_0$, zato sledi, da je $D_{kr} \approx \mu_{\max}$.

Hitrost redčenja, pri kateri obratuje kemostat, mora biti 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, torej $F \cdot X$. **Volumenska produktivnost** oziroma volumenska hitrost proizvodnje biomase (Q_X ; $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) je tako enaka:

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

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

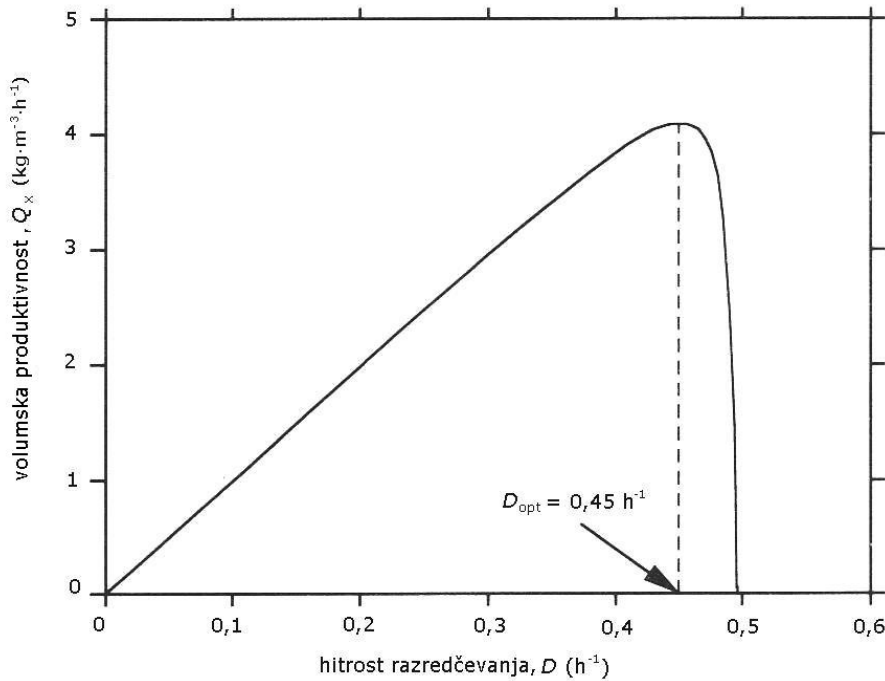
$$Q_X = D \cdot Y_{XS} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_S}{\mu_{\max} - D} \right) \quad (7.12)$$

Povezavo med Q_X in D iz enačbe (7.12) lahko prikažemo 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 iz enačbe (7.12) izpeljemo izraz za D_{opt} :

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

Ker je D_{opt} zelo blizu D_{kr} , kemostat običajno obratuje pri hitrosti redčenja, ki je 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: $\mu_{\max} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0,2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $S_0 = 20 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ (prirejeno po Doran, 2013)

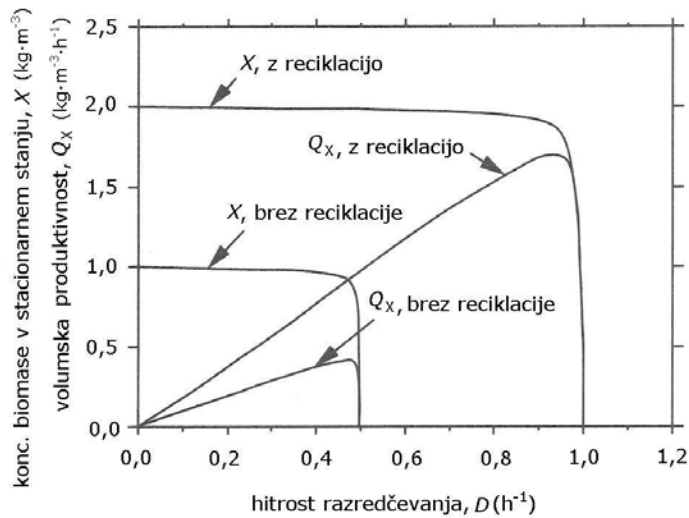
Koncentracijo celic v kemostatu lahko povečamo tudi z recikliranjem biomase iz bioprocesne brozge. Takšen bioreaktorski sistem imenujemo **kemostat z reciklacijo**.

Biomaso lahko recikliramo na več načinov, najpogostejša sta:

- Z usedalnikom ali centrifugo zunaj bioreaktorja skoncentriramo biomaso oziroma ločimo celice od tekočega dela bioprocesne brozge, nato pa del biomase kontinuirano vračamo nazaj v bioreaktor. Takšen sistem imenujemo kemostat s povratnim tokom. Lahko obratuje v ustaljenem stanju in se najpogosteje uporablja za biološko čiščenje odpadnih vod.
- Celice zadržimo v bioreaktorju tako, da iz bioreaktorja izteka brozga z manjšo koncentracijo celic. To dosežemo z uporabo posebnih mehanskih naprav, na primer 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 ($D > \mu_{\max}$), saj je D_{kr} , pri kateri pride do izpiranja, večja kot v običajnem kemostatu.

