



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,  
ZNANOST, KULTURO IN ŠPORT



IZOBRAŽEVALNI CENTER PIRAMIDA MARIBOR  
Srednja šola za prehrano in živilstvo • Višja strokovna šola • Medpodjetniški izobraževalni center



Naložba v vašo prihodnost  
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA  
Evropski socialni sklad

# BIOTEHNOLOGIJA



**Rosvita Arzenšek Pinter**



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,  
ZNANOST, KULTURO IN ŠPORT



IZOBRAŽEVALNI CENTER PIRAMIDA MARIBOR  
SREDNJA ŠOLA ZA PREHRANO IN ŽIVILSTVO • VIŠJA STROKOVNA ŠOLA • MEDPODIJETNIŠKI IZOBRAŽEVALNI CENTER



Naložba v vašo prihodnost  
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA  
Evropski socialni sklad

Naslov: BIOTEHNOLOGIJA  
Izobraževalni program: ŽIVILSKO PREHRANSKI TEHNIK  
Modul: ŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA Z BIOTEHNOLOGIJO

Avtorica:

Rosvita Arzenšek Pinter, univ. dipl. inž. živ. teh.

Strokovni recenzent:

Marija Predikaka, univ. dipl. inž. živ. teh.

Lektorica:

Manuela Krajcer, prof. slov.

Maribor, 2012

© Avtorske pravice ima Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije.

Gradivo je sofinancirano iz sredstev projekta Biotehniška področja, šole za življenje in razvoj (2008–2012).

Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, razvojne prioritete: Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja, prednostna usmeritev: Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja.

Vsebina tega dokumenta v nobenem primeru ne odraža mnenja Evropske unije. Odgovornost za vsebino dokumenta nosi avtor.

**Kazalo**

Kazalo .....	I
1 UVOD V BIOTEHNOLOGIJO.....	1
1.1 Definicija biotehnologije .....	1
1.2 Definicija bioprocasa .....	1
Faze, ki sestavljajo bioproces .....	1
Produkti bioprocasa .....	2
1.3 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA.....	2
2 PRIPRAVLJALNI PROCESI.....	4
2.1 Izbira biokulture .....	4
Izolacija biokulture .....	4
Identifikacija biokulture .....	4
Izboljšanje lastnosti biokulture .....	5
Shranjevanje matične biokulture .....	6
2.2 Izbira substrata.....	6
Sestava substrata .....	6
Sterilizacija substratov .....	9
2.3 Izbira bioreaktorja .....	10
2.4 Vrste bioreaktorjev.....	10
Bioreaktorji z mehanskim mešanjem z mešali .....	11
Bioreaktorji z mešanjem z vstopnim curkom zraka ali plina .....	11
Bioreaktorji z mešanjem z obtočno črpalko.....	15
Bioreaktorji za biosintezo posebnih produktov .....	15
2.5 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA.....	16
3 BIOPROCES .....	17
3.1 Šaržni ali zaprti bioproces .....	17
3.2 Kontinuirni ali odprti bioproces .....	18
3.3 Polkontinuirni ali polodprti bioproces.....	18
3.4 Kriteriji, ki določajo uporabo načina kultivacije .....	18
3.5 Uporaba sistemov kultivacije .....	19
3.6 Bioprodukti.....	19
3.7 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA.....	20
4 SPREMLJANJE POTEKA BIOPROCESA.....	21
4.1 Načini spremljanja poteka bioprocasa .....	21
Off line analiza.....	21

On line analiza .....	21
In line analiza .....	21
4.2    Merilniki.....	21
4.3    POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA .....	22
5    TEHNIKE IZOLACIJE PRODUKTOV – METABOLITOV .....	23
5.1    PRIPRAVA FERMENTACIJSKE BROZGE .....	23
Hlajenje.....	23
Flokulacija .....	23
Razbijanje celic .....	23
5.2    FILTRACIJA .....	24
5.3    KONCENTRIRANJE PRODUKTA.....	25
Obarjanje .....	25
Koncentriranje z reverzno osmozo.....	25
5.4    KROMATOGRFSKI KORAKI .....	25
Ionska izmenjevalna kromatografija .....	25
5.5    POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA .....	26
6    BIOTEHNOLOGIJA V SLOVENIJI .....	27
6.1    POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA .....	30
7    KAZALO TABEL .....	31
8    KAZALO SLIK.....	32
9    VIRI.....	33

# 1 UVOD V BIOTEHNOLOGIJO

## 1.1 Definicija biotehnologije

Biotehnologija je integralna uporaba mikrobiologije, biokemije in inženirskih znanosti za tehnološko izkoriščanje biokultur (mikroorganizmov, tkivnih kultur živali in rastlin ter njihovih sestavnih elementov).

**Tradicionalna biotehnologija** vključuje že stoletja znane tehnologije, ki se uporabljajo v proizvodnji fermentiranih izdelkov, kot so npr. jogurti, siri, pivo, vino, sušene mesnine, kislo zelje, itd.

**Sodobna biotehnologija** vključuje tehnologije, ki temeljijo na uporabi **rekombinantne DNA (rDNA)** in novih procesnih tehnikah pri proizvodnji izdelkov, koristnih za ljudi, kot so npr. zdravila, semena, itd.

## 1.2 Definicija bioprocasa

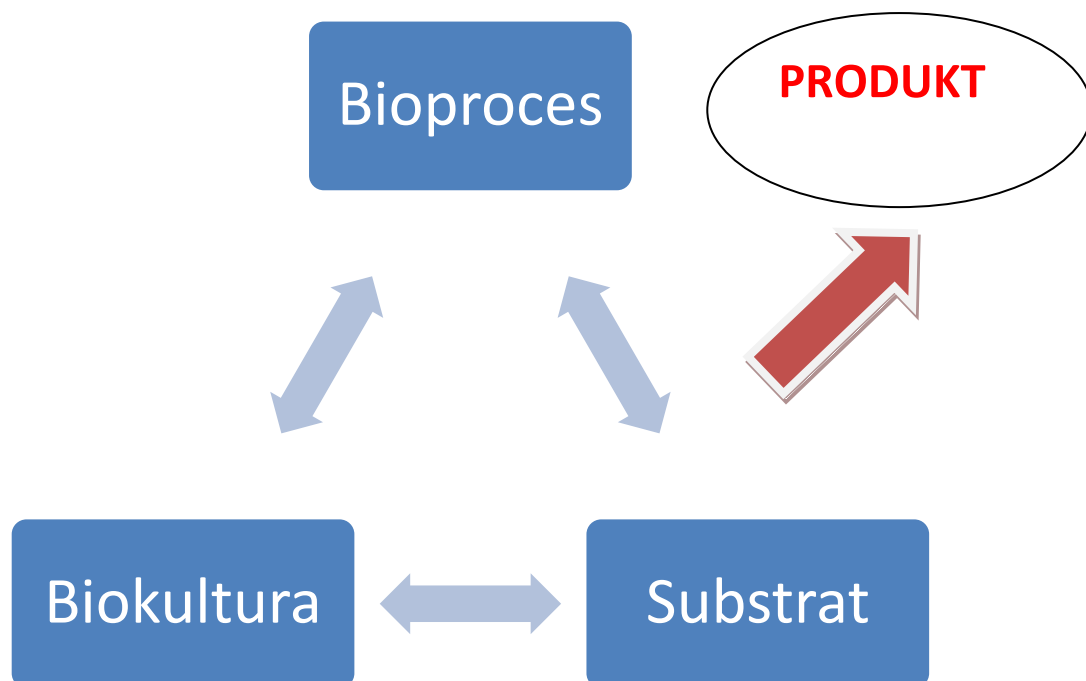
Bioproces je proces, v katerem s pomočjo biokulture in substrata v bioreaktorju pridobimo produkt. Produkt izoliramo in očistimo, odpadne snovi pa odstranimo.

### *Faze, ki sestavljajo bioproces*

Bioproces sestavlja pet faz. Vsaka faza je sestavljena iz različnih postopkov. Kateri postopki bodo sestavljali posamezen bioproces, je odvisno od vrste bioprocasa, od vrste in količine produkta, ki ga pridobimo z njim in od vrste biokulture.

### Faze bioprocasa

- 1. Pripravljalni procesi**
  - Izbira: biokulture, substrata, bioreaktorja;
  - Priprava: biokulture, substrata, bioreaktorja;
- 2. Bioproces**
- 3. Zaključni procesi – izolacija produkta**
- 4. Čiščenje produkta, koncentriranje produkta**
- 5. Odstranjevanje odpadnih snovi bioprocasa**



Slika 1: Osnovna shema bioprocesa

Vir: Lasten

### ***Produkti bioprocesa***

Produkti bioprocesa so lahko:

- snovi v substratu – etanol, mlečna kislina;
- celoten spremenjen substrat – vino;
- snovi v celicah biokulture – intracelularni encimi;
- celice biokulture – kvas;
- spremenjen substrat in biokultura skupaj – jogurt, kefir.

K produktom biotehnologije, poleg produktov klasičnih živilskih fermentacij, prištevamo tudi encime, citrsko kislino, inzulin, eritropoetin, antibiotike, ...

Vedno bolj pa se iščejo biokulture, ki bodo sposobne izkoriščati odpadke in jih v postopku biokonverzije (razgradnje s pomočjo mikroorganizmov) pretvarjati v produkte, koristne za ljudi.

