

BIOLÓGIA és BIOTECHNOLÓGIA

4. rész

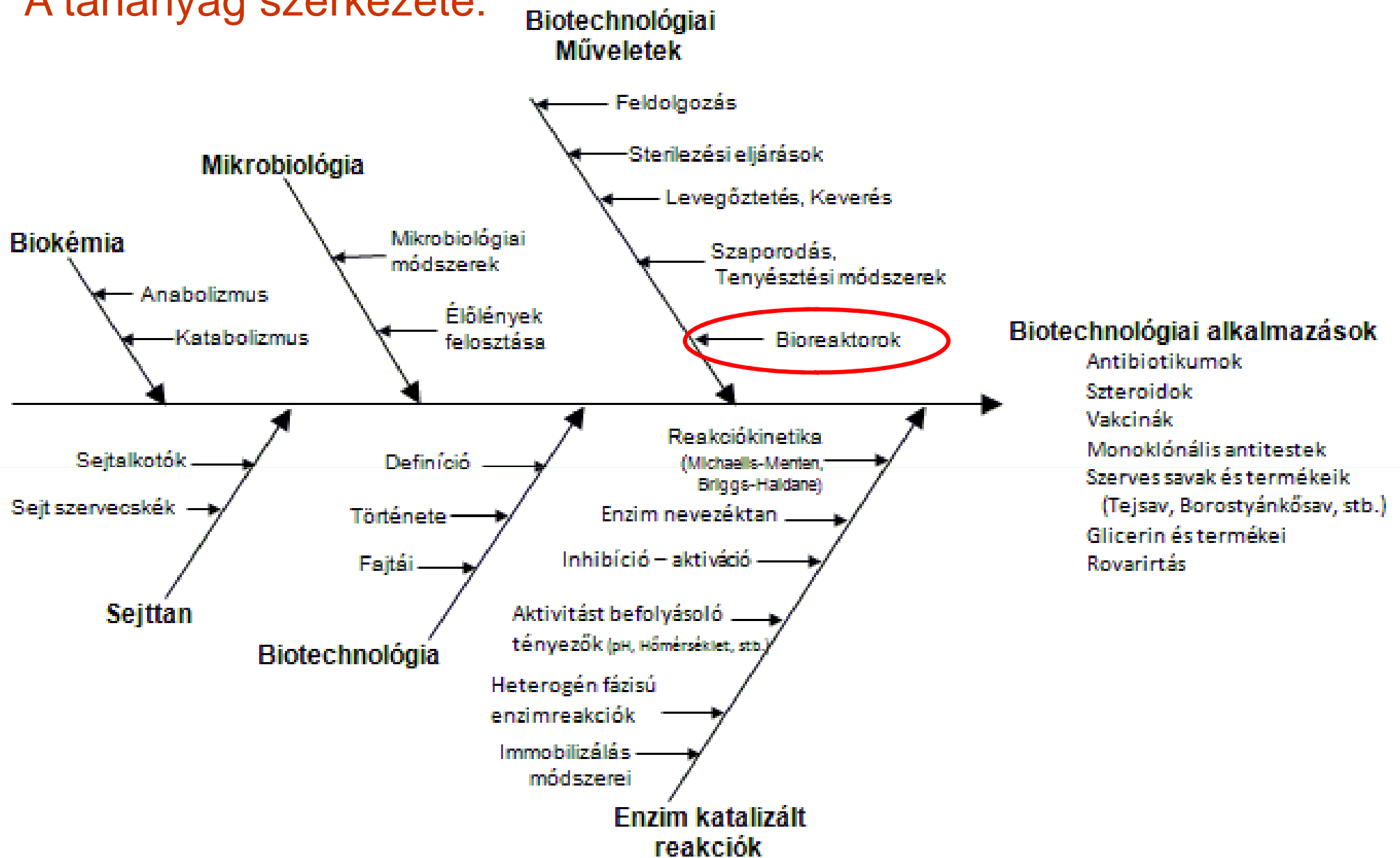
Előadók: Ballagi András, c. egyetemi tanár
Richter Gedeon NyRt. - BME

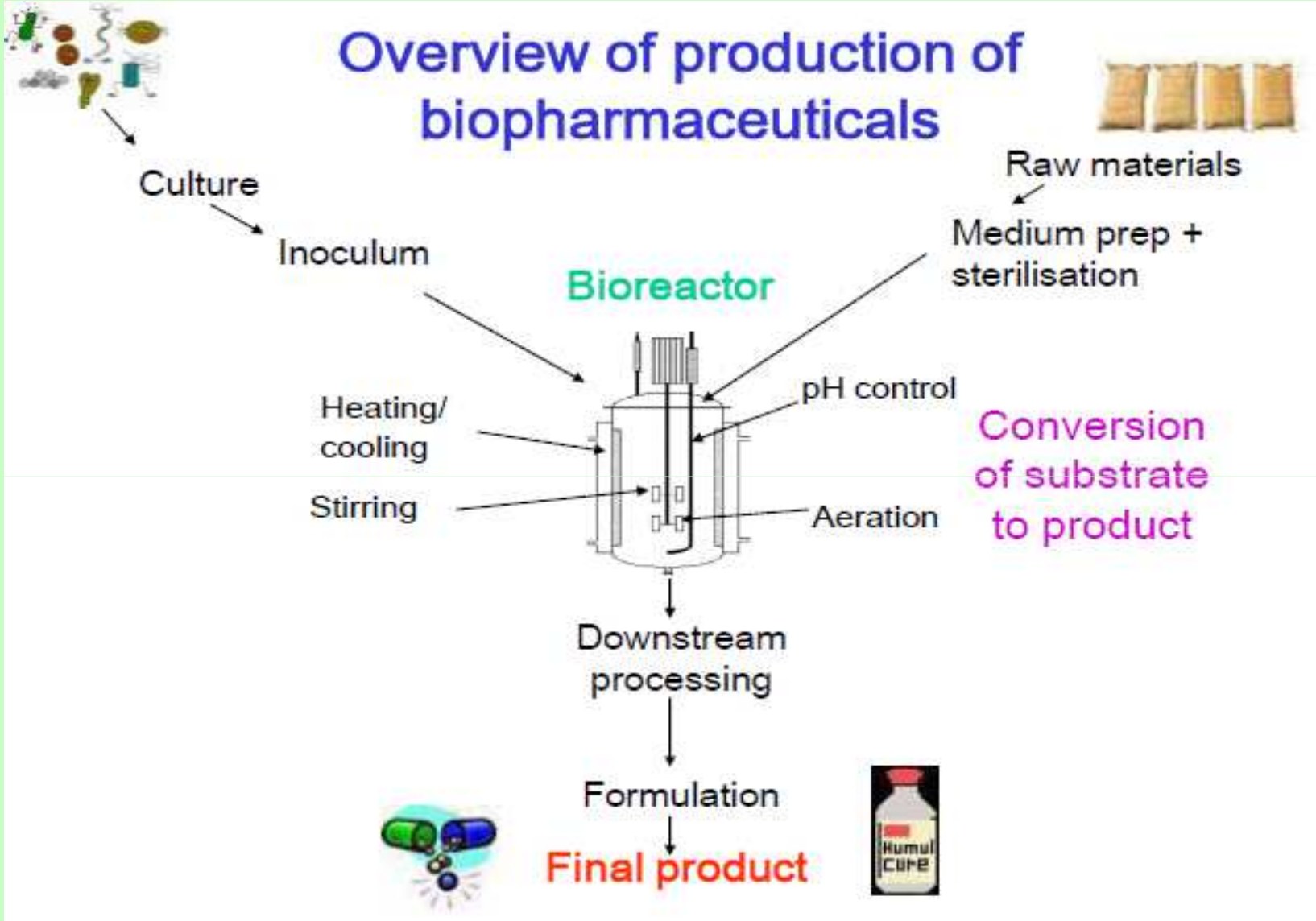
Írásos segédanyag található a:

<http://oktatas.ch.bme.hu>
/oktatas /konyvek /mezgaz
/Biol-biotech-vegyszer-MSc címen



A tananyag szerkezete:





Bioreactor (Fermentor)

- Submerged liquid culture most common method of large scale cultivation of microbes or mammalian cells for biopharm products.
- Vessel similar to chemical reactor – cylindrical stainless steel, (glass for small ones) with controls, ports and facility to sterilize.
- Volume can vary from 1 litre to 500,000 l
- Proportions are important for good aeration and mixing - height : diameter usually 1:1 – 6:1 or more.

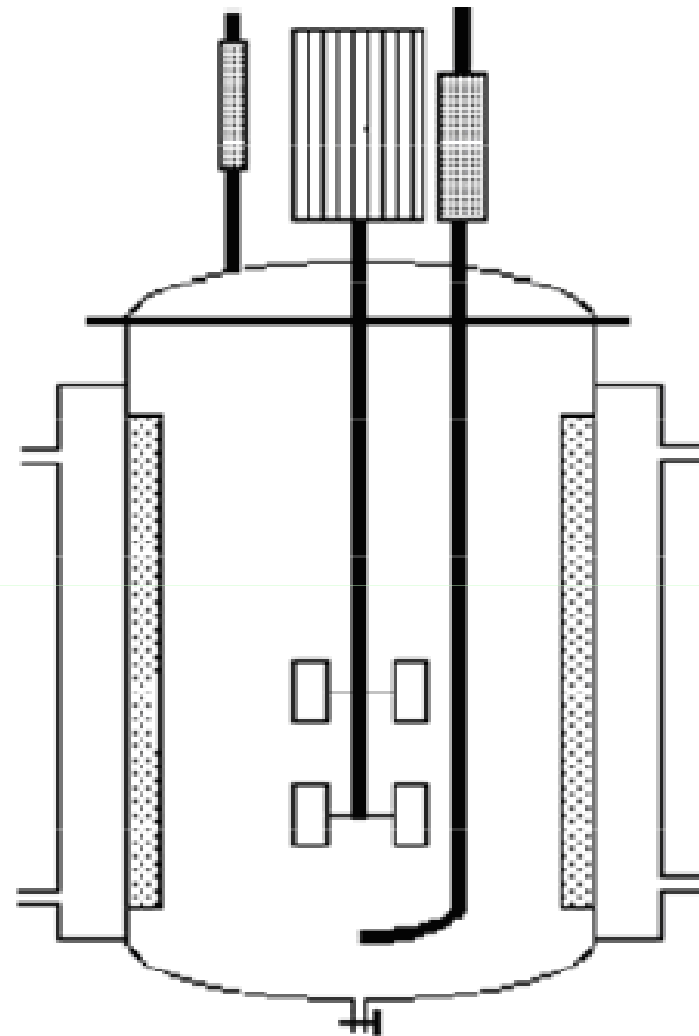


Main features of aerobic bioreactor – (see diagram)

- Vessel – cylindrical with rounded bottom
- Working volume less than actual volume – headspace needed for foaming and “liquid hold-up”.
- Temperature control usually by jacket or coils – heating **and** cooling.
- **Impellers** provide agitation – more than 1 needed for large bioreactors.
- **Baffles** – increase turbulence, give better mixing of air.



- impeller
- baffle
- jacket
- sparger
- air filter
- water in/out
- steam in/out

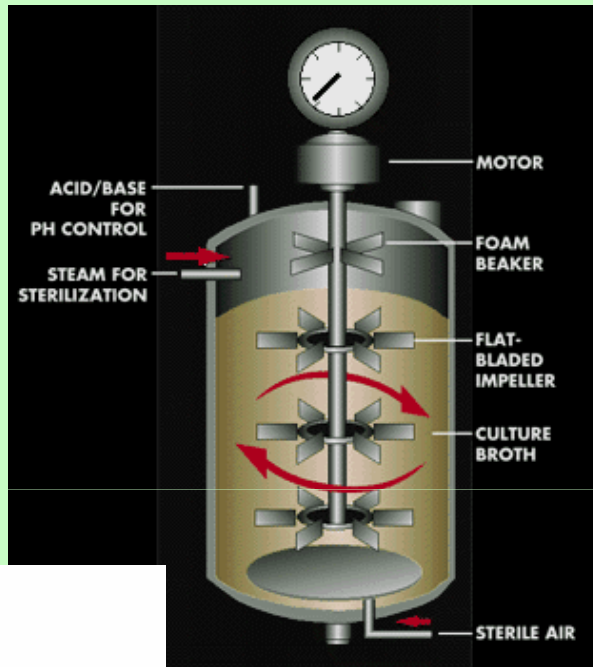


Features of bioreactor cont'd

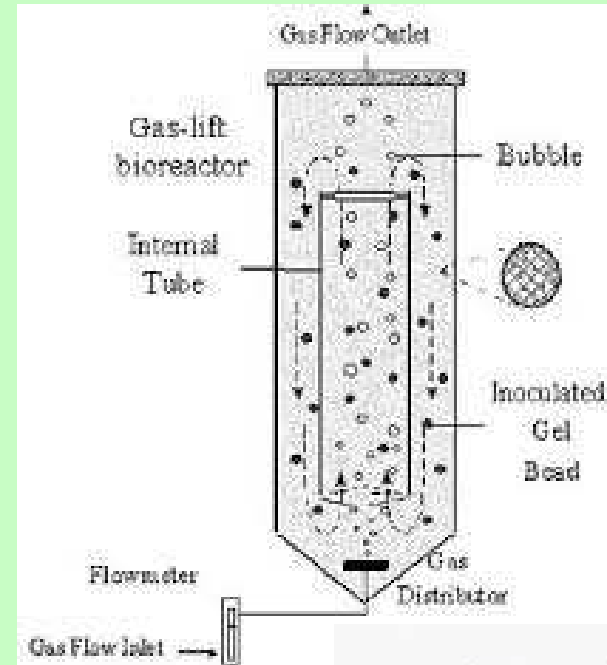
- **Aeration** is provided by air compressor – air volume is controlled by flow meter and filtered to sterilize before entering reactor. Enters at bottom through **sparger** to produce small bubbles.
- **pH** may need to be controlled – electrode linked to controller – acid or base added automatically as required.
- **Foaming** may be a problem with high aeration rates – chemical antifoam can be added automatically – signal from foam sensor.
- **Ports** for sensors, addition of chemicals, sampling, emptying.



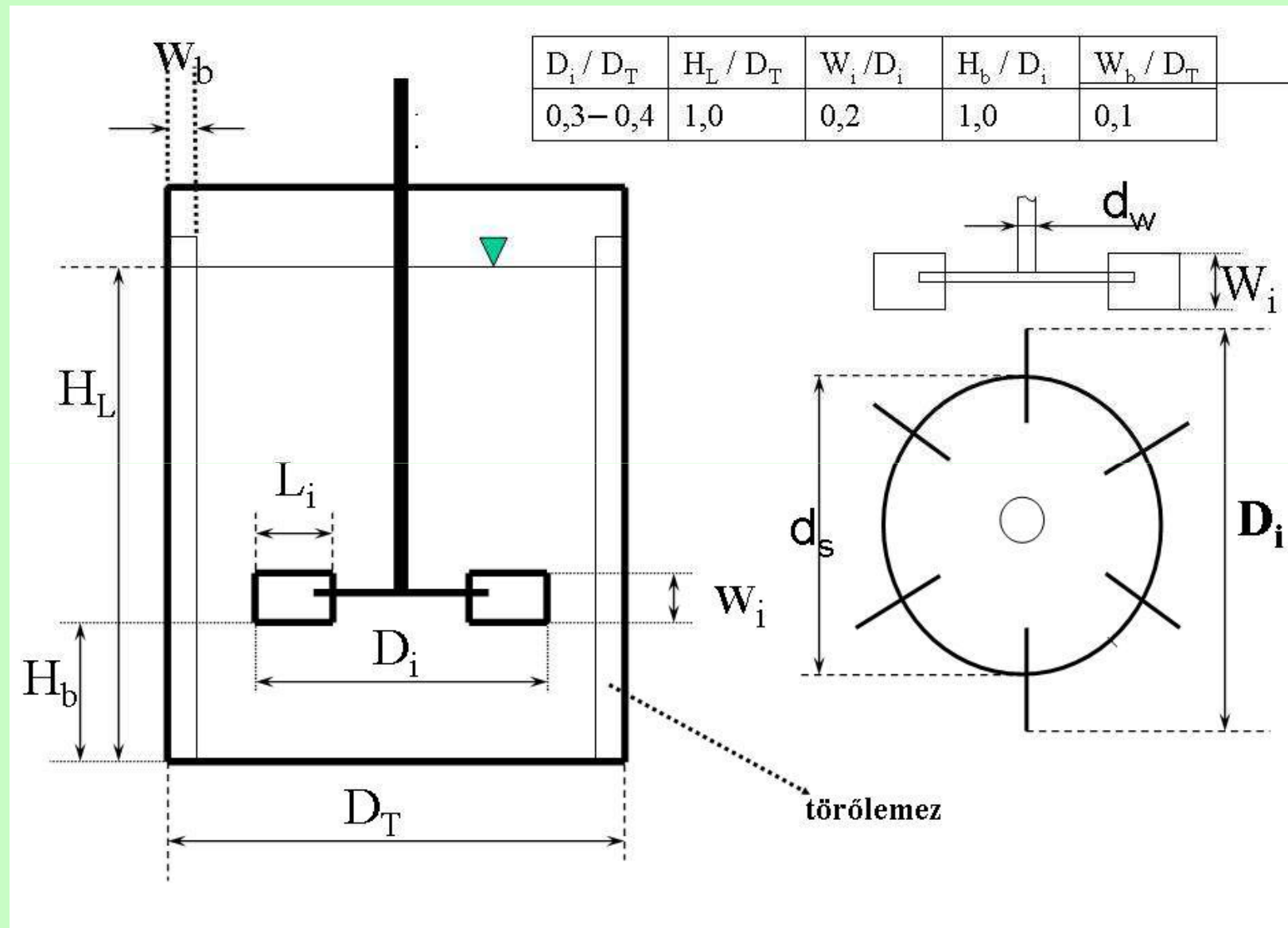
Kevert tankreaktor – Stirred Tank Reactor (STR)



Air Lift Reactor



STR geometriai paramétereit

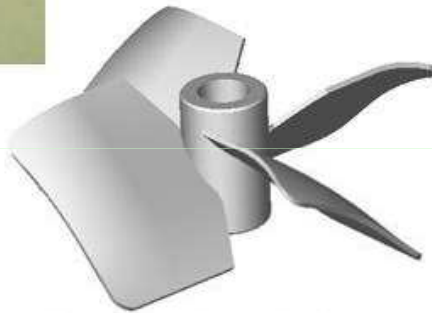
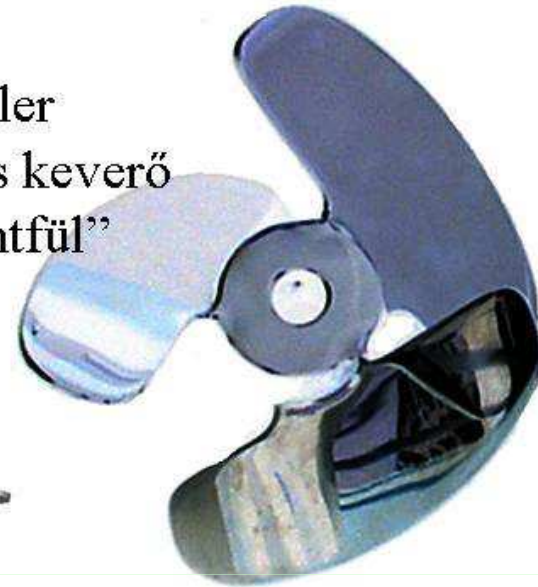


STR keverő típusok



Rushton-turbina

Propeller
axiális keverő
„elefántfül”



Maxflo és Lightning
axiális keverők



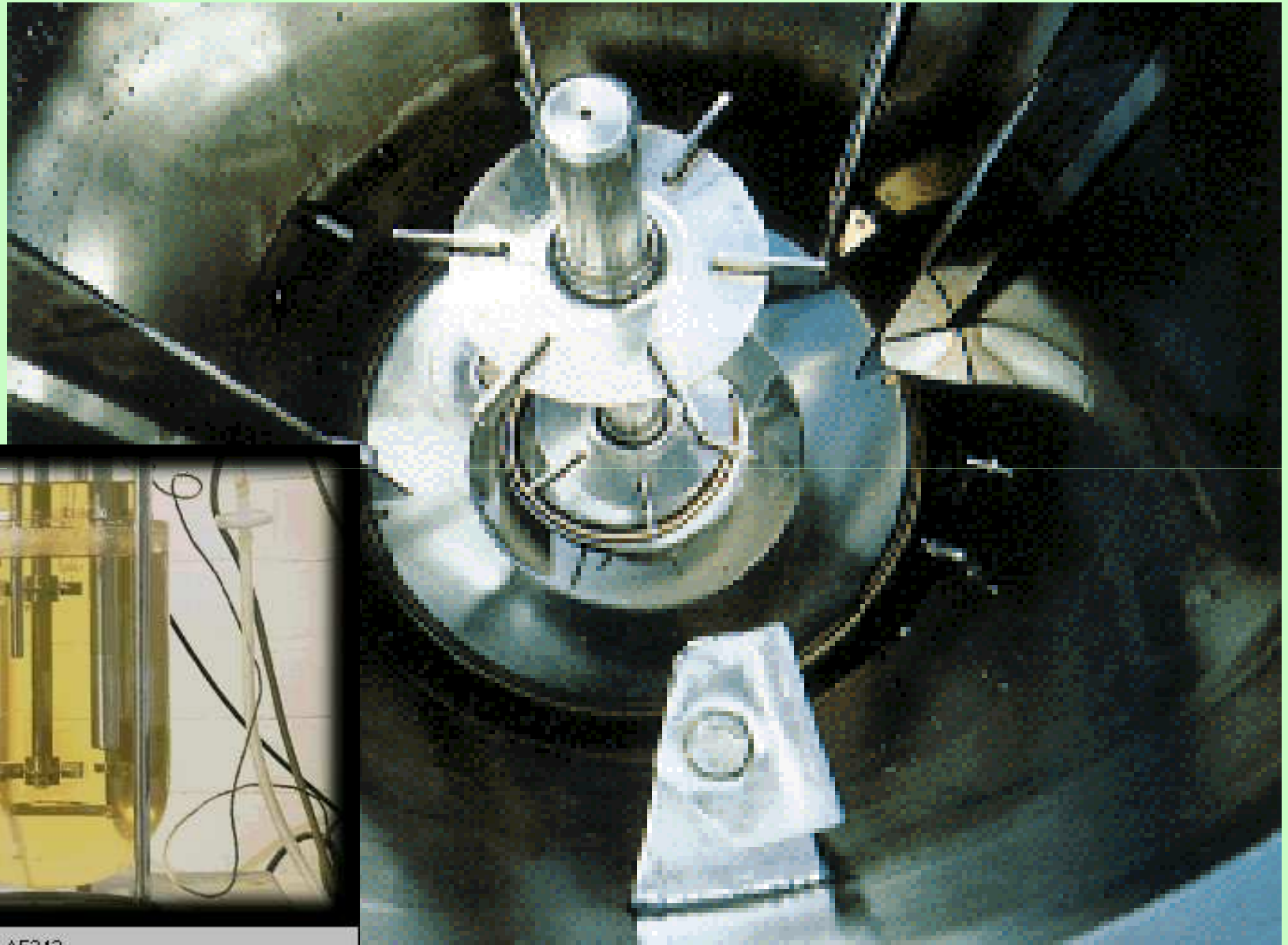
Chemineer CD-6



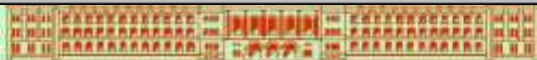
Chemineer BT-6



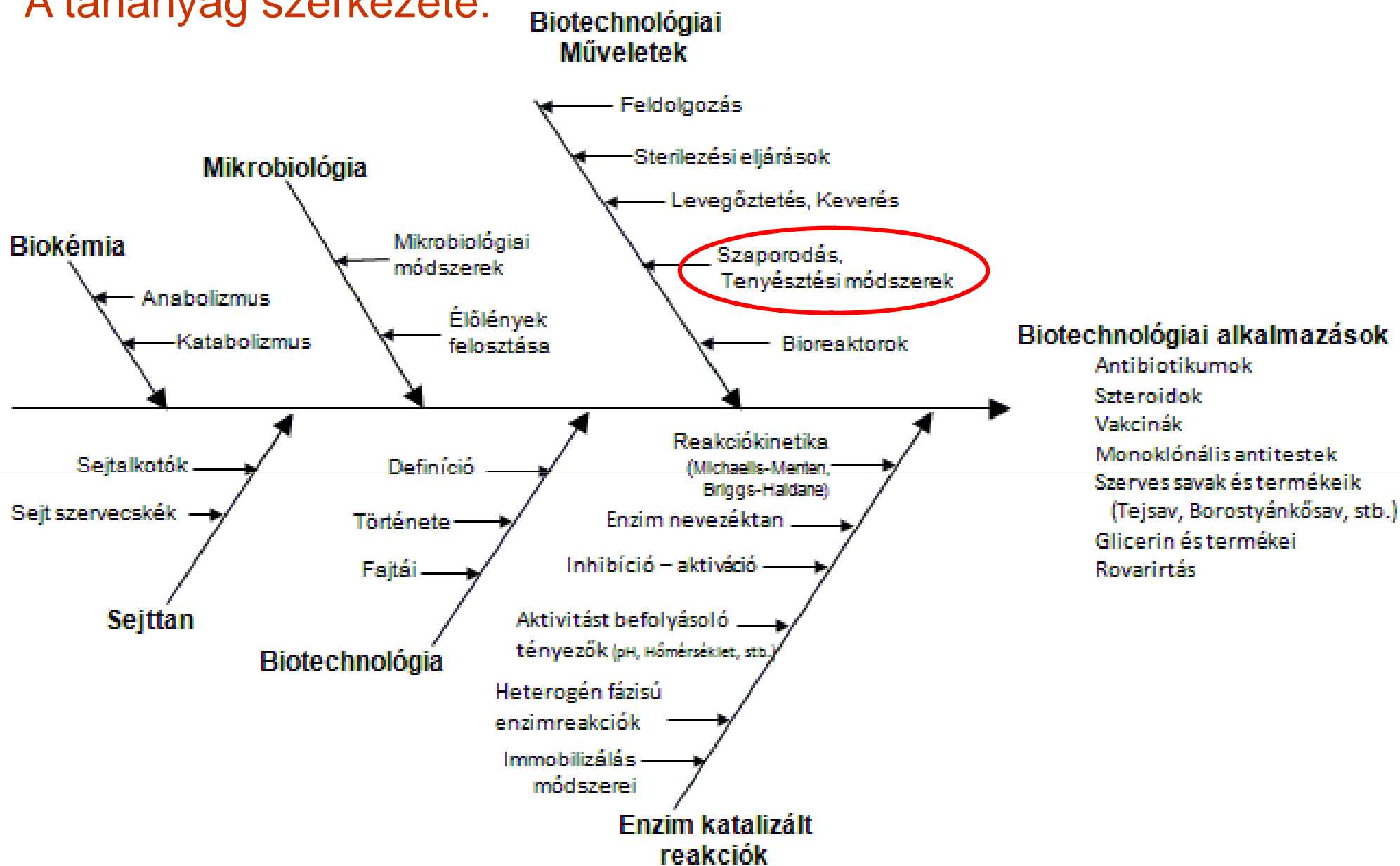
Rushton turbine



A5342

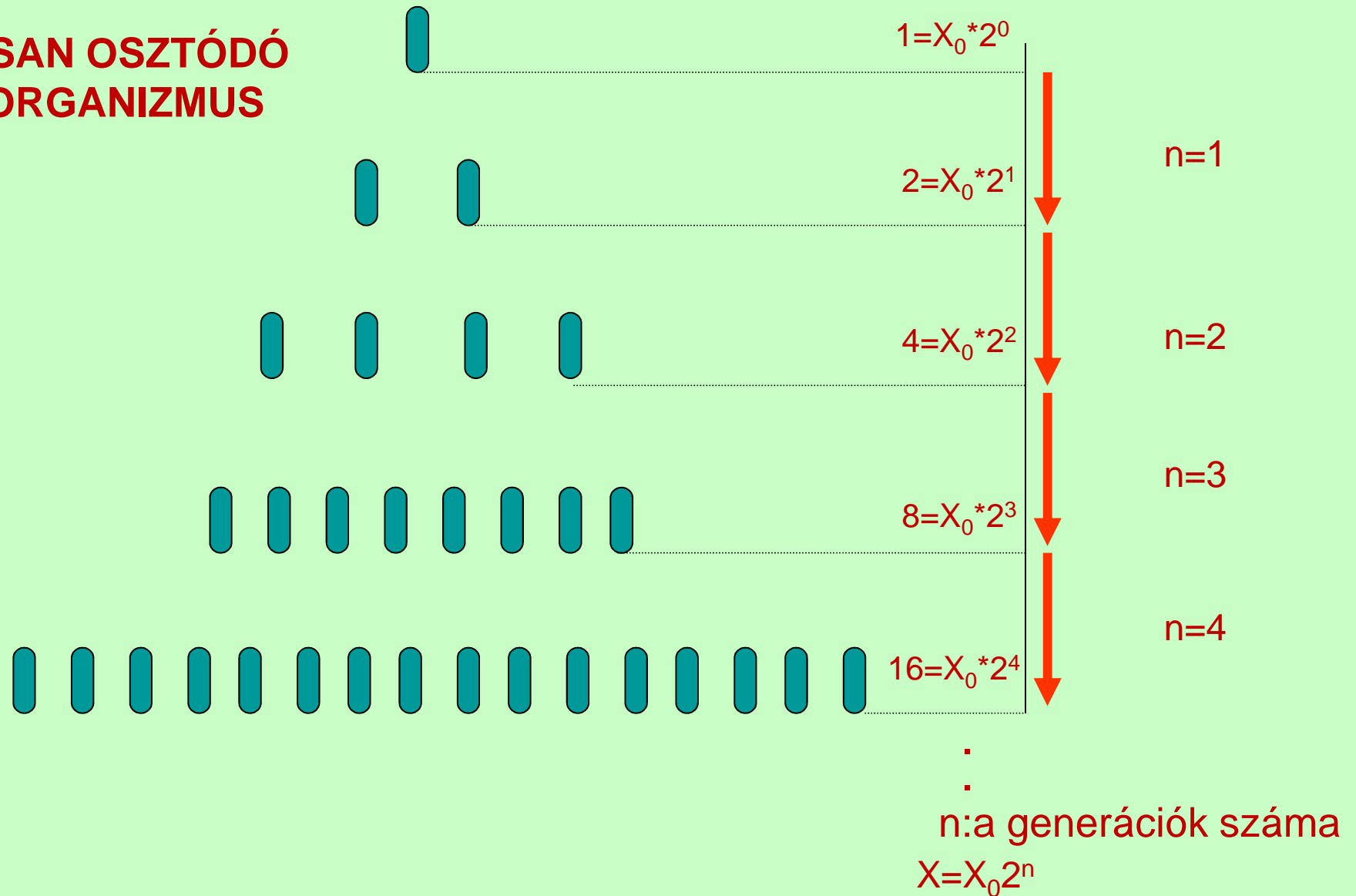


A tananyag szerkezete:



A mikroba szaporodás alapösszefüggései

**BINÁRISAN OSZTÓDÓ
MIKROORGANIZMUS**



A mikroba szaporodás alapösszefüggései

$$n = \frac{t}{t_g}$$

a generációk száma

Generációs idő - doubling time
generation time

$$x = x_0 2^{\frac{t}{t_g}} = x_0 2^n$$

Sejtszám db/ml

N, x

Sejttömeg: sz.a.
mg/ml, g/l, kg/m³

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x$$

μ : fajlagos növekedési sebesség

MONOD, 1942



A mikroba szaporodás alapösszefüggései



$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x$$

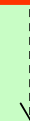


$$x = x_0 e^{\mu t}$$

$$\frac{dN}{dt} = v \cdot N$$



$$N = N_0 e^{vt}$$



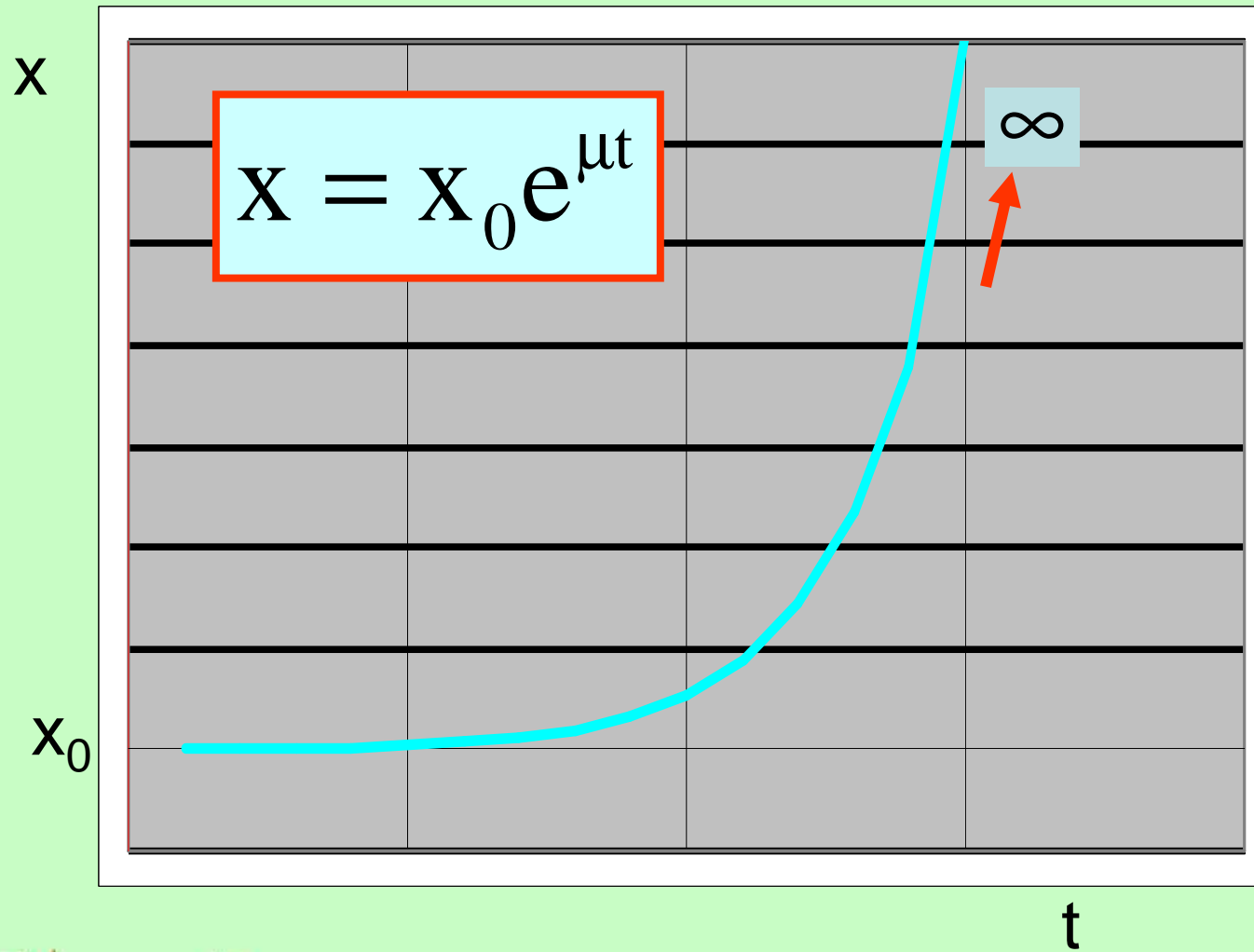
v : fajlagos szaporodási sebesség

μ és a generációs idő kapcsolata:

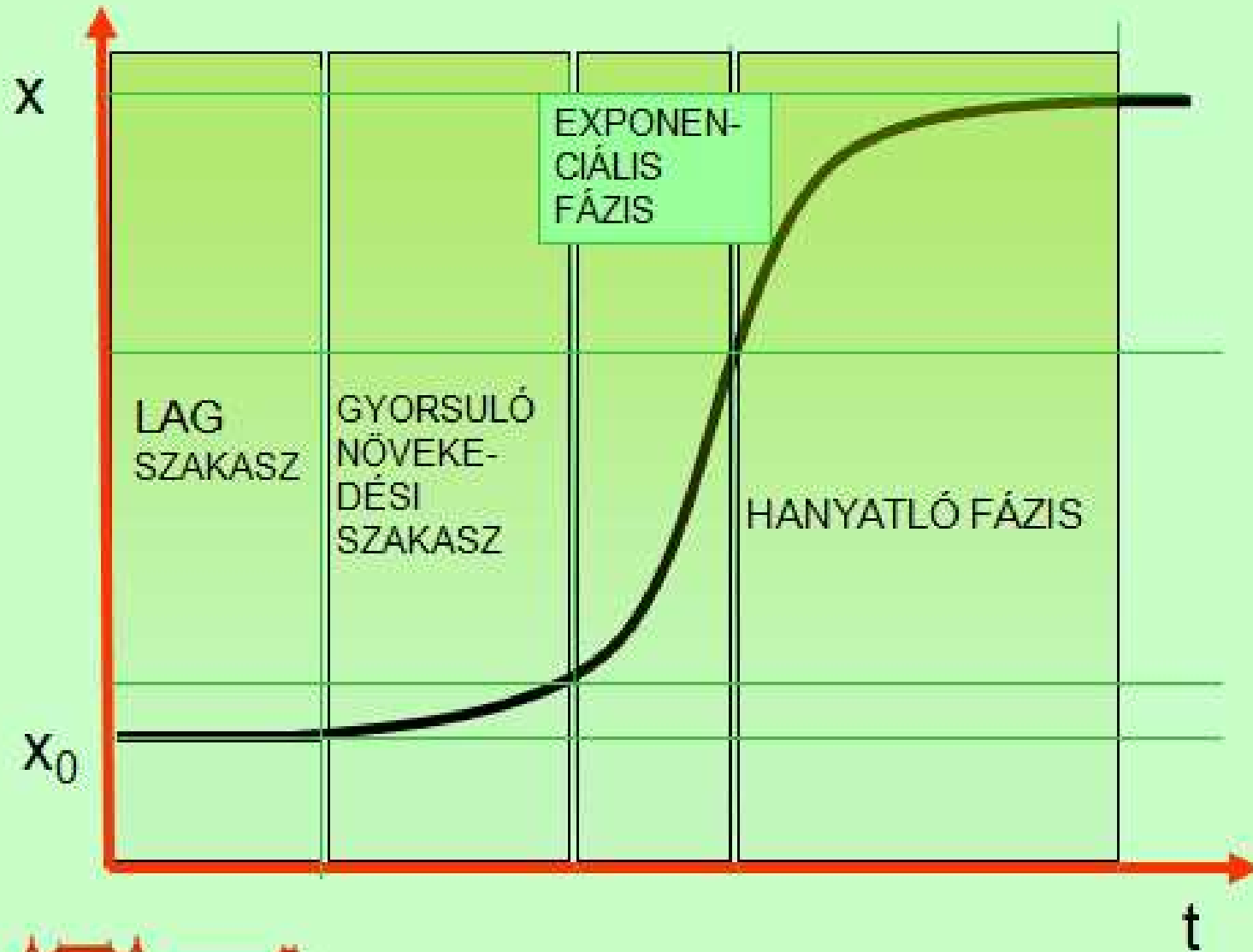
$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu}$$



A mikroba szaporodás alapösszefüggései



A mikroba szaporodás alapösszefüggései



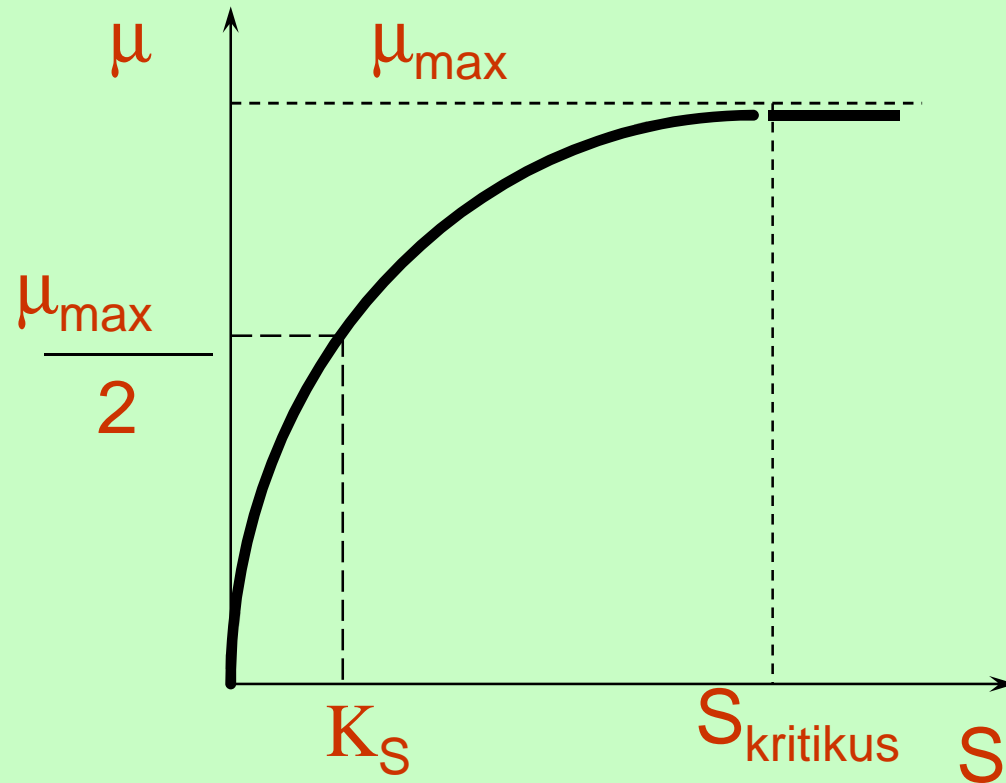
A mikroba szaporodás alapösszefüggései

MI AZ OKA A HANYATLÓ FÁZISNAK?

1. TÁPANYAG LIMITÁCIÓ
2. TOXIKUS METABOLIT TERMÉK(EK)
3. HELYHIÁNY

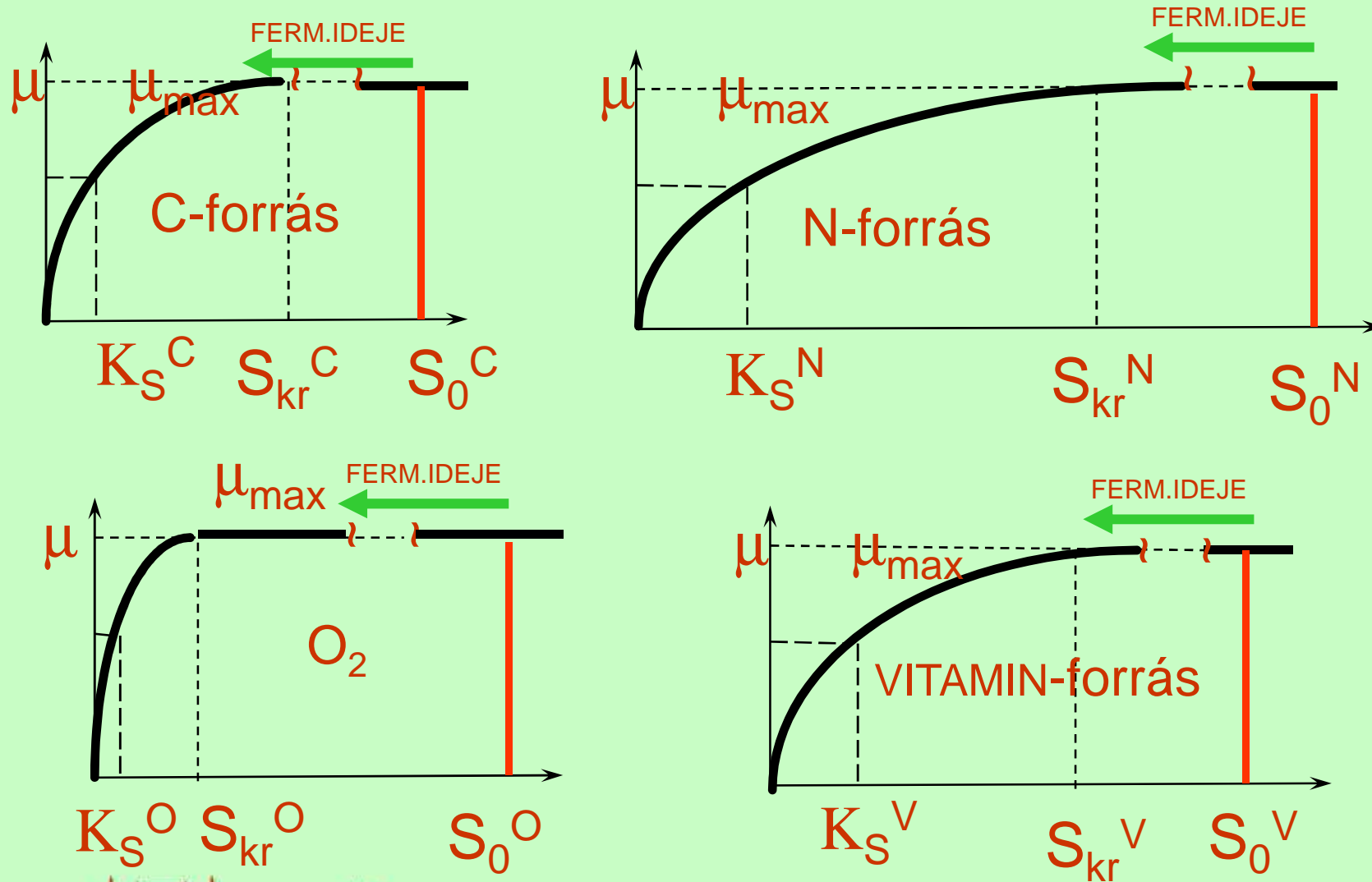
MONOD- modell

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

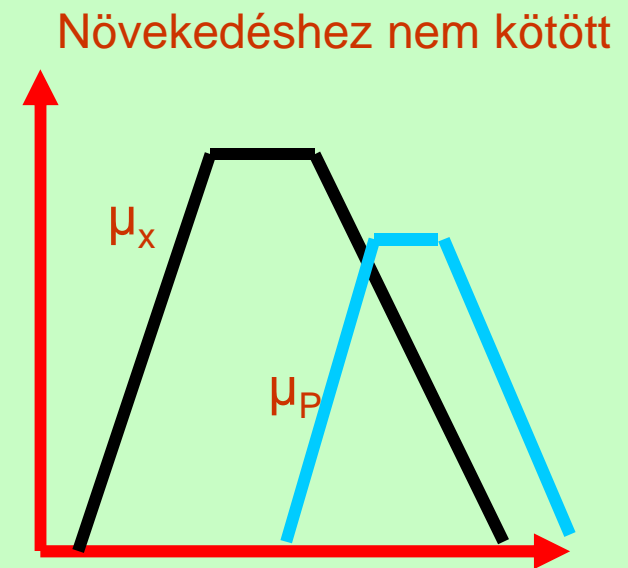
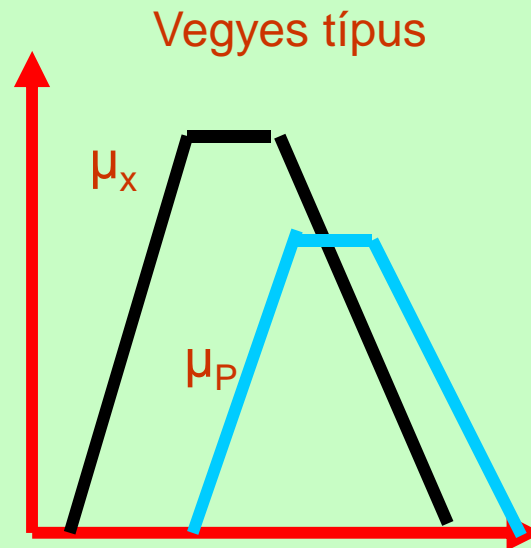
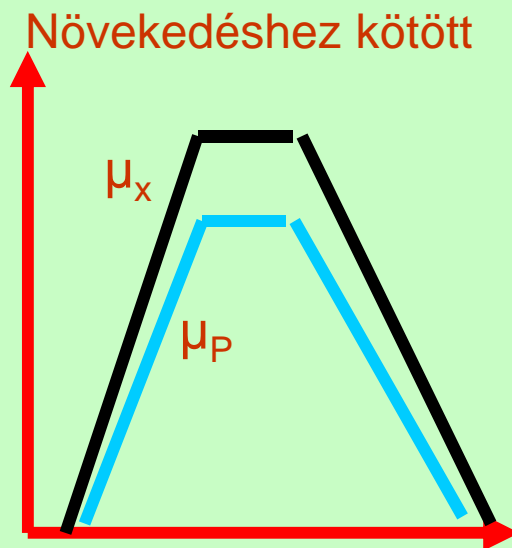
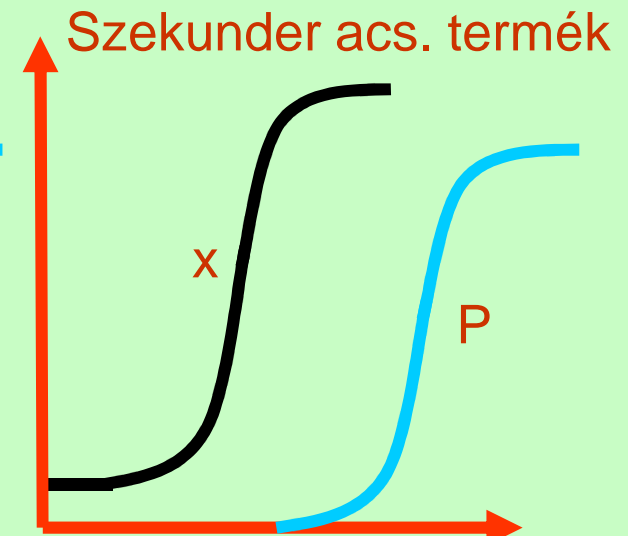
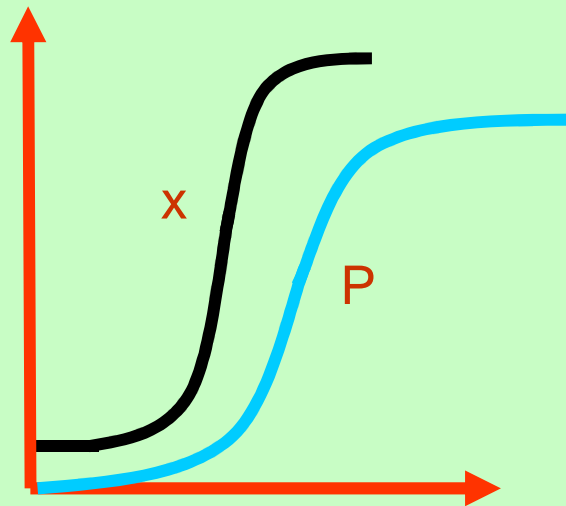
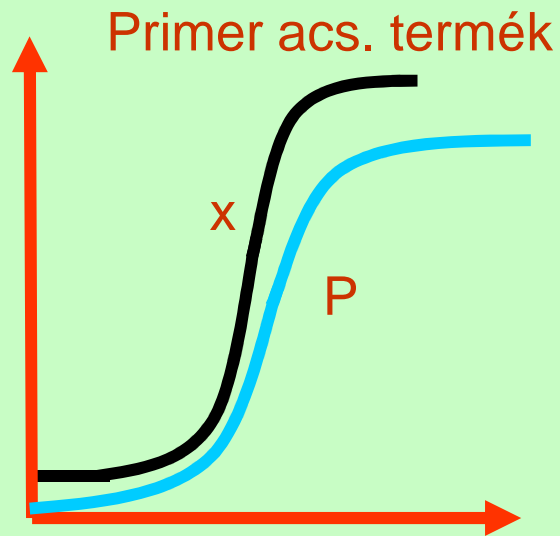


A mikrobaszaporodás alapösszefüggései

MELYIK S LESZ LIMITÁLÓ SZUBSZTRÁT ???



MONOD modell-család GAEDEN-féle termékképződési típusok

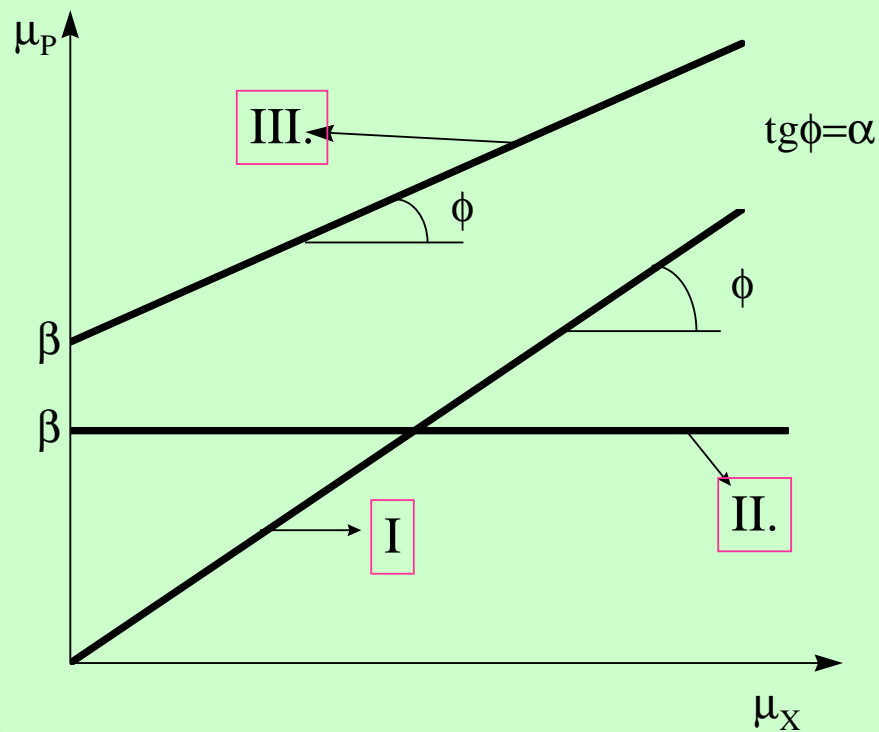


MONOD modell-család TERMÉKKÉPZŐDÉS KINETIKAI LEÍRÁSA

LUEDEKING – PIRET MODELL

$$r_P = \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dx}{dt} + \beta x$$