Tipične razlike med kemostatoma brez reciklacije in z reciklacijo v poteku značilnih parametrov bioprocasa (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: $\mu_{\max} = 0,5 \text{ h}^{-1}$, $K_S = 0,01 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $Y_{XS} = 0,5 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$, $S_0 = 2 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, $\alpha = 0,5$, $\theta = 2,0$ (prirejeno po Doran, 2013)

7.2 Naloga

Simulacija kontinuirnega bioprocesa z uporabo računalniškega programa SIMKE. Od petih vhodnih parametrov ($\mu_{\max}$, K_S , Y_{XS} , S_0 , M oziroma m_S) spreminjamo enega in spremljamo potek značilnih parametrov kontinuirnega bioprocesa (X , S , Q_x). V bioprocesu z reciklacijo spreminjamo reciklacijski faktor 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:

$$\mu_{\max} = 0,1\text{--}1,4 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 0,2\text{--}5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$Y_{XS} = 0,2\text{--}0,8 \text{ kg} \cdot \text{kg}^{-1}$$

$$S_0 = 1\text{--}500 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$$

$$M (m_S) = 0,001\text{--}0,2.$$

Spreminjamo enega od parametrov tako, da izberemo tri različne vrednosti. Drugi pogoji (parametri) ostanejo nespremenjeni.

Kemostat s povratnim tokom

- Izberemo simulacijo kemostata z reciklacijo biomase in možnostjo »trije grafi«.
- Vhodne parametre bioprocasa določimo v naslednjih območjih:

$$\mu_{\max} = 0,1-1,4 \text{ h}^{-1}$$

$$K_S = 0,2-5 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

$$Y_{XS} = 0,2-0,8 \text{ kg}\cdot\text{kg}^{-1}$$

$$S_0 = 1-500 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$$

$$M(m_S) = 0,001-0,2$$

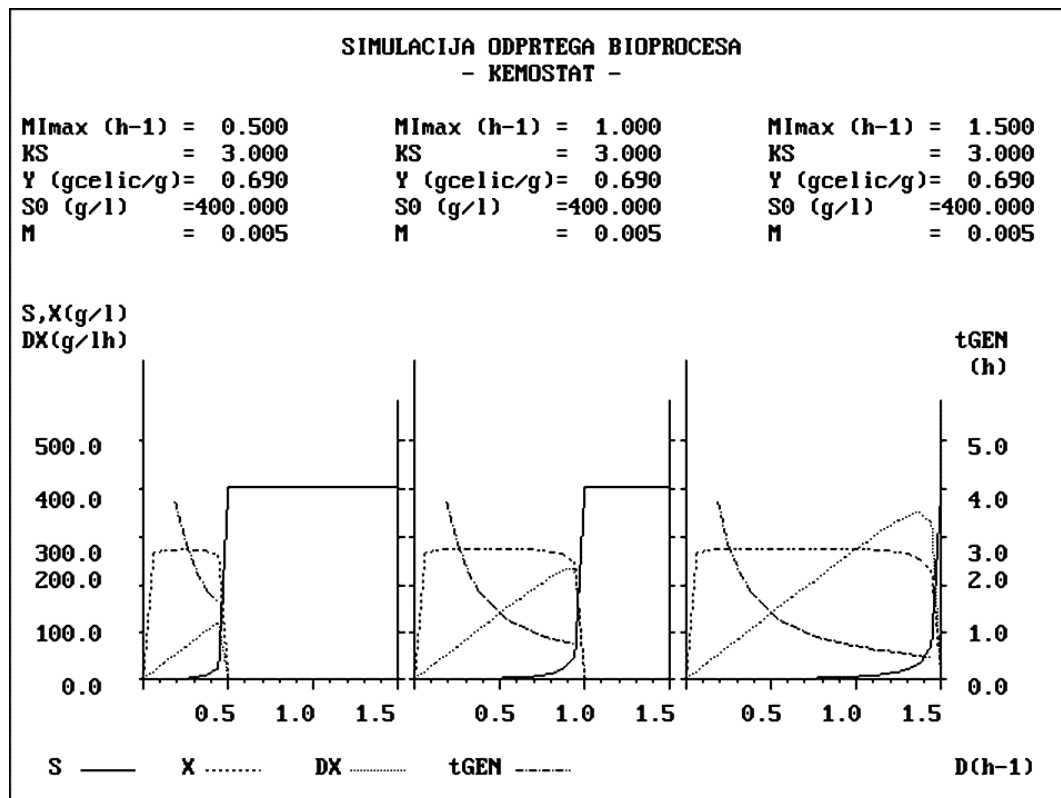
$$r(\alpha) = 0-1.$$

Spreminjamo le reciklacijski faktor r , tako da izberemo tri različne vrednosti.