## **1.3 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA**

Biotehnologija je integralna uporaba mikrobiologije, biokemije in inženirskih znanosti za tehnološko (industrijsko) izkoriščanje biokultur (mikroorganizmov, tkivnih kultur živali in rastlin ter njihovih sestavnih elementov). Mejniki v razvoju biotehnologije segajo v obdobje pred Pasteurjem pa vse do današnje dobe rDNA tehnologij.

1. Opišite kaj je biotehnologija.
2. Pojasnite pomen rDNA tehnologije in kaj vključuje.
3. V pravilnem vrstnem redu naštejite faze bioprocesa.
4. Naštejite vse možne produkte bioprocesa.
5. S pomočjo spletnih strani napišite, ali ima Slovenija urejeno zakonodajo glede GSO. Razložite kako.

## 2 PRIPRAVLJALNI PROCESI

### 2.1 Izbira biokulture

Biokultura opravi biološko spremembo snovi v substratu ali **biokonverzijo**. Z izrazom **biokultura** poimenujemo **vse žive celice mikroorganizmov in njihove biokemijsko aktivne gradbene dele** (encime, liposome, mitohondrije, kloroplaste, itd.)

Za vsak bioproces je potrebna točno določena biokultura. Biokulturi so v bioprocesu prilagojeni substrat in ekološki dejavniki, pri katerih bioproces poteka (temperatura, pH vrednost, vrste in razmerje hranilnih snovi, koncentracija kisika, ...).

Pred začetkom izbire biokulture za določen bioproces je potrebno **definirati produkt in aktivnost biokulture**. Definirati produkt pomeni, da natančno določimo snov, ki jo želimo kot produkt pridobiti. Definirati biokulturo pa pomeni določiti katere snovi v substratu in s kakšnimi kemijskimi reakcijami naj jih naša biokultura med bioprocesom spreminja, da bo nastal želen produkt.

### Izolacija biokulture

Izolacija kultur iz naravnega okolja zahteva poznavanje najverjetnejših lokacij za predvidene organizme. Tako kvasovke izoliramo iz grozdnih jagod, mlečnokislinske bakterije iz mleka, ipd. Zaradi težavnosti izolacije v naravi uporabljamo danes kot vir mikroorganizmov mikrobiološke zbirke. To so ustanove, kjer so shranjene čiste kulture mikroorganizmov. Kulture morajo biti shranjene tako, da se njihove lastnosti ne spremenijo. Na svetu je več kot 350 organiziranih zbirk kultur, ki jih imenujemo tudi banke kultur. V Sloveniji imamo dve:

- zbirka gliv na Kemijskem inštitutu v Ljubljani,
- zbirka kvasovk na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

### Identifikacija biokulture

Značilnosti, na podlagi katerih **identificiramo** določeno mikrobno vrsto, so sledeče:

- **morfološke značilnosti:** oblika celic, njihova velikost in struktura, namestitve celic, pojavljanje struktur in oblik, barvne reakcije, gibljivost, bički, itd.;
- **kemijska sestava:** različne sestavine celice, sestava rezervnih snovi, celične stene;
- **značilnosti kultur:** potreba po hranilnih snoveh in fizikalnih pogojih, način rasti na tekočih in trdnih gojiščih, oblika, barva, velikost kolonij;
- **značilnosti metabolizma:** kako celice dobijo energijo, opravljajo biokemijske procese in mehanizmi regulacije metabolnih procesov;
- **antigene lastnosti:** vsebnost specifičnih sestavin mikrobne celice – antigenov, ki pri bakteriji pomagajo pri identifikaciji zelo podobnih vrst;
- **genetske značilnosti:** karakteristike DNA, navzočnost in delovanje drugih oblik DNA (plazmidi);



- **patogene lastnosti:** sposobnost povzročanja obolenja rastlin, živali, človeka, drugih mikroorganizmov;
- **ekološke lastnosti:** razporeditev mikroorganizmov v naravi in interakcija med mikroorganizmi v naravnem okolju.

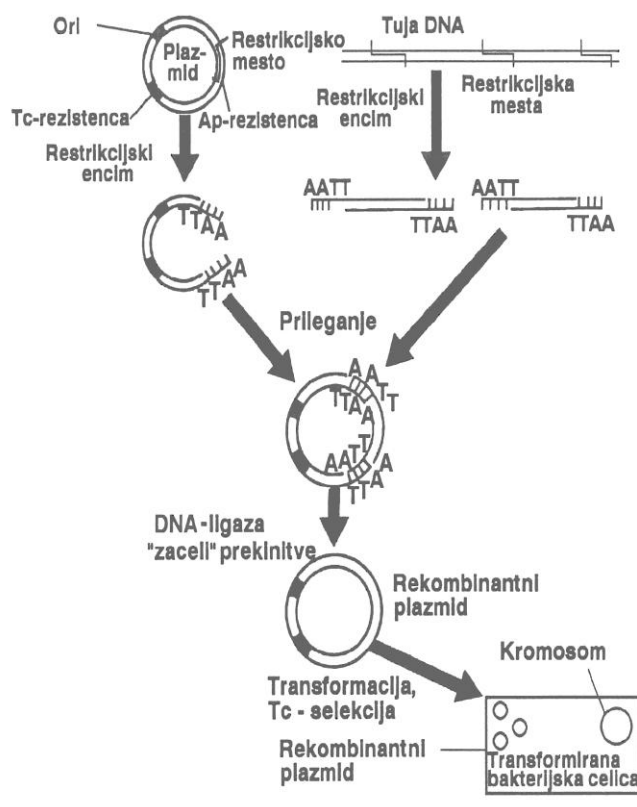
Ko smo mikroorganizmu na podlagi njegovih lastnosti dali ime, smo ga identificirali!

## Izboljšanje lastnosti biokulture

Običajno sevi niso primerni za takojšnje aplikacijo v industriji, zato je potrebno sev **izboljšati**.

Pri tem poznamo dve stopnji:

- **s selekcijo različnih ekoloških faktorjev** je mogoče vplivati na želeno lastnost mikroorganizma oz. pridelok (temperatura, pH, hranila, ...);
- **s posegi na genetskem nivoju**, indukcija mutacij z različnimi fizikalnimi in s kemijskimi sredstvi ali s tehnikami rekombinantne DNA.



Slika 2: Kloniranje fragmentov DNA s plazmidnim vektorjem  
Vir: Raspor, P. Biotehnologija. Ljubljana: BIA d. o. o., 1996.

## Shranjevanje matične biokulture

### Priprava biokultur za začasno in trajno shranjevanje

Ko imamo primerno aktiven mikrobní sev za industrijsko proizvodnjo, ga moramo znati ohraniti nespremenjenega za daljši čas. Obstaja več načinov, vendar vsak ni primeren za vsak mikroorganizem.

### Možnosti shranjevanja mikroorganizmov so:

- a) **precepljanje v rednih časovnih presledkih na sveže gojišče** (pri tem obstaja nevarnost okužbe in spremembe lastnosti kultur);
- b) **shranjevanje kultur pod tekočim parafinskim oljem** (dobro preraslo kulturo na poševnem agarju prelijemo s steriliziranim (suha sterilizacija pri 170 °C, 1–2 uri) parafinskim oljem. Ta metoda je primerna predvsem za kvasovke.
- c) **liofilizacija** – sušenje v zamrznjenem stanju (potrebujemo liofilizator, to je aparaturo, v kateri iz zamrznjenih mikrobnih celic z vakuumom odstranimo kristalčke vode. Preživetje liofiliziranih kultur je do 10 let);
- d) **shranjevanje pri nizkih temperaturah** je najbolj uspešna metoda shranjevanja. Poteka:
  - v tekočem dušiku (–196 °C),
  - v parah tekočega dušika (–156 °C),
  - v zamrzovalnih skrinjah (–80 °C).

Poseben problem bank so genetsko spremenjeni sevi, saj je njihova stabilnost znatno slabša od divjih tipov mikroorganizmov. Danes se za shranjevanje gensko spremenjenih sevov uveljavljata **liofilizacija in zmrzovanje pri zelo nizkih temperaturah** (pri –80 °C v mehanskih zamrzovalnikih ali med –156 °C in –196 °C v plinski ali tekoči fazi dušika). Prednost teh dveh postopkov je bistveno povečana stabilnost sevov.

## 2.2 Izbira substrata

Ko se množijo, mikroorganizmi povečujejo množino lastne snovi, ki je po sestavi približno enaka. Vse osnovne gradnike snovi morajo mikroorganizmi dobiti s hrano. Sestava mikroorganizmov v veliki meri določa, kakšna naj bo sestava hranilnih snovi in kakšno naj bo njihovo razmerje v substratu. Npr. mikroorganizem v povprečju vsebuje največ vode, zato mora biti od vseh snovi, ki sestavljajo substrat tudi največ vode.

### Sestava substrata

**Voda** je glavna sestavina mikroorganizmov in je v večini primerov tista snov, ki jo moramo v substrat dati največ. Ker jo imamo vsaj pri nas še dovolj in je sorazmerno poceni, si ponavadi z njo ne belimo glave. Pri vodi moramo upoštevati dva osnovna vidika: koliko je mora biti, da

biotehnološki postopek zadovoljivo teče in koliko je ne sme biti, da se surovine ali produkti v skladišču ne bodo kvarili.

Tabela 1: Najnižje vrednosti aktivnosti vode ( $a_w$ ), ki še omogočajo rast mikroorganizmov

Mikroorganizmi	Najnižja $a_w$
Bakterije	0,91
Kvasovke	0,88
Plesni	0,80
Halofilne bakterije (imajo rade sol)	0,75
Ozmofilne kvasovke (rastejo v okoljih z visokim osmotskim pritiskom)	0,60
Xerofilne glive (rastejo v pogojih z majhno količino vode)	0,65

Vir: Raspor, P. Biotehnologija, BIA d. o. o., Ljubljana, 1992.

Aktivnost vode je tista odločilna količina, ki pove, ali bo prišlo do razvoja mikroorganizmov ali ne. Prav tako je aktivnost vode prvi kriterij, ki pove, ali smo v substrat dodali zadostno količino vode.

**Viri ogljika** oziroma ogljikove spojine so druga glavna sestavina mikroorganizmov in se v njih pretvarjajo iz oblike v obliko ter pri tem služijo kot vir gradbenih elementov in energije. Na splošno gledano pride v poštev zelo veliko ogljikovih spojin, od  $\text{CO}_2$ , ki ga industrijsko pomembni mikroorganizmi običajno izločijo več, kot ga porabijo, preko ogljikovodikov, med njimi zlasti alkanov, nadalje maščob, organskih kislin, alkoholov, vključno z ogljikovimi hidrati, do spojin, ki vsebujejo poleg ogljika, vodika in kisika še druge elemente.

**Monosaharidi:** najosnovnejši monosaharid je glukoza. Glukoza je pomemben metabolit številnih mikroorganizmov in jo večinoma proizvajamo iz škroba. V večjih koncentracijah jo uporabljamo takrat, ko želimo hitro rast delovnih organizmov (preveč glukoze lahko v določenih pogojih povzroči tudi inhibicijo oziroma zavrtje rasti). Zelo primerna je tudi za dohranjevanje mikroorganizmov med samim potekom bioprocasa. Druge monosaharide uporabljamo redko.

**Oligosaharidi:** večinoma se uporabljajo spojine z vezano glukozo, kot so npr. saharoza, laktoza, maltoza, dekstrini. Zaradi nižje cene od glukoze, so posebno pomembne manj čiste raztopine saharoze, zlasti melasa in pesni sok. Melasa je odpadna matična lužina, ki nastane po kristalizaciji sladkorja.

Tabela 2: Sestava melase

Sestavina (%)	Melasa (pesna)	Melasa (trsna)
Saharoza	49	33
Invertni sladkor	1	20
Pepel	11	10
Voda	18	16

Vir: Raspor, P. Biotehnologija, BIA d. o. o., Ljubljana, 1992.

Laktozo ali mlečni sladkor dobimo iz sirotke. Uporabljamo jo v bioprocesih, kjer je potrebna zadostna množina sladkorja ob istočasni majhni aktivnosti glukoze. To pomeni, da se glukoza hitreje porablja, kot se sprošča iz laktoze.

**Polisaharidi:** uporabljata se škrob in celuloza. Škrob se uporablja za tiste mikroorganizme, ki za svoje potrebe proizvajajo dovolj amilaz – da lahko pride do encimske hidrolize škroba do sladkorjev. Celuloza bi lahko bila najpomembnejši vir ogljika, ker je organska snov, ki je na Zemlji največ. Večine se ne da racionalno uporabiti zaradi spreminjajoče se sestave in težav pri transportu in skladiščenju teh voluminoznih in hitro kvarljivih surovin.

Ogljikovodiki: alkani, zlasti metan so bili zelo obetavne surovine, z zvišanjem cen nafte pa so izgubili precej svojih perspektiv.

**Viri dušika:** uporaba dušika iz zraka so sanje številnih generacij – uspeh bo velik že, če nam bo v večji meri uspelo fiksirati dušik iz zraka v poljedelstvu.

Amonijeve spojine, nitrati, sečnina: sem uvrščamo predvsem amonijak, ki ga uporabljamo za delo z mikroorganizmi, ki so sposobni iz amonijevih ionov sintetizirati aminokislino. Če delovni mikroorganizem ni zadovoljen z anorganskimi viri dušika, mu dodamo sečnino.

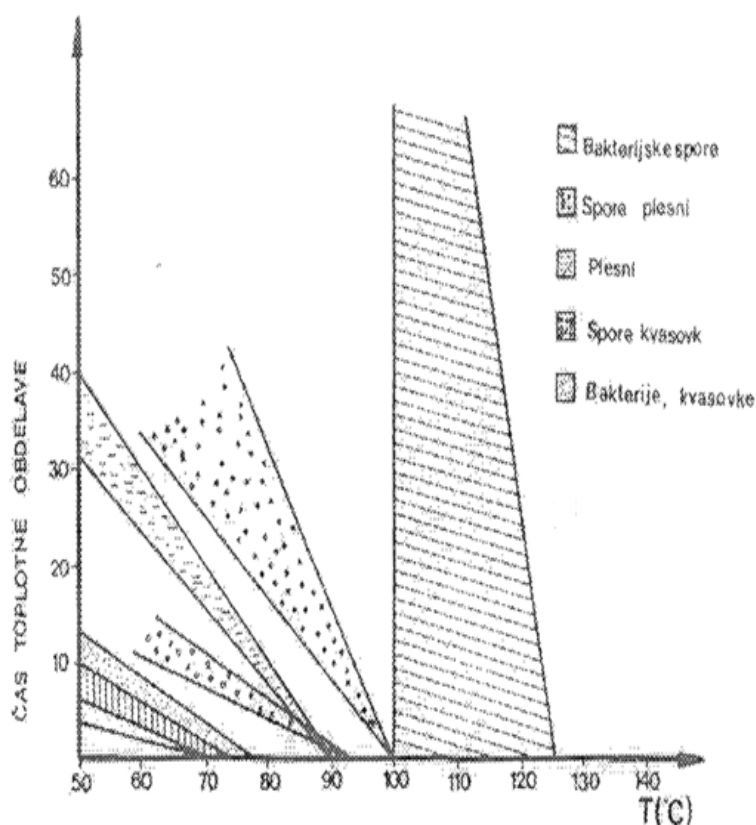
**Aminokislino in proteini:** proteinske vire dušika veliko uporabljamo zlasti v fazi rasti, ko se hitro vgrajujejo v celično substanco. Taki viri so zlasti sojina moka, gluten ter drugi proteinski koncentracije in njihovi hidrolizati (npr. koruzni sirup).

**Viri fosforja:** dodajamo ga kot fosforjevo kislino ali njene soli. Podobno velja tudi za vse druge dodatke.

**Izbira in priprava substrata** je vir negotovosti in rizika. Prisiljeni smo iskati najugodnejši kompromis med zahtevami delovnega organizma, sposobnostjo procesne opreme, zahtevnostjo produkta, naravno variabilnostjo sestave komponent substratov, njihovo dosegljivostjo in ceno. Kompleksni substrati so kljub številnejšim neznankam še vedno boljše izbira kot kemično definirani.

## Sterilizacija substratov

V nadaljevanju postopka priprave substrata je ključnega pomena sterilizacija. Opravljeni sterilizaciji in ohladitvi gojišča na delovno temperaturo sledi inokulacija (vcepitev) s produkcijskim mikroorganizmom, kar pomeni začetek mikrobne procesa. Od tu dalje se sterilnost oz. mikrobiološka čistost nanaša samo na prisotnost produkcijskega mikroorganizma. Ko se poleg produkcijskega mikroorganizma pojavi neželeni mikroorganizem, je mogoče govoriti o nesterilnosti oziroma kontaminaciji.



Slika 3: Območja občutljivosti nekaterih mikrobov oziroma njihovih oblik na toploto  
Vir: Raspor, P. Biotehnologija, BIA d. o. o., Ljubljana, 1992.

Da bi preprečili vnos neželenih mikrobov v bioproces, uporabljamo različne tehnike sterilizacije, ki vključujejo:

- toplotno sterilizacijo z vlažno in suho toploto,
- filtracijo,
- plinjenje.

Vlažna toplota se običajno uporablja za sterilizacijo gojišč, suha toplota pa za steklovino in kovinsko opremo. V primerjavi z vlažno sterilizacijo, ki poteka z nasičeno vodno paro, so za isti učinek pri suhi sterilizaciji potrebne višje temperature.

Filtracija se uporablja za bistre tekočine in v glavnem za pline (procesni zrak).

Plinjenje se uporablja za instrumente, steklovino in plastične materiale.

## 2.3 Izbira bioreaktorja

Z bioreaktorjem ustvarimo primerne fizikalne pogoje za delovanje biokulture. Fizikalni parametri, ki jih v bioreaktorju med samim bioprocesom spremljamo, so:

- temperatura,
- količina vpihanega zraka in s tem koncentracija plinov v substratu,
- mešanje, ki omogoča biokulturi hitrejši dostop do hranilnih snovi in ustrezne temperature.



Slika 4: Avtomatski laboratorijski bioreaktor Lara

Vir: <http://www.bia.si>

Lara je avtomatski laboratorijski bioreaktor, katerega bistvene lastnosti so enostavna namestitve in uporaba, modularnost (omogoča priključitev črpalk, tehtnic, termoregulatorjev, itd.) in vsestranskost (sprejema od 100 mL do 7 L) ter možnost nadgradnje. Mehansko mešalo se enostavno pritrdi. Reaktor je kontroliran s programsko opremo.

Bioreaktor omogoča uravnavanje bioprocasa in merjenje parametrov, s katerimi potek bioprocasa spremljamo. Bioreaktor in vsi merilniki morajo biti pred bioprocesom sterilni. Ponavadi notranjost bioreaktorja steriliziramo s pregreto paro.

