

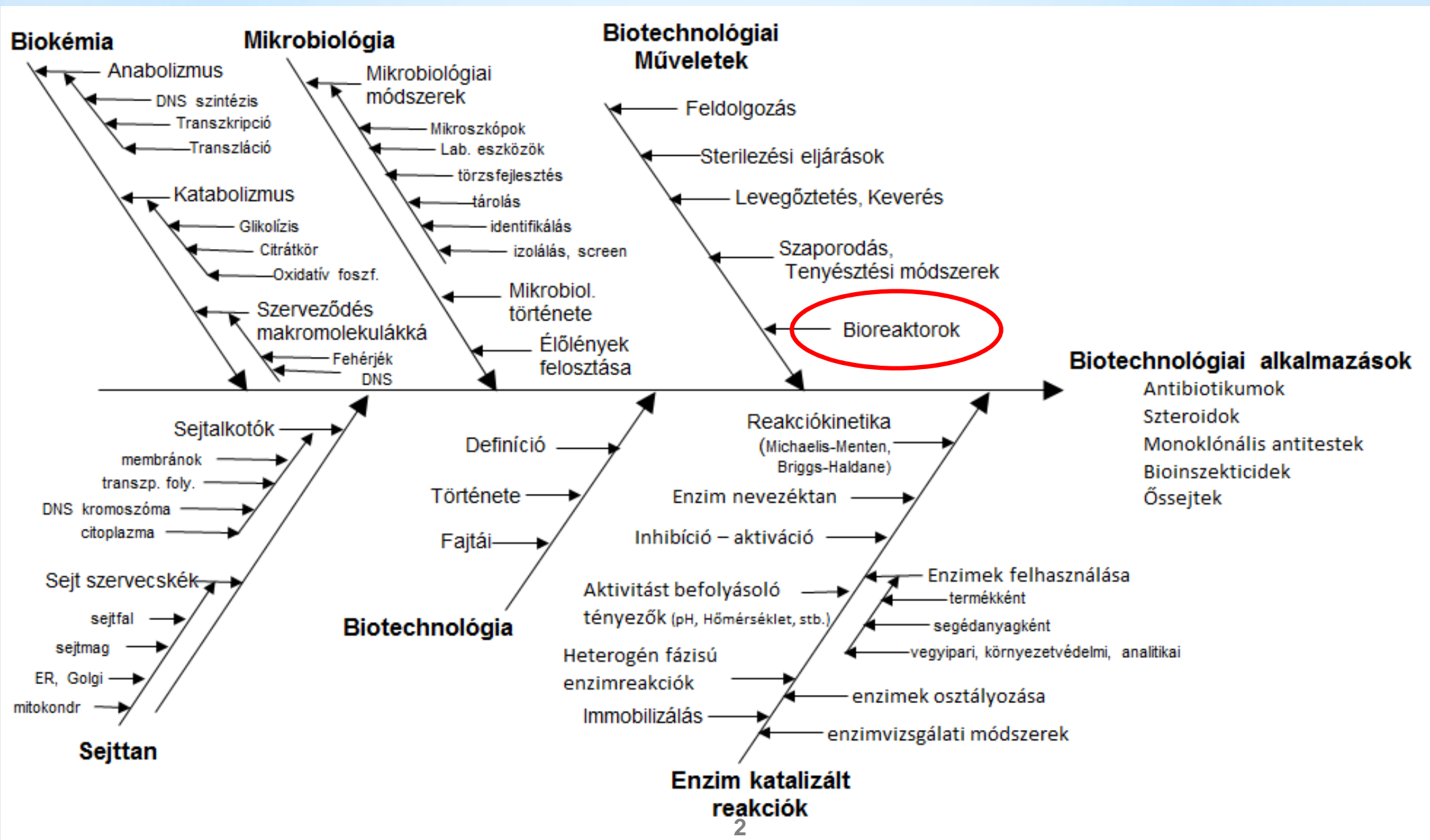
BIOLÓGIA és BIOTECHNOLÓGIA

BMEVEMBM 301

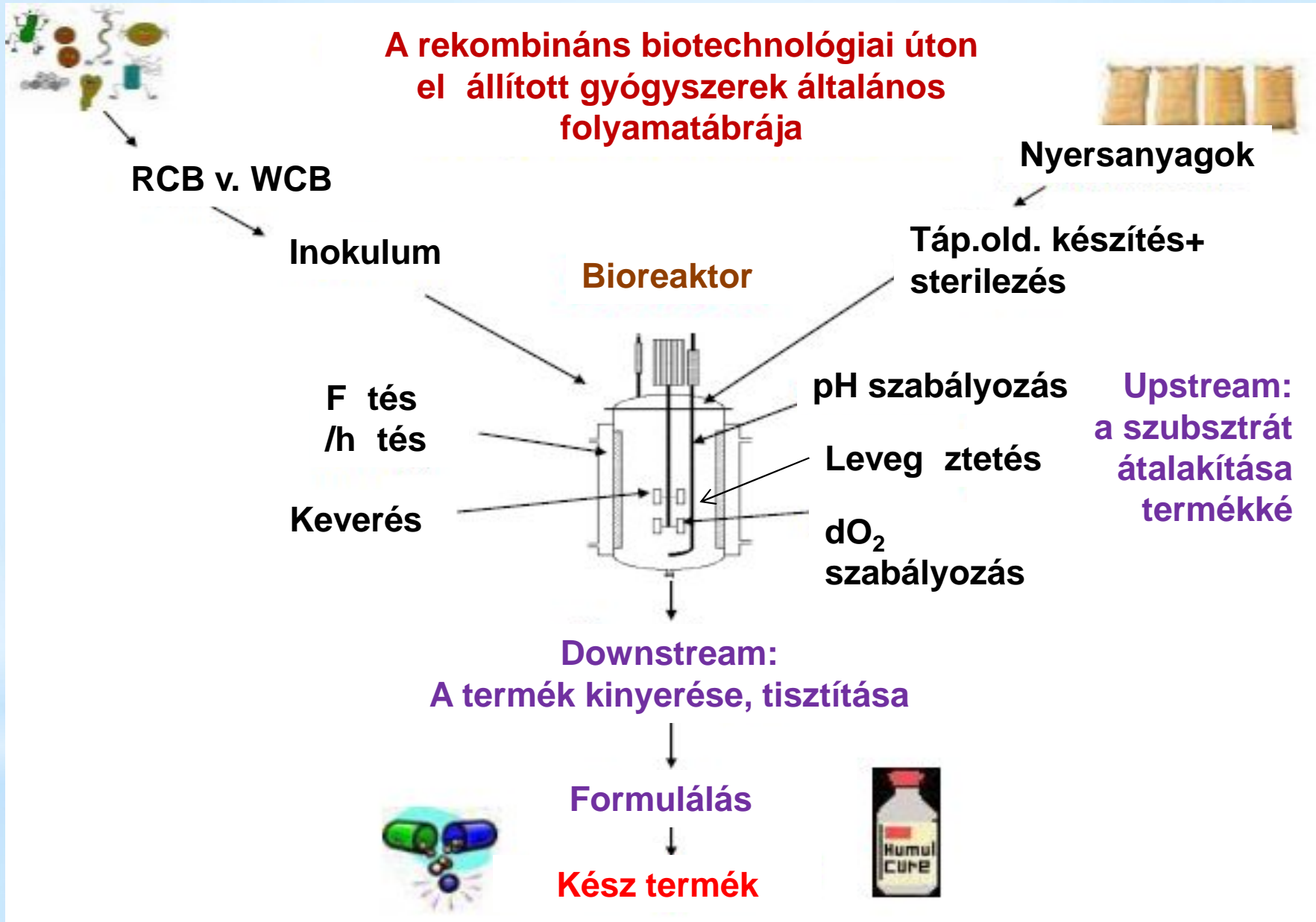
El adó: Ballagi András - címzetes egyetemi tanár, BME
- Technológiai igazgató, Diagon Kft.

4/6. rész

Itt járunk:



A rekombináns biotechnológiai úton el állított gyógyszerek általános folyamatábrája



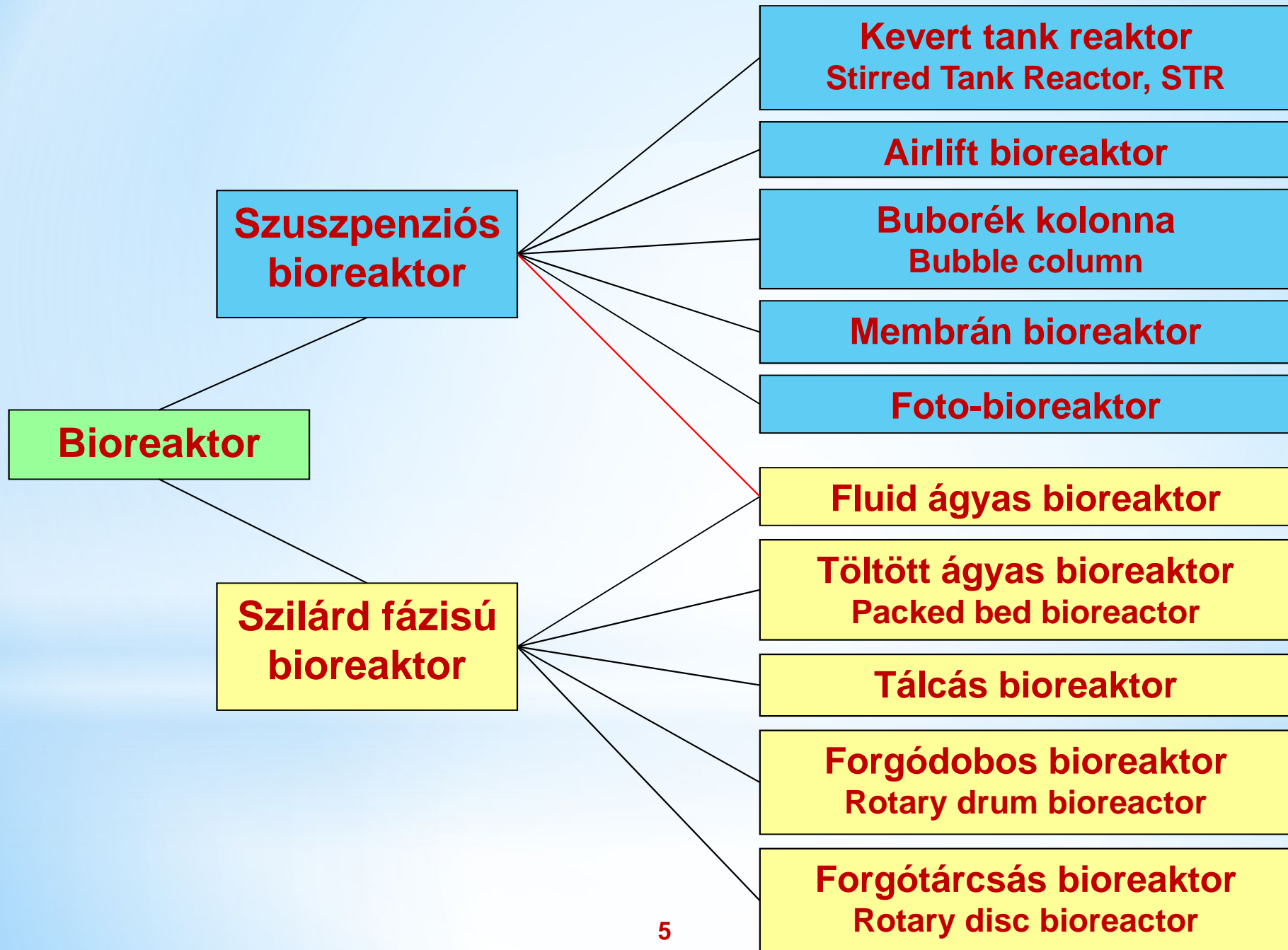
A bioreaktor definíciója

A bioreaktor olyan eszköz, amelyben sejteket lehet tenyészteni és megfelelő fiziológiai körülményeket biztosítani a kívánt termék előállítására érdekében.

A bioreaktor zárt rendszer abból a szempontból, hogy csak a tudatosan alkalmazott mikroorganizmusok tenyésztése folyik benne, más mikroorganizmusok kizárása mellett...

...viszont nyitott abból a szempontból, hogy anyagok (levegő, oxigén, tápanyagok) és energia (fűtés, hűtés, keverés) betáplálása és elvétele történik benne.

A bioreaktorok osztályozása



Kevert tankreaktor

– Stirred Tank Reactor (STR)

vagy Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR)

Szubmerz (felszín alatti)
mikróba, vagy emlős
sejt és növényi sejt
folyadékkultúra
nagy lépték
tenyésztésére.

Hasonló a kémiai
reaktorhoz – hengeres
alak, acél test
(kisebbségénél üveg),
keveréssel,
levegőztetéssel,
érzékelőkkel,
szabályzókkal,
csatlakozó helyekkel
(port) és sterilizálásnál
alkalmazott
alkatrészekkel

Meghajtó motor

pH kontrol, sav lúg
adagolás

Keverő lapát

Habtör

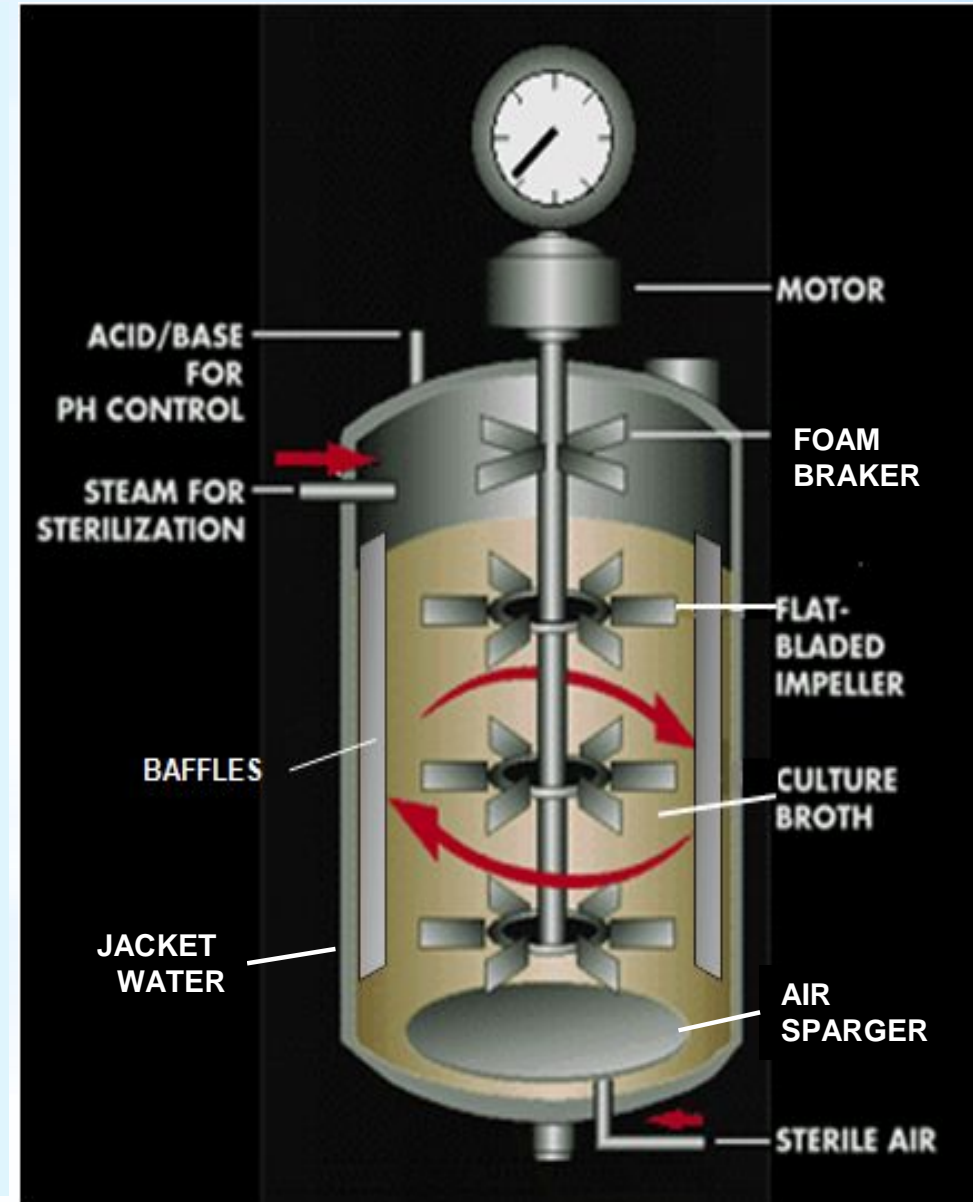
Gáz ki/be

Terelő lemezek
(baffles)

Táplálás

Köpenyvíz ki/be

Levegőztetés cs
(air sparger)



A kevert tankreaktor (folyt.)

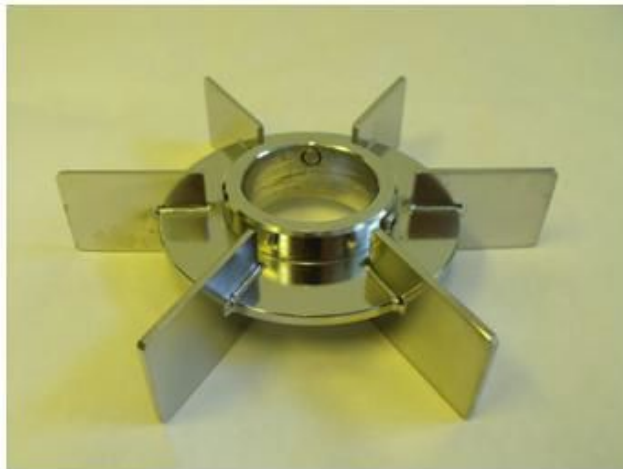
A munkatérfogat kisebb, mint a teljes térfogat. A fejtérfogat kell a habtérnek, és a folyadék „hold-up”-nak.

A h mérséklet szabályozása a köpenytéren, vagy cs spirálon keresztül.

Kevert elem a homogén eloszlás biztosításához és a levegő bekeveréséhez. Nagyobb reaktornál, azonos tengelyen több is.

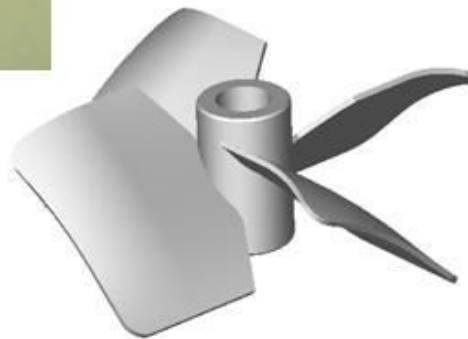
Tör lemezek (baffles) növelik a turbulenciát, keverési tölcsér (vortex) kialakulásának megakadályozása.