7.5 Meritve, izračuni in rezultati

Komentar rezultatov računalniške simulacije

Na podlagi primerjave grafičnih izpisov (slika 7.5) opišemo vpliv spreminjanja posameznih vhodnih parametrov na koncentracijo biomase in limitnega substrata v ustaljenem stanju, volumensko produktivnost ter stabilnost sistema (točka izpiranja). Komentiramo, kako in zakaj se potek osnovnih parametrov kemostata spremeni ob spreminjanju posameznih vhodnih parametrov.



Slika 7.5. Prikaz poteka značilnih parametrov kontinuirnega bioprocasa (X , S , Q_X) v odvisnosti od hitrosti redčenja (D) pri različnih $\mu_{\max}$ v računalniškem programu SIMKE

8 RAČUNSKÉ NALOGE

1. Maksimalna specifična hitrost respiracije aerobne 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 kvasno 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 bioprocasa 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% , kvasovke pa med bioprocesom porabijo ves substrat?

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

a) Produktivnost kontinuirnega bioprocasa glede na biomaso je bila $0,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ pri hitrosti redčenja $0,10 \text{ h}^{-1}$. 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 (mg·L ⁻¹)	Površina (mV·min)
0	0
0,5	1
1,0	2
4,0	8

Vzorec, ki smo ga predhodno 4x redčili, je imel površino 2,8 mV·min. Kolikšna je koncentracija ciljnega proteina v originalnem vzorcu?

6. V HPLC injiciramo 200 µl 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 mg·mL⁻¹ ter ponovno injicirali 100 µl. Površina dobljenega vrha je bila 20 enot. Kolikšna je koncentracija albumina v začetnem vzorcu?

9 LITERATURA

Brand on line catalogue, 2008

http://catalog.brand.de/index.php?encrypt=0&ID_O_TREE_GROUP=88&chapter=88&ID_O_PRODUCT=588&begin=0&sLanguage=English&start_infoblock=1 (julij, 2008).

Caron, C. Commercial production of baker's yeast and wine yeast. V: Biotechnology, second edition, vol. 9: Enzymes, Biomass, Food and Feed. Reed, G. (ur.), Nagodawithana, T.W. (ur.). Weinheim, VCH: 322-351.

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

Connecticut Valley Biological Supply Company, 2009

Csiszar P. Post Mixing Optimizations and Solutions, LLC, <https://www.postmixing.com/mixing%20forum/impellers/impellers.htm> (13. 7. 2026)

Doran, P. M. 2013. Bioprocess engineering principles, second edition. London, Academic Press Limited: 919 str.

Nagodawithana, T.W. Products and uses of yeast and yeastlike fungi. V: Handbook of applied mycology, vol. 3: Foods and feeds. Arora, D.K. (ur.), Mukerji, K.G. (ur.), Marth, E.H. (ur.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 553-603.

Paš, M. 2000. Vključevanje Cr(III) in Cr(VI) zvrsti v celično zgradbo kvasovke: doktorska disertacija, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 106.

Paš, M., Piškur, B., Šuštarčič, M., Raspor, P. 2007. Iron enriched yeast biomass - a promising mineral feed supplement. Bioresource Technology, 98, 8: 1622-1628.

Paš, M., Raspor, P. 2010. Praktikum iz osnov biotehnologij: drugi učbenik za študente univerzitetnega študija Živilstvo in prehrana pri vajah predmeta Osnove biotehnologij. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 54 s. http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Praktikum_osnove_biotehnologij.pdf.

Plummer, D.T. 1987. An introduction to practical biochemistry. London, McGraw-Hill Book Company.

Podgornik, A., Paš, M., Raspor, P. 2013. Biotehnološki tehnikum: učbenik za vaje. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 68 s.

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

Raspor, P., Smole-Možina, S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA: 109-115.

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

Žnidaršič, P., Pavko, A. 2002. Praktikum iz biokemijskega inženirstva. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani: 89 str.

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

Waters. Beginner's Guide to Liquid Chromatography, <https://www.waters.com/nextgen/tr/en/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography.html> (17. 8. 2026)

10 POROČILO O OPRAVLJENI VAJI

Poročilo vsebuje naslednje podatke:

Ime in priimek študenta

Skupina

Datum opravljanja vaje

Zgrajeno je iz naslednjih osnovnih poglavij:

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