## 2.4 Vrste bioreaktorjev

Poznamo več vrst bioreaktorjev. Delimo jih glede na:

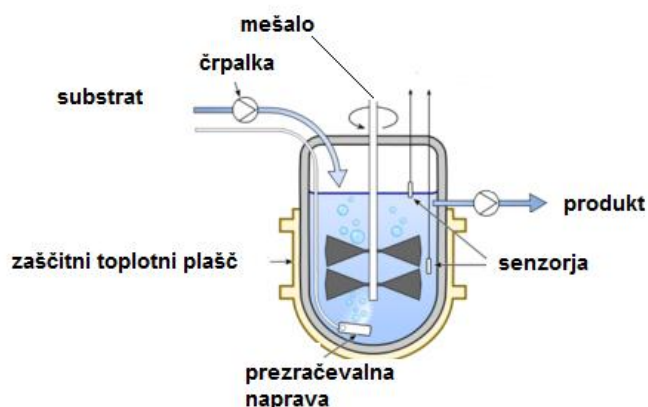
- princip delovanja: šaržne, polkontinuirne, kontinuirne;
- prisotnost kisika: aerobne, anaerobne;

- način mešanja: bioreaktorje z mehanskim mešanjem z mešali, bioreaktorje z mešanjem z obtočno črpalko, bioreaktorje z mešanjem z vstopnim curkom zraka ali plina.

Univerzalnega bioreaktorja, ki bi ga lahko uporabili za izvedbo vseh bioprocsov, ni. Bioreaktor izberemo glede na potek bioprocesa, vrsto uporabljene biokulture in vrsto produkta, ki v bioprocesu nastaja. Naloga bioreaktorja je, da ustvarja optimalne (najbolj ugodne) pogoje za delovanje biokulture in sam potek biokonverzije.

## Bioreaktorji z mehanskim mešanjem z mešali

Bioreaktorji imajo vgrajena mešala različnih oblik in velikosti, ki se vrtijo okoli svoje osi in s tem mešajo vsebino v bioreaktorju. Od oblike in velikosti mešala ter hitrosti vrtenja osi je odvisno, kako hitro se bo celoten volumen substrata v bioreaktorju homogeniziral in s tem omogočil enake **razmere za življenje biokulture v celotnem volumnu bioreaktorja**.



Slika 5: Bioreaktor z mešalom

Vir: <http://www.google.si/imgres?q=bioreaktor>

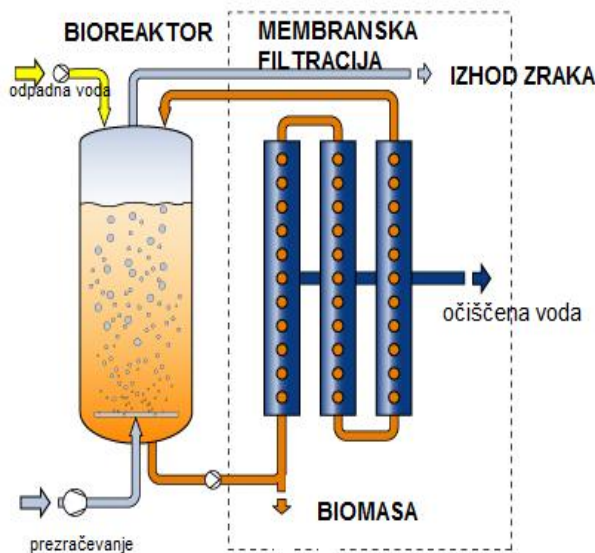
Bioreaktorji z mehanskim mešanjem z mešali se v biotehnologiji največ uporabljajo za proizvodnjo pekovskega kvasa, aminokislin, organskih kislin in antibiotikov.

## Bioreaktorji z mešanjem z vstopnim curkom zraka ali plina

Bioreaktorji imajo vgrajene prezračevalnike, s katerimi v substrat uvajamo zrak ali plin v obliki mehurčkov. S tem, ko se mehurčki zraka gibajo po substratu, ga premešajo.

Poznamo **statične prezračevalnike ali aeratorje**. To so perforirani obroči ali plošče iz kovine, ki so nameščeni na dnu bioreaktorja in skozi njih doteka zrak ali plin.

**Dinamični prezračevalniki so lahko ejektorji in injektorji.** Delujejo tako, da skozi pod povečanim pritiskom v bioreaktor uvajamo zrak ali plin, lahko celo hkrati uvajamo substrat in zrak ali plin. Zaradi pritiska nastajajo zelo močni tokovi, ki substrat še dodatno mešajo. Slaba stran dinamičnih aeratorjev je, da povečujejo penjenje med bioprocesom.



Slika 6: Bioreaktor z mešanjem z vstopnim curkom zraka in membransko filtracijo

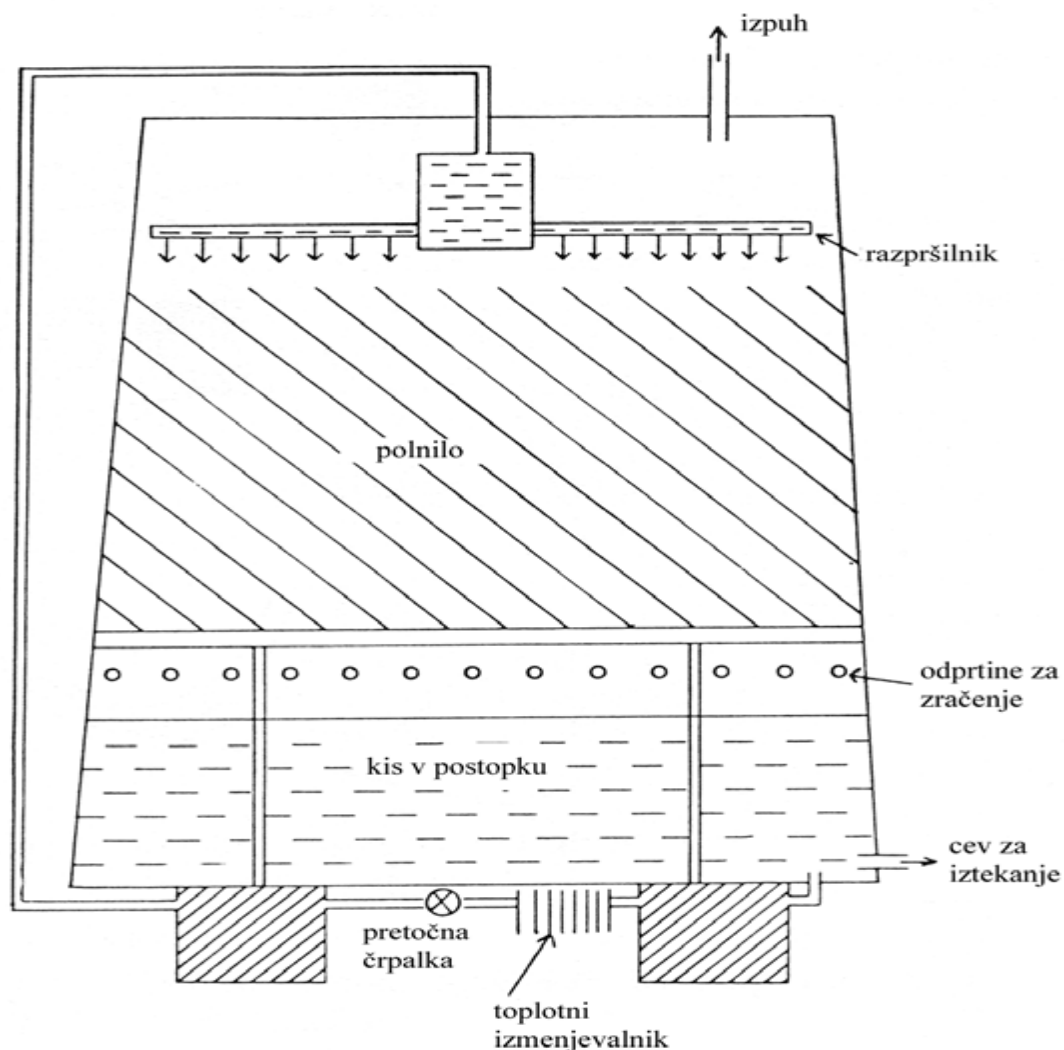
Vir: <http://www.lenntech.com/processes/crossflow-mbr.htm#ixzz1zdj2p1ua>

Slika 6 prikazuje čiščenje odpadnih voda s pomočjo bioreaktorja z mešanjem z vstopnim curkom zraka, ki je povezan z membranskim filtrom za filtracijo biomase. Biomasa se v povratnem toku vrača v bioreaktor, prečiščena voda pa se izloča iz sistema čiščenja.

Veliko bioreaktorjev z mešanjem z vstopnim curkom zraka ali plina ima na stenah vgrajene pregrade, ki učinek mešanja še povečajo. Prav tako vsebujejo razna polnila, na katere se oprimejo celice biokulture. Tipičen predstavnik te vrste bioreaktorjev je Fringsov generator, v katerem se proizvaja kis s pomočjo očetno kislinskih bakterij.

Očetno kislinske bakterije so vezane ali imobilizirane na polnilo (lesene oblace), ki je potopljeno v substrat. Ker očetno kislinske bakterije potrebujejo izključno aerobne razmere, poteka mešanje substrata z vpihovanjem zraka, le-ta nato kroži okrog delcev polnila.