$$\frac{1}{x} \frac{dP}{dt} = \mu_P = \alpha \mu_x + \beta$$

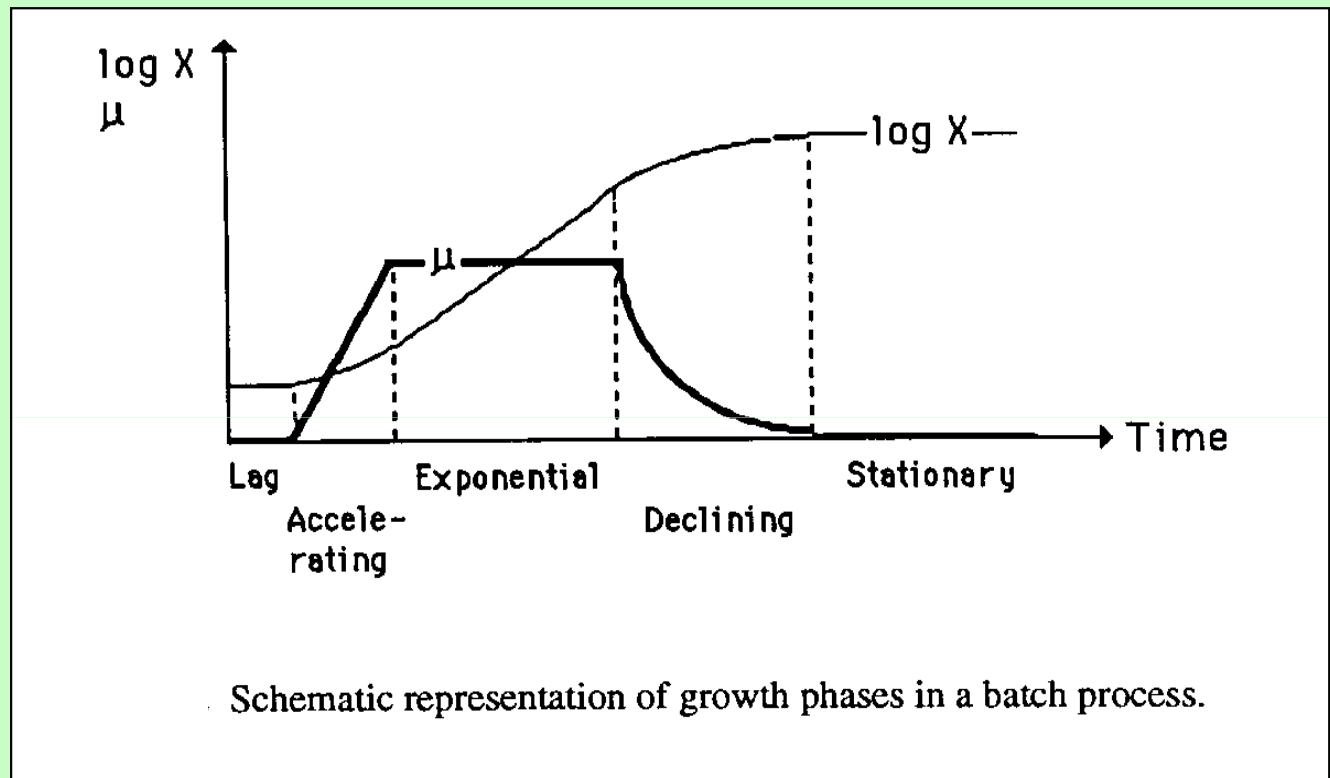
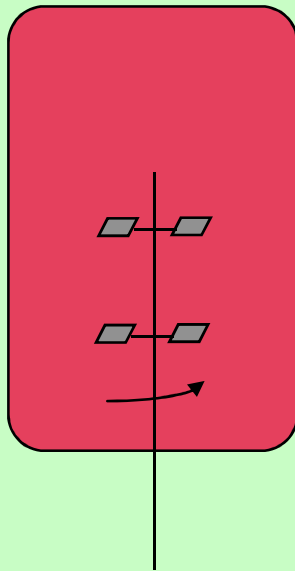


- I:** $\alpha > 0$ és $\beta = 0$ növekedéshez kötött termékképződés
- II:** $\alpha = 0$ és $\beta > 0$ növekedéshez nem kötött termékképződés
- III:** $\alpha > 0$ és $\beta > 0$ vegyes típusú fermentáció.



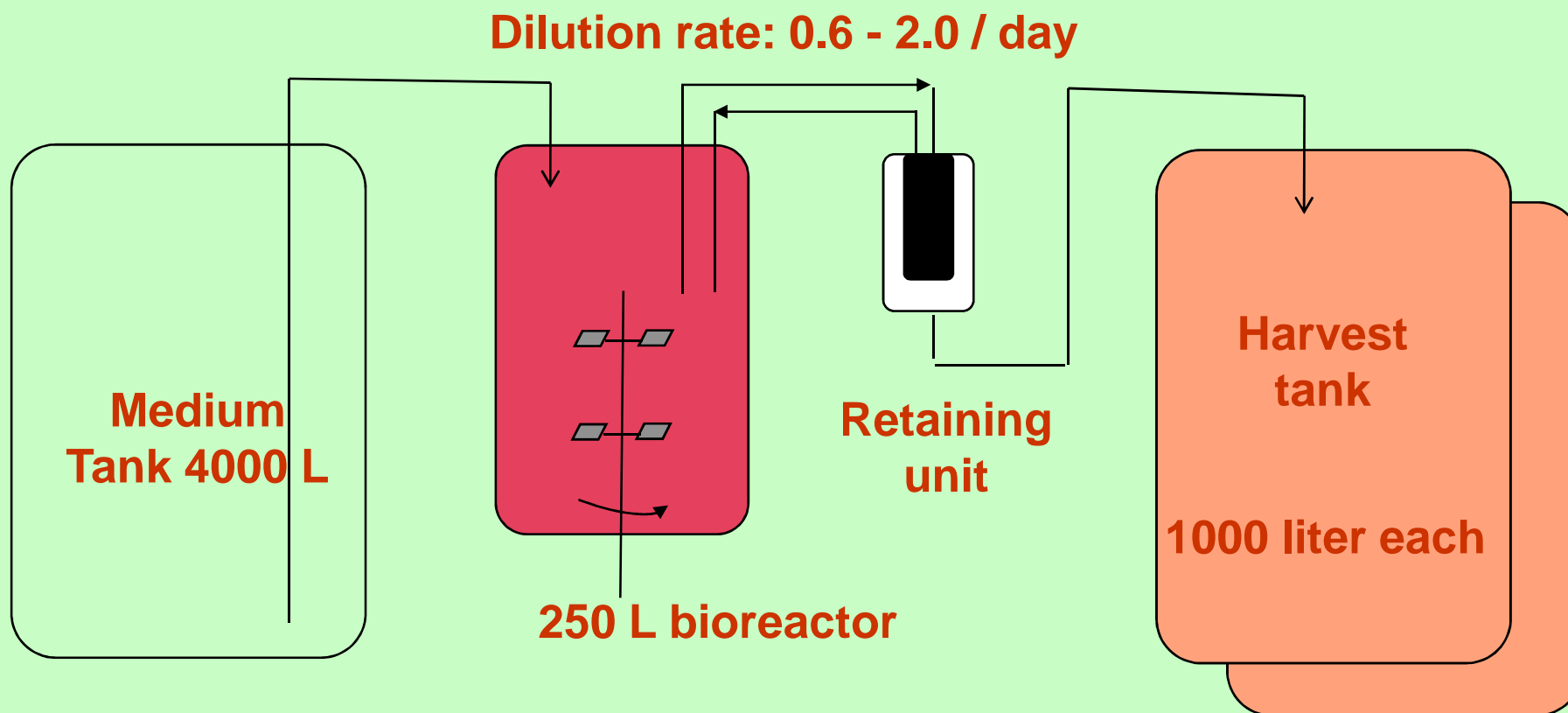
Tenyésztési módszerek: Sejtek szakaszos tenyésztése

Kevert tankreaktor Szubmerz tenyésztés

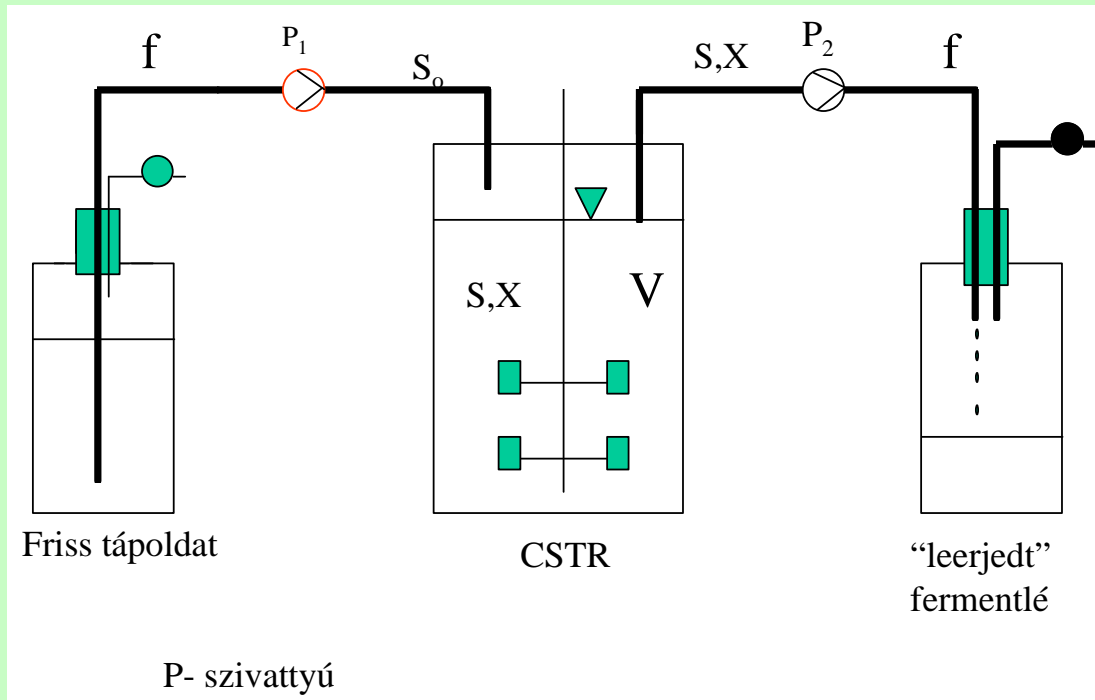


Tenyésztési módszerek: Folyamatos tenyésztés

Kevert tank reaktorban szubmerz tenyésztés folyamatos átfolyással, sejtviisszatartással, vagy sejt és termék viisszatartással.



Folyamatos tenyésztés



$$\frac{f}{V} = D$$

D: higítási sebesség

sejttömeg:

$$V \frac{dx}{dt} = V \left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{növekedés}} - f \cdot x$$

$$\frac{dx}{ds} = Y$$

Y: hozamkonstans

i-edik szubsztrát:

$$V \frac{dS_i}{dt} = f (S_{i,0} - S_i) - \frac{1}{Y_{x/S_i}} \left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{növekedés}}$$

Folyamatos tenyésztés

Egy limitáló szubsztrát esetében:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx = (\mu - D)x = \left(\mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} - D \right) x$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu x}{Y}$$

Az állandósult állapot szükséges és elégséges feltétele:

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad \text{és} \quad \frac{dS}{dt} = 0$$

$$\mu = D$$

$$D = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$$

illetve

$$\bar{S} = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}$$

$$D(S_0 - \bar{S}) = \frac{\mu x}{Y}$$

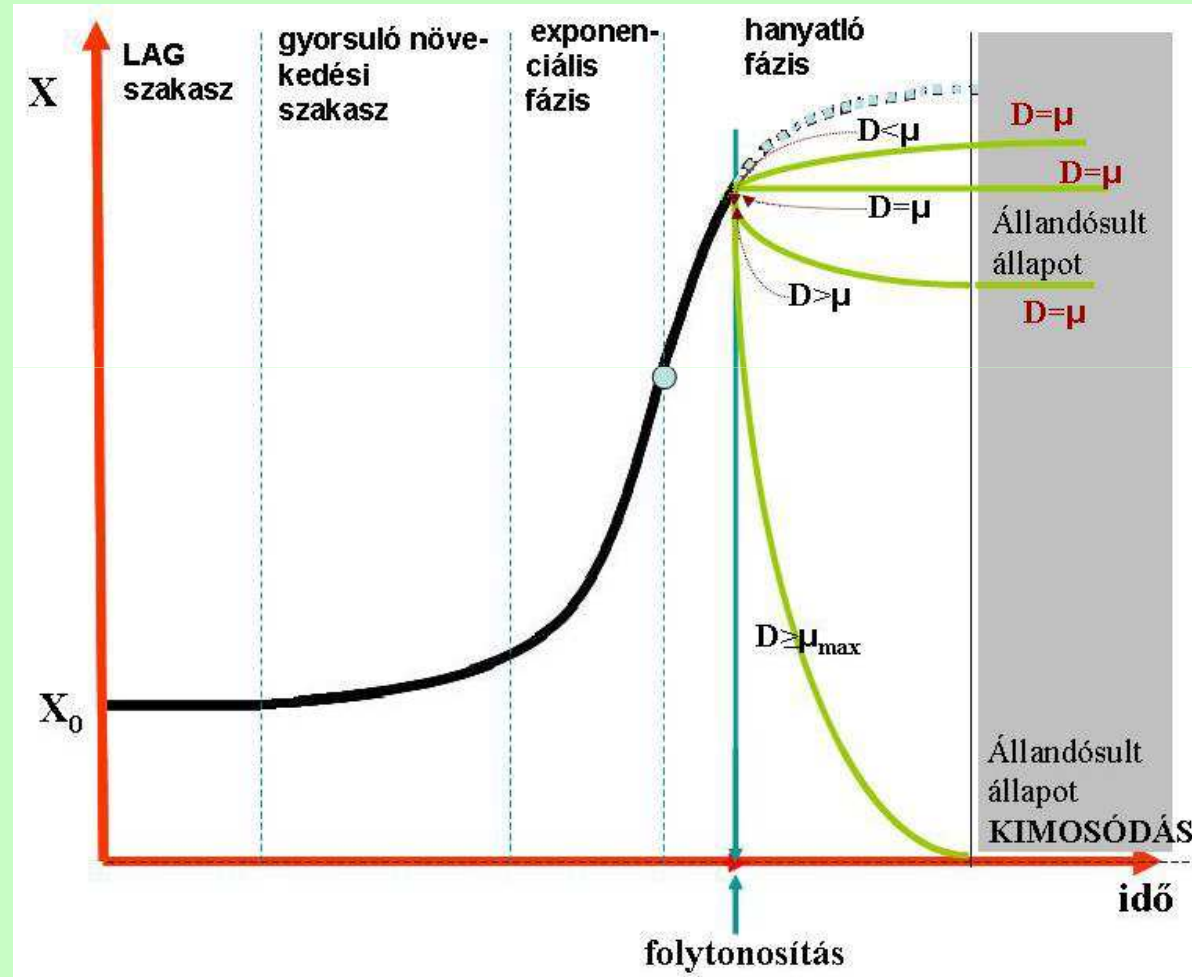
$$\bar{x} = Y(S_0 - \bar{S}) = Y \left(S_0 - \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D} \right)$$



FOLYTONOS FERMENTÁCIÓ

Tranziens viselkedés

Indulás szakaszáról, áttérés a folytonosra



**Mindíg csak
itt üzemelhet!**



RÁTÁPLÁLÁSOS (FED-BATCH) TENYÉSZTÉS

A hanyatló fázis meghosszabbításaként értelmezhetjük a fed batch technikát, állandó, változó vagy periódikus módon friss tápanyago(ka)t adagolunk a rendszerbe, elvétel nincs, állandóan növekvő térfogat.

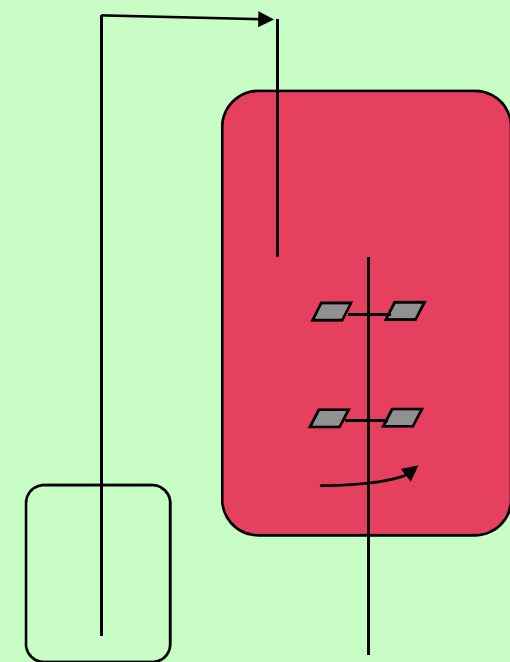
alacsony állandó szintű S koncentráció (pl. élesztőfermentációban, glükóz represszió elkerülése),

magas állandó S koncentráció (pl. citromsav fermentációban)