A kevert tankreaktorok keverője



Rushton-turbina

Propeller
axiális keverő
„elefántfül”



Maxflo és Lightning
axiális keverők



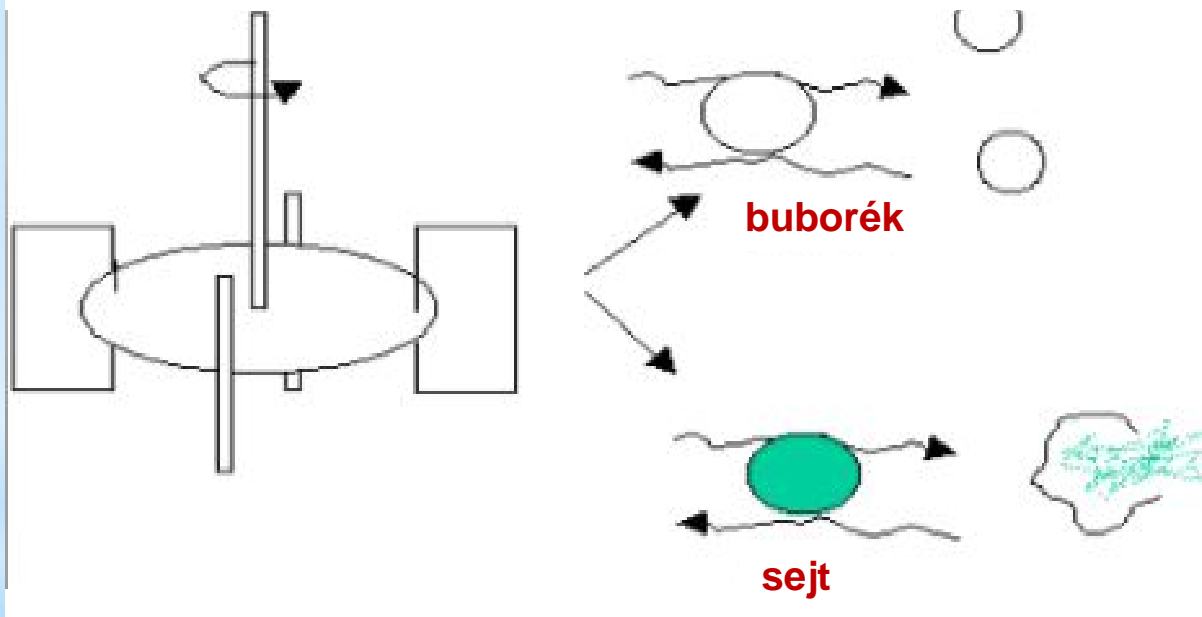
Chemineer CD-6



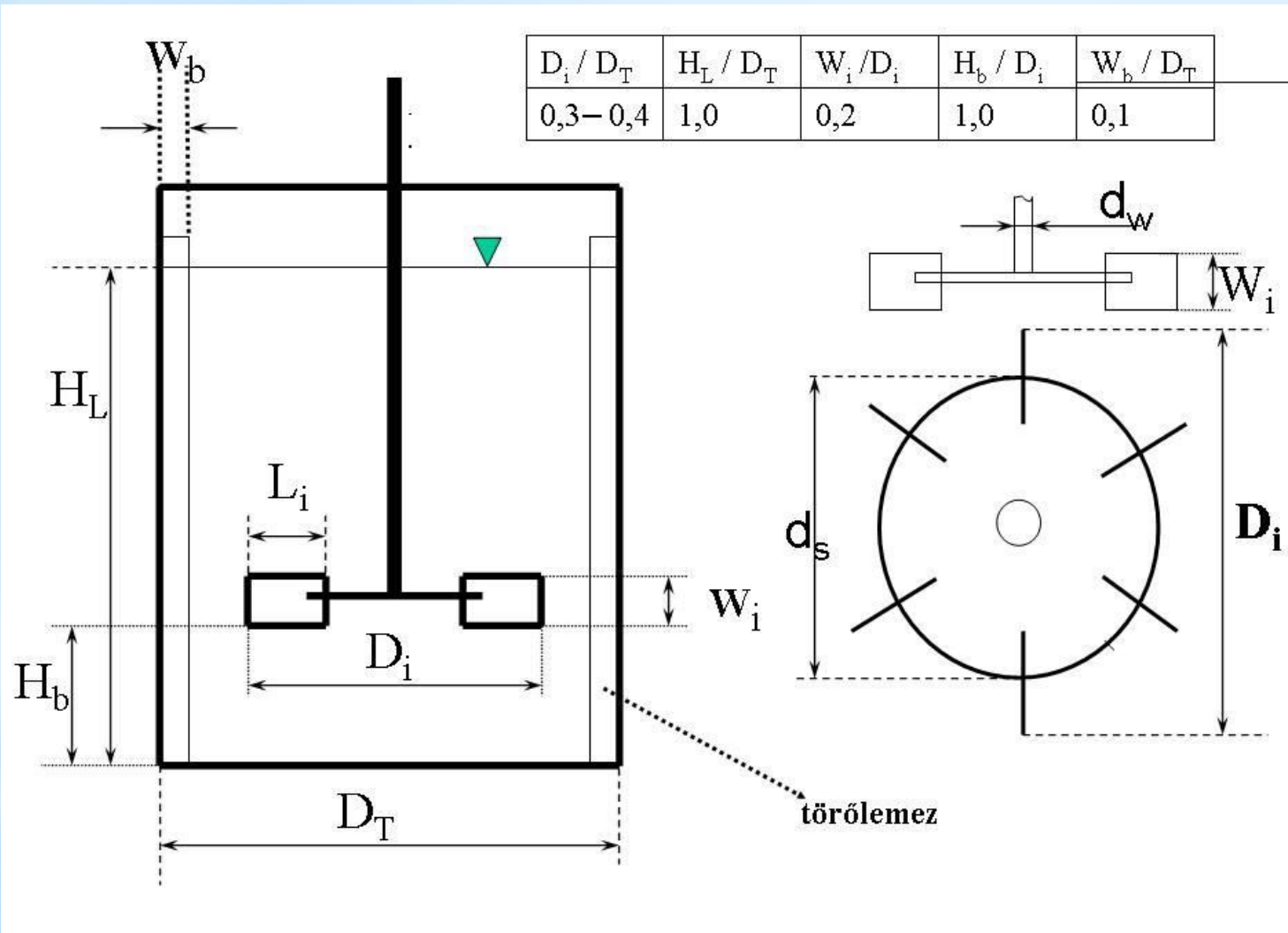
Chemineer BT-6

Rushton turbina

A Rushton turbina nagy nyíróerők kialakítására képes, amely kis buborékméreteket, ezen keresztül nagyobb víz-levegő felületet biztosít, de káros lehet az arra érzékeny sejtek esetében.



A kevert tankreaktor geometriája



Térfogat: 1 – 500 000 lit.
(eml s sejteknél kb. 20 000 lit.-ig)
Geometriai arányok
lényegesek a
leveg ztetés és a
keverés szempontjából.
Pl. magasság : átmér
arány 1:1-t l, 6:1-ig.

Kevert tankreaktor folyt.

Levegőztetés kompresszorral (olaj és vízmentes), a térfogatáram mérése árammérővel. Levegő sterilizáció szűrővel. Bejuttatás levegőztető csövön, a cső végén egy nagyobb lyuk, több kis furat vagy szinterezett üveg



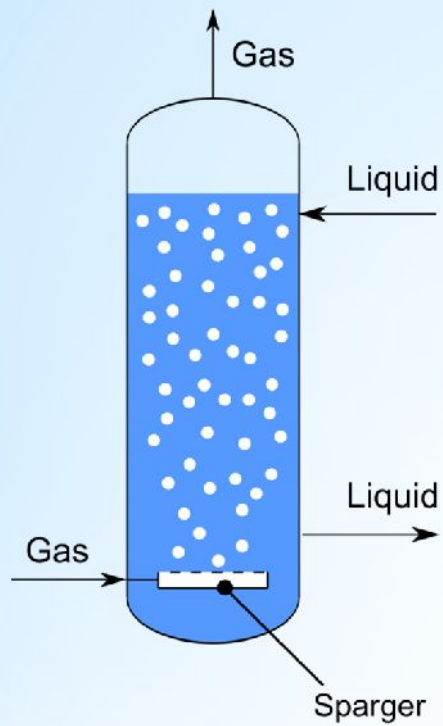
pH szabályozás: elektródák és hőmérséklet szabályzó áramkörhöz kapcsolva. Sav vagy lúg automatikusan adagolva szabályzási igény szerint.

Habzás elkerülése: habérzékelő szonda, felületaktív anyag (pl. szilikonolaj stb.) adagolása.

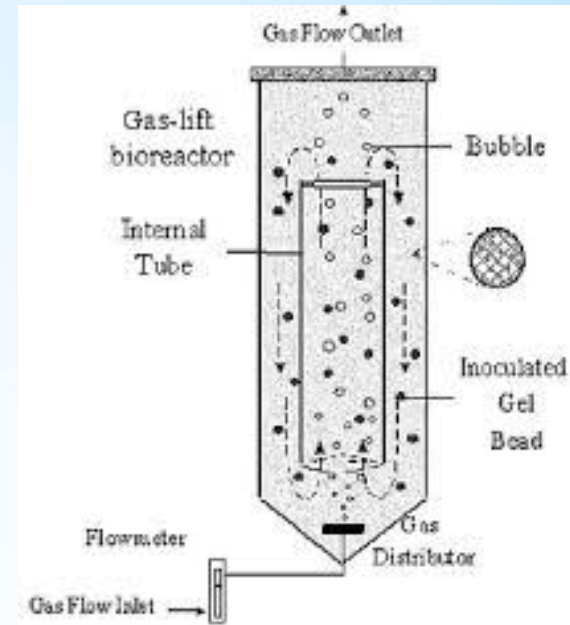
Csatlakozó nyílások: elektródák, adagolások, mintavétel, ürítés



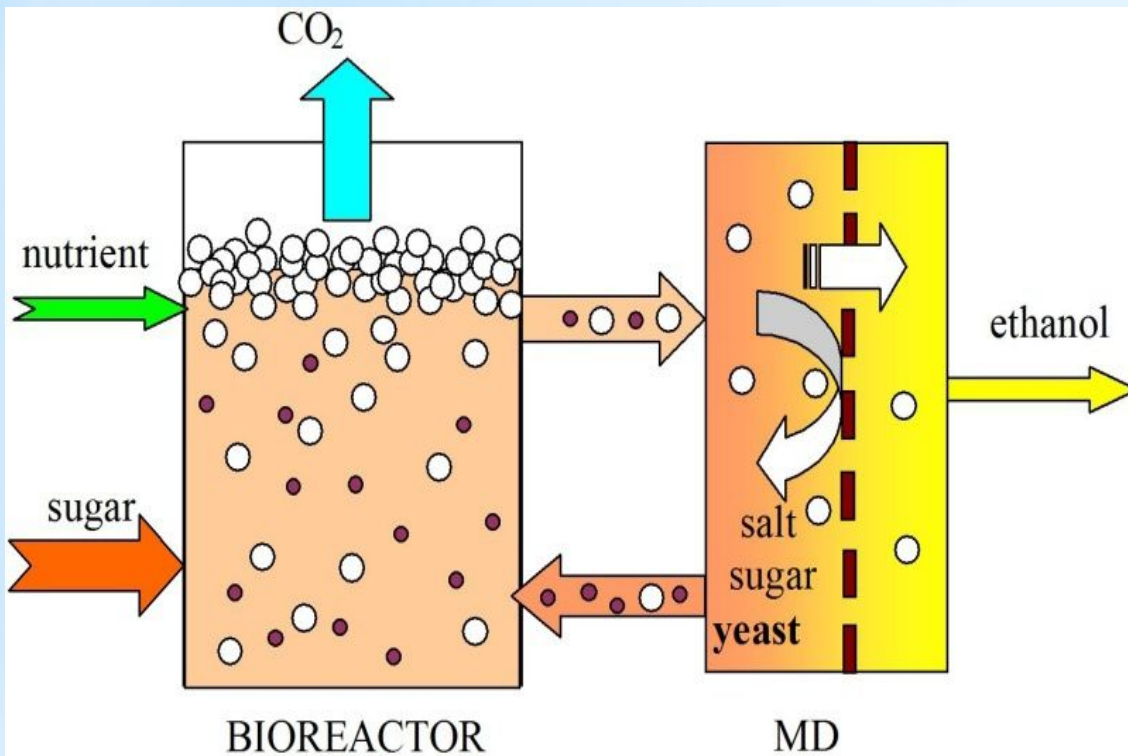
Buborék kolonna



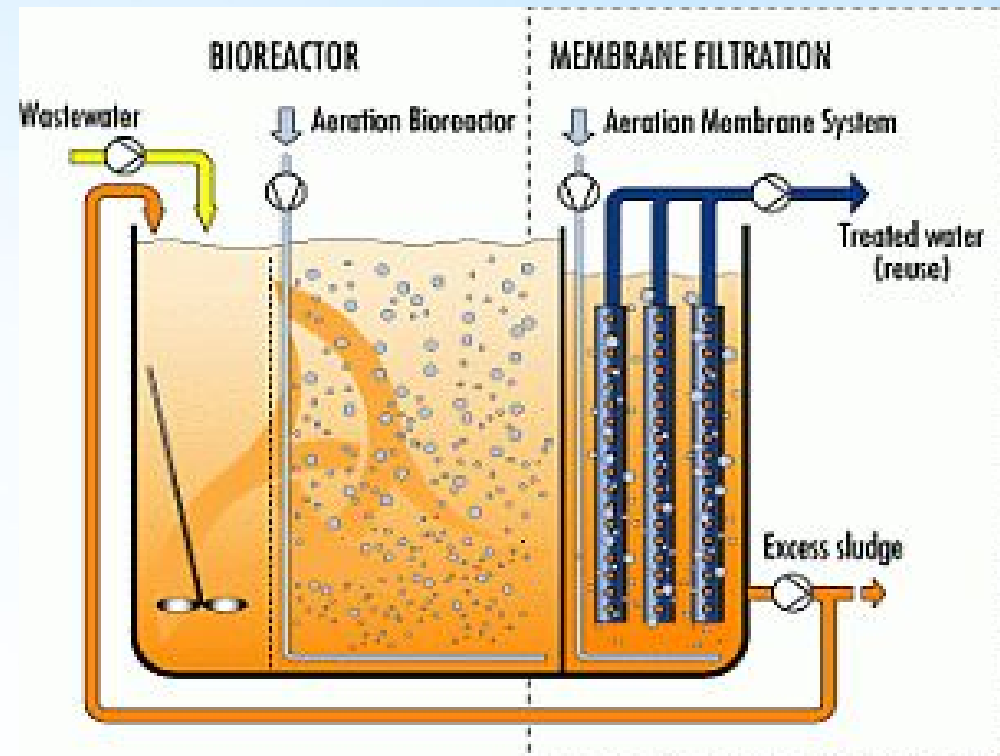
Airlift bioreaktor



Membrán bioreaktor



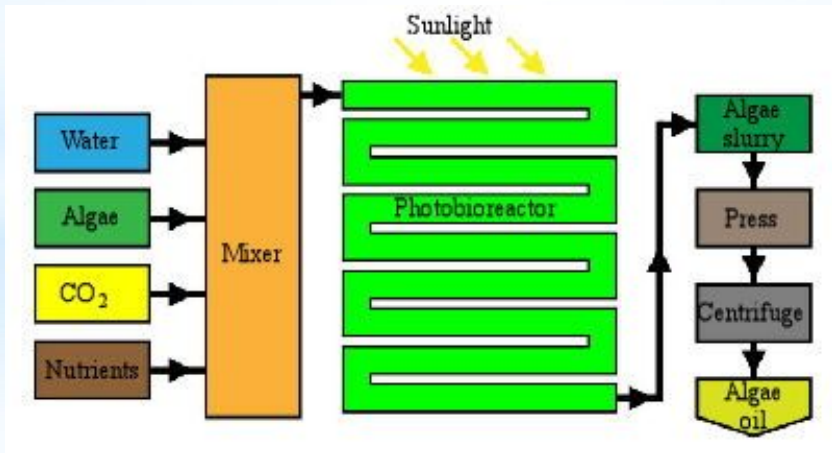
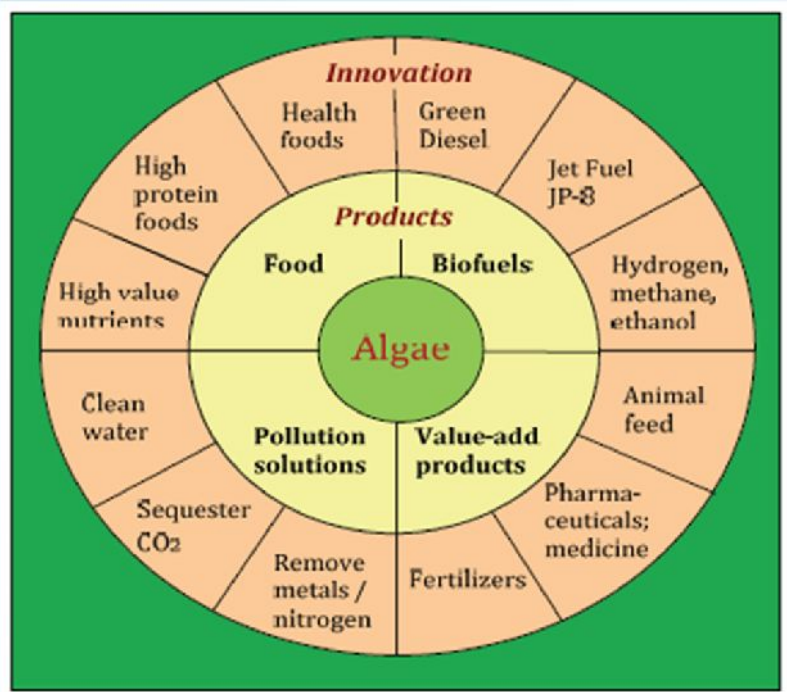
Alkohol termelés élesztővel