Slika 7: Shematični prikaz Fringsovega generatorja

Vir: Adams, 1985.

Fringsov generator je napolnjen s polnilom (parjenimi bukovimi oblanci), po katerih tekočino z vrha prši rotirajoča škropilna roka. Z zunanjim toplotnim menjalnikom je med kroženjem omogočeno učinkovito reguliranje temperature (optimalno med 28 in 35 °C), zadostno količino zraka (0,8–0,9 m/h) pa zagotavlja prezračevanje z dna generatorja. Ko količina alkohola v substratu pade z začetnih 4–5 % na okoli 0,3 %, proces zaustavimo. Del kisa odčrpamo, preostanek pa dopolnimo s svežim substratom, kar novi šarži skrajša lag fazo (fazo prilagajanja) in pospeši kisanje. En cikel traja približno en teden.

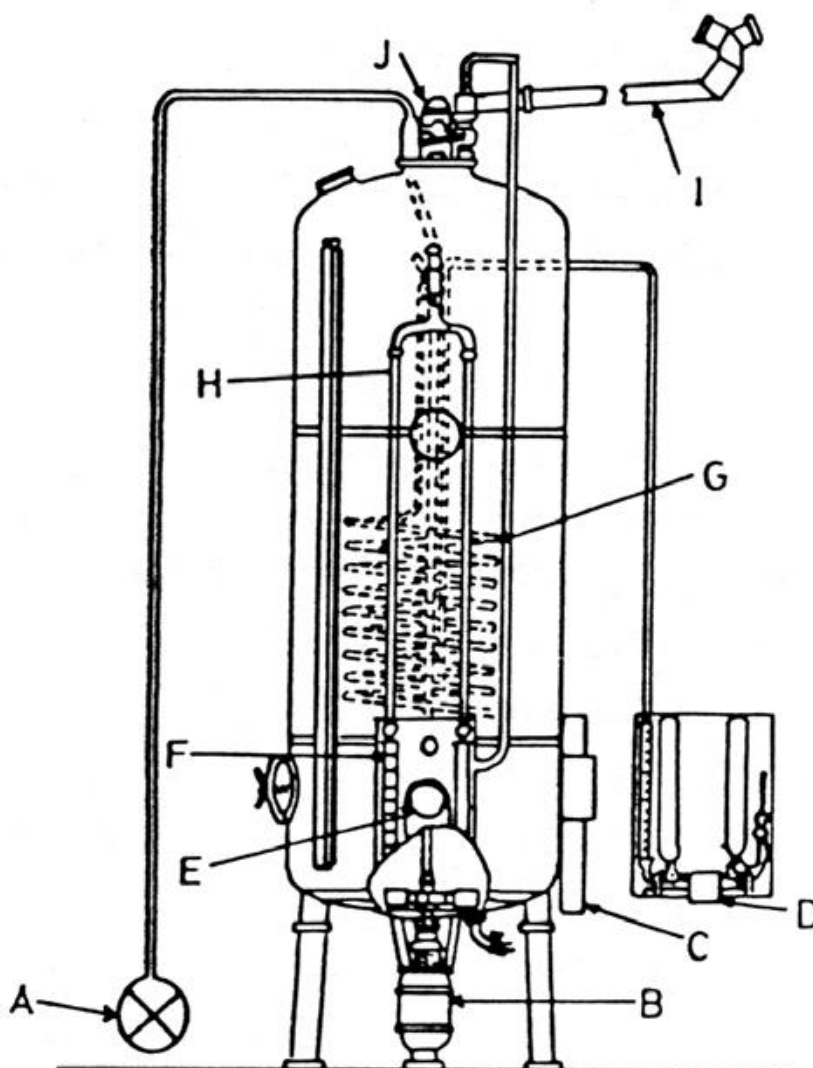
Ideja o postopku s potopljeno kulturo se je začela pojavljati konec 19. stoletja. Razvitih je bilo kar precej različnih postopkov, vendar je daleč najuspešnejši t. i. Fringsov Acetator®. Bistvo tega procesa je, da so mikroorganizmi potopljeni v samem substratu.

Ker je oacetnokislinska fermentacija aerobna, je potrebno zagotoviti stalen dovod kisika. Za to skrbi aerator. To je ponavadi plošča diskaste ali kvadratne oblike, ki ima na robovih luknjice, skozi katere potiska zrak v substrat. Že 1 minutna prekinitve dovoda zraka lahko popolnoma zaustavi proces acetifikacije, ki se tudi po ponovni vzpostavitvi prezračevanja ne obnovi.

Aerator se vrti s hitrostjo 1450–1750 min<sup>-1</sup> in predstavlja največji del energije, potrebne za obratovanje od 1,2 do 20,0 kWh/h. Temperatura med fermentacijo je vzdrževana na 30 °C, kar omogoča hladilna kača znotraj acetatorja, po kateri se hladilna voda pretaka s hitrostjo 500–8000 l/h (Adams, 1985).

Zaradi prej omenjene občutljivosti je pri večjih kisarnah nujno potrebna uporaba električnih generatorjev, ki se vklopijo v primeru izpada električne energije. Večji problem pri submerznih fermentacijah lahko predstavlja tudi penjenje.

Pena, ki nastane zaradi prisotnih površinsko aktivnih snovi, lahko vodi do izgub tekočine, blokade zračnih izpuhov, poveča se nevarnost infekcij, hitrost prenosa kisika pa je manjša. Nastajanje pene lahko uravnavamo s protipenilci, vendar se ob njihovi uporabi poveča velikost plinskih mehurčkov v tekočini, zaradi česar se zmanjša hitrost prenosa kisika in s tem učinkovitost prezračevanja.



Slika 8: Shematični prikaz acetatorja

A, črpalka; B, motor za mešalo; C, alkoholmeter; D, ventil za hladilno vodo; E, termostat; F, rotameter; G, hladilna kača; H, cev za zrak; I, izpuh za zrak; J, razbijalec pene.

Vir: [http://web.bf.uni-lj.si/zt/biotech/seminar\\_all/zivil/2002\\_03/Jabolcni%20kis.pdf](http://web.bf.uni-lj.si/zt/biotech/seminar_all/zivil/2002_03/Jabolcni%20kis.pdf)

## Bioreaktorji z mešanjem z obtočno črpalko

V teh bioreaktorjih mešamo in prezračujemo **fermentacijsko brozgo** (substrat in biokulturo med biokonverzijo) tako, da jo s pomočjo obtočne črpalke vodimo iz bioreaktorja v prezračevalnik, ki je nameščen na vrhu bioreaktorja. Prezračevalnik meša zrak ali plin in fermentacijsko brozgo in to mešanico vbrizgava v notranjost bioreaktorja. Tako se vsebina bioreaktorja intenzivno premeša in prezrači. Obtočna črpalka mora biti tlačna ali potisna, omogočati mora sterilizacijo in ločevanje pene od fermentacijske brozge.

Ti bioreaktorji so uporabni za bioprocese, v katerih uporabljamo substrate z nizko viskoznostjo. V praksi se uporabljajo v proizvodnji organskih kislin in pri čiščenju odpadnih voda.

## Bioreaktorji za biosintezo posebnih produktov

Bioreaktorji za biosintezo posebnih produktov so bioreaktorji manjših volumnov, opremljeni z zelo natančnimi merilnimi instrumenti, ki omogočajo nadzor in uravnavanje večih parametrov. Uporabljajo se za proizvodnjo specialnih terapevtskih encimov, hormonov, gensko spremenjenih proteinov in za gojenje tkivnih kultur.

Poznamo več tipov bioreaktorjev za biosintezo posebnih produktov:

- **bioreaktor z lebdečim slojem** – biokultura je imobilizirana v kroglicah iz poroznega stekla, ki jo ščitijo pred poškodbami sil, ki nastanejo pri mešanju fermentacijske brozge.
- **bioreaktor s poroznimi vlakni** – kot prezračevalnik in kot mešalo služijo porozna vlakna, obešena na mešalu. Med mešanjem vlakna nihajo in odnašajo vstopni zrak s površine poroznih vlaken v fermentacijsko brozgo. Uporablja se za proizvodnjo celičnih in tkivnih kultur, ki ne marajo mehanskega mešanja in intenzivnega prezračevanja.
- **ultrafermentor** – je kombiniran bioreaktor, v katerem potekata fermentacija in ultrafiltracija med samim bioprosesom tako, da nastali produkt odteka skozi membrano, preostali substrat pa se vrača v fermentor. S tem se povečuje ekonomičnost in produktivnost bioprocresa.
- **fotoreaktor** – se uporablja za gojenje biokultur, ki so sposobne fotosinteze (alge, rastlinske tkivne kulture). Fotoreaktor ima veliko površino za vnos svetlobe in naprave za odvajanje nastalega kisika, ki bi nadaljnje gojenje biokulture zaviral. Na ta način vzgajamo v praksi tržno zanimive alge kot sta *Clorella* in *Spirullina*.

## 2.5 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA

Pripravljalni procesi so v biotehnologiji zelo pomembni. Od njih je odvisna uspešnost samega bioprocesa. Izbrati moramo primeren mikroorganizem, ki nam bo omogočal proizvodnjo zelenega produkta. Včasih je potrebno mikroorganizem za potrebe bioprocesa tudi spremeniti (s spremembo ekoloških faktorjev, s posegi na genetskem nivoju) in seveda ustrezno shraniti. Uspešno shranjen mikroorganizem bo ohranil svojo aktivnost tudi v daljšem časovnem obdobju. Pri izbiri substrata pa moramo izbrati takšnega, ki bo po elementarni sestavi čim bližje sestavi našega delovnega mikroorganizma. Substrate pred začetkom steriliziramo, da iz njih odstranimo morebitne kontaminante, ki bi motili sam bioproces. Za bioproces potrebujemo bioreaktor, tj. prostor, v katerem potekajo vodeni bioprocesi.