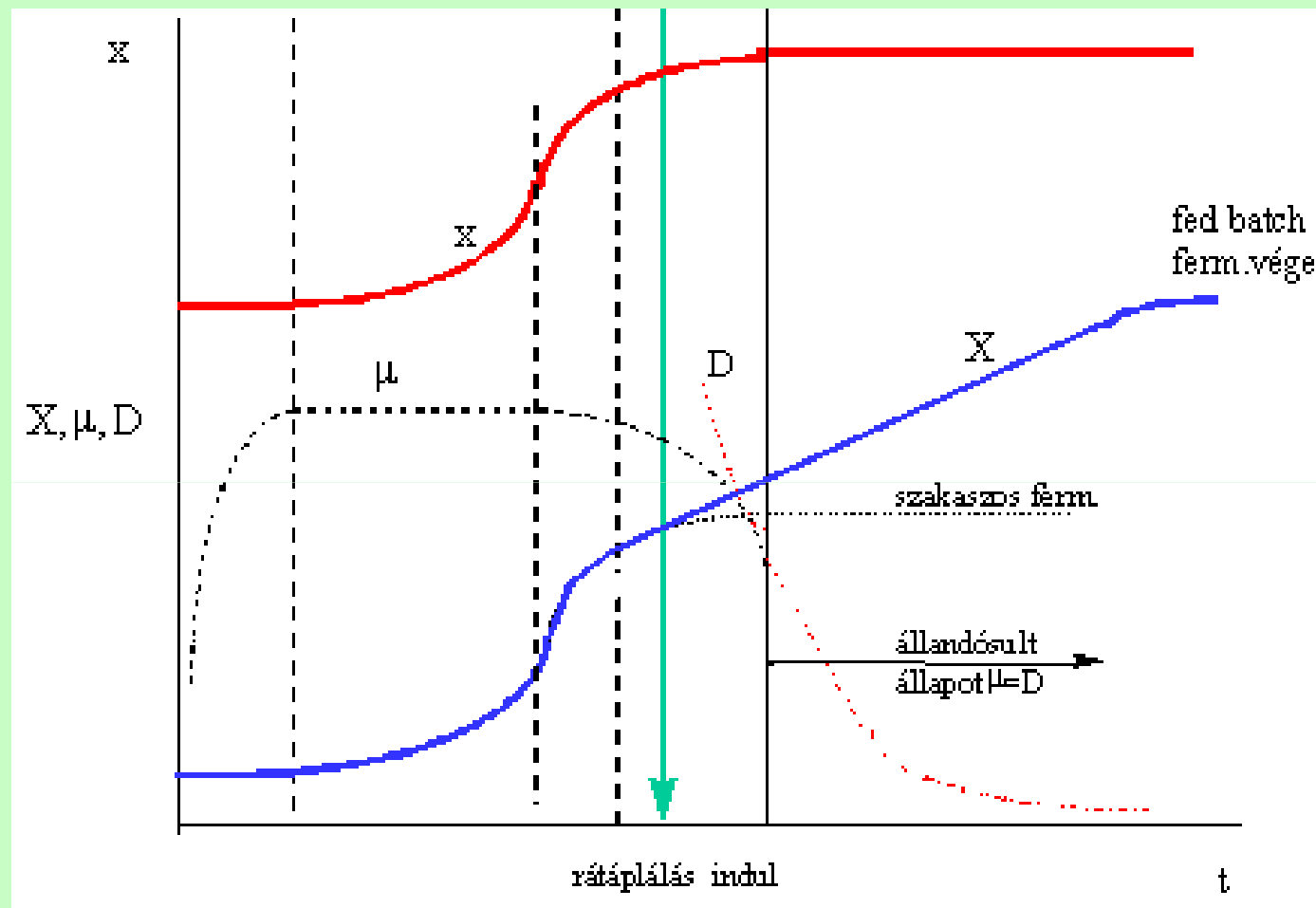
prekurzor folyamatos adagolása (pl. penicillin gyártásban fenilecetsav, v. triptofán gyártásban indol)



FED BATCH FERMENTÁCIÓ NÖVEKEDÉSI GÖRBÉJE



Medium tank



A FERMENTÁCIÓS ELJÁRÁSOK OPTIMALIZÁLÁSA

Táptalaj összetevők (inokulum, fő táptalaj)

Oxigénellátás (keverés, buborékoltatás)

Hőmérséklet

pH

Inokulum (oltótenyészet) mennyisége

Inokulum kora

Tenyésztés ideje

Indukció (ha van) időpontja

Betáplálás ideje és sebessége

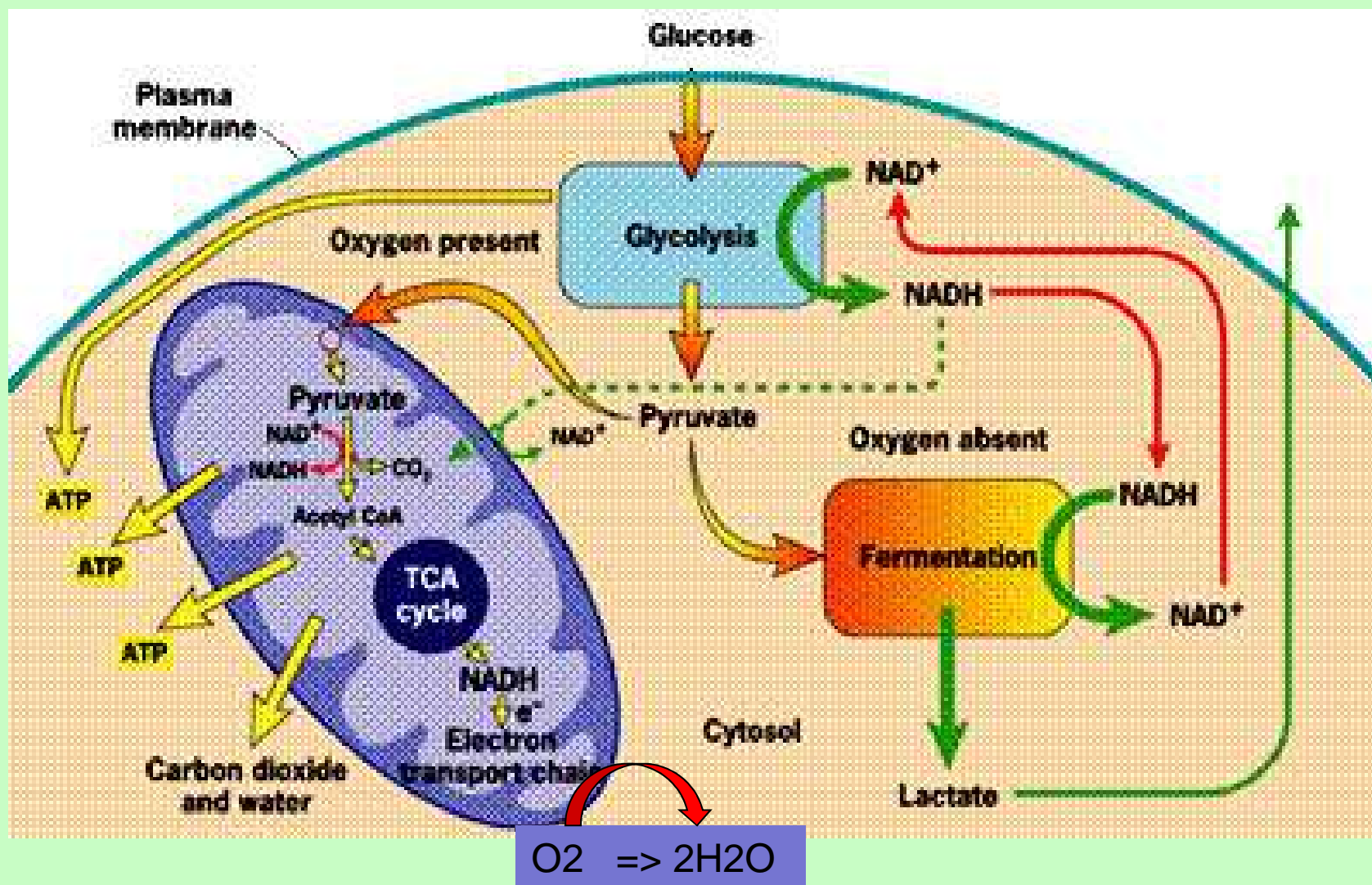
Fermentor felépítése



A tananyag szerkezete:

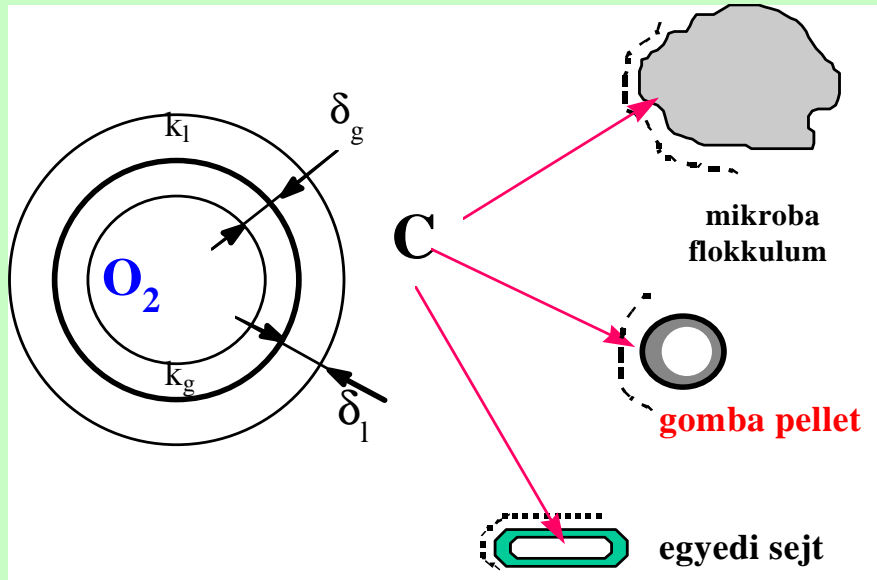


Az oxigén felhasználása eukarióta sejtben



Oxigénellátás fermentációban

O_2 alacsony oldhatóságú a vízben \longrightarrow Folyamatos O_2 betáplálás kell



Az oxigén útjának leglassabb lépése a gázfázisból a folyadékfázisba való átmenet.

$$\frac{dc}{dt} = \underbrace{K_L a (c^* - c)}_{\text{bevitel (OTR)}} - \underbrace{qx}_{\text{fogyasztás}}$$

K_L – az eredő folyadékololdali tömegátadási tényező [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$],

a – térfogategységre jutó anyagátadási felület [$\text{cm}^2 \cdot \text{cm}^{-3} = \text{cm}^{-1}$],

$K_L a$ – eredő folyadékololdali (térfogati) oxigénabszorpciós együttható [h^{-1}],

C^* – telítési oxigénkoncentráció (mg/dm^3),

C – az aktuális oldott oxigén-koncentráció (mg/dm^3).



OXIGÉNIGÉNY ÉS LEVEGŐZTETÉS

Az oxigén is lehet limitáló szubsztrát

A mikrobák oxigénigényét két módon lehet megadni:

1. légzési sebesség = $\frac{dc}{dt}$ [mmol O₂/ dm³.h],
[kg O₂/ m³ .h]

2. fajlagos légzési sebesség $Q = \frac{1}{x} \frac{dc}{dt}$ [h⁻¹]

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} \frac{c}{K_{O_2} + c} x$$

$$Y_O = \frac{\Delta x}{\Delta c}$$



OXIGÉNIGÉNY ÉS LEVEGŐZTETÉS

$$\frac{dc}{dt} = -\frac{1}{Y_o} \frac{dx}{dc} = -\frac{1}{Y_o} \mu_{\max} \frac{c}{K_{O_2} + c} x$$

$$Q = \frac{1}{x} \frac{dc}{dt} = -\frac{1}{Y_o} \mu_{\max} \frac{c}{K_{O_2} + c}$$

$$Q \cong Q_{\max}$$

μ_{\max} – fajlagos növekedési sebesség

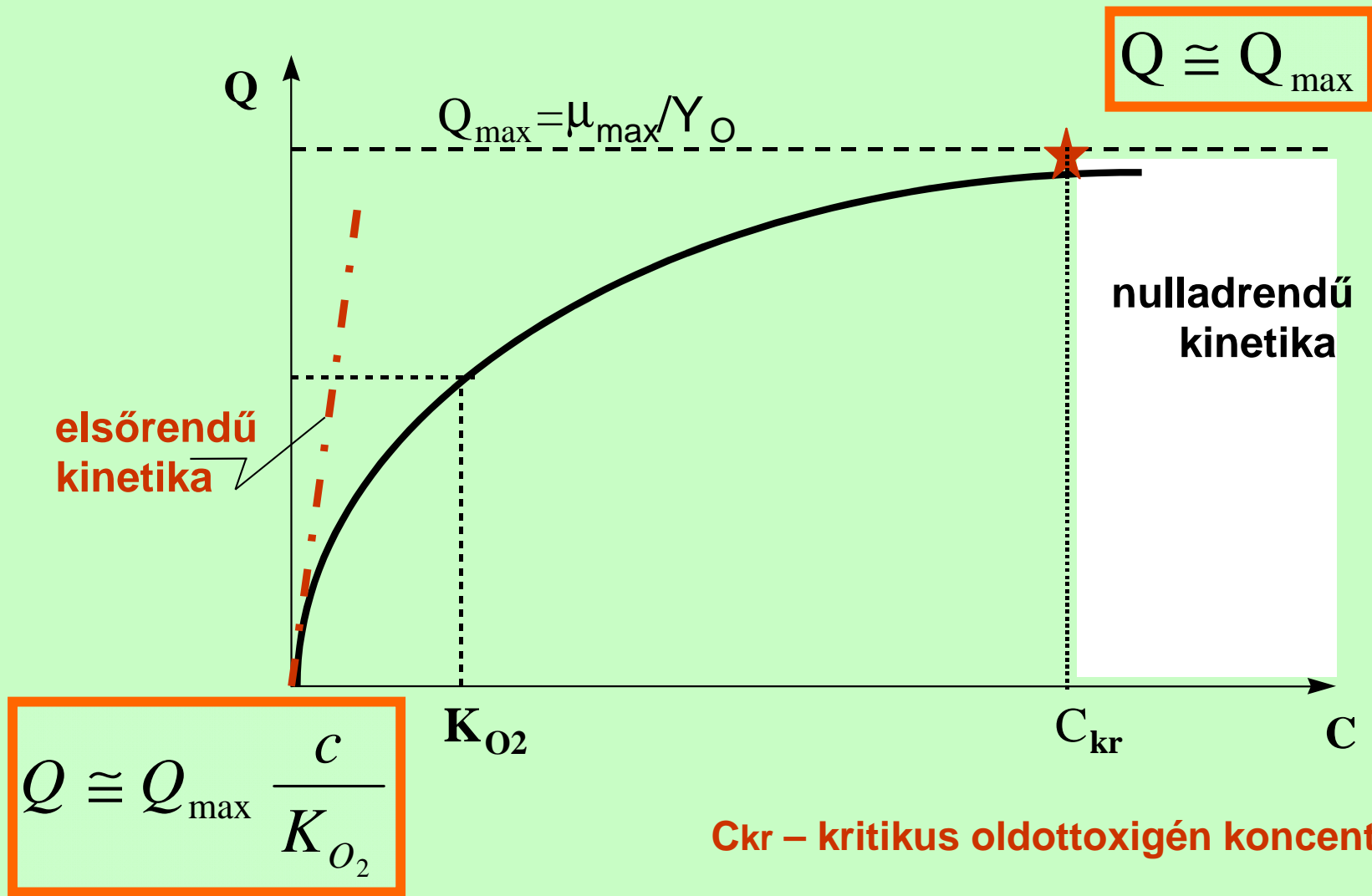
Y_o – eredő oxigénhozam (az elnevezés kissé zavaró, hiszen itt nem oxigén-előállításról van szó); jobb az oxigénre vonatkozó eredő hozam kifejezés)

Q_{\max} – maximális fajlagos oxigénigény vagy maximális fajlagos légzési sebesség

K_{O_2} – oxigénre vonatkozó szubsztráttelítési állandó (Monod-modell)



OXIGÉNIGÉNY ÉS LEVEGŐZTETÉS



C_{kr} – kritikus oldottoxigén koncentráció



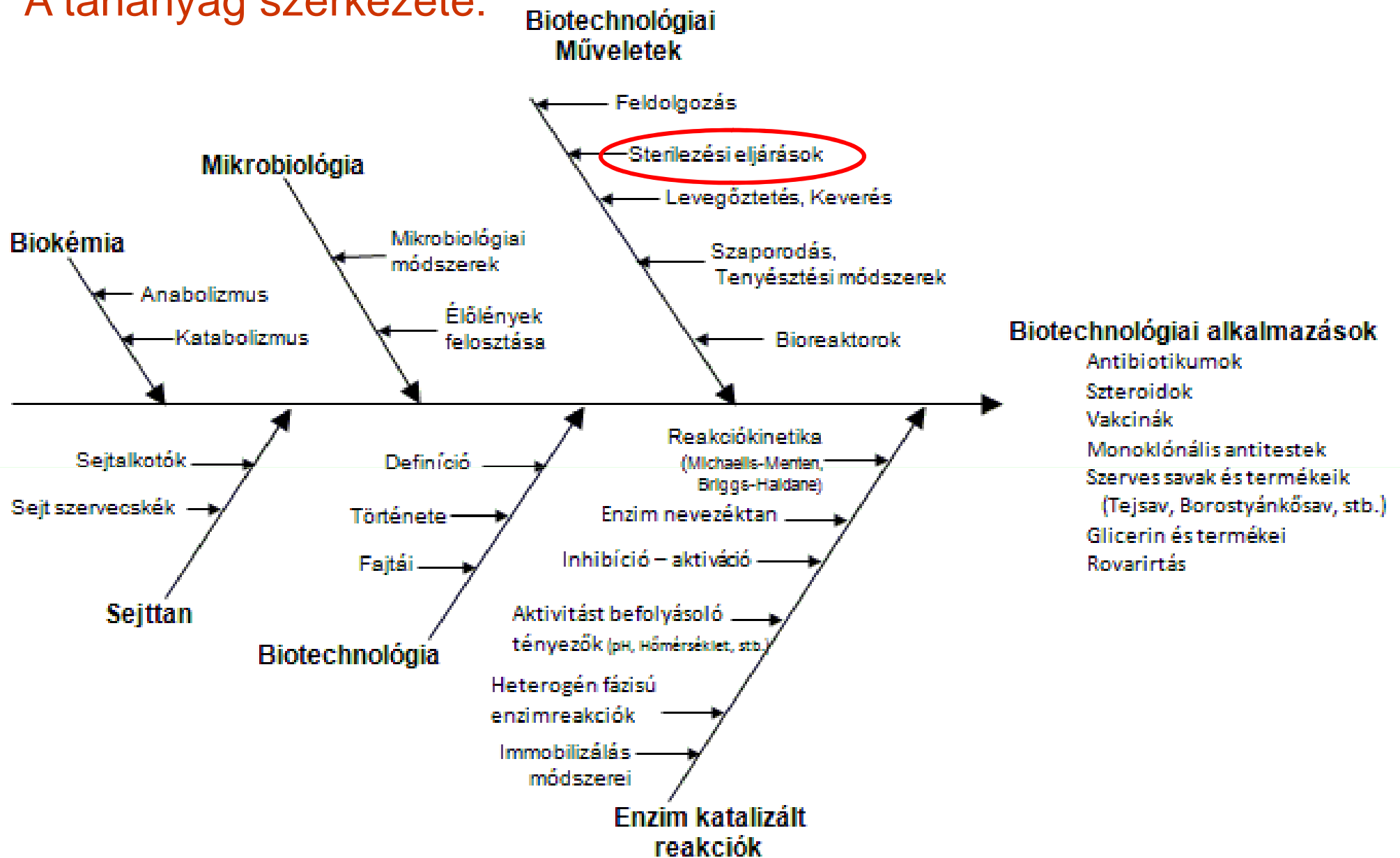
OXIGÉNIGÉNY ÉS LEVEGŐZTETÉS

A glükóz és oxigén, mint szubsztrátok összehasonlítása (*Saccharomyces cerevisiae*)

	Glükóz	Oxigén
Koncentráció a fermentlében	1% \approx 104 mg/dm	7 mg/dm ³
Kritikus koncentráció	50 mg/dm ³	0,7 mg/dm
Fajlagos felhasználási sebesség	580 mg/g.h	208 mg/g.h



A tananyag szerkezete:



Sterilisation

Sterilisation are applied:

- to ensure that the process is carried out only with the desired organism, to avoid loss in productivity and competition for the substrates
- to avoid environmental contamination
- to prevent deterioration of the final product, e.g., beta-lactam antibiotics contaminated by beta-lactamase-producing bacteria
- to prevent contamination of the final product, e.g., pharmaceutical products by pyrogene compounds.