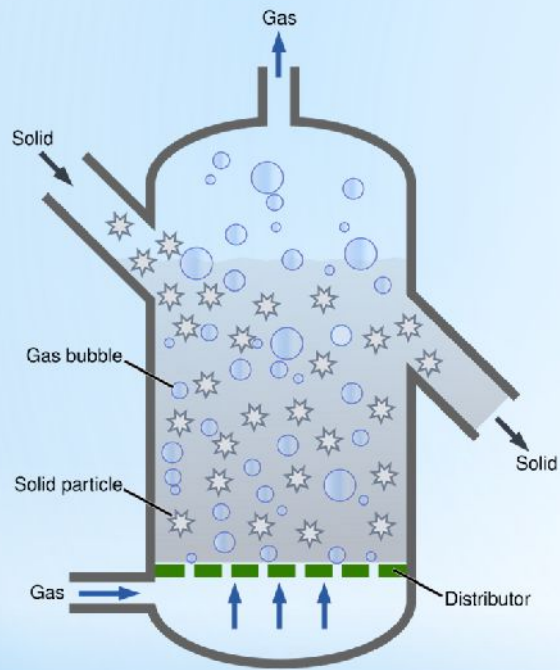
**Olaj és gázipari
szennyvíztisztítás**



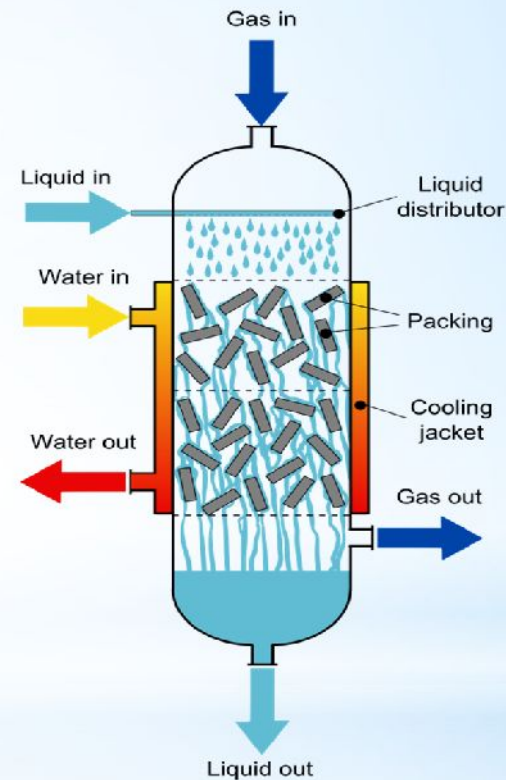
Foto-bioreaktor



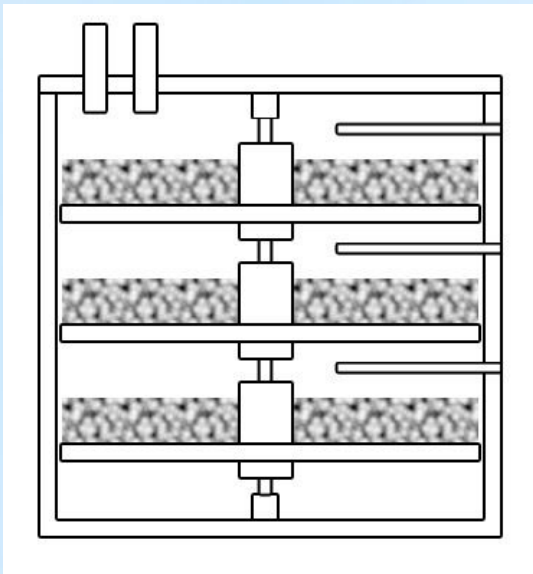
Fluid ágyas bioreaktor (Fluid bed bioreactor)



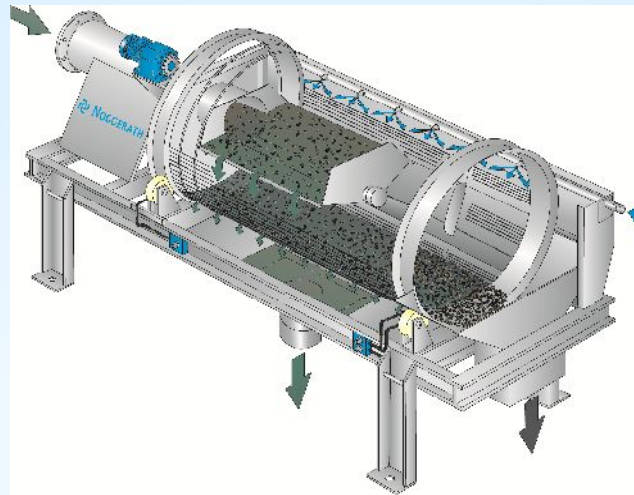
Töltött ágyas bioreaktor (Packed bed bioreactor)



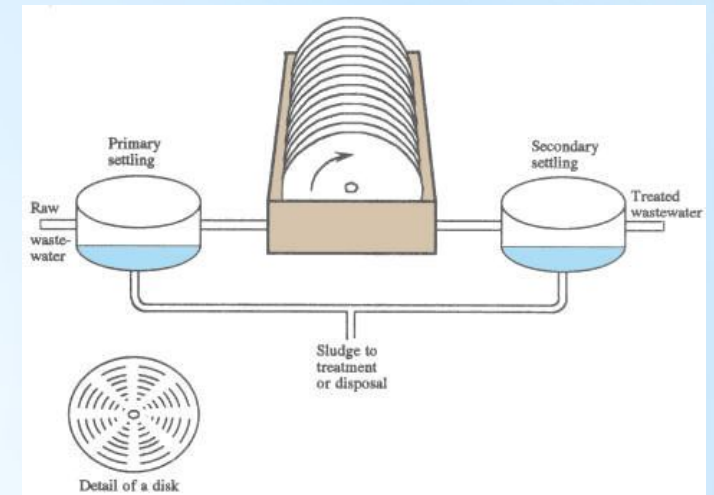
Tálcás bioreaktor



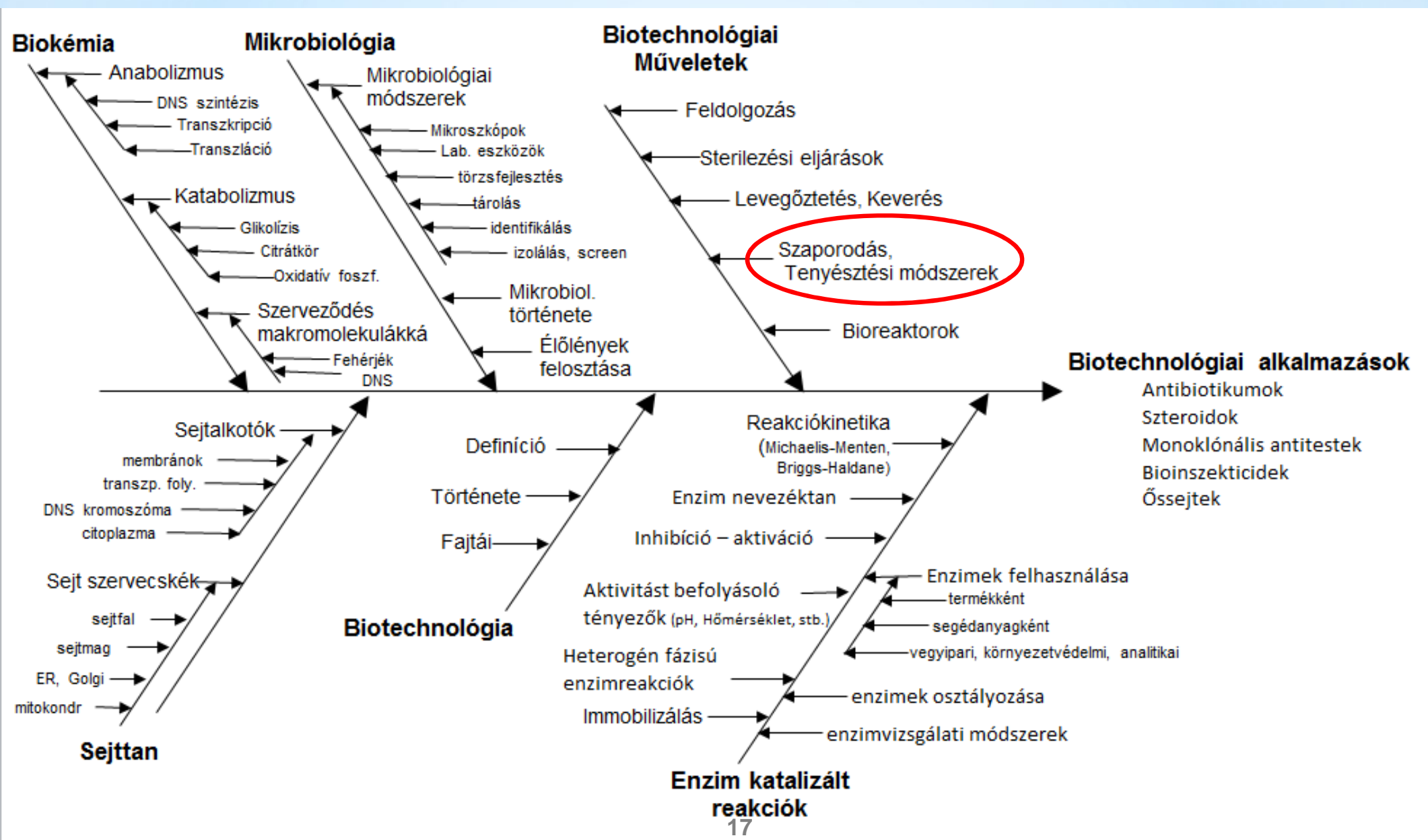
Forgódobos bior. Rotary drum bior,



Forgótárcsás bior. Rotary disc bior.

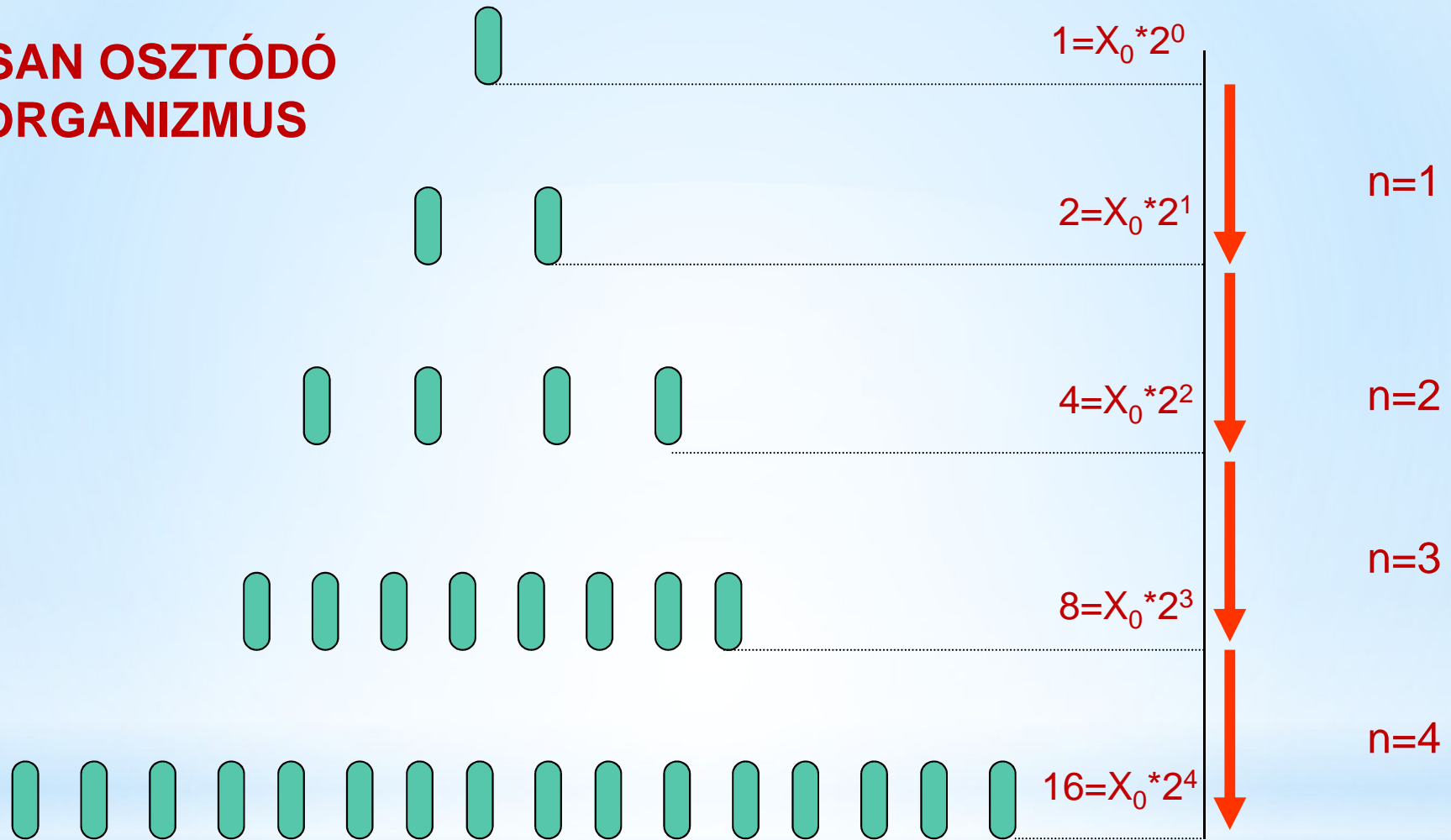


Itt járunk:



A mikroba szaporodás alapösszefüggései

BINÁRISAN OSZTÓDÓ MIKROORGANIZMUS



·
·
n: a generációk száma
 $X=X_0 \cdot 2^n$

A mikroba szaporodás alapösszefüggései

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

a generációk száma

Generációs id - 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



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



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

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



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

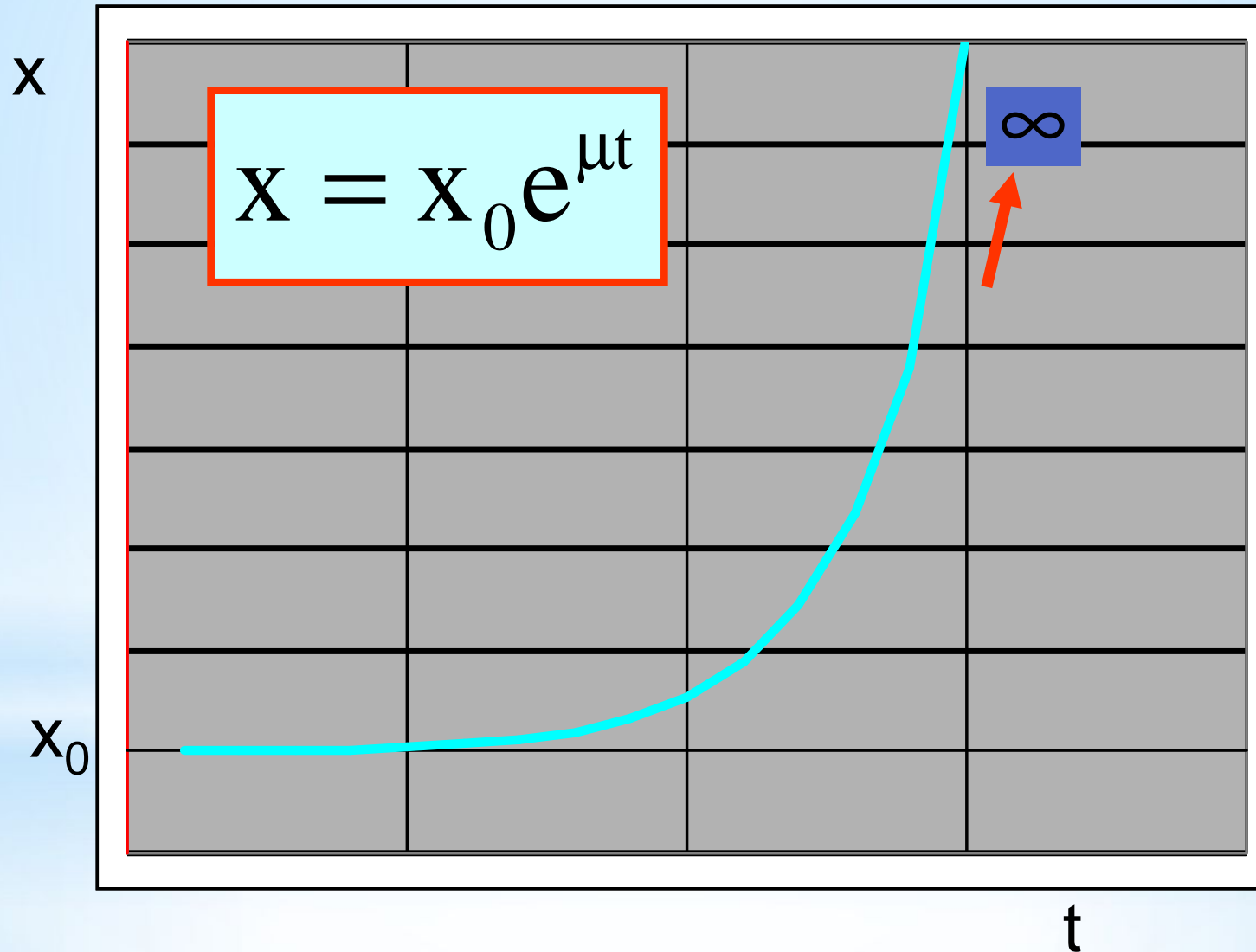


v : fajlagos szaporodási sebesség

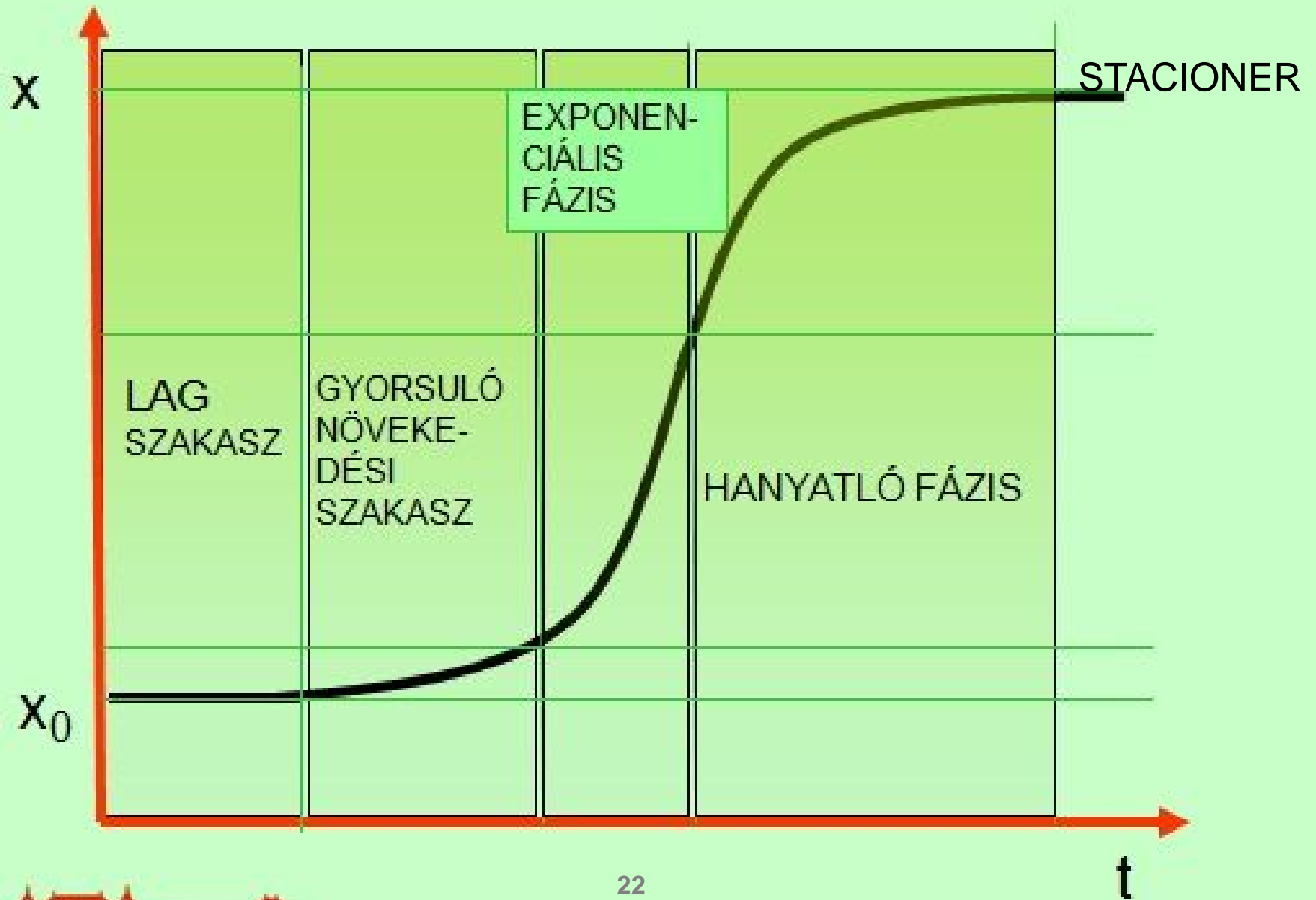
μ és a generációs id kapcsolata:

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

A mikroba szaporodás alapösszefüggései



A mikroba szaporodás alapösszefüggései



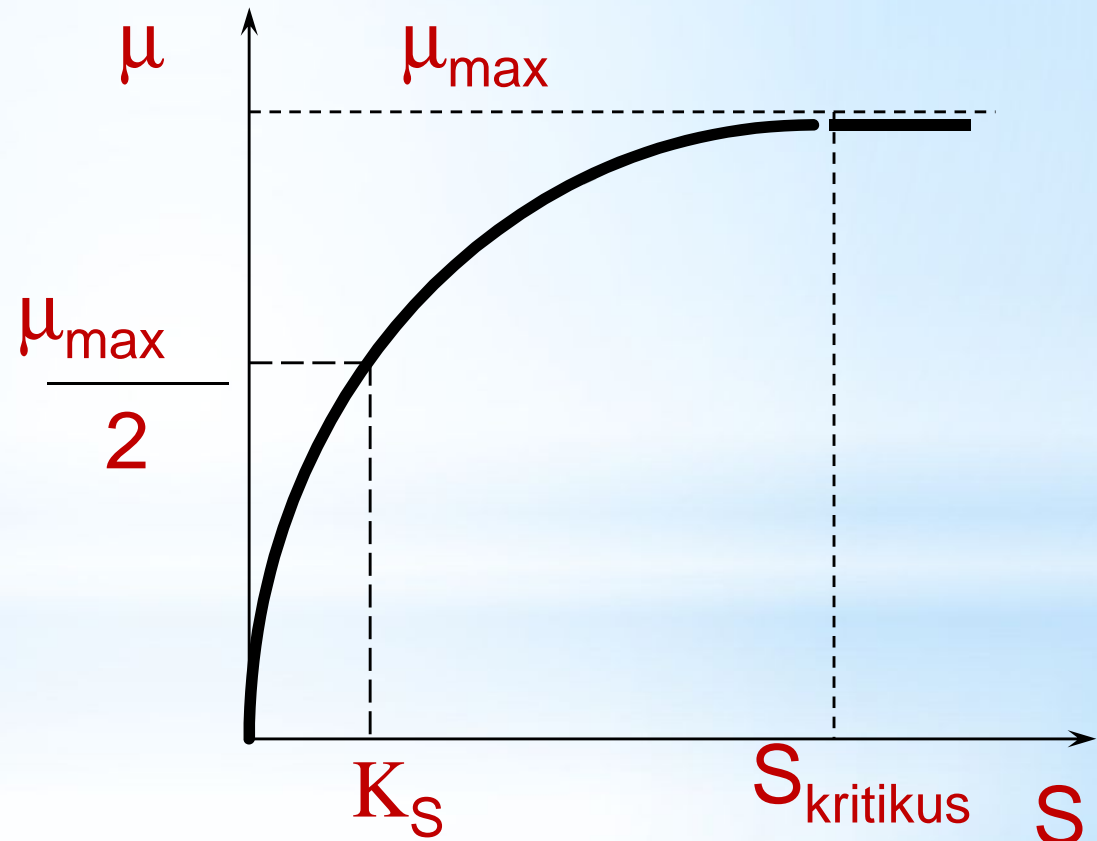
A mikroba szaporodás alapösszefüggései

Mi az oka a hanyatló fázisnak?

1. Tápanyag limitáció
2. Toxikus metabolit termék(ek)
3. Helyhiány

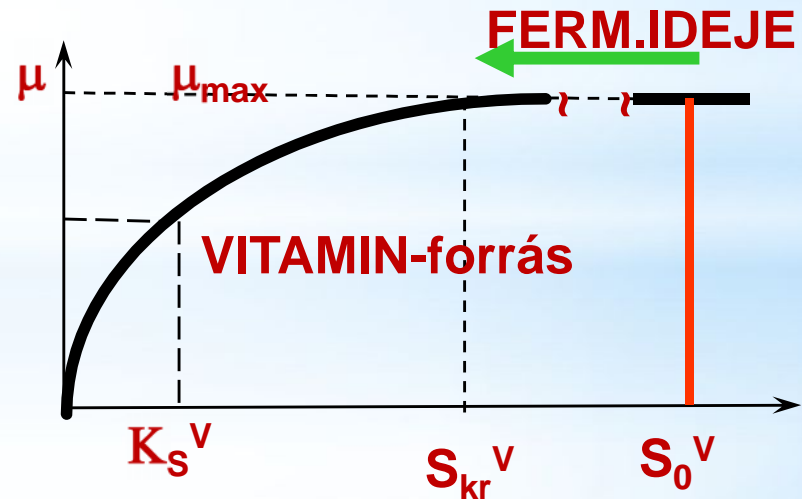
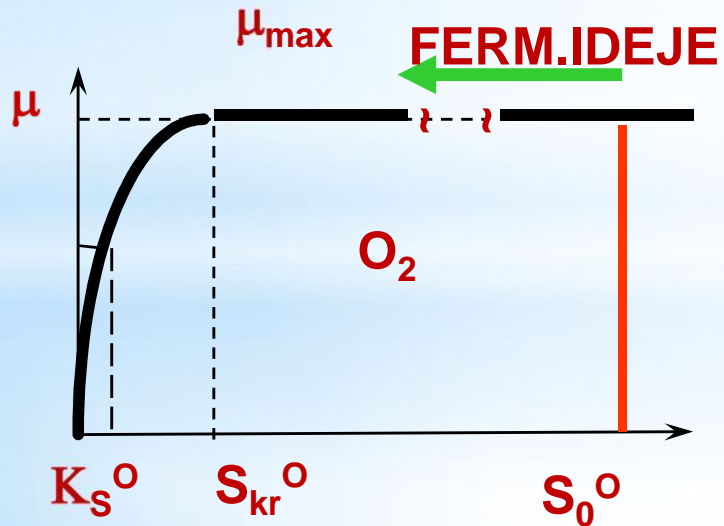
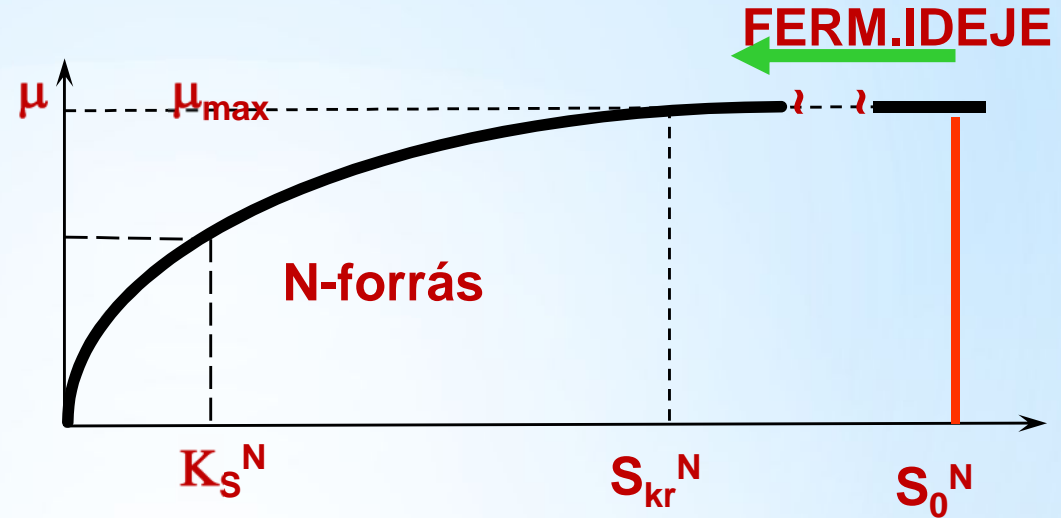
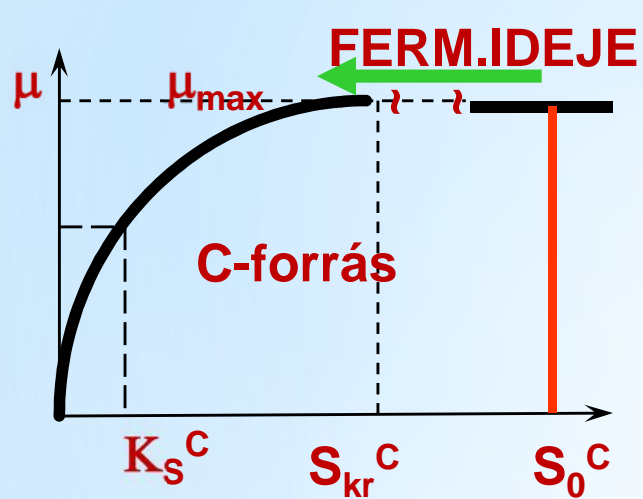
MONOD- modell

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



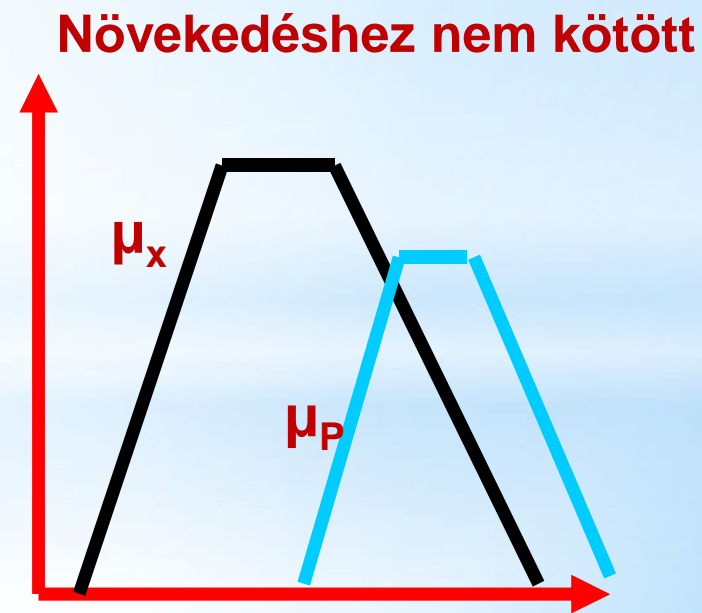
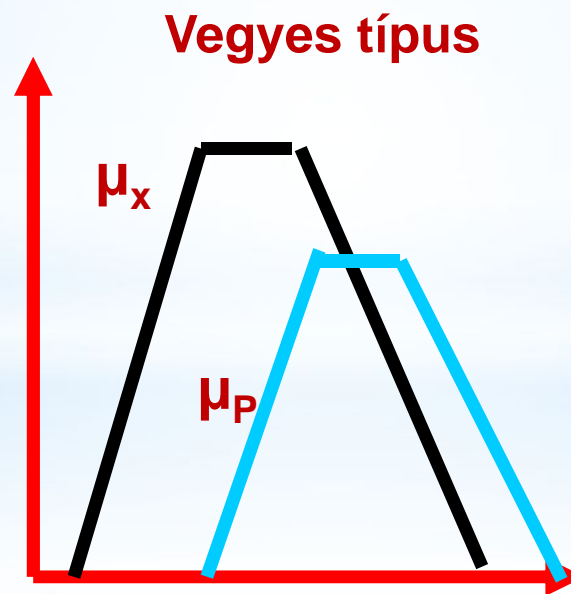
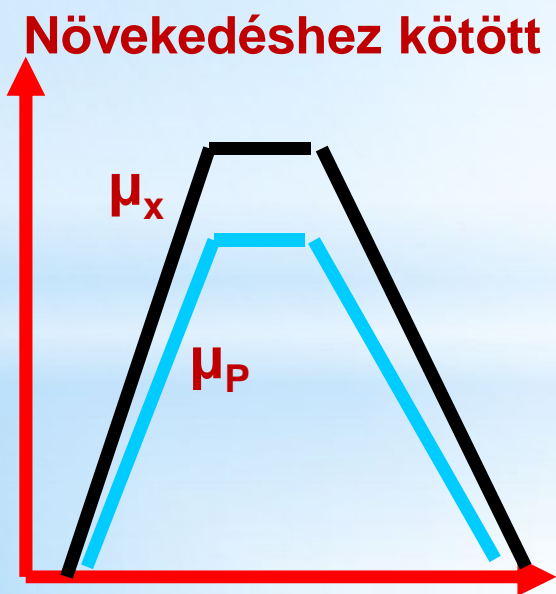
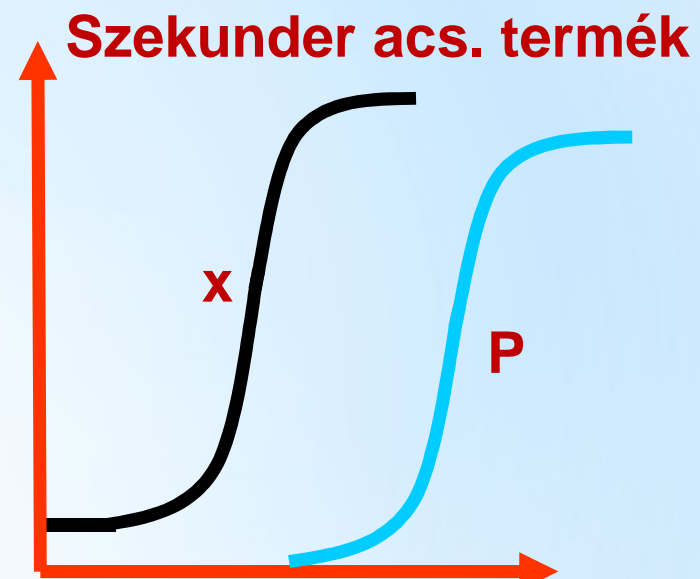
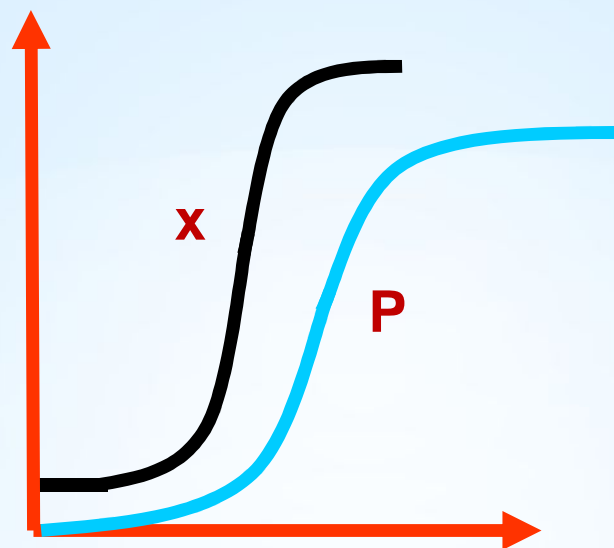
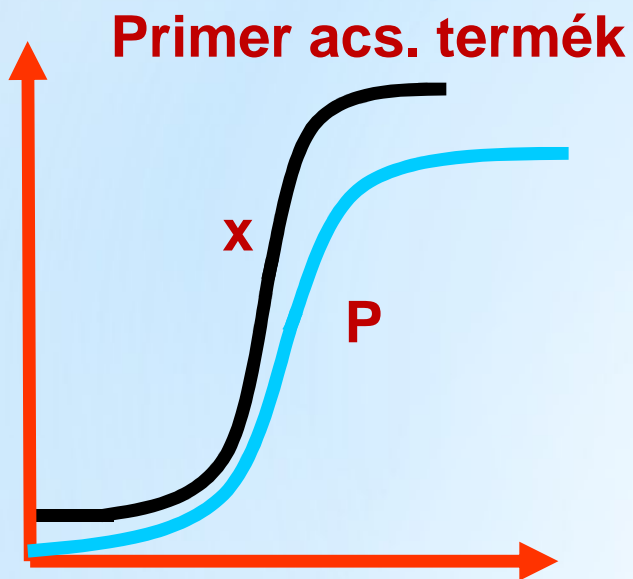
A mikrobaszaporodás alapösszefüggései

Melyik lesz a limitáló szubsztrát?