1. Naštejte načine in tehnike izbire biokulture.
2. Kje lahko dobimo biokulture za izbrani bioproces?
3. S katerimi tehnikami lahko biokulture trajno shranjujemo?
4. Katere sestavine mora vsebovati substrat?
5. Naštejte nekaj naravnih in nekaj umetnih substratov in predvidite njihovo uporabnost.
6. Kako substrate steriliziramo?
7. Kaj pomeni izraz kontaminacija bioprocesa?
8. Kaj je bioreaktor?
9. Kako delimo bioreaktorje?
10. Naštejte in opišite posamezne vrste bioreaktorjev in navedite njihovo uporabnost za posamezni bioproces.
11. S pomočjo spletnih strani poiščite vsaj 3 različne slike bioreaktorjev in opredelite vrsto bioprocesa.

## 3 BIOPROCES

Bioproces poteka v izbranem bioreaktorju, napolnjenem s substratom in biokulturo. Bioprocese ločimo:

### a) glede na merilo:

- **laboratorijski bioproces** – poteka v bioreaktorjih do 5 litrov volumna, lahko pa tudi v petrijevkah in erlenmajericah. Uporablja se predvsem za izbiro biokulture in substrata ter za revitalizacijo biokultur.
- **polindustrijski ali pilotski bioproces** – poteka v bioreaktorjih od 5–200 litrov volumna. Uporablja se za iskanje in optimizacijo optimalnega okolja za želeno delovanje biokulture z uravnavanjem pH vrednosti, koncentracije kisika, temperature, koncentracije hranilnih snovi, hitrosti mešanja.
- **industrijski bioproces** – poteka v bioreaktorjih od 5.000 do 100.000 litrov volumna. Pomembno je, da je čim bolj ekonomičen.

### b) glede na trajanje:

- **šaržni ali zaprti bioproces;**
- **kontinuirni ali odprti bioproces;**
- **polkontinuirni ali polodprti bioproces.**

### 3.1 Šaržni ali zaprti bioproces

Šaržni ali zaprti bioproces se imenuje bioproces, pri katerem na začetku bioprocasa damo v bioreaktor substrat in biokulturo. V bioreaktor **med bioprocenom ničesar ne dodajamo ali odvezamo**. Bioproces poteka tako dolgo, dokler ima biokultura optimalne pogoje za delovanje in ustvarjanje produkta. Ko je bioproces končan, bioreaktor izpraznimo, iz biokulture in substrata pa izoliramo produkt.

Tipična primera takšnega bioprocasa sta **alkoholno vrenje** mošta v vino in **mlečnokislinska fermentacija** mleka v jogurt ali kislo mleko.

Pri alkoholnem vrenju v sod (bioreaktor) nalijemo mošt (substrat) in vanj dodamo kvasovke (biokulturo). Sod zapremo na vrhu z vrelna veho in na ta način vzpostavimo anaerobne razmere v sodu. Kvasovke začnejo pretvarjati sladkor iz mošta v alkohol in ogljikov dioksid. Bioproces spremljamo z merjenjem parametrov kot so: temperatura, koncentracija sladkorja, količina ogljikovega dioksida, koncentracija etanola, število kvasovk. Ko je koncentracija etanola dovolj visoka, kvasovke odmrejo in bioproces je s tem končan.

## 3.2 Kontinuirni ali odprti bioproces

Kontinuirni ali odprti bioproces je bioproces, pri katerem med samim bioprocenom v bioreaktor dodajamo sveži substrat in hkrati odvajamo produkt tako, da je koncentracija snovi v bioreaktorju vedno enaka.

Kontinuirni ali odprti procesi lahko potekajo dolgo časa, saj ima biokultura vseskozi ustrezne pogoje za biokonverzijo.

## 3.3 Polkontinuirni ali polodprti bioproces

Polkontinuirni ali polodprti bioproces je bioproces, ki začne teči enako kot šaržni ali zaprti bioproces, ko pa biokultura doseže fazo hitre rasti ali začetek stacionarne faze, pa začnemo dodajati v bioreaktor sveži substrat toliko časa, dokler bioreaktor ni poln. S tem v substratu povečamo koncentracijo hranilnih snovi in zmanjšamo koncentracijo metabolnih produktov. Zaradi tega se podaljšata faza rasti in stacionarna faza. Produktivnost tega sistema je večja od šaržnega, hkrati pa je tehnično manj zahteven od kontinuirnega bioprocena.

Polkontinuirni ali polodprti način kultivacije je primeren za gojenje tistih biokultur ali produktov, pri katerih pride do zaviranja rasti/delovanja biokulture zaradi pomanjkanja hranilnih snovi, niso pa občutljive na svoje metabolne produkte.

## 3.4 Kriteriji, ki določajo uporabo načina kultivacije

Kriteriji, ki določajo, kakšen sistem kultivacije bomo v posameznem bioprocenu uporabili, so odvisni od količine vode v gojišču in prisotnosti kisika v gojišču.

### 1. Količina vode v gojišču

Količina vode določa tip gojišča (tekoče, poltekoče, trdno) in s tem tudi tip kultivacije. Tipi kultivacije so lahko:

- kultivacija v substratu (globinska ali submerzna),
- kultivacija na substratu (površinska ali emerzna),
- kultivacija imobiliziranih biokultur (vezanih v ali na nosilec).

Primeri uporabe različnih tipov gojišč so:

- kultivacija v tekočem gojišču, ki se uporablja pri proizvodnji pekovskega kvasa;
- kultivacija na tekočem gojišču, ki se uporablja pri proizvodnji kisa in citronske kisline;
- kultivacija v čvrstem gojišču, ki se uporablja pri proizvodnji sirov s plemenito plesnijo in pri razgradnji odpadkov;
- kultivacija na čvrstem gojišču, ki se uporablja pri proizvodnji gob.

## 2. Prisotnost kisika v gojišču

Glede na potrebe po kisiku ločimo:

- aerobno kultivacijo, pri kateri mora biti kisik v substratu prisoten;
- anaerobno kultivacijo, ki poteka brez prisotnega kisika v substratu.

## 3.5 Uporaba sistemov kultivacije

Teoretično je kontinuirni sistem kultivacije najboljši, ker so pri tem bioprocesu v bioreaktorju vedno enaki pogoji in je možnost nadzora in kontrole bioprocesa optimalna. Kljub temu ga v praksi zelo malo uporabljajo, razen za proizvodnjo biomase in etanola. V praksi se bolj uporabljata šaržna in polkontinuirna bioprocesa.

Kontinuirni sistem kultivacije ima tudi slabo lastnost, in sicer večjo možnost kontaminacije med bioprocesom zaradi stalnega nadomeščanja alikvotnega dela substrata s svežim in odvajanje produkta.

Največji napredek je bil dosežen na razvoju polkontinuirnih sistemov, s katerimi danes proizvedemo največ pekovskega kvasa in antibiotikov.

## 3.6 Bioprodukti

V bioprocesu nastanejo številni bioprodukti kot rezultat biokonverzije. Med bioproducte štejemo **celice delovnih mikroorganizmov**, snovi, ki se akumulirajo v celicah ali se sproščajo v okolje. Delimo jih na primarne in sekundarne metabolite.

**Primarni metaboliti** so snovi, ki jih celice izločajo v okolje ves čas svojega življenja in jih za svojo rast ne potrebujejo. Med primarne metabolite uvrščamo tudi ekstracelularne encime, ki jih celice izločajo v okolje, da lahko z njimi razgradijo hranilne snovi in jih potem uporabijo za rast.

**Sekundarni metaboliti** so snovi, ki v celici pričnejo nastajati šele v fazi intenzivne rasti ali v začetku stacionarne faze rasti. V okolje se pričnejo sproščati šele po razgradnji celične membrane. Do izločanja v okolje pride, če membrano mehansko poškodujemo ali jo razgradimo z encimi, v naravi pa se to zgodi ob avtolizi celice.

Sekundarni metaboliti so lahko tudi spremenjeni ali predelani primarni metaboliti.

### **3.7 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA**

Bioproces poteka v bioreaktorju, napolnjenem s substratom in biokulturo. Bioprocese ločimo glede na merilo in glede na trajanje. Kriteriji, ki določajo, kakšen sistem kulture bomo v posameznem bioprocesu uporabili, so odvisni od količine vode in prisotnosti kisika v gojišču. Na koncu bioprocasa pridobimo različne bioprodukte. Bioprodukti so lahko same celice biokulture, ali pa nastajajo kot primarni in sekundarni metaboliti.

1. Kako delimo bioprocese glede na merilo?
2. Definirajte šaržni ali zaprti bioproces.
3. Na osnovi primera opišite razlike med kontinuirnim in polkontinuirnim bioprocesom.
4. Pojasnite razlike med primarnimi in sekundarnimi metaboliti.