Sterilisation by

- **removing organisms (filtration)**
- **heating**
- **irradiation**
- **chemicals**
- **extreme circumstances in the culture, e.g., pH, toxic substrates**

mechanism of killing

heat (protein, DNA, RNA; the function of water)

radiation

- **UV (pyrimidine dimers),**
- **gamma-ray, X-ray (breaking DNA and/or create peroxides and free radicals)**

chemicals (oxidising or alkylating, but often also toxic, carcinogenic, explosive)



Kinetics of heat sterilization

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (5.1)$$

where N is the number of viable organisms present,
 t is the time of the sterilization treatment,
 k is the reaction rate constant of the reaction,
or the specific death rate.

On integration of equation (5.1) the following expression is obtained:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt} \quad (5.2)$$

where N_0 is the number of viable organisms present at the start of the sterilization treatment,
 N_t is the number of viable organisms present after a treatment period, t .

On taking natural logarithms, equation (5.2) is reduced to:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -kt. \quad (5.3)$$

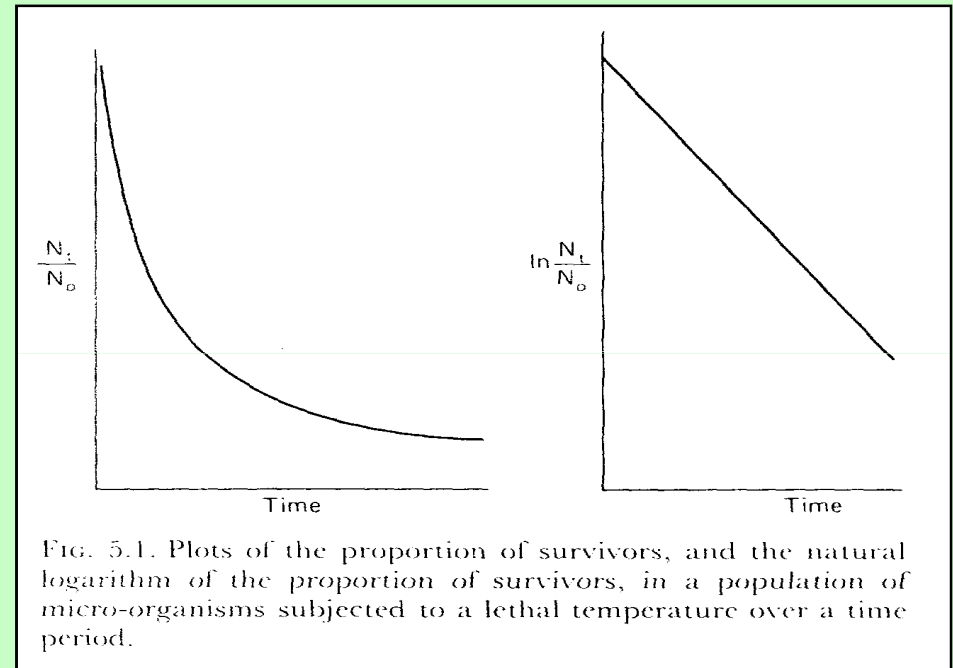
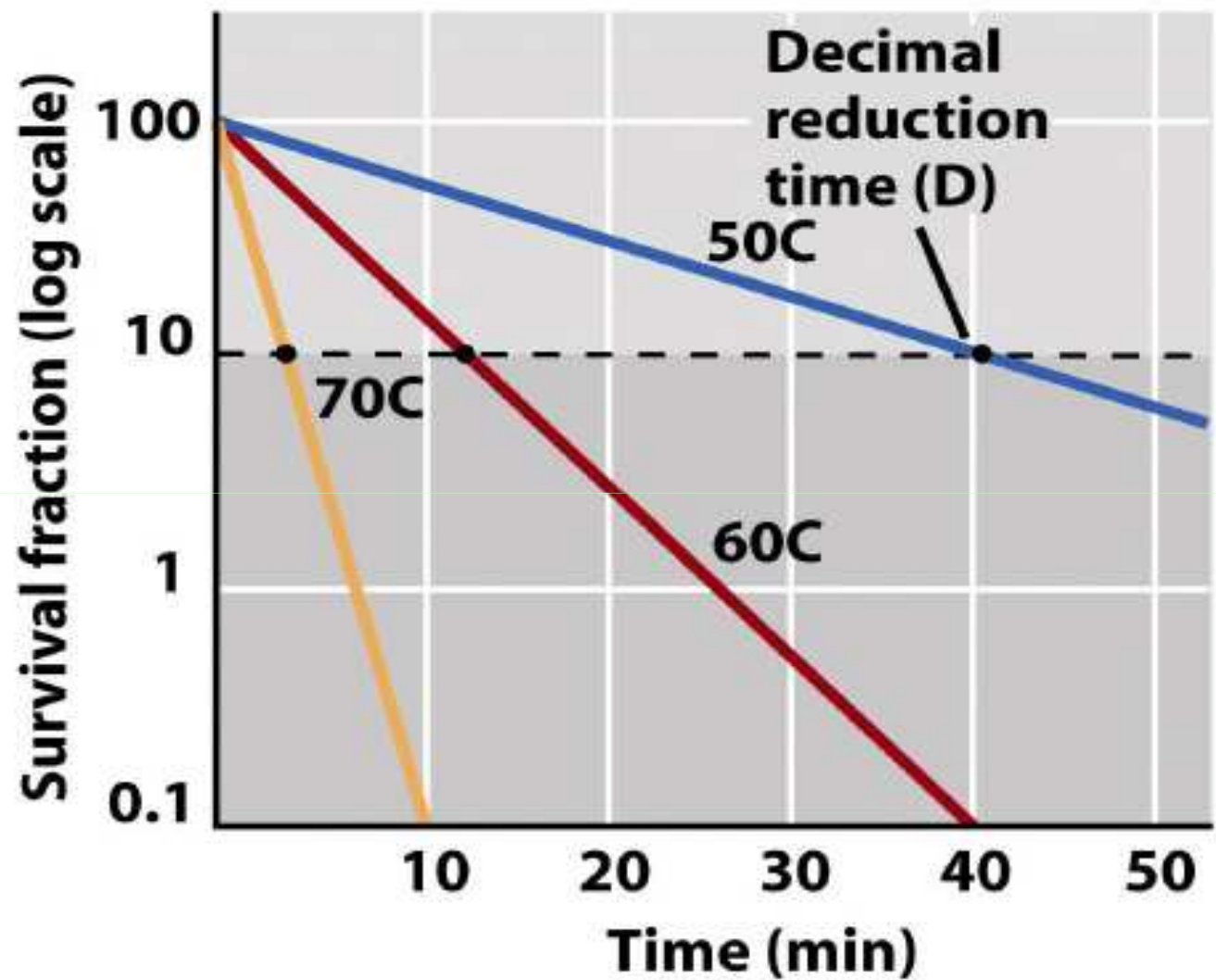


FIG. 5.1. Plots of the proportion of survivors, and the natural logarithm of the proportion of survivors, in a population of micro-organisms subjected to a lethal temperature over a time period.

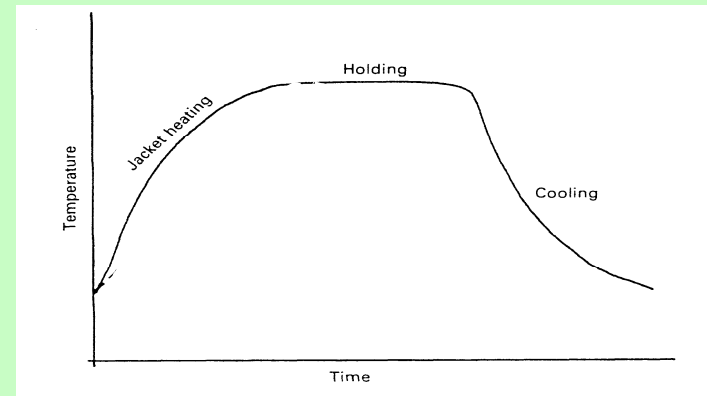




Methods for heat sterilizations

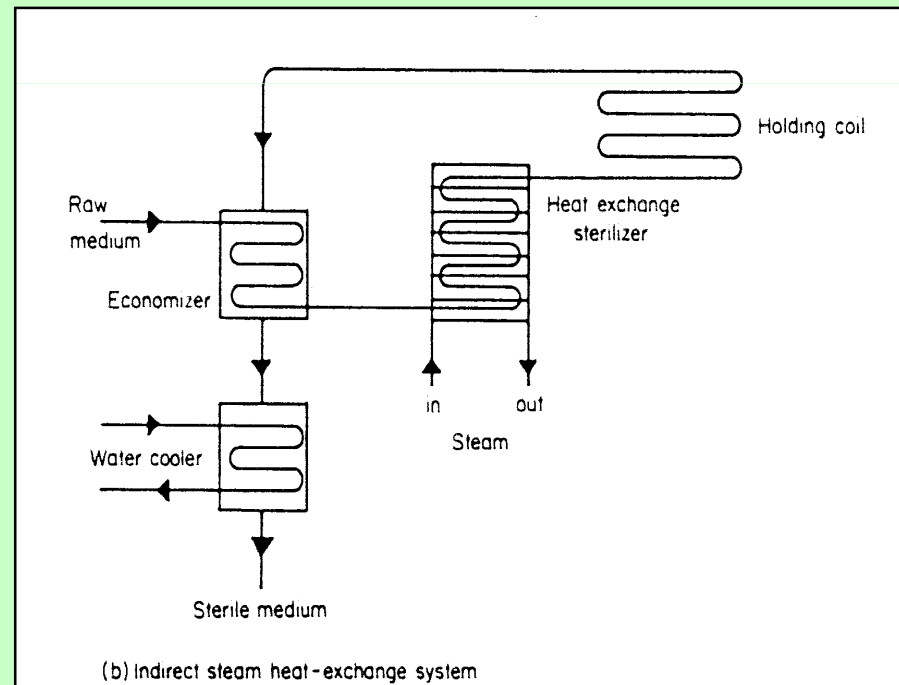
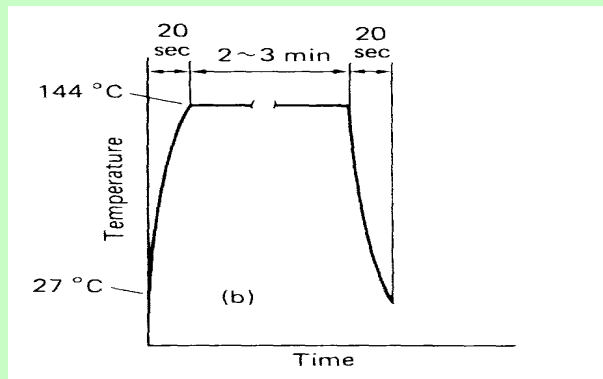
Practical methods:

**batch: autoclave,
direct steam injection,
indirect heating
(problems by big volumes)**



continuous flow sterilisation

- 1.) rapid heating up
- 2.) holding at the sterilising temperature
- 3.) rapid cooling



Schematic diagrams of continuous flow sterilisation.



Factors influencing sterilisation by heat

- Type of contaminants present
- Numbers of contaminants
- Volume of medium
- Type of medium
- Temperature sensitivity of medium ingredients
- Temperature which can be achieved
- Degree of sterility required
- Batch or continuous process



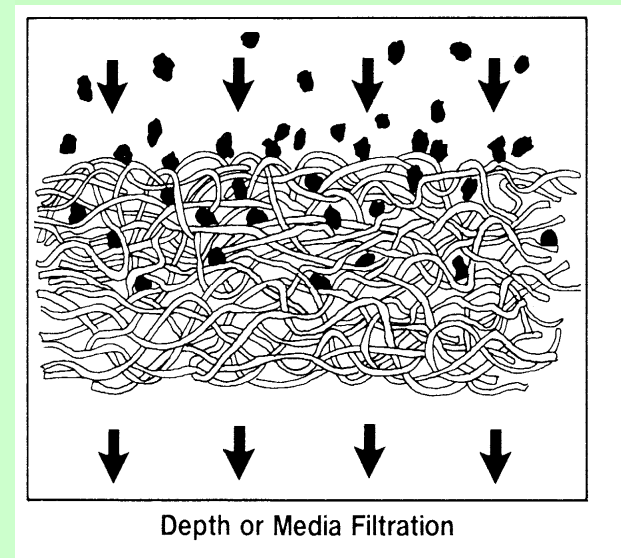
Filter sterilisation

by depth filters (fibrous material like fibreglass, cotton, mineral wool, cellulose, asbestos)

$$N/N_0 = e^{-Kx} \quad x - \text{depth of filter}$$

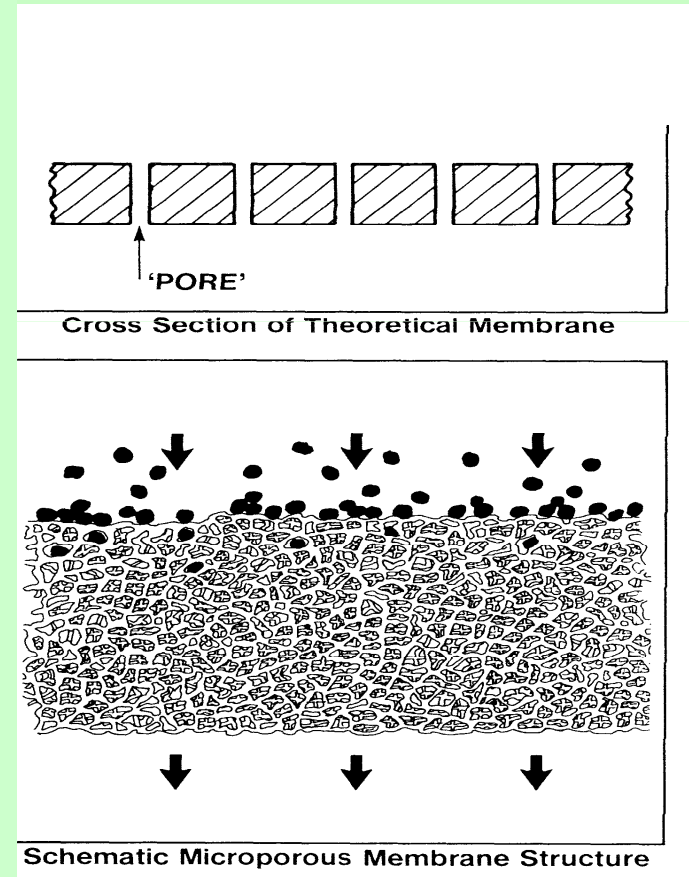
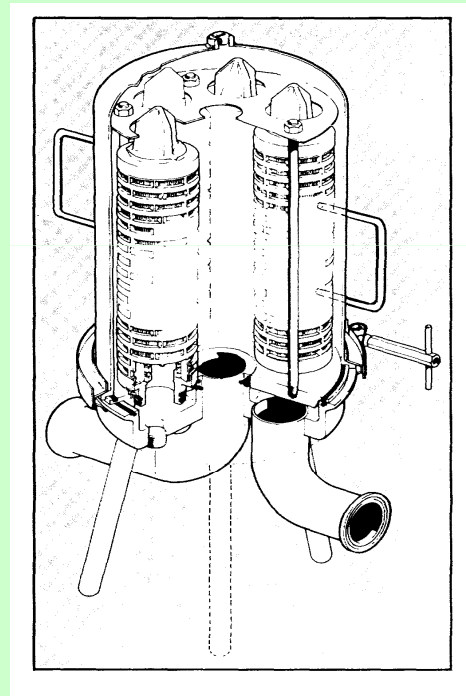
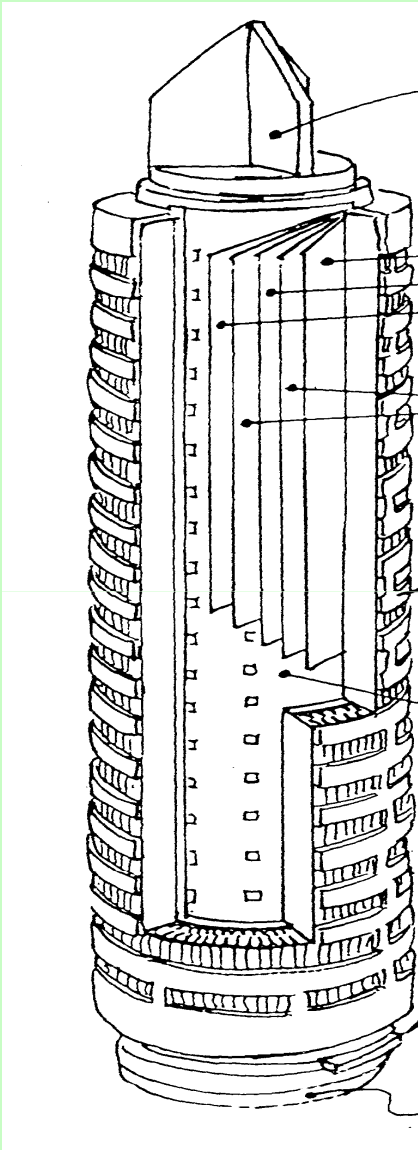
x can be calculated - necessary parameters:

- total amount of air provided, e.g., 10 m³/min for 100 hr.
- linear air velocity, e.g., 0.15 m/sec.
- air contaminated by, e.g., 200 microorg./ m³
- desired sterility, e.g., 1 microorg./ 1000 m³