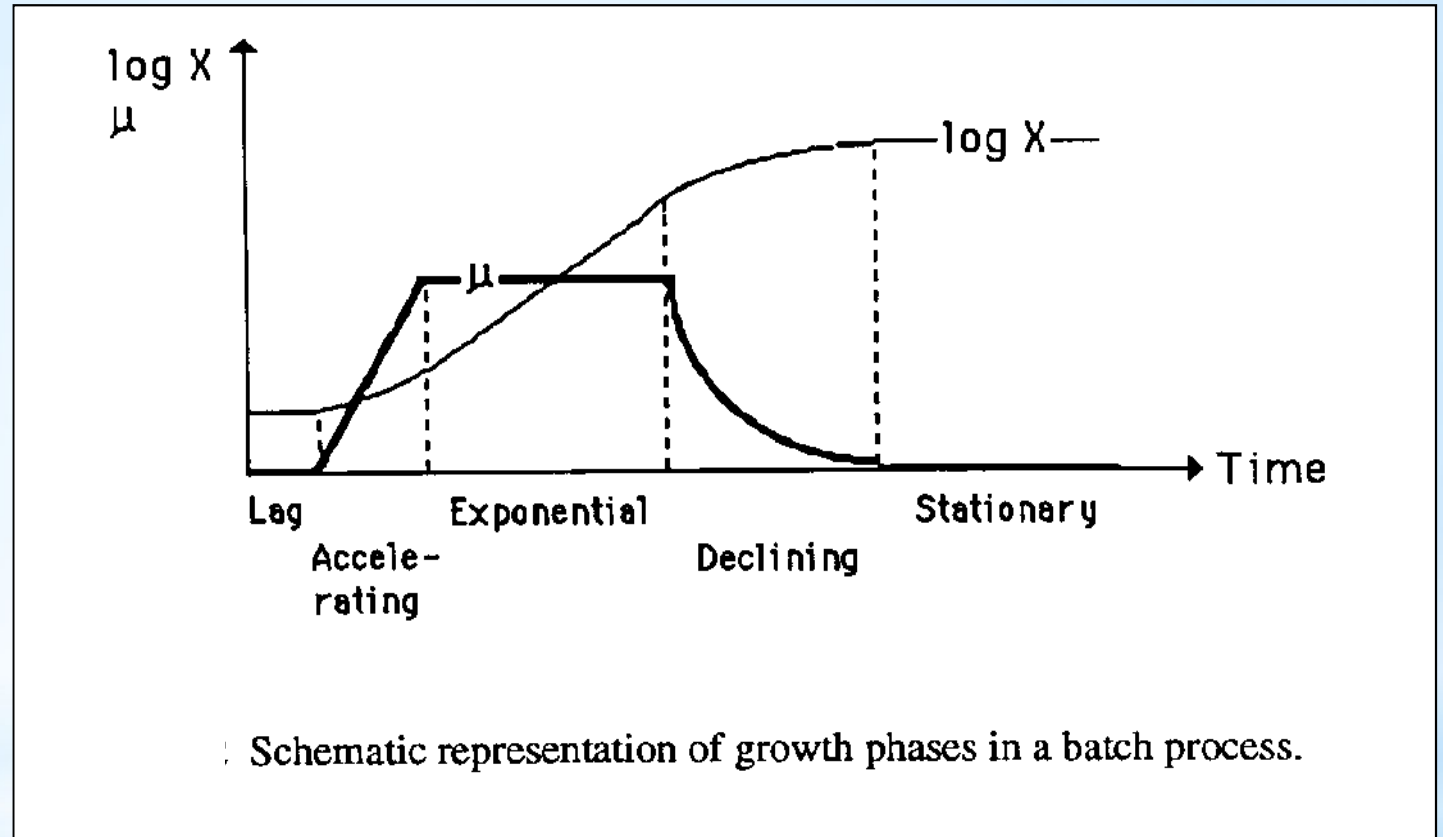
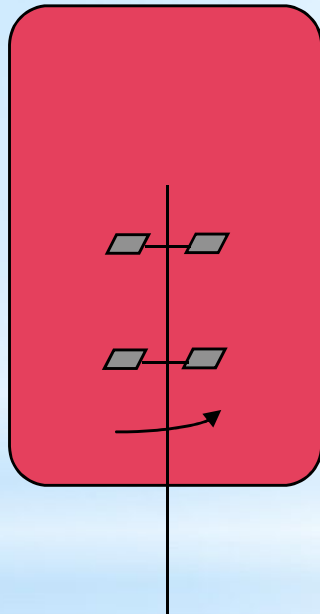
MONOD modell-család

GAEDEN-féle termékképződési típusok



Tenyésztési módszerek: Sejtek szakaszos tenyésztése

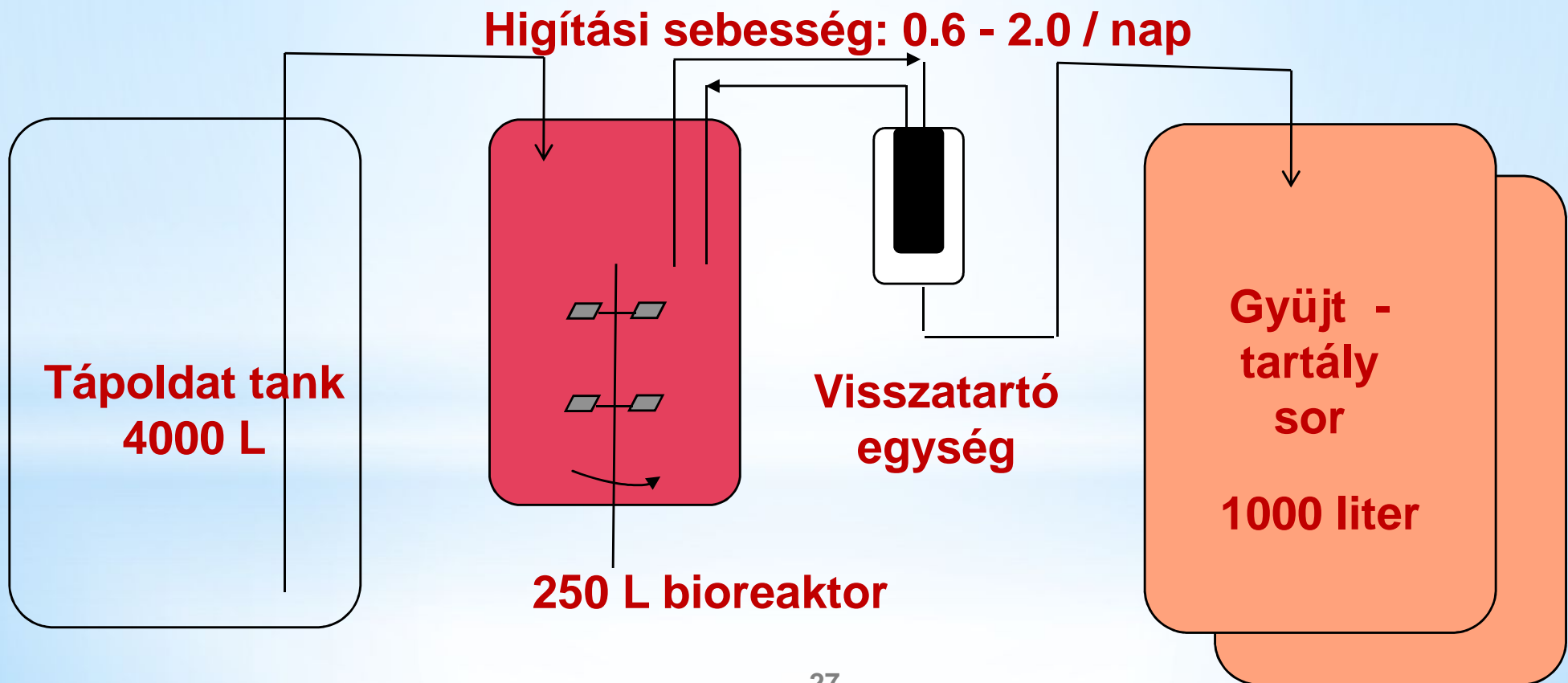
Kevert tankreaktor szubmerz tenyésztés



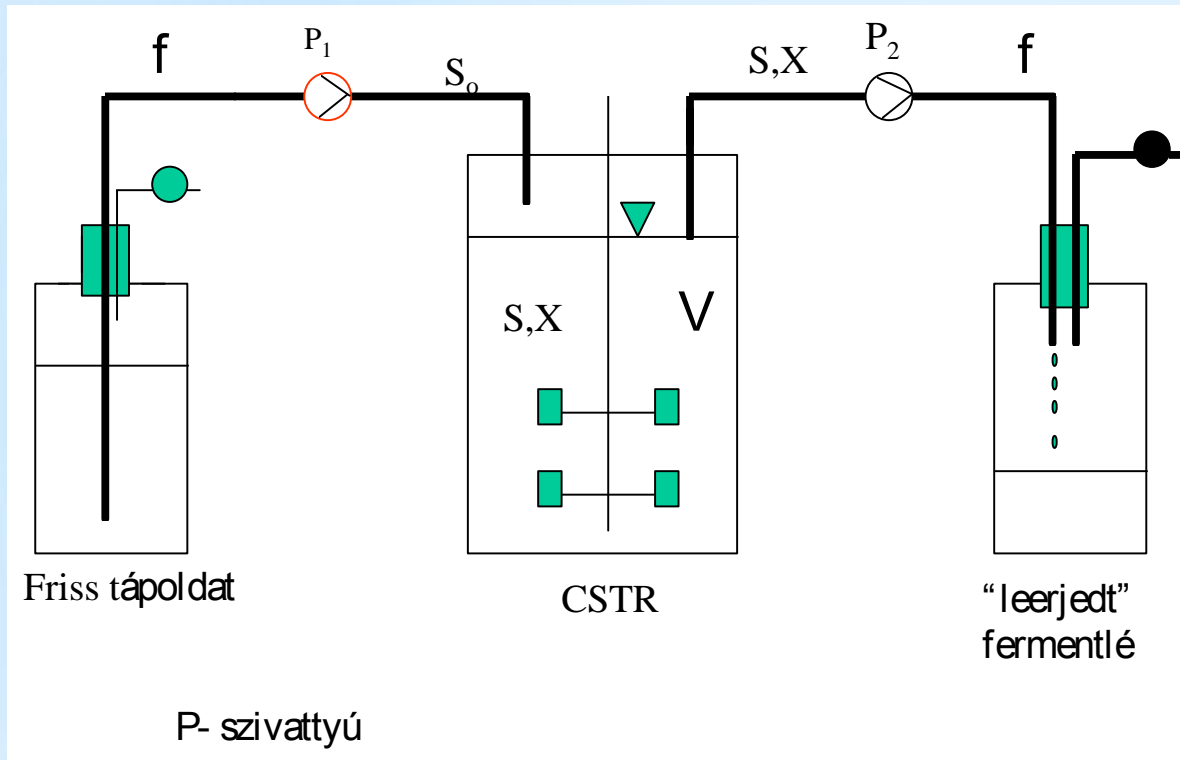
Tenyésztési módszerek: Folyamatos tenyésztés

Kevert tank reaktorban szubmerz tenyésztés folyamatos átfolyással. Ha a sejteket visszatartjuk a reaktorban, akkor perfúziós technikáról beszélünk.

Van olyan perfúziós technika, ahol a termék is visszatartásra kerül, csak a sejtmentes és termékmentes elhasznált tápoldat távozik.



Folyamatos tenyésztés



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

D: hígítási 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

Az $\frac{dx}{dt}$ és $\frac{dS}{dt}$ két egyenletet osszuk el V -vel:

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:

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

$$\mu = D$$

$$D = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad \text{illetve} \quad \bar{S} = \frac{K_S D}{\mu_{\max} - D}$$

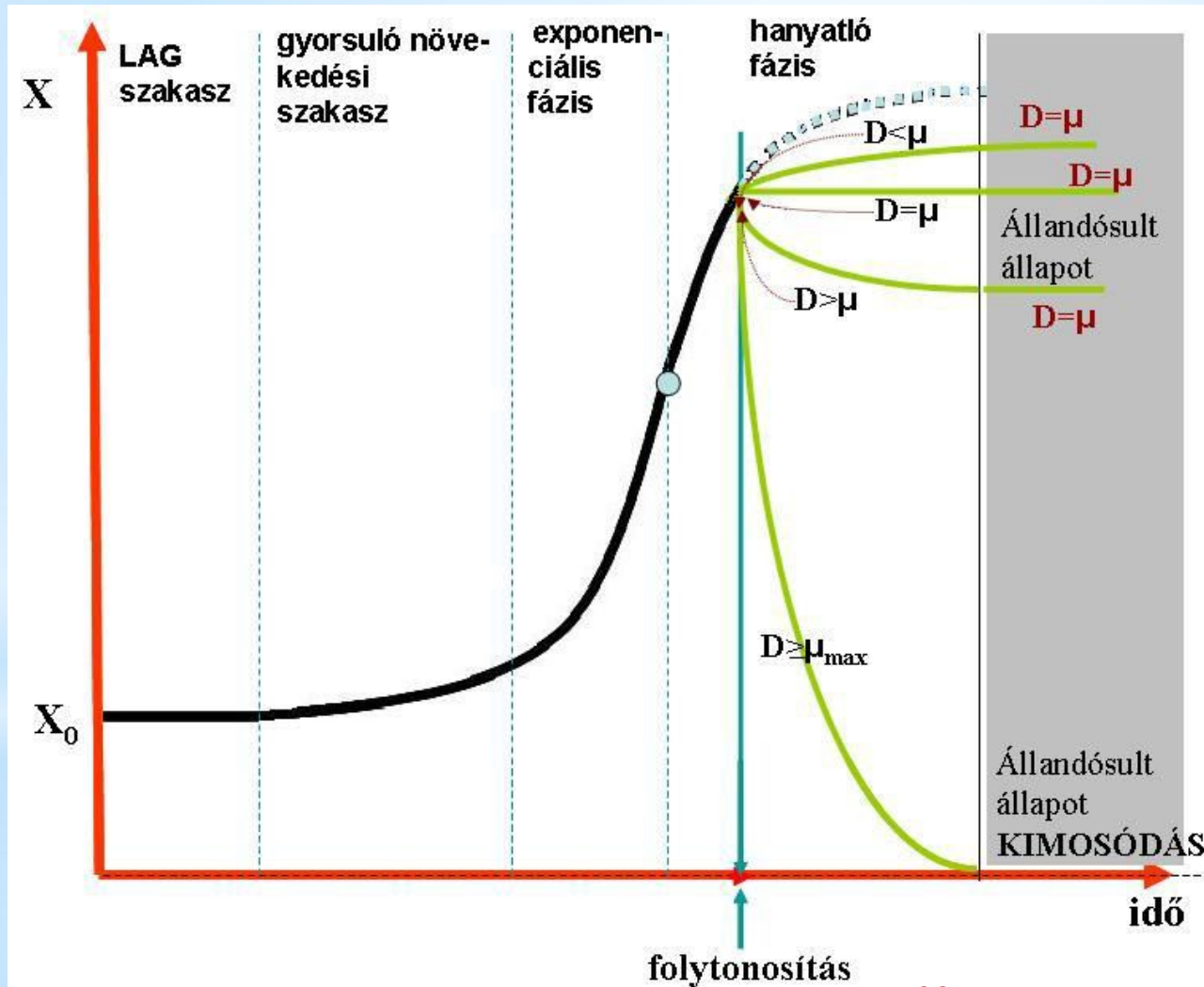
$$D(S_0 - \bar{S}) = \frac{\mu x}{Y}$$

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

Folytonos fermentáció

Tranziens viselkedés

Indulás szakaszáról, áttérés a folytonosra



Mindig csak itt üzemelhet!

A rátáplálásos (Fed-batch) tenyésztés

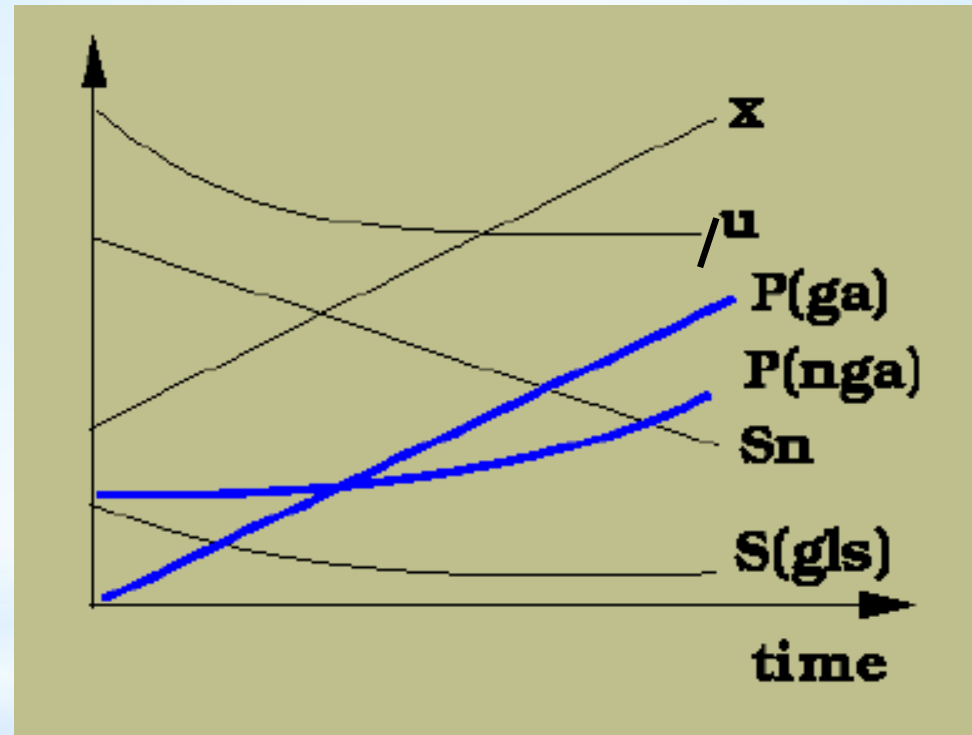
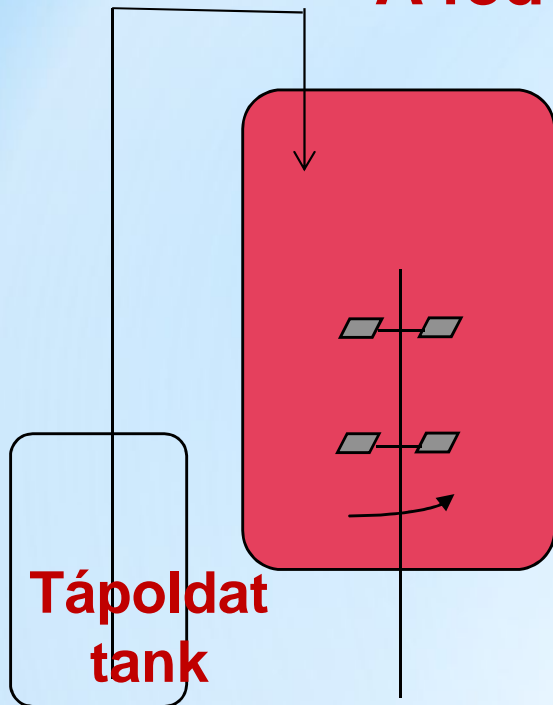
A hanyatló fázis meghosszabbításaként értelmezhetjük a fed batch technikát, állandó, változó vagy periódikus módon friss tápanyago(ka)t adagolunk a rendszerbe, elvétel nincs, állandóan növekvő térfogat.

alacsony állandó szint S koncentráció (pl. sűrű élesztő fermentációban a túl magas glükóz koncentráció oxigén jelenlétében is alkoholtermeléshez vezet, ami gazdaságtalan.)

magas állandó S koncentráció fenntartása (pl. citromsav fermentációban)