## 4 SPREMLJANJE POTEKA BIOPROCESA

Bioproces lahko vodimo in spremljamo, če imamo na voljo informacije, ki jih dobimo kontinuirano ali v časovnih intervalih z off line, in line ali on line analizami. Cilj spremljanja poteka bioprocesa je omogočiti optimalne pogoje rasti biokulture, optimizirati porabo energije, surovin in časa ter izboljšati kakovost produktov. Merilni sistemi morajo omogočati sterilno vzorčenje in imeti kratek odzivni čas. Pomembni sta tudi operacijska (med delovanjem merilnika se ne spreminja njegova natančnost merjenja) in mehanska (med delovanjem sestavni deli merilnika ne spreminjajo svojih mehanskih lastnosti) stabilnost merilnih sistemov.

### 4.1 Načini spremljanja poteka bioprocesa

#### Off line analiza

Pri **off line** analizi vzamemo vzorec iz bioreaktorja v določenih časovnih intervalih in ga shranimo za poznejšo analizo.

#### On line analiza

Pri **on line** analizi vzorčenje in prenos vzorca do senzorja potekata avtomatsko in se izvajata kontinuirano ali pa v določenih časovnih intervalih.

#### In line analiza

Pri **in line** analizi poteka vzorčenje kontinuirano v samem bioreaktorju, kar pomeni, da rezultate meritev dobimo takoj, samo merjenje pa ne povzroča spremembe vzorca.

### 4.2 Merilniki

Merilniki so sestavljeni iz merilne naprave in senzorja, ki prihaja v stik z merjeno snovjo. Pri izbiri merilnika moramo biti pozorni predvsem na občutljivost merilnika, odzivni čas, ponovljivost meritev, natančnost merjenja, merilno območje in možnost shranjevanja meritev.

Tabela 3: Parametri merjenja s pripadajočimi napravami in principom merjenja

Parametri	Naprave	Princip merjenja
temperatura	termometri	Sprememba prostornine snovi s temperaturo.
tlak	tekočinski manometri	Merjenje višine stolpca tekočine.
pretok	rotacijski merilniki pretoka	Hitrost vrtenja rotorja glede na količino pretoka plina ali tekočine.
viskoznost	viskozimetri	Meri pretok tekočine skozi kapilaro.
motnost	turbidimetri	Meri intenziteto prepuščene sipane svetlobe.
pH vrednost	pH meter	Merjenje koncentracije H <sup>+</sup> ionov.
konc. kisika	kisikova elektroda	Merjenja koncentracije kisika v brozgi.

Vir: Raspor, P. Biotehnologija. Ljubljana: BIA d. o. o., 1996.

Danes se na področju biotehnologije vedno bolj uporabljajo optične metode merjenja fizikalnih in kemijskih parametrov bioprocesa, ki temeljijo na tehnologiji prenosa svetlobe skozi optična vlakna. Svetloba potuje po optičnem vlaknu in se na koncu zbere na področju, kjer želimo izvesti meritev. Ko svetlobni delec zadene merjeno snov, povzroči gibanje molekul in atomov v tej snovi in to se odrazi kot sprememba valovne dolžine vpadne svetlobe ali kot sprememba polarizacije vpadne svetlobe ali kot sprememba intenzivnosti vpadne svetlobe.

### 4.3 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA

Ugotavljanje sestavin v substratu in spremljanje parametrov bioprocesa omogoča optimizacijo bioprocesa in nastanek kakovostnega produkta. Od načinov spremljanja bioprocesa je najučinkovitejša **in line** analiza, kjer dobimo rezultat analize takoj in lahko takoj reagiramo na spremembe bioprocesa. Merilniki so sestavljeni iz senzorja in merilne naprave.

1. Zakaj je potrebno bioprocese spremljati in nadzirati?
2. Katere načine spremljanja bioprocsov poznamo?
3. Kako so zgrajeni merilniki in na kaj moramo paziti pri njihovi izbiri?
4. Naštej vsaj tri parametre merjenja s pripadajočimi napravami in principom merjenja.

# 5 TEHNIKE IZOLACIJE PRODUKTOV – METABOLITOV

Cilj metod izolacije je **v čim večji meri izkoristiti bioproducte**. Uporabljamo različne metode, izbira pa je odvisna od vrste substrata, vrste metabolitov, sredstev. Spoznali bomo, da so postopki izolacije sestavljeni iz posameznih faz, ki obsegajo:

- pripravo fermentacijskih brozg,
- ločevanje biomase od tekoče faze,
- izolacije aktivnih produktov,
- dodelave aktivnih produktov.

Cilj tega poglavja je spoznati postopek izolacije produktov po končanem bioprocesu in posamezne tehnike izolacije.

## 5.1 PRIPRAVA FERMENTACIJSKE BROZGE

Bioproces se zaključi z izstopom **fermentacijske brozge** iz bioreaktorja. Brozga je ponavadi sestavljena iz preostankov gojišč, mikrobnih metabolitov, biomase in vode. Ob izstopu iz bioreaktorja želimo ustaviti bioreakcije, preprečiti nezaželjeno kontaminacijo in pripraviti brozgo na filtracijo.

### Hlajenje

Brozgo pred vstopom v postopek izolacije navadno ohladimo na čim nižjo temperaturo, da **upočasimo bioreakcije** ob koncu bioprocesa. Z nižanjem temperature tudi močno **zmanjšamo intenzivnost kontaminacije**.

### Flokulacija

Pred filtracijo lahko s pridom uporabimo flokulacijo, s katero **povečamo velikost delcev** za primerno posedanje. To dosežemo z dodatki različnih polielektrolitov in pomožnih sredstev, kot so  $\text{Al}^{3+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  soli. Mikroskopsko **majhni delci aglomerirajo (se združijo) v večje skupke**, kar močno olajša posedanje.

### Razbijanje celic

Če izoliramo intracelularne metabolite, moramo najprej na nek način uničiti celično steno. To lahko storimo z razbijanjem celic **s kemičnimi vplivi, z encimi, termično ali mehansko**.

V praksi uporabljamo predvsem kemijske metode, v zadnjem času pa tudi mehansko razbijanje celic z ultrazvokom ali visoko tlačnimi homogenizatorji. To so visokotlačne črpalke,

ki tlačijo fermentacijsko brozgo z visokim pritiskom skozi ventil za razbijanje, kjer se celice raztrgajo zaradi velikih strižnih sil ob prehodu iz visokega na normalni tlak.

## 5.2 FILTRACIJA

Filtriranje se v biotehnologiji uporablja pogosto, in sicer obratna (reverzna) osmoza, ultrafiltracija in mikrofiltracija.

Z **ultrafiltracijo** zadržimo molekule med 1–5 nm nad membrano, medtem ko ioni soli in pufra ter voda potujejo skozi. Tako koncentriramo proteine, bakterije in viruse, razsolimo vzorce ali zamenjamo pufre.

Z **mikrofiltracijo** odstranimo delce od 0,05 do nekaj deset  $\mu\text{m}$ . Mikrofiltracija se uporablja za pripravo sterilnega zraka in sterilizacijo raztopin, v zadnjem času pa tudi za ločevanje biomase od vodne faze.

Filtre za mikrofiltracijo delimo na globinske in membranske.

**Globinski filtri** so iz gosto prepletenih vlaken. Delci se ujamejo na površini filtrov in se adsorbirajo v filtrih, ki so debeli od 50–120  $\mu\text{m}$ . Imajo veliko kapaciteto zadrževanja nečistoč in so relativno poceni, zato se velikokrat uporabljajo kot predfiltri za podaljšanje življenjske dobe membranskih filtrov.

**Membranski filtri** so tanjši (10  $\mu\text{m}$ ) in zadržijo delce na svoji površini. Lahko so simetrični in asimetrični.

**Simetrični filtri** so enoslojni, s porami enake velikosti in oblike, ki so porazdeljene enakomerno.

**Asimetrični filtri** imajo pore večjih velikosti na zgornji strani membrane, na spodnji strani pa je velikost por manjša. Zgornji del membrane deluje kot lovilec večjih delcev, v spodnjem pa lahko dosežemo tudi zadrževanje mikroorganizmov in s tem sterilnost filtrata. Največja prednost takih membran je, da zagotavljajo velike hitrosti pretoka skozi membrano daljši čas kot simetrične membrane.

Membranski filtri so lahko **v obliki končnih filtrov**, kjer tekočina teče pravokotno na filtre ali prečno **in tangencialni**, kjer tekočina teče paralelno s filtrnim medijem. S tangencialno filtracijo preprečimo, da bi se zadržani delci prilepili na membrano in blokirali filtracijo, saj jih paralelni tok sproti odnaša s površine.

Skoraj vedno je potrebno ločiti biomaso oz. suspendirani del fermentacijske brozge od tekoče vodne faze. Filtracijske naprave morajo imeti velike zmogljivosti, odstraniti pa morajo tudi **delce velikosti 0,5 mikrona navzgor**.

## 5.3 KONCENTRIRANJE PRODUKTA

Produce koncentriramo, da odstranimo vodo in jim s tem podaljšamo rok trajanja ter zmanjšamo stroške prevoza.

### Obarjanje

Pri obarjanju izkoriščamo različno topnost proteinov, ki je odvisna od pH, ionske jakosti in temperature raztopine. Z dodatkom soli, polielektrolitov, neionskih polimerov ali organskih topil, spremenimo lastnosti topila in povzročimo obarjanje iskanega proteina ali nečistoč.

### Koncentriranje z reverzno osmozo

Pri tem postopku s primerno tlačno razliko ustavimo in **obrtno tok manjših, mobilnih molekul topila (vode) skozi selektivno propustno membrano** tako, da se koncentracija topljenca na tlačni strani povečuje, dokler premagujemo osmotski tlak.