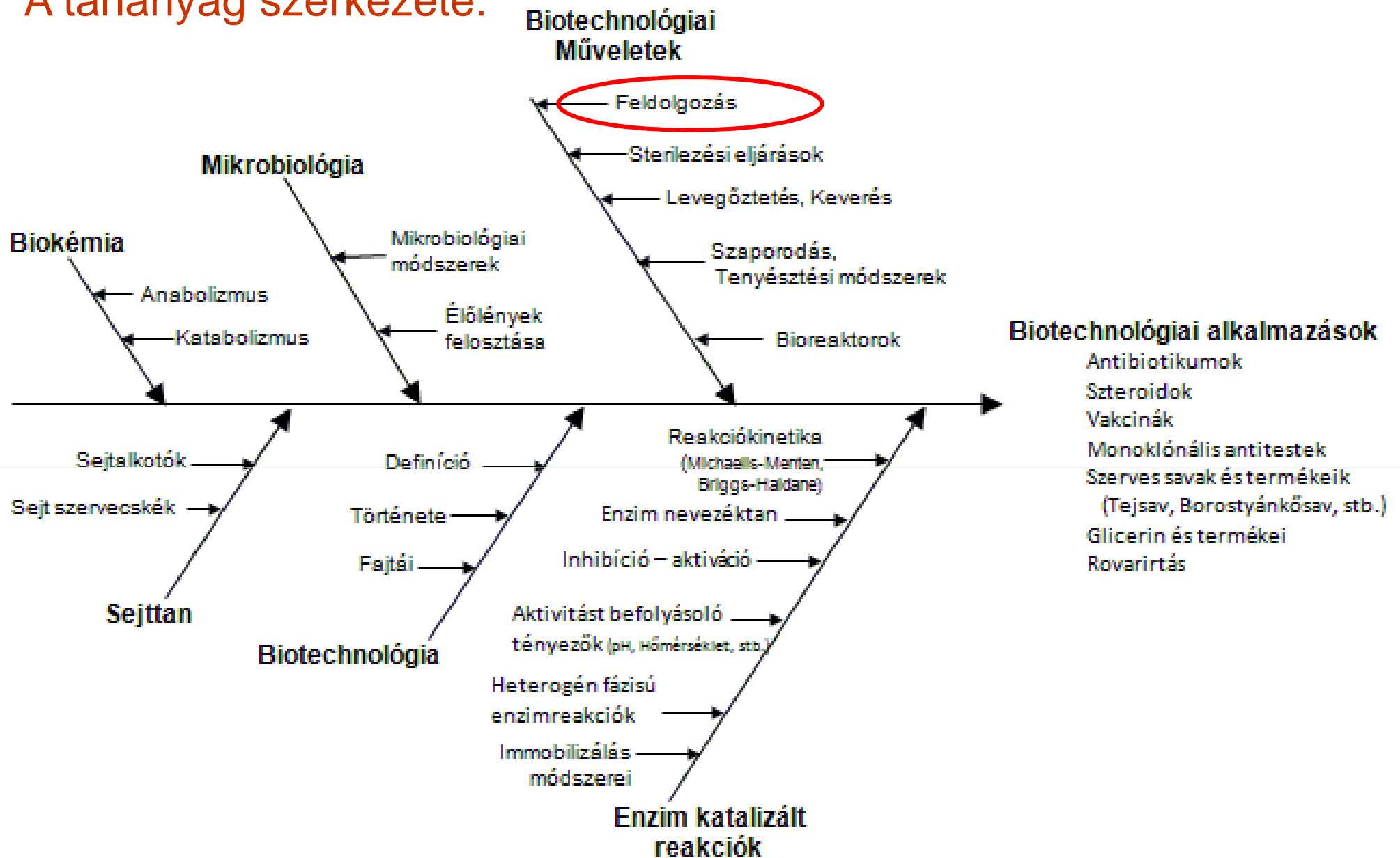


Filter sterilisation

Membrane filters (absolute filters with 0.2-0.45 μm pore size) remove bacteria but not viruses or enzymes !



A tananyag szerkezete:

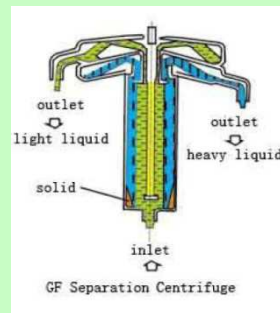
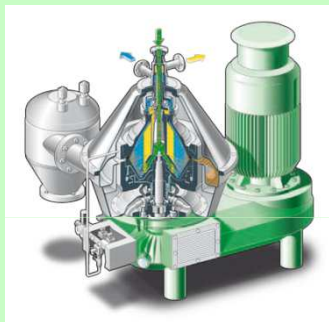


MŰVELETI SORREND

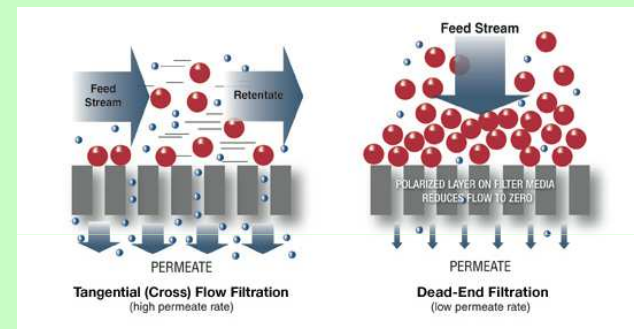
Nincs rögzített sorrend, de vannak általános irányelvek:

1. Sejtek elválasztása → szilárd-folyadék elválasztás
más szilárd anyagok: táptalaj-szemcsék, CaCO_3 , kristály-fermentáció

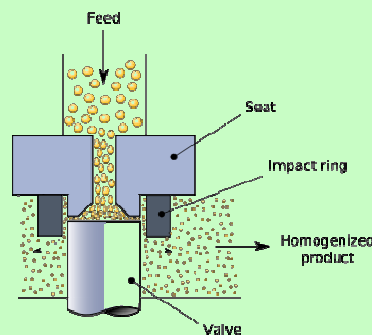
Jellemző műveletek:



Szűrés
Centrifugálás
(ülepítés)



(1/b Sejtfeltárás: csak akkor szükséges, ha a termék intracelluláris)



MŰVELETI SORREND

2. Koncentráló lépés(ek) → a nagyobb mennyiségben jelen lévő szennyezéseket, elsősorban a vizet választjuk el.

Jellemző műveletek:

Extrakció

Adszorpció

Membránszűrés

Csapadékképzés

(bepárlás, desztilláció)



MŰVELETI SORREND

3. Tisztítás → a termék és a szennyező anyagok elválasztása.

Jellemző műveletek: az összes eddigi

+ kromatográfia

4. Végtisztítás (polishing) → a terméket a kereskedelmi forgalomba hozás előírásainak megfelelő tisztaságig tisztítják.

Jellemző műveletek:

az összes eddigi

+ kristályosítás

+ szárítás



Chromatography

Ion exchange – based on differences on protein surface charge at a given pH

Gel filtration – differences in mass or shape of proteins

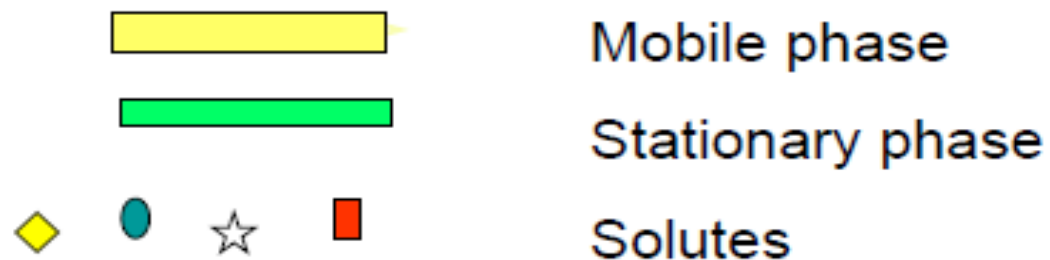
Affinity chromatography – biospecific interaction between protein and an appropriate ligand e.g. competitive inhibitor or antibody/antigen

Hydrophobic interaction – differences in surface hydrophobicities of proteins

Chromatofocusing - differences in isoelectric points



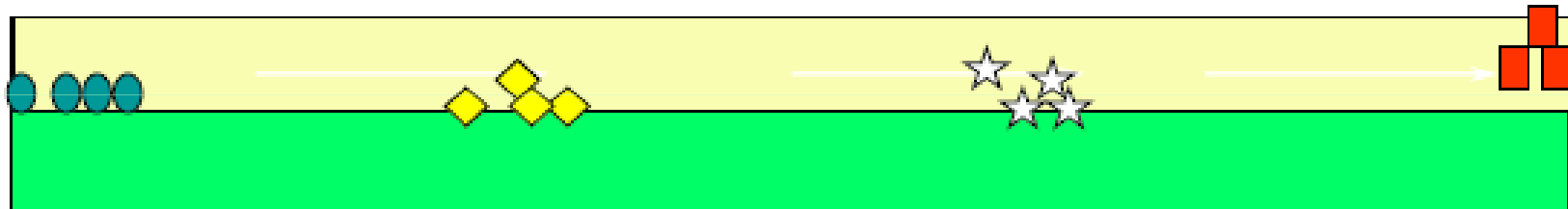
General principles of chromatographic separation – all types




Chromatographic Separation

 Mobile phase

 Stationary phase



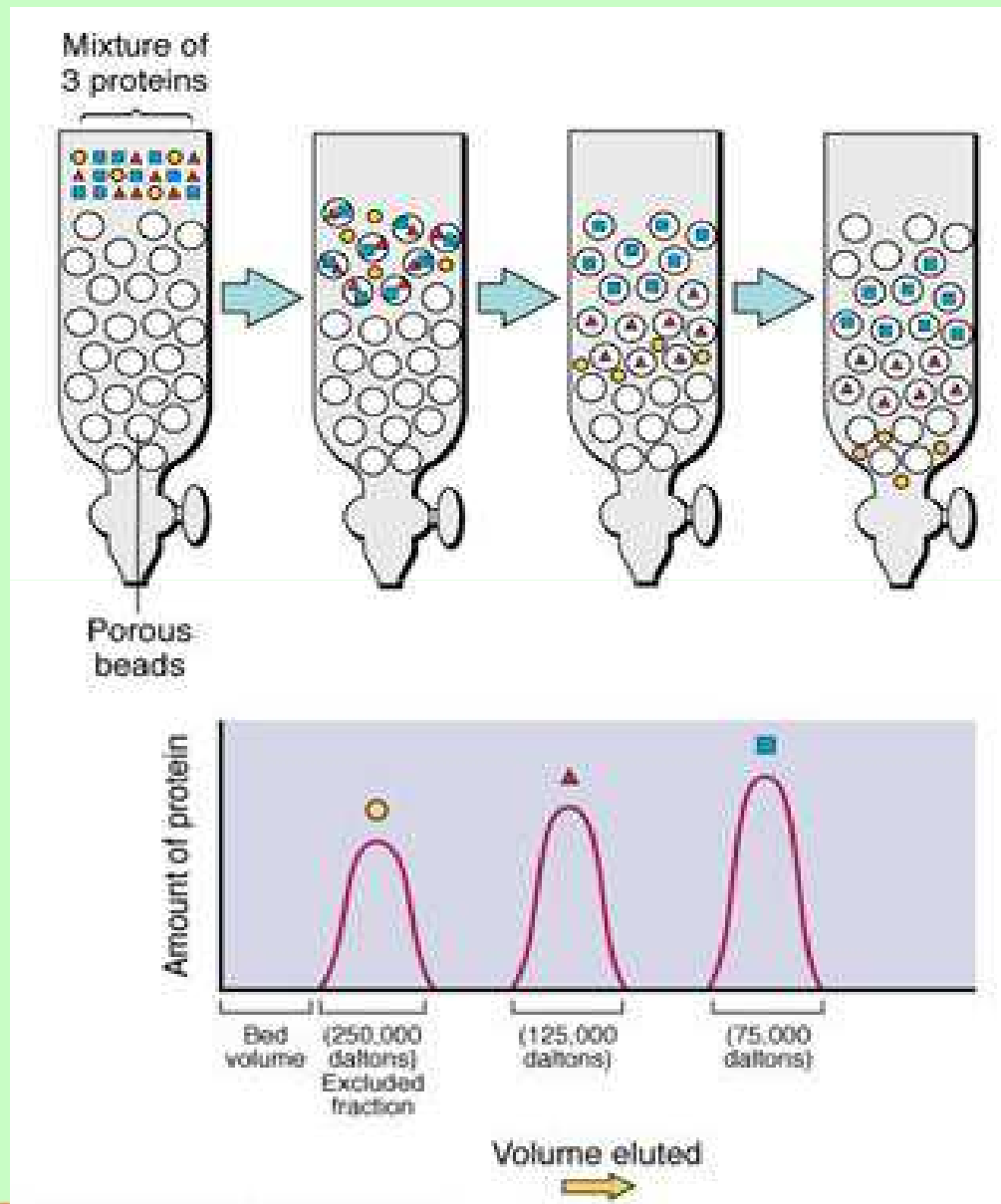
 Unretained solute

 Partially retained solute

 Totally retained solute



Gel filtration



Copyright 1999 John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Ion exchange chromatography

Protein molecules are charged except at their isoelectric point (pI).

Proteins are charged differently at the same pH. Charge depends on AA-s.

Positive charge below pI, negative charge above pI

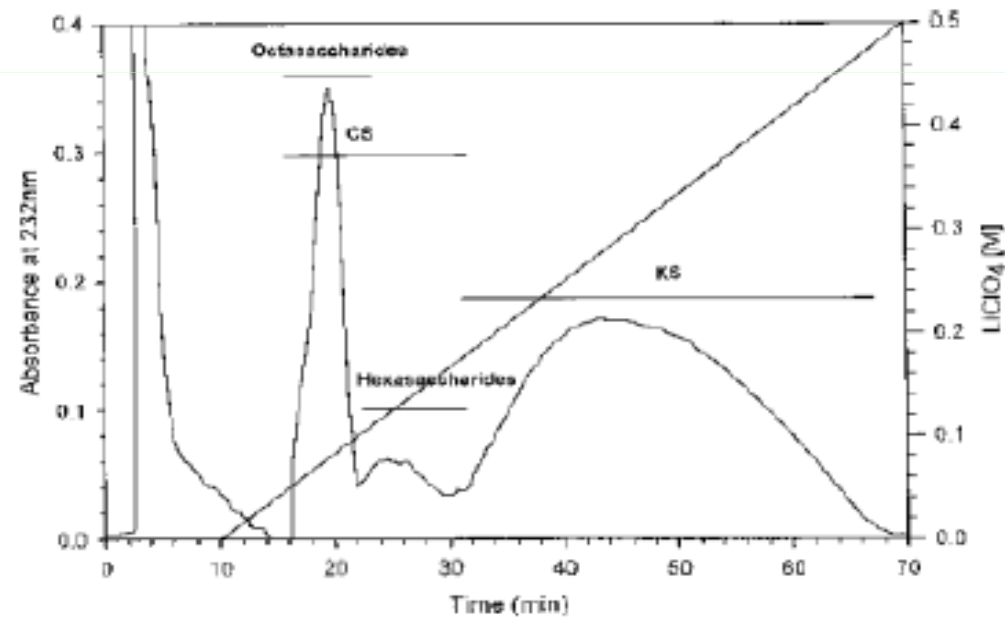
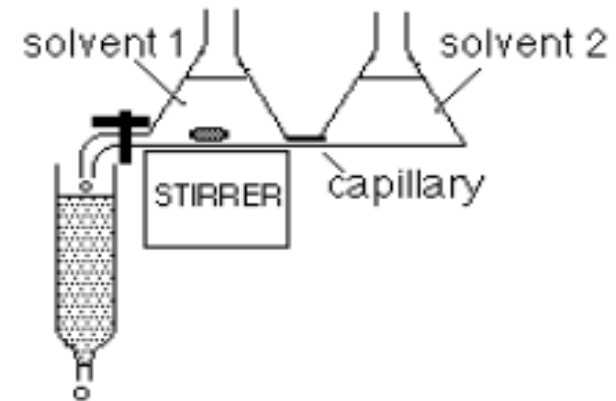
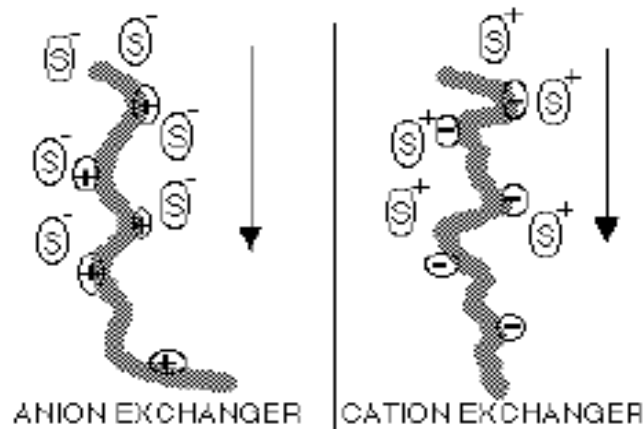
Can interact reversibly with solid matrix with opposite charge due to electrostatic attraction

Often based on cellulose or agarose with charged groups attached

Having attached to matrix, proteins can elute by changing salt conc or pH, often in gradient.