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

A fed-batch tenyésztés növekedési görbéje



Sejtkoncentráció

Fajlagos növ. sebesség

Termékképz. növ. kötött

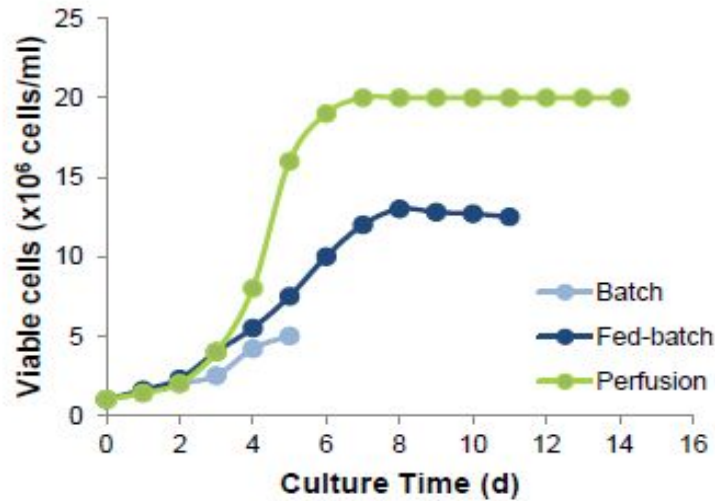
Termékképz. növ. független

Nem-limitáló szubsztrát

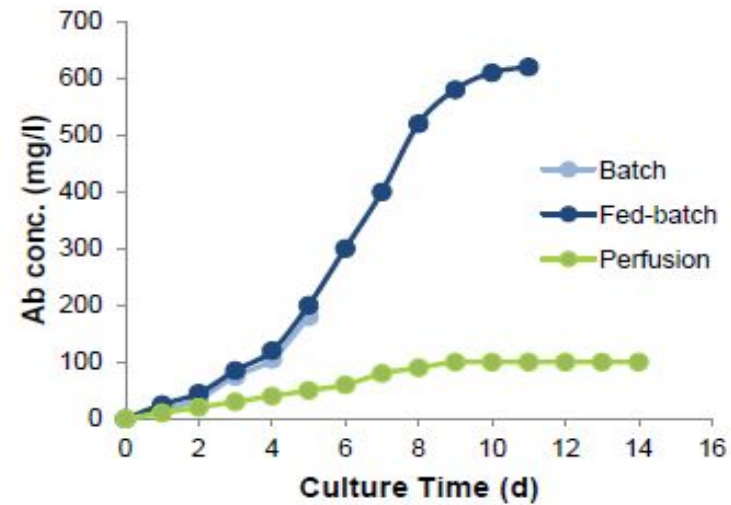
Limitáló szubsztrát

A tenyésztési technológiák összehasonlítása

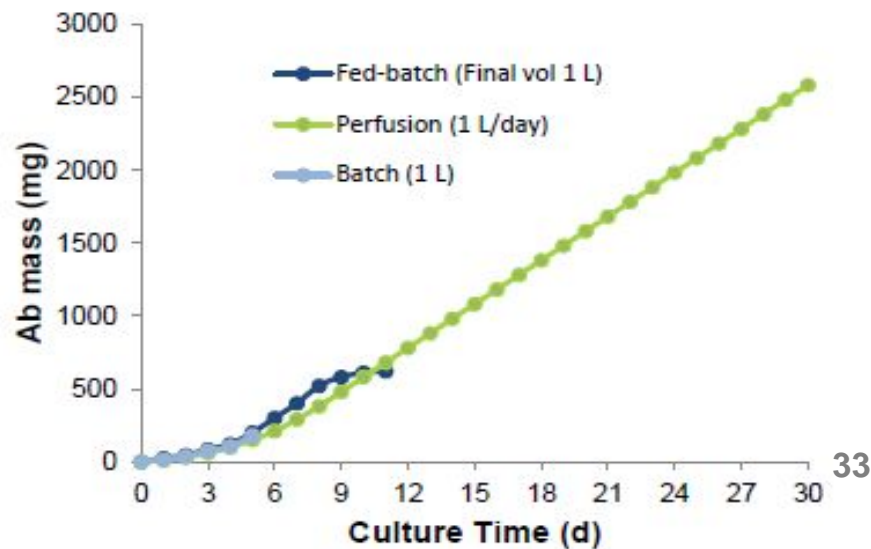
Number of Viable Cells



Antibody Titre



Product Mass



Perfusion : 2600 mg
Fed-Batch : 620 mg
Batch : 180 mg

A fermentációs eljárások optimalizálása

Táptalaj összetevők (inokulum, f táptalaj)

Oxigénellátás (keverés, buborékoltatás)

H mérséklet

pH

Inokulum (oltótenyészet) mennyisége

Inokulum kora

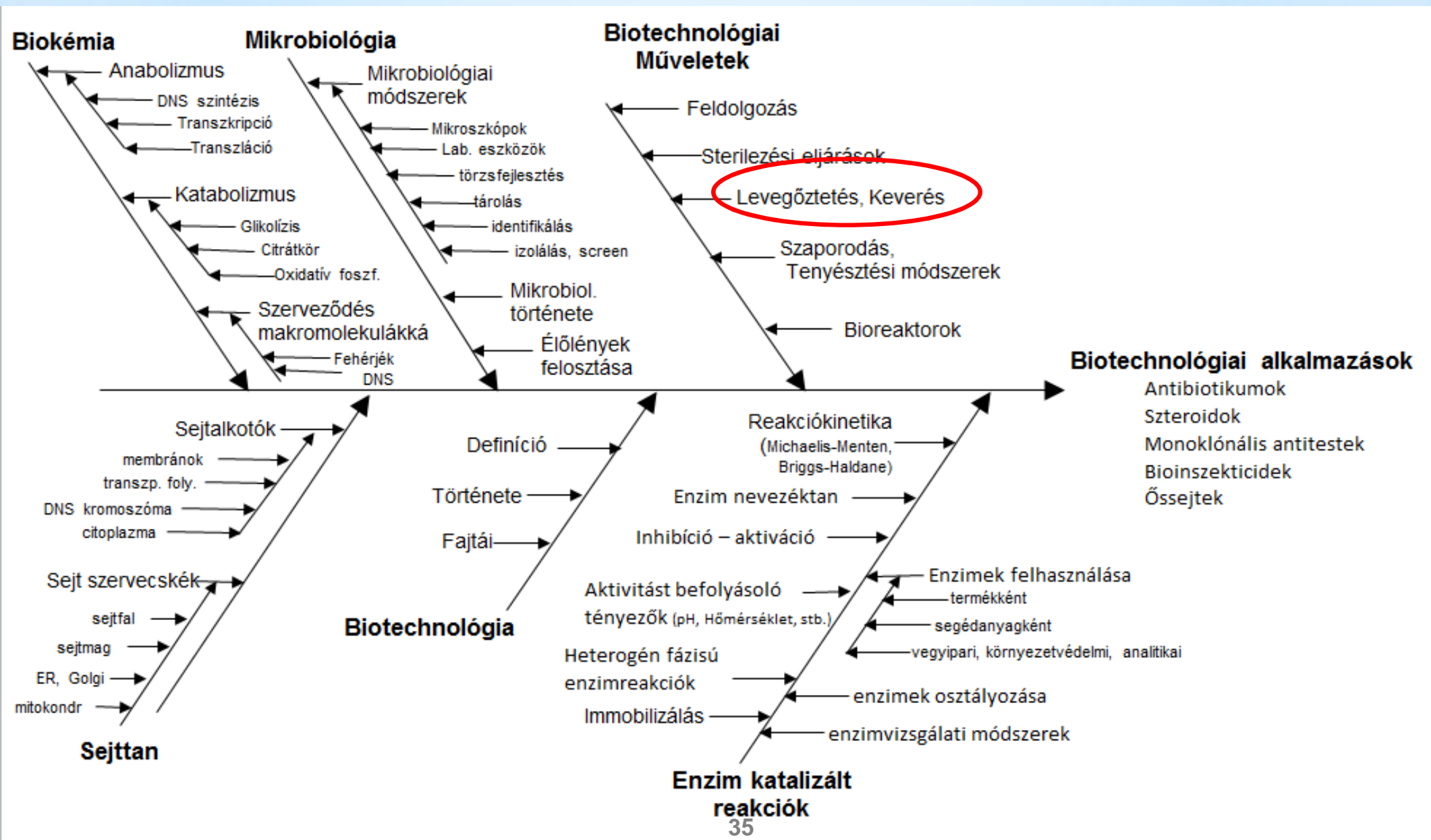
Tenyésztés ideje

Indukció (ha van) időpontja

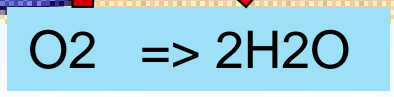
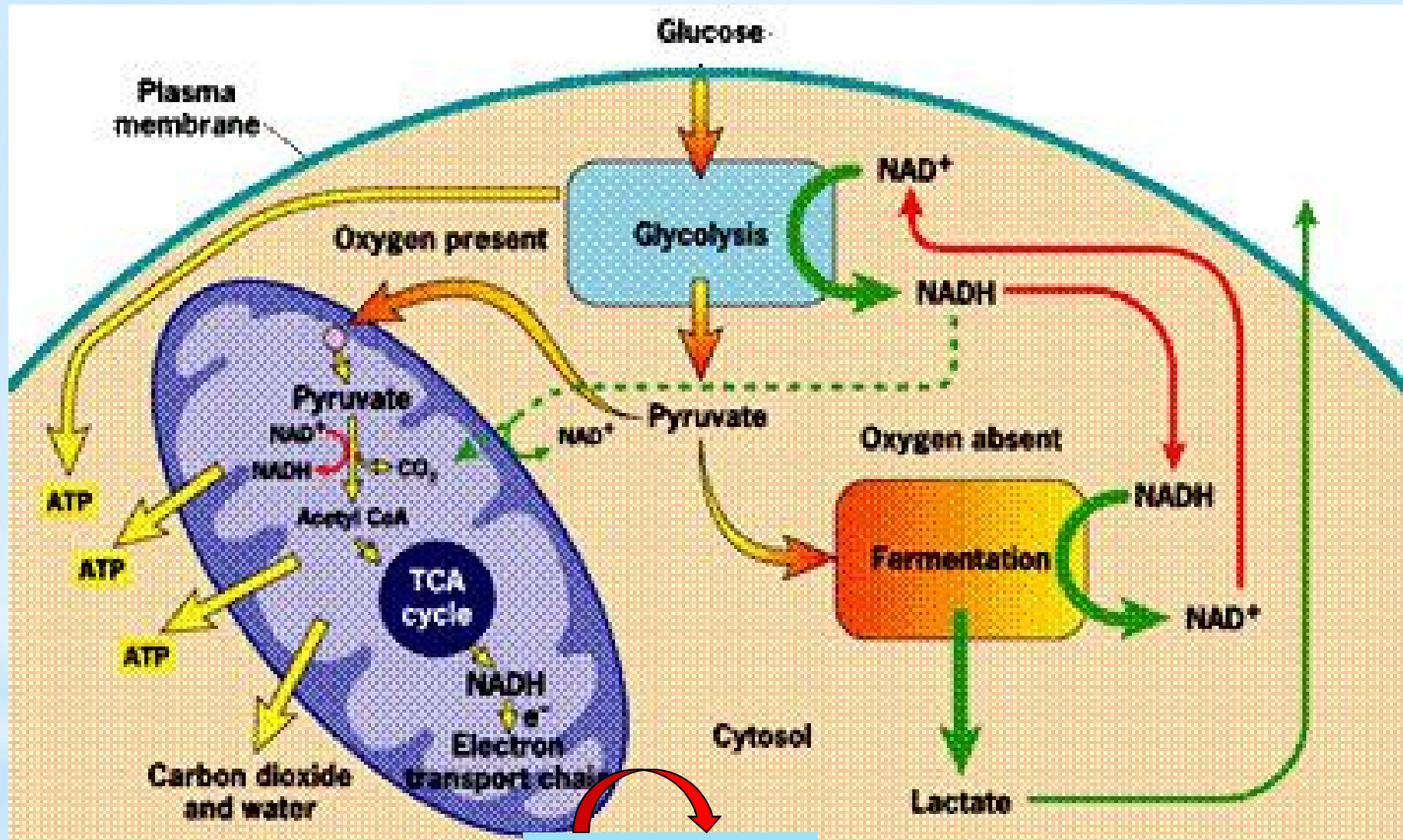
Betáplálás ideje és sebessége

Fermentor felépítése

Itt járunk:

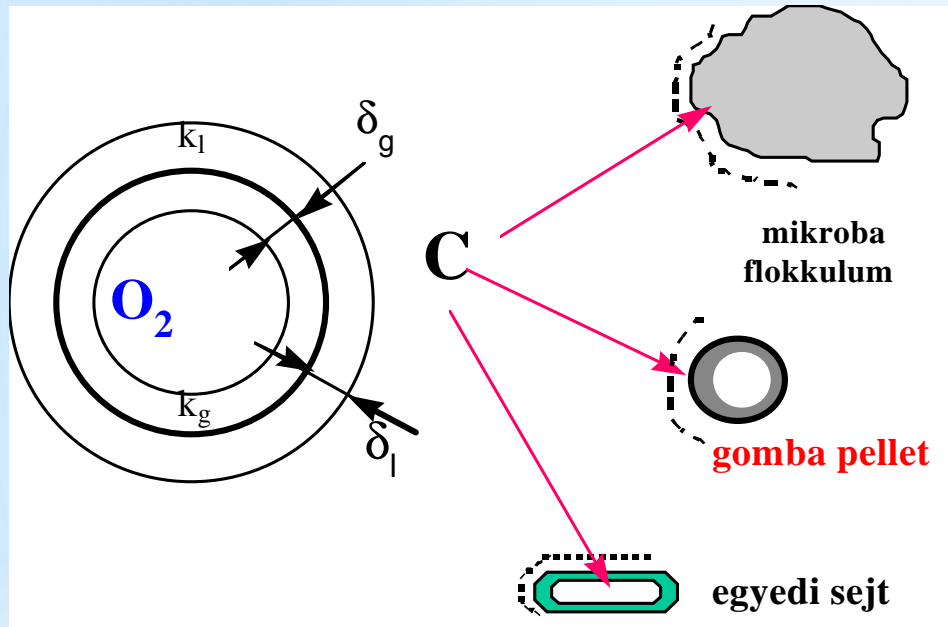


Az oxigén felhasználása eukarióta sejtben



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 eredet folyadékololdali tömegátadási tényező $[\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}]$,

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

$K_L a$ – eredet folyadékololdali (térfogati) oxigénabszorpció együttható $[\text{h}^{-1}]$,

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:

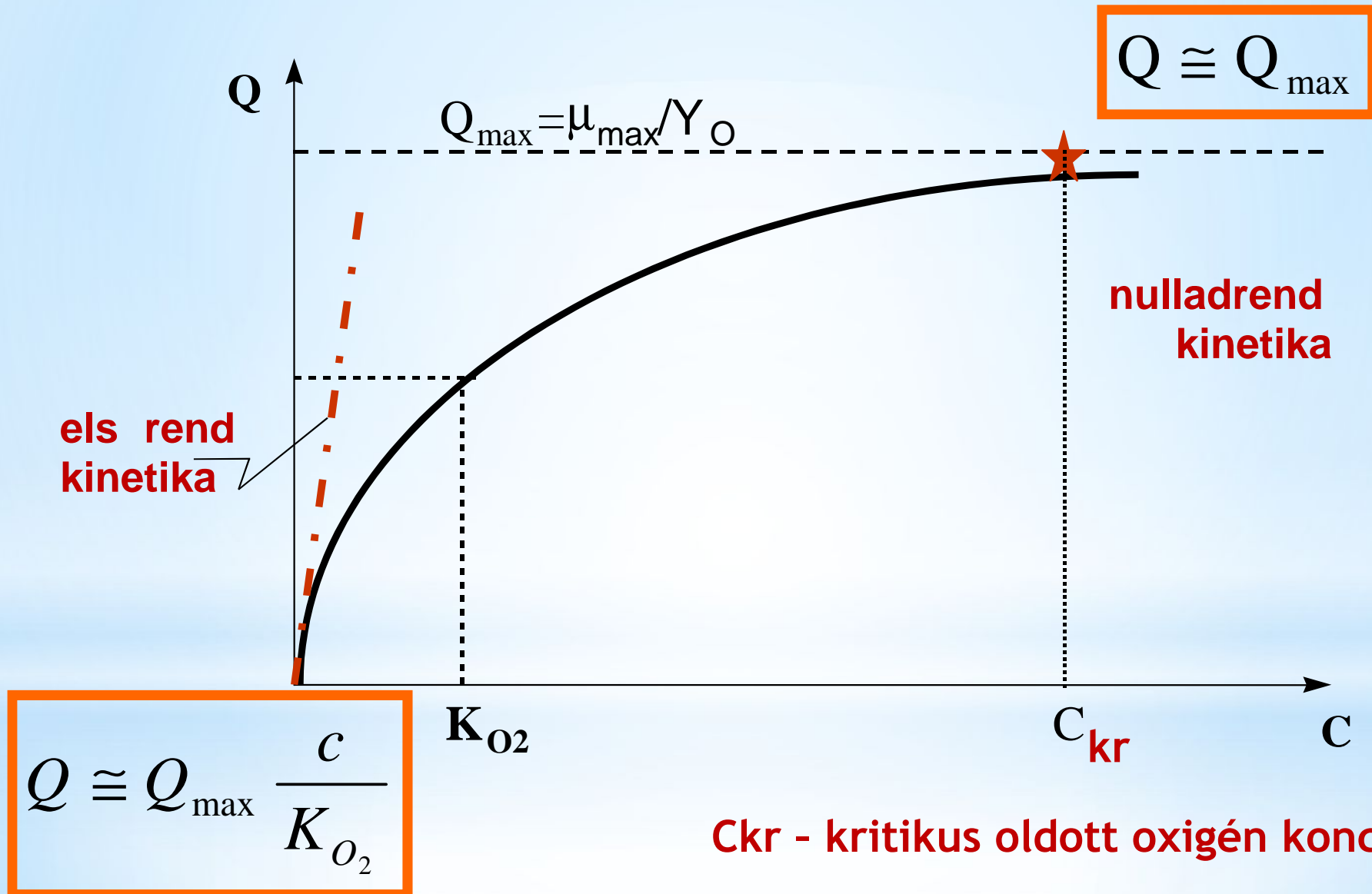
1. légzési sebesség = $\frac{dc}{dt}$ [mmol O₂/ dm³.h],
[kg O₂/ m³ .h]