Naprave, ki delujejo na tem principu, so vse pogostejše, ne le za koncentriranje, ampak tudi za čiščenje odpadnih vod in pripravo zelo čiste vode.

## 5.4 KROMATOGRAFSKI KORAKI

Praktično vsak proces čiščenja proteinov vsebuje vsaj eno kromatografsko stopnjo. Število in zaporedje kromatografskih korakov pa je prilagojeno posameznemu proteinu oziroma zahtevani stopnji čistosti. Iskani protein moramo na osnovi njegovih specifičnih lastnosti ločiti od nečistoč. Pri tem izkoriščamo topnost, stabilnost, površinski naboj, hidrofobnost, velikost in obliko molekule. Topnost proteina je odvisna od hidrofилnih in hidrofobnih stranskih skupin aminokislin. Nanjo vplivamo s spreminjanjem pH okolice. Proteini so manj topni pri pH-vrednostih, ki so blizu njihovi izoelektrični točki.

Pri načrtovanju procesa moramo upoštevati tudi stabilnost proteina, da ohranimo njegovo biološko aktivnost.

V proizvodnji biotehnoloških produktov najbolj uporabljamo ionsko izmenjevalno kromatografijo.

### Ionska izmenjevalna kromatografija

Po ločevanju biomase od tekoče faze velikokrat nadaljujemo postopek z ionskimi izmenjevalci. Ionska izmenjava je ena od metod, s katerimi selektivno ločimo aktivne metabolite od preostanka gojišča. Metabolit je ponavadi organska spojina s kationskim ali anionskim značajem, tako da ga lahko izmenjamo z ustreznim ionom na izmenjevalni smoli.

Danes se za ionske izmenjevalce običajno uporabljajo polimeri divinilbenzena, stirena in akrilnih smol. Osnovna polimerna rešetka vsebuje funkcionalne skupine, ki so lahko bazične ali kisle.



Izmenjevalno smolo po uporabi regeneriramo s prebitkom iona, ki smo ga izmenjali. Glede na jakost funkcionalnih skupin ločimo šibko in močno kisle in šibko in močno bazične izmenjevalce, glede na njihovo strukturo pa gelske in makroporozne.

## 5.5 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA

Prava izbira samega postopka izolacije in izolacijskih tehnik je zelo pomembna za uspešno izolacijo produkta. Z napačno izbiro lahko tvegamo, da produkt med izolacijo izgubimo, kontaminiramo ali pa ga pridobimo v bistveno manjši količini od predvidene. S samo izolacijo produkta so povezani veliki materialni stroški in s tem cena produkta na trgu. Zelo pomembno je, da pri izolaciji izberemo čim manj faz, ker se s tem tveganja zmanjšajo. Osnovni model izolacije produkta predvideva najprej hlajenje, ločevanje trdne in tekoče faze, izločanje produkta in njegovo koncentriranje.

1. Kaj je fermentacijska brozga?
2. Kaj je flokulacija?
3. Katere načine filtracije poznate?
4. Razložite, kdaj kot tehniko izolacije uporabimo ionsko izmenjevalno kromatografijo?
5. Pojasnite, katere tehnike izolacije bi izbrali v primeru izolacije kvasovk in katere v primeru izolacije intracelularnih encimov?

## 6 BIOTEHNOLOGIJA V SLOVENIJI

V tem poglavju bomo spoznali, da obvladovanje in razvoj biotehnologije v Sloveniji ne zaostaja bistveno za svetovnimi koraki. Biotehnologija zahteva interdisciplinaren pristop in sodelovanje različnih strokovnjakov, še posebej na področju moderne biotehnologije. Biotehnologijo danes delimo po posameznih področjih na mikrobno, rastlinsko, živalsko, farmacevtsko, medicinsko, kmetijsko, okoljsko, idr. Za majhno državo je ključnega pomena izbor tehnologij, ki jih bo strokovno podpirala. Na eni strani imajo prednost tehnologije, ki so v pomoč človeku (zdravje, hrana), na drugi strani pa tiste, ki imajo visoko profitno stopnjo (moderna biotehnologija).

Ko poskušamo opredeliti pomen biotehnologije v slovenskem prostoru, je njena razširjenost v veliki meri odvisna od tega, kako biotehnologijo definiramo.

V literaturi najdemo naslednje delitve biotehnologije: **mikrobna biotehnologija**, **rastlinska biotehnologija** in **živalska biotehnologija**, ki poimenujejo biotehnologijo po organizmih, na katerih temelji. Na drugi strani so v slovenskem prostoru poznane **živilska**, **okoljevarstvena**, **farmacevtska**, **medicinska**, **fermentacijska** in **kmetijska biotehnologija**.

Tabela 9: Biotehnološke aplikacije v Sloveniji, povezane z mikrobno, rastlinsko in živalsko biotehnologijo

Področje:	Biotehnološka uporaba:
fermentacijska tehnologija	etanol, organske kisline.
farmacevtska biotehnologija	antibiotiki; monoklonska protitelesa; biosenzorji; diagnostične metode; ergot alkaloidi; encimi.
kmetijska biotehnologija	vegetativno razmnoževanje; transgene vrste, sorte, kultivarji rastlin; rastlinski hormoni; biognojenje (fiksacija elementov); insekticidi mikrobne izvora;

Področje:	Biotehnološka uporaba:
	transgene vrste in pasme živali; dodatki za živalsko krmo: encimi, probiotiki; veterinarski pripravki: zdravila, vakcine, diagnostika.
medicinska biotehnologija	diagnostične metode.
okoljska biotehnologija	predelava odpadkov v hrano in krmo; kompostiranje; proizvodnja bioplina; mikrobna razgradnja strupenih snovi; biološko čiščenje odpadnih vod.
živilska biotehnologija	fermentirane jedi in pijače; genetsko spremenjeni mikroorganizmi in starter kulture; beljakovine; encimi; umetna sladila; slani peptidi; barvila; organske kisline, arome in ojačevalci arom; biopolimeri, zgoščevalci; sredstva za želiranje in kapsuliranje; okisovalci; prehranski dodatki: vitamini, aminokisliline; površinsko aktivne snovi.

Vir: Raspor, P. Biotehnologija, BIA d. o. o., Ljubljana, 1992.

Poseganje v genom organizmov z namenom, da bi spremenili njihove lastnosti, je najbolj razširjen pri mikroorganizmih, srečujemo ga tudi pri rastlinah in živalih. Primer take aplikacije je dopolnitev genetske informacije bakterije *E. coli* z majhno krožno molekulo DNA, ki povzroča, da tako spremenjene bakterijske celice proizvajajo novo beljakovino – človeški rastni hormon. V biotehnoloških postopkih ga izolirajo iz bakterijskih celic in ga prečiščenega uporabljajo za zdravljenje pritlikavosti.



Primer uporabe informacij o genomu organizmov za izboljšanje učinkovitosti tradicionalnih postopkov žlahtnenja in selekcije lahko poiščemo v rastlinski biotehnologiji: v sušnih predelih je bistvenega pomena, da so kulturne rastline odporne na sušo in zato so žlahtnitelji posvečali posebno pozornost izbiri takih sort koruze, ki so bolj odporne na sušo.

Kolikšen potencial za nove proizvodne tehnologije pomenijo novosti v reprodukcijski tehnologiji, nam lahko najbolje ponazori veliko zanimanje, ki ga je zbudila novica v zvezi s kloniranjem ovce Dolly. Tehnologija kloniranja omogoča proizvodnjo genetsko identičnih osebkov in tako obide naključni izbor genetskih informacij, ki jih starši posredujejo potomcem pri spolnem razmnoževanju.

### **Z uporabo novih biotehnoloških tehnik nastajajo novi živilski dodatki in izdelki, za katere bo potrebno postaviti kriterije in predpise za njihovo varno uporabo.**

Za preverjanje varnosti novih živil je Evropska unija že v letu 1997 uvedla uredbo o Novih živilih in novih sestavinah živil. Po tej uredbi mora podjetje, ki želi prvič tržiti nov produkt predložiti predlog o tem pristojnemu oblastnemu organu v državah, kjer ga želi prodajati.

Na podlagi Zakona o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (Uradni list RS, št. 52/00 in 42/02), je minister za zdravje v soglasju z ministrom za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano in ministrom za okolje, prostor in energijo 5. 12. 2002 izdal **Pravilnik o novih živilih**.

Ta pravilnik določa posebne zahteve, ki jih morajo izpolnjevati nova živila in nove sestavine živil, način njihovega označevanja, prijavo in druge pogoje za pridobitev dovoljenja za dajanje v promet.

Nova živila so definirana kot živila in sestavine živil, ki se do sedaj še niso v pomembnem obsegu uporabljala za prehrano ljudi in se razvrščajo v naslednje skupine:

- a) živila in sestavine živil, ki vsebujejo ali jih sestavljajo gensko spremenjeni organizmi;
- b) živila in sestavine živil, pridobljena iz gensko spremenjenih organizmov, ki pa gensko spremenjenih organizmov ne vsebujejo;
- c) živila in sestavine živil z novo ali namerno spremenjeno primarno molekularno strukturo;
- d) živila in sestavine živil, ki jih sestavljajo ali so pridobljena iz mikroorganizmov, gliv ali alg;
- e) živila in sestavine živil, ki jih sestavljajo ali so pridobljene iz rastlin, in sestavine živil, pridobljene iz živali, razen živil in sestavin živil, pridobljenih s tradicionalnim razmnoževanjem ali gojenjem, ki že veljajo