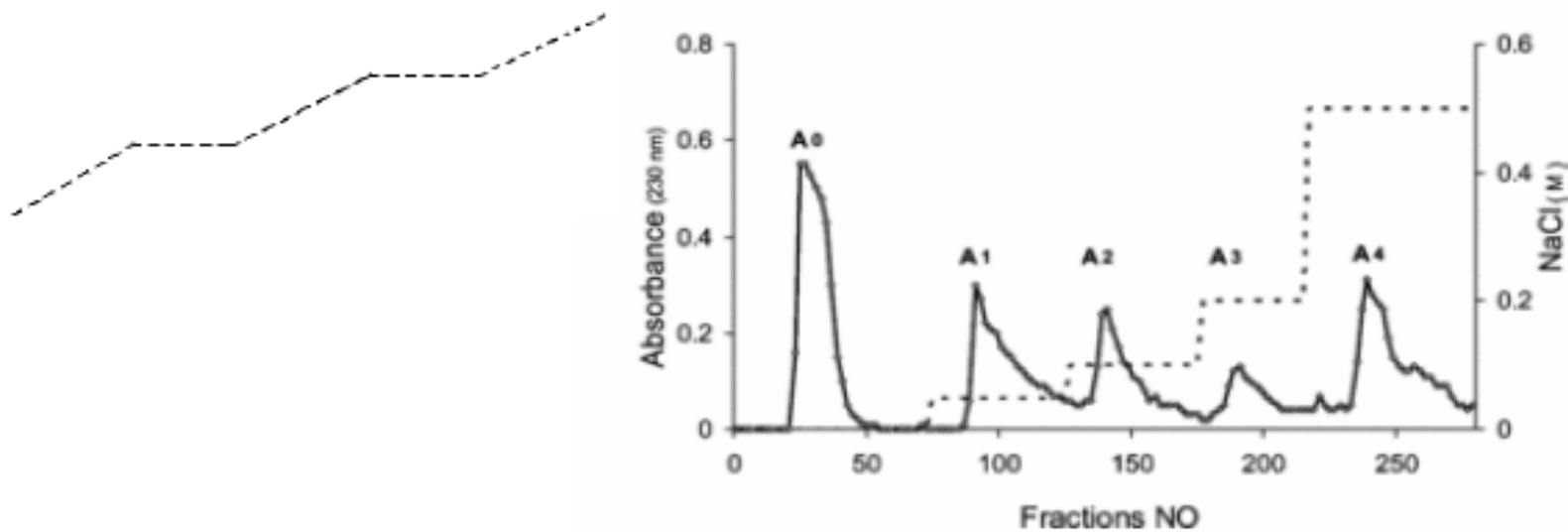
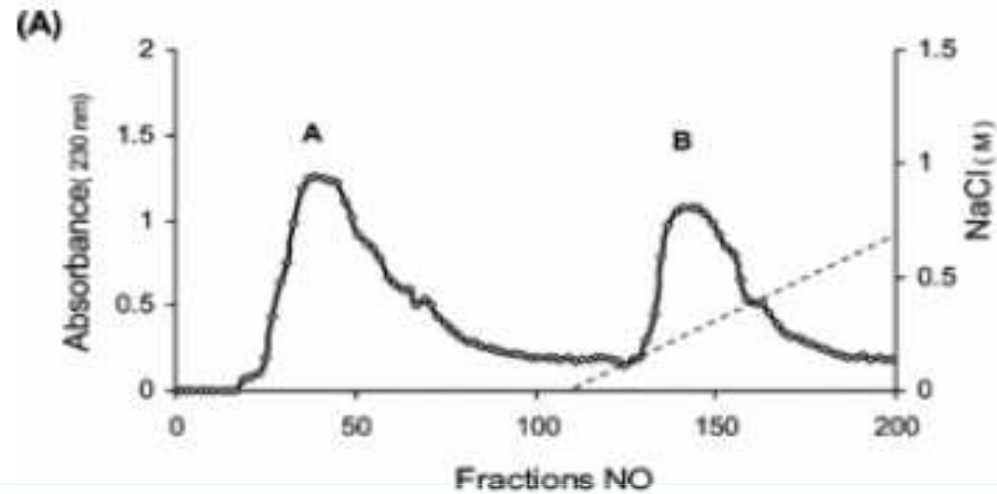
Ion exchange chromatography



Ion exchange chromatography

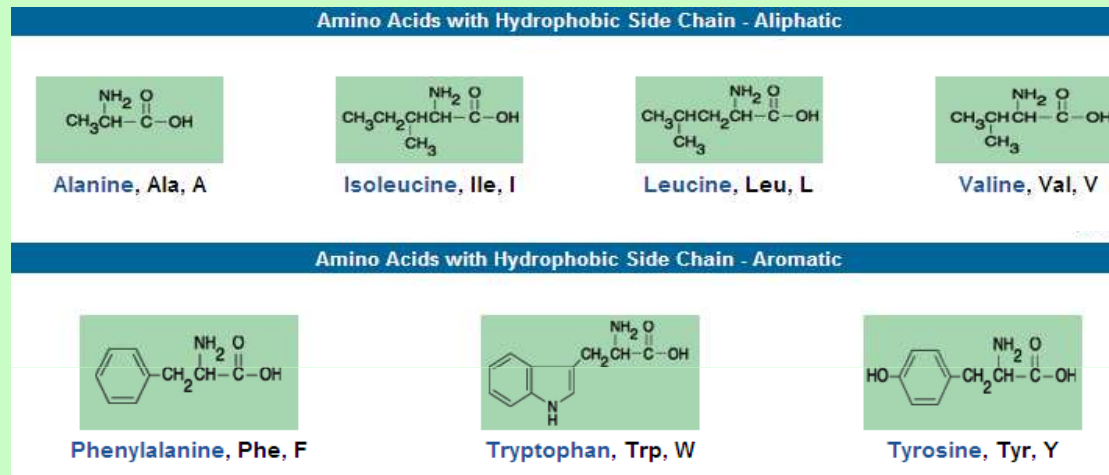
Salt gradient can be continuous or **stepped**

Combinations of both are possible



Hydrophobic interaction chromatography

7 hydrophobic AAs -found in different proportions on surface in different proteins



Most on internal parts of folded protein

Tend to be arranged in patches

Can interact with hydrophobic groups on a column matrix

Adding salt increases hydrophobicity of protein

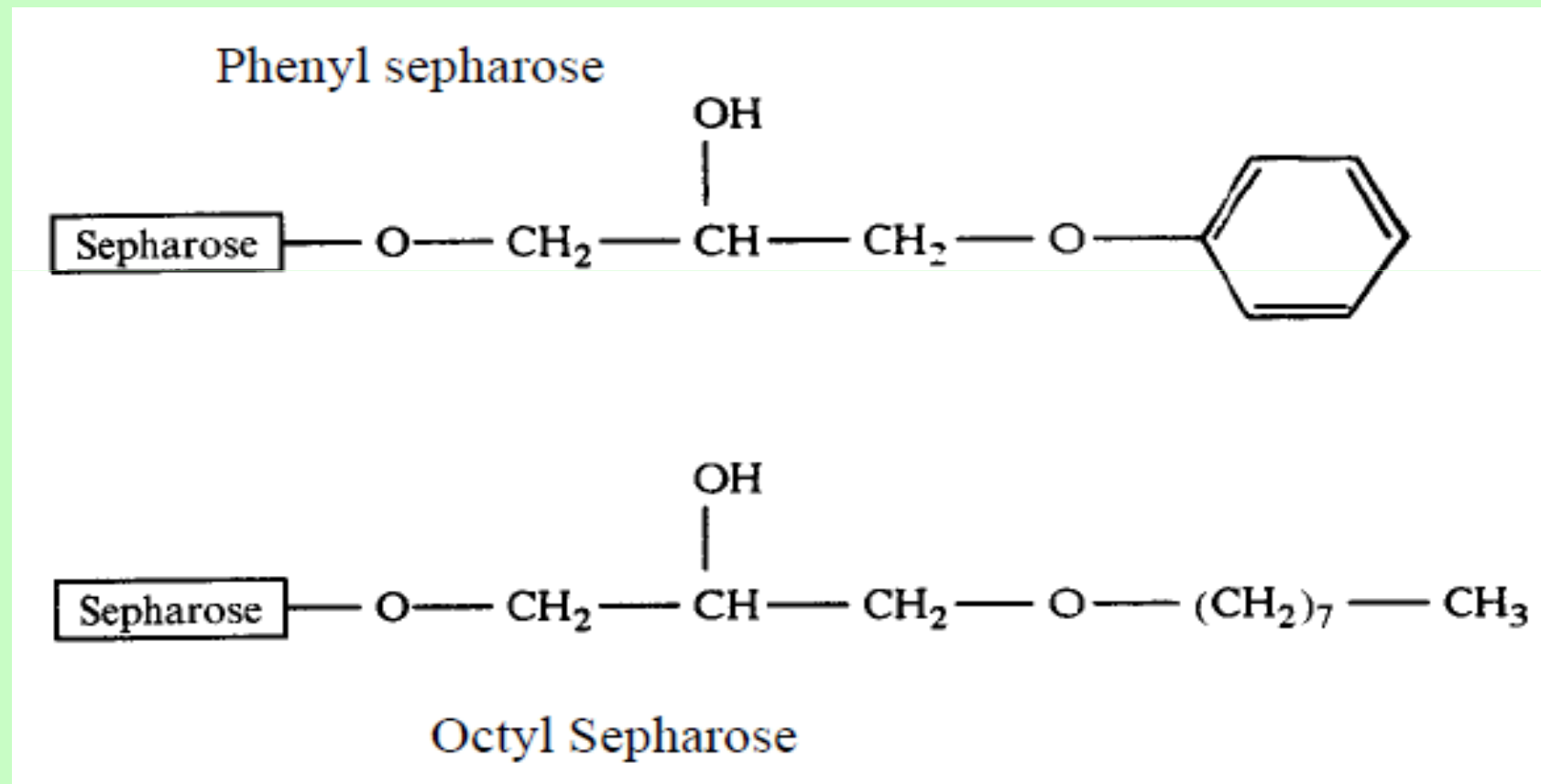
– usually applied to column in high ionic strength solutions.

Eluted by reducing salt, adding detergent or solvent

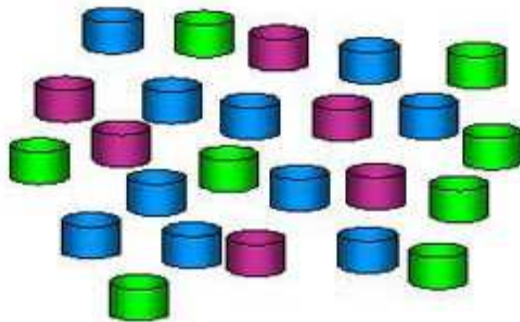
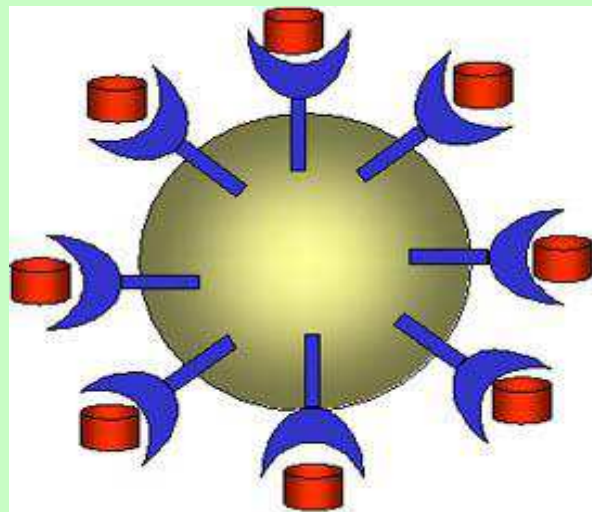


Hydrophobic matrixes

Often cross linked agarose gels with phenyl groups or octyl groups attached.



Affinity chromatography



the enzyme binds to the immobilised substrate; all other proteins that do not bind the substrate are eluted in the void volume of the column

Based on specific interaction between protein and ligand on matrix

Biospecific, e.g. enzyme-inhibitor or co-factor, antibody-antigen

Pseudoaffinity ligand with specificity for particular class of proteins, e.g. some dyes, Protein G



Affinity chromatography

Advantages

High degree of purification possible in single step.

Can separate proteins with very similar chemical composition –e.g. antibodies by using antigen –affinity chrom.

“Designer” method –less trial and error.

Disadvantages

Can be expensive

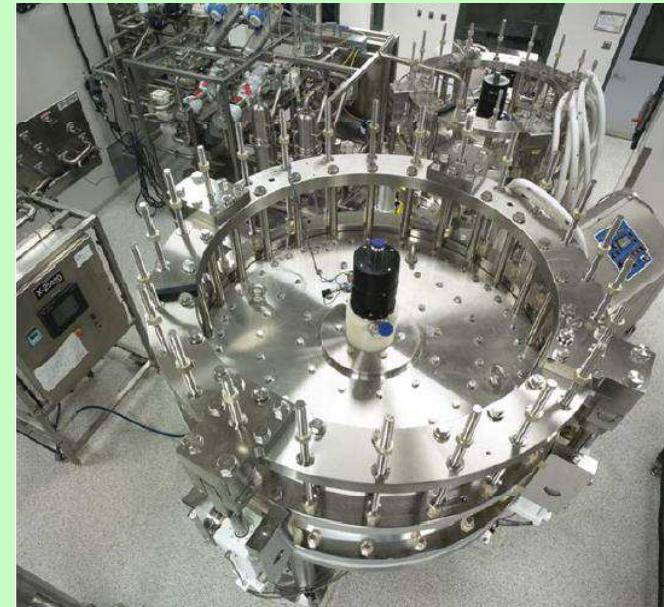
Sometimes hard to find good ligand

Sometimes hard to displace protein –binds too well to ligand!

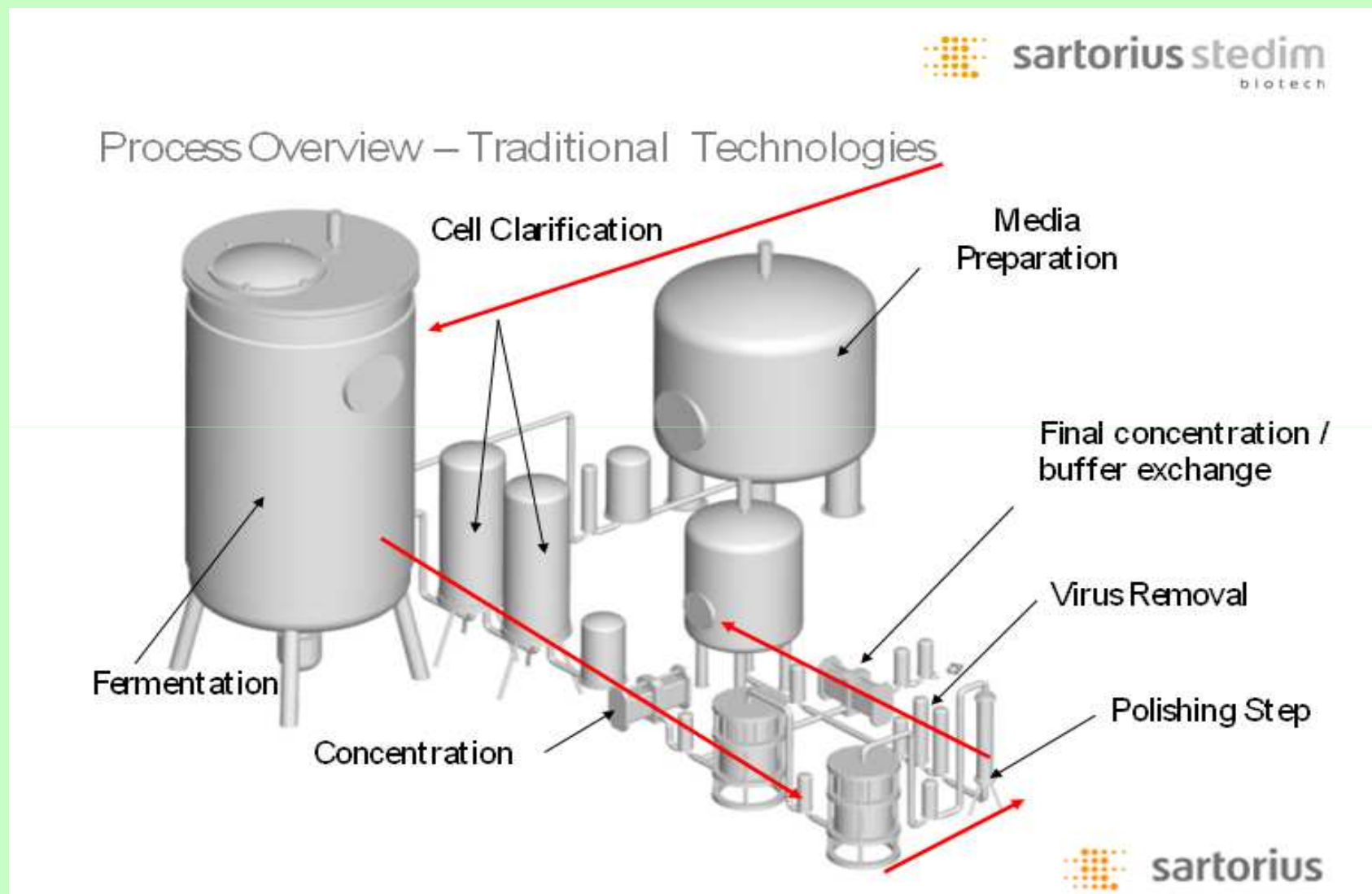
Ligand may be destroyed or leach from column



Kromatográfiás oszlopok



Monoklonális antitest termelő technológiai sor



TISZTASÁGI SZINTEK

- Humán injekciós készítmény (kis → nagy dózis)
- Humán enterális gyógyszerek
- Állatorvosi gyógyszerek
- Élelmiszerek
- Külsőleges gyógyszerek
- Kozmetikai készítmények (le mosandó → bőrön maradó)
- Technikai, más gyártások alapanyaga

A gyógyszerkönyvi minőség nem mindig a legtisztább, egy kis NaCl ott nem gond, de analitikánál viszont zavarhat.



A biológiai biztonság 4 szintje - EüM 61/1999 (WHO alapján)

1. szint - alap biológiai kockázatú (BSL 1)

az a biológiai tényező, amely nem képes emberi megbetegedést okozni

2. szint - alap biológiai kockázatú (BSL 2)

az a biológiai tényező, amely

- képes emberi megbetegedést okozni,
- veszélyt jelenthet
- elterjedése nem valószínű,
- az általa kiváltott betegség eredményesen megelőzhető, vagy kezelése hatásos

3. szint – fertőzésveszélyes (BSL 3)

súlyos emberi megbetegedéseket képes okozni (akár halálosat),

- komoly veszélyt jelenthet
- szétterjedésének kockázata az emberi közösségben fennállhat,
- általában eredményesen megelőzhető, vagy kezelése hatásos

4. szint - kiemelten fertőzésveszélyes (BSL 4)

- súlyos emberi megbetegedést okoz, (akár halálosat)
- komoly veszélyt jelent a munkavállaló számára,
- az emberi közösségben való szétterjedésének nagy a kockázata,
- általában nem előzhető meg, vagy nem kezelhető hatásosan



A biológiai biztonság négy szintjére jellemző mikroorganizmusok

	I.	II.	III.	IV.
BAKTÉRIUMOK	<i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Vibrio cholerae</i> <i>Clostridium tetani</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Yersinia pestis</i>	<i>Mycoplasma mycoides</i>
GOMBÁK	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Coccidioides immitis</i>	
VÍRUSOK	Vakcinálás-hoz használt influenza törzs	Hepatitis Influenza Herpes simplex	HIV Sárgaláz Creutzfeldt-Jacob betegség (prion!)	Ebola Marburg vírus Közép-Európai encephalitis (agyvelogyulladás) vírus (EU-ban csak III. szint)