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

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

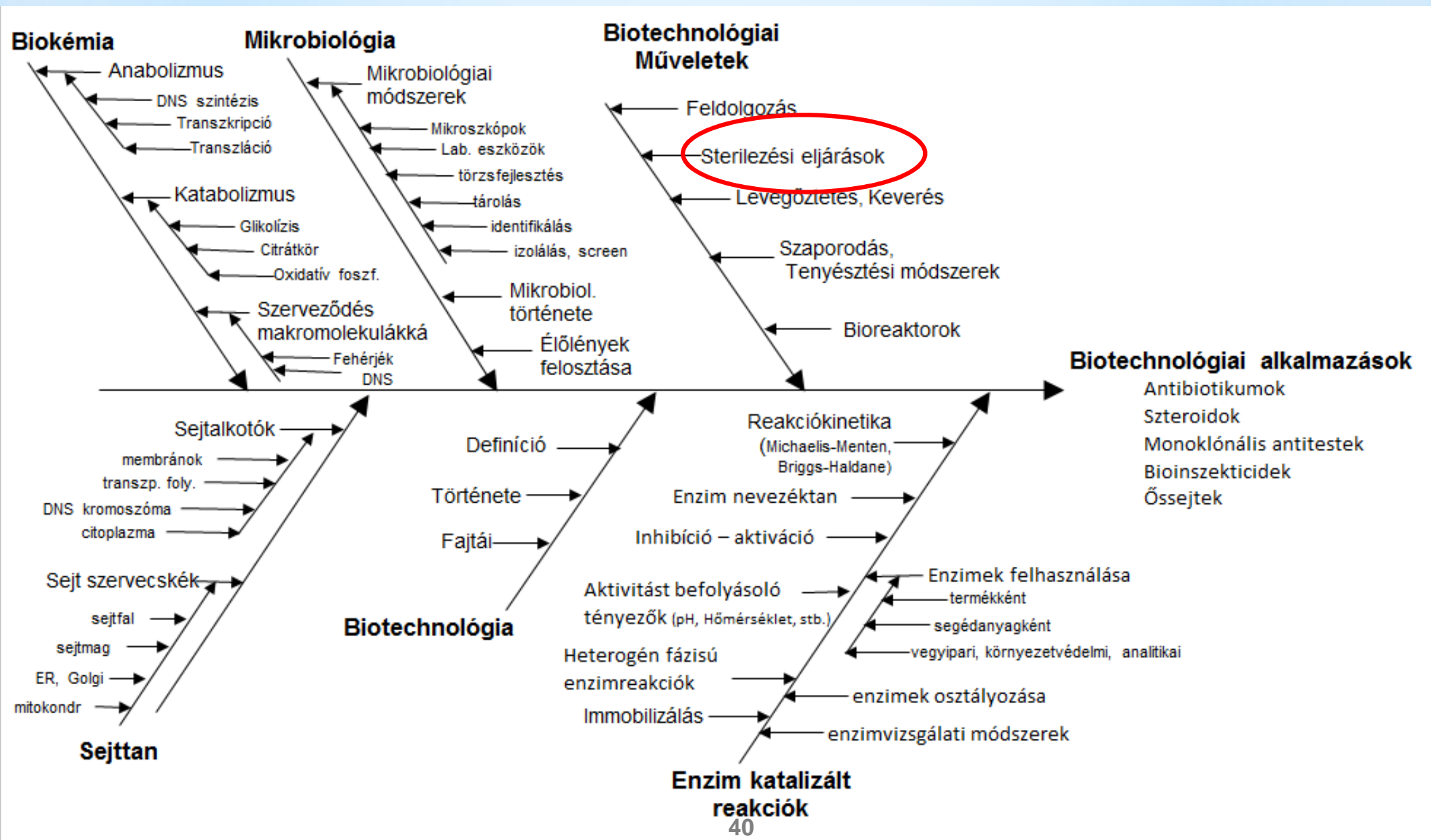
$$Y_{O_2} = \frac{\Delta x}{\Delta c} \longrightarrow Y_{O_2} = - \frac{\frac{dx}{dt}}{\frac{dc}{dt}}$$

Oxigénigény és levegőztetés



C_{kr} - kritikus oldott oxigén koncentráció

Itt járunk:



Sterilezés

A sterilezés alkalmazásának céljai:

- **Annak biztosítására, hogy az eljárás csak és kizárólag a kívánt mikroorganizmussal zajlik le, így kerülve el a hozamcsökkenést és a versengést a szubsztrátért**
- **A környezet szennyezésének elkerülésére**
- **A végső termék lebontásának elkerülésére, pl. idegen mikrobákból származó enzimekkel**
- **A végső termék beszennyezésének elkerülése pl. lázkeltő pirogén anyagokkal.**

A sterilizálás végrehajtása

- Idegen szervezetek fizikai eltávolítása (szűrés, centrifugálás)
- hővel
- sugárzással
- Kémiai anyagokkal
- Extrém paraméterek alkalmazásával pl. pH, toxikus vegyszerek, hőmérséklet

Az elpusztítás mechanizmusa

hő (fehérjék, lipid membránok károsodnak, fontos a víz jelenléte v. hiánya)

sugárzás

- UV (pirimidin dimerek keletkezése),
- gamma-sugárzás, Röntgen sugárzás (DNA feldarabolás és/vagy peroxidok és szabad gyökök keletkezése)
- vegyi anyagok (oxidáló és alkiláló hatás, de gyakran karcinogén hatás is)

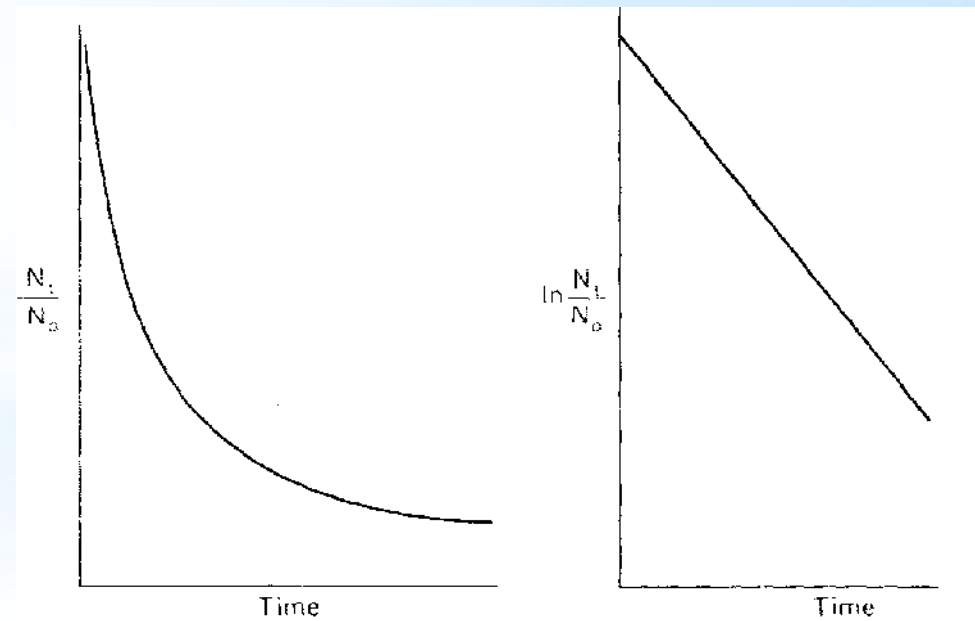
A h sterilizálás kinetikája

$$-\frac{dN}{dt} = kN \longrightarrow -\frac{dN}{N} = kdt$$

integrálás

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-kt} \longrightarrow \ln \frac{N_t}{N_0} = -kt$$

x	sejttömeg
t	id
μ	a fajlagos növ. sebesség [id⁻¹]
N	abszolút sejtszám
k	h pusztulási sebesség



A hősterilizációt befolyásoló tényezők

A fertőző szervezetek fajtája

Kiindulási sejtkoncentráció

Össztérfogat

Tápközeg fajtája

A tápközeg komponenseinek hőérzékenysége

Szakaszos v. folyamatos sterilizálás

A sterilitás kritériuma (azért kell, mert nincs tökéletes sterilizálás).

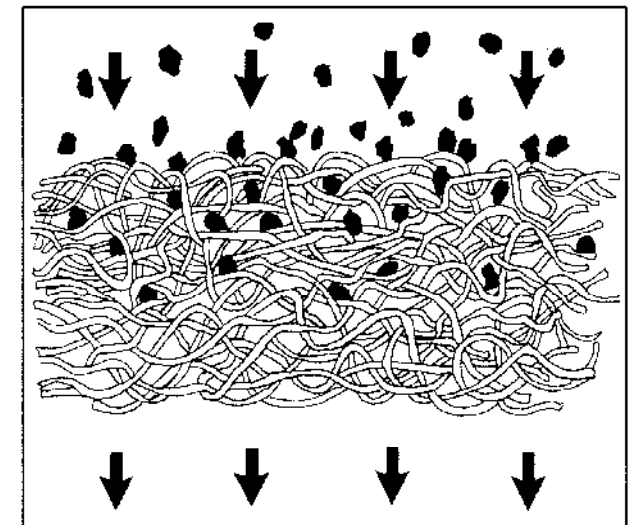
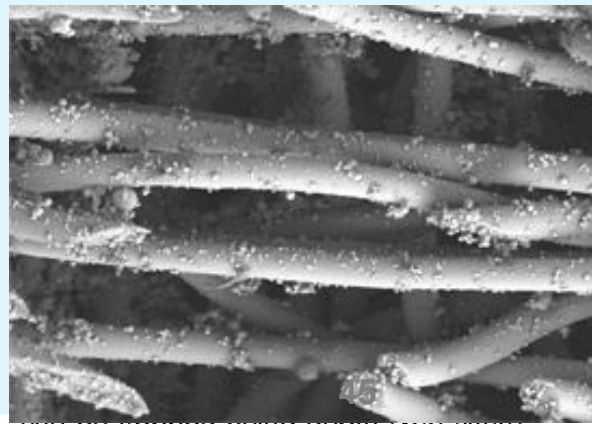
Sterilizés szűrővel

Mélyeségi szűrő (szálás anyag, pl. üvegyapot, gyapot, ásványi szálak, cellulóz, fémszálak)

$$N/N_0 = e^{-Kx} \quad x - \text{szűrő vastagság}$$

Az x kiszámítható – szükséges paraméterek:

- Teljes szűrő mennyiség, pl., 10 m³/min 100 órán keresztül: 60 000 m³
- A levegő lineáris sebessége, pl., 0.15 m/sec.
- A levegő szennyezettsége, pl., 200 mikroorg./ m³
- A sterilitás kritériuma: pl., 1 mikroorg./ 10 000 m³
- K : szűrőre jellemző empirikus koefficiens

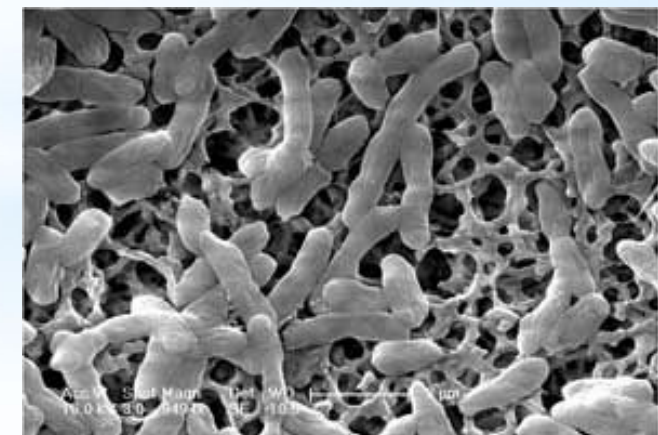
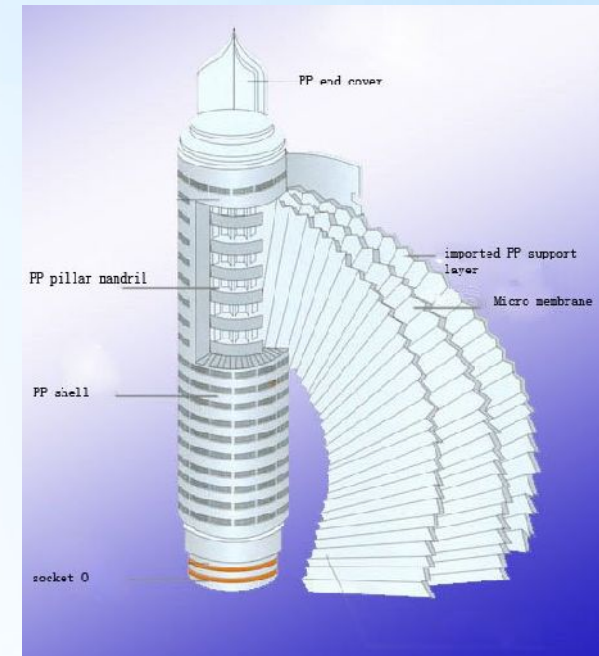
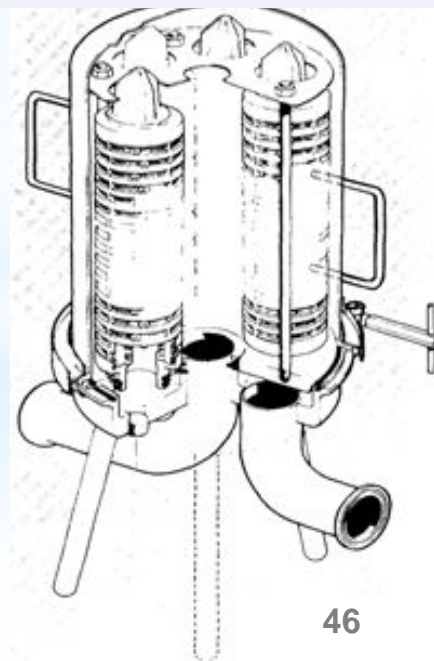
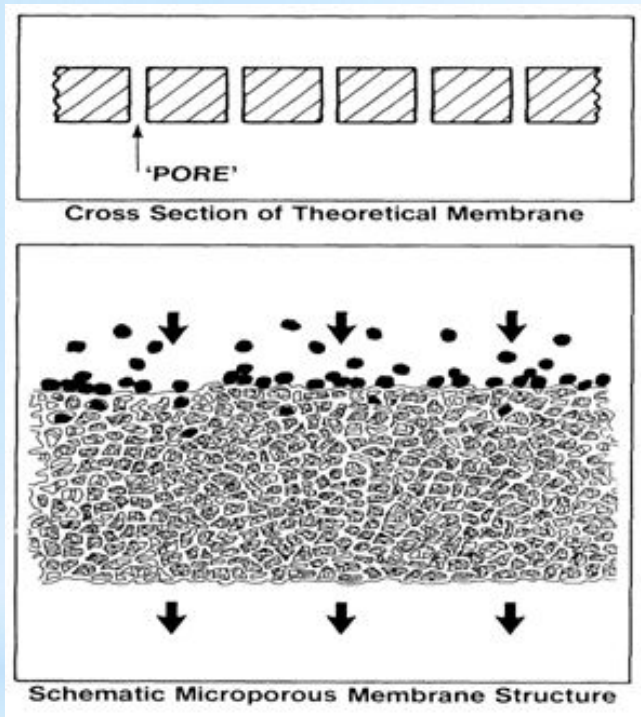


can be trapped using depth type filter.

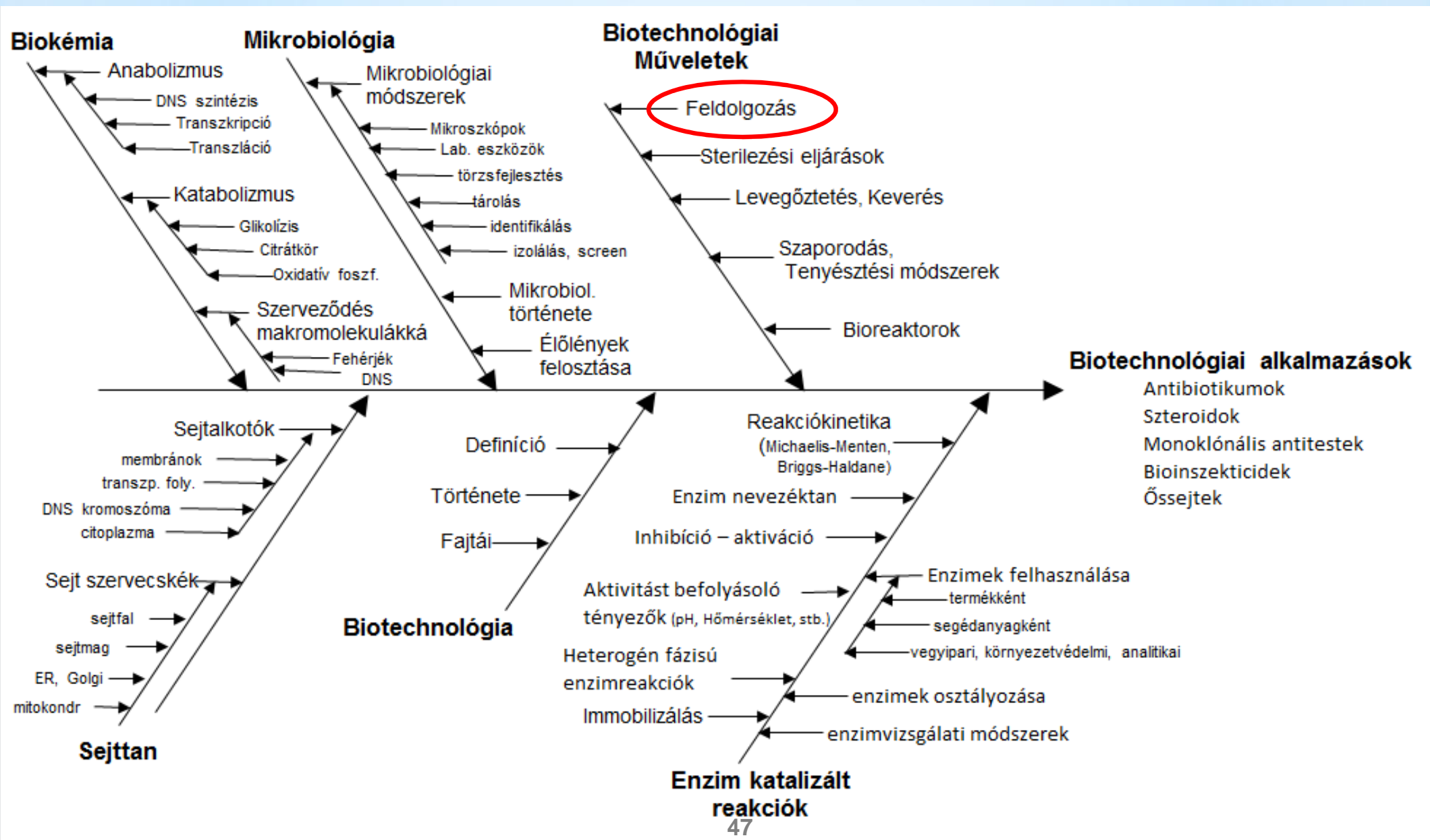
Sterilizés szűrővel

Membrán szűrők (abszolút szűrők 0.2-0.45 μm pórusmérettel)

eltávolítja a baktériumokat és a náluk nagyobb élő szervezeteket levegőből, gázból v. folyadékból



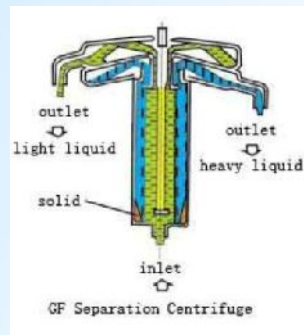
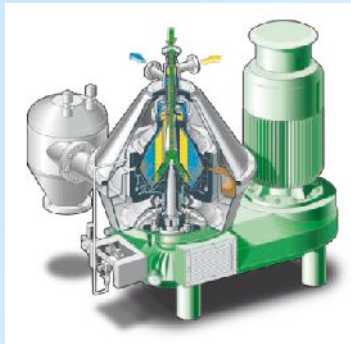
Itt járunk:



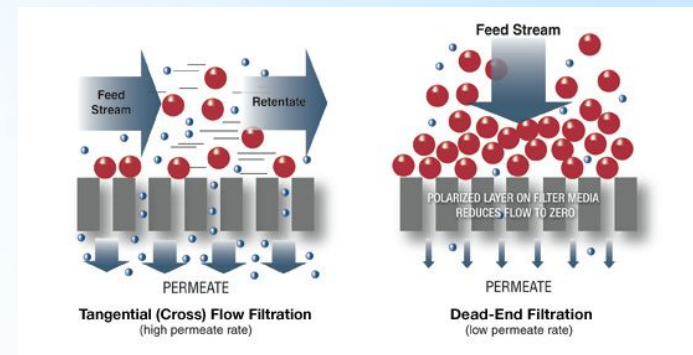
Termékek kinyerése, tisztítása - Downstream processing

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

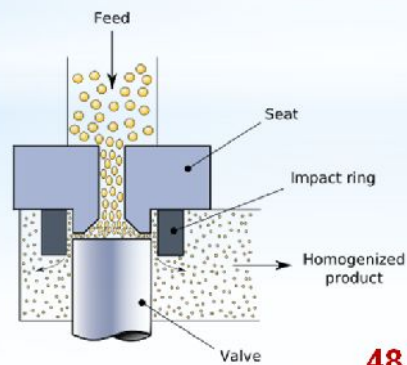
Jellemző műveletek:



Szűrés
Centrifugálás
(ülepítés)



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



Termékek kinyerése, tisztítása - Downstream processing

2. Koncentráló lépés(ek) elsősorban a vizet távolítjuk el, de a nagyobb mennyiségben jelen lévő szennyezéseket is.

Jellemző műveletek:

Extrakció

Adszorpció

Membránszűrés

Csapadékképzés

(bepárlás, desztilláció)

Termékek kinyerése, tisztítása - Downstream processing

3. Tisztítás a termék és a szennyező anyagok elválasztása.

Jellemző műveletek: Extrakció, Adszorpció, Membránszűrés,
Kromatográfia

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

Jellemző műveletek: Extrakció, Adszorpció, Membránszűrés,
Kromatográfia, Kristályosítás, Szárítás

Fehérjék kromatográfiája

Ioncserés krom. – a fehérjék eltérő felületi töltése alapján

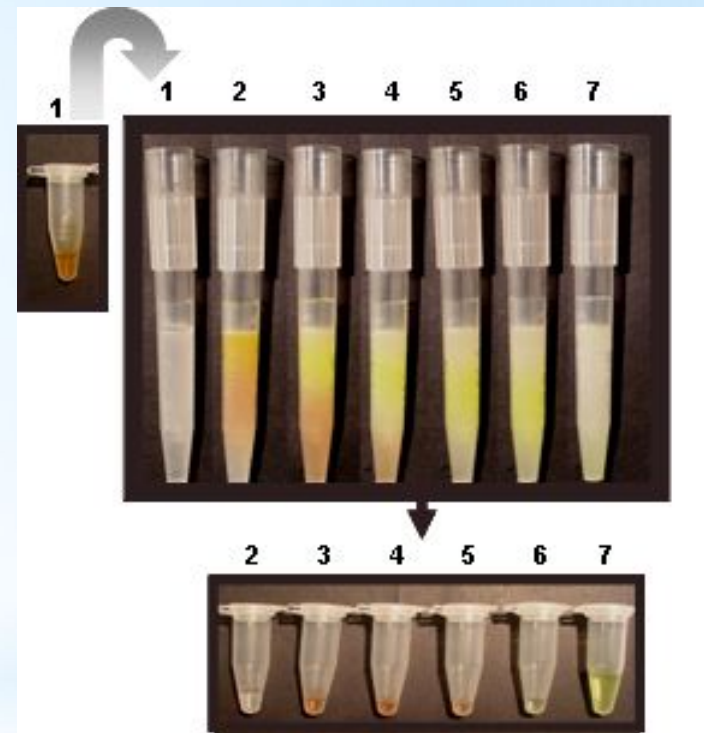
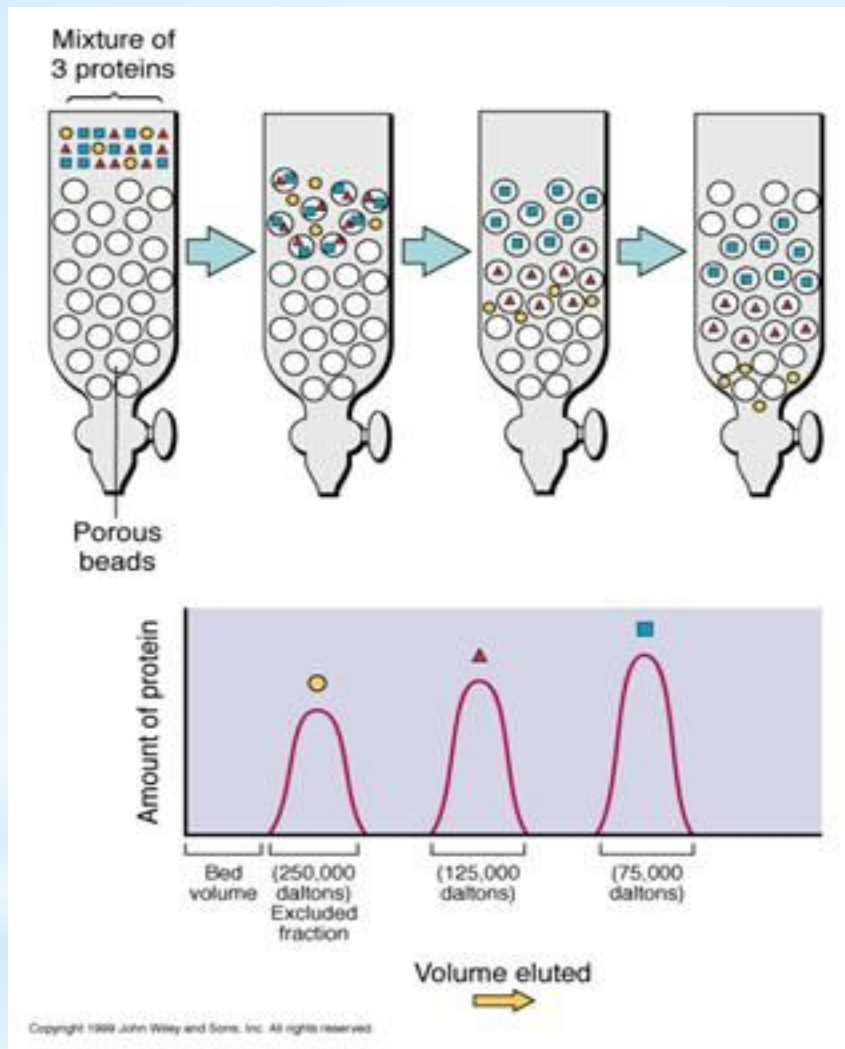
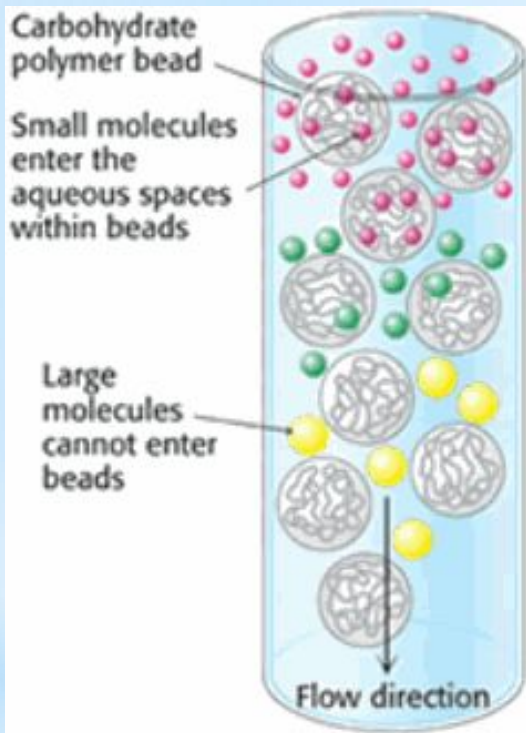
Gél szűrés – eltérés a fehérjék tömege és alakja között (tk. méret alapján történő elválasztás – SEC)

Affinitás krom. – biospecifikus kölcsönhatás a fehérje és egy alkalmas ligand között, pl. antitest – antigén

Hidrofób kölcsönhatás – a felületi hidrofobicitás alapján

Kromatofókuszálás – izoelektromos pont alapján

Gél sz rés



Ion cserés kromatográfia

A fehérjék töltéssel rendelkeznek, kivéve az izoelektromos pontjukat (pI).

A fehérjék egy adott pH-n különböző töltéssel rendelkeznek az eltér aminosav összetétel miatt.

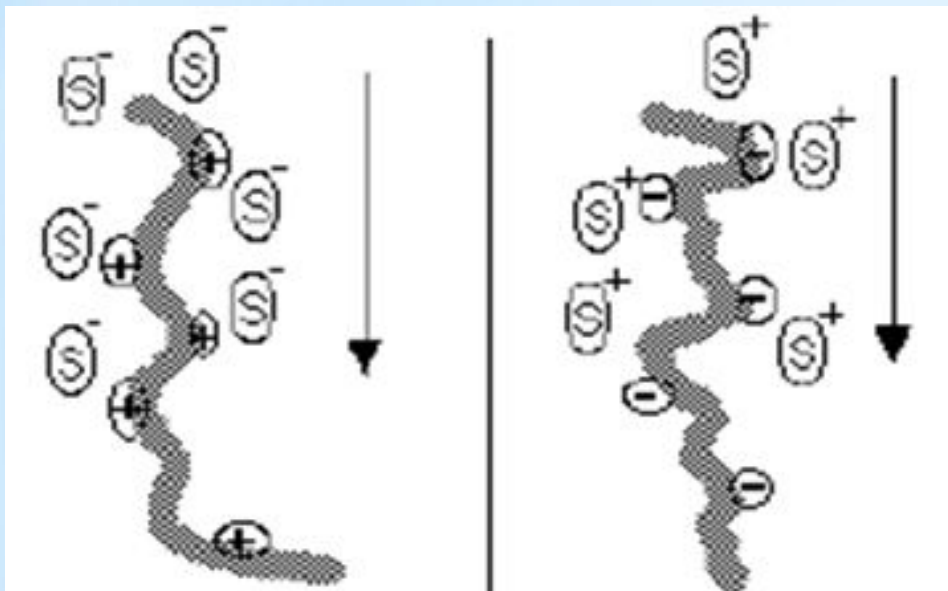
A fehérjék pozitív töltésűek pI-juk alatt, negatív töltésűek pI-juk felett.

A fehérjék kapcsolatba tudnak lépni a szilárd fázissal, ha annak ellentétes töltése van.

Leggyakrabban töltéssel rendelkező cellulóz v. agaróz mátrixot alkalmaznak.

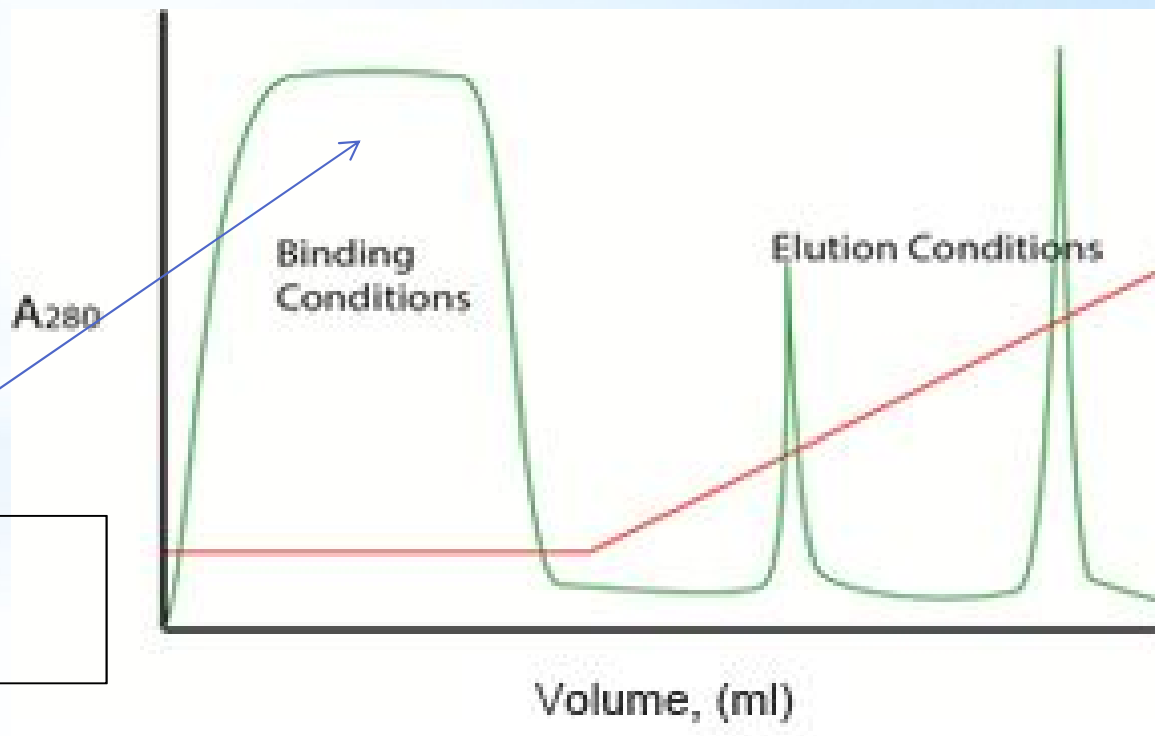
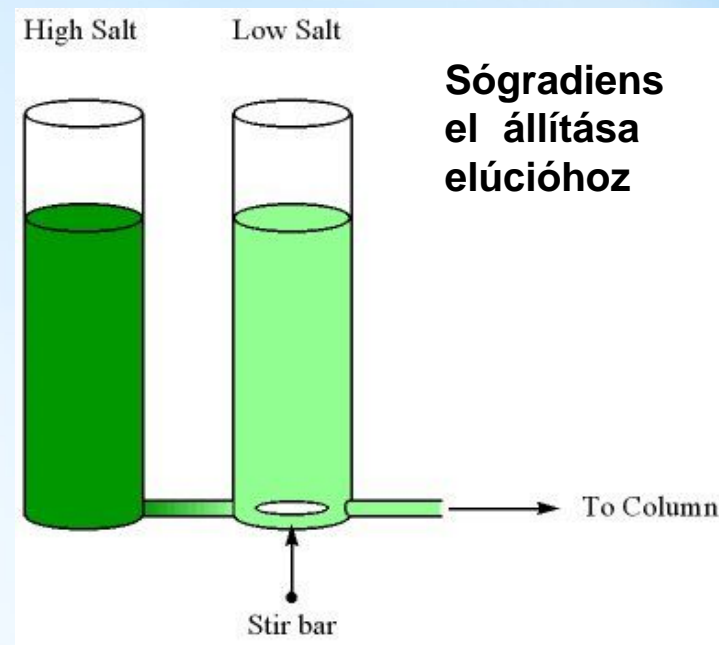
A hordozóhoz kötött fehérje eluálható a sókoncentráció v. a pH megváltoztatásával. Néha erre gradiens változást használnak.

Ion cserés kromatográfia



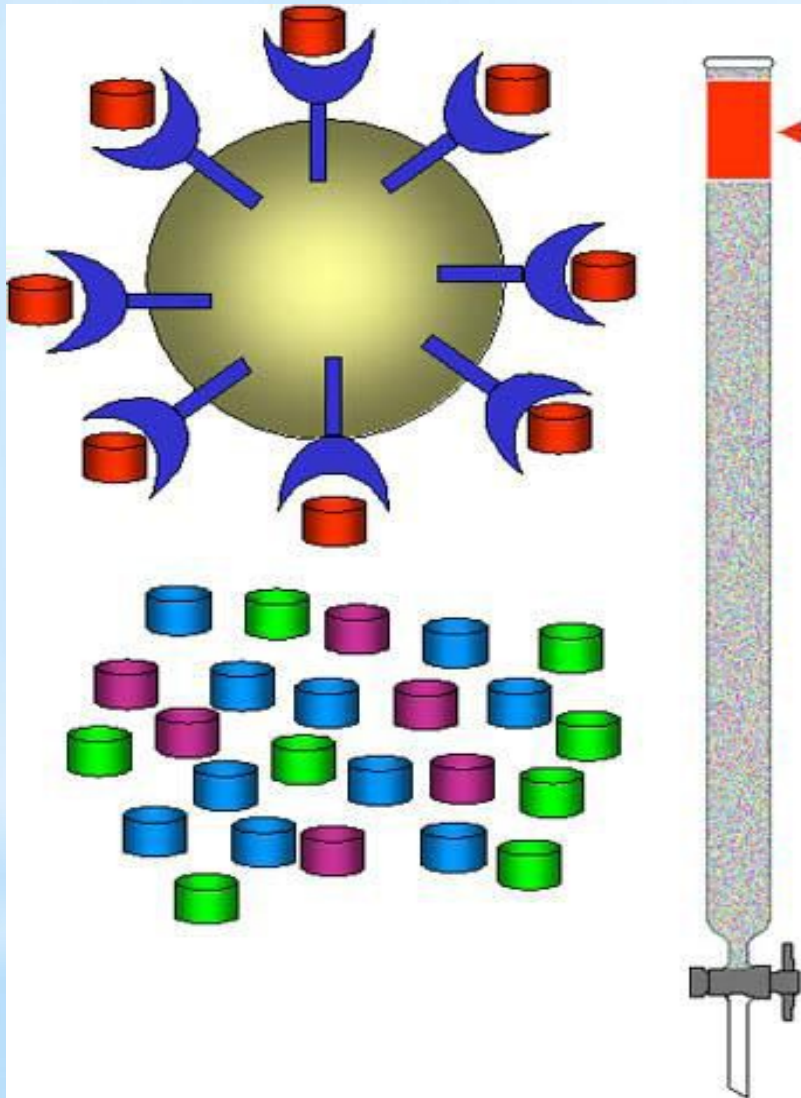
**Anion cserél gyanta (pozitív töltés)
negatív ionok elválasztására**

**Kation cserél gyanta (negatív töltés)
pozitív ionok elválasztására**



A nagy jelet a fel nem kötött szennyezések okozzák

Affinitás kromatográfia



A fehérjék és egy mátrixhoz kötött ligand kapcsolódásán alapszik:
Pl. enzim – szubsztrát, enzim – inhibitor,
enzim – kofaktor, antitest – antigén

El nyök

- Egy lépésben nagy tisztítás
- Nagyon hasonló szerkezet fehérjék elválasztása pl. antitestek
- Tervezhet eljárás

Hátrányok

- Drága
- Nehéz néha ligandot találni
- Nehéz néha eluálni (nem bontható kapcsolat)
- A ligand leszakadhat a mátrixról

Kromatográfiás oszlopok



Kromatográfiás oszlopok léptéknövelése a magasság állandóságán és a felület arányos növelésén alapszik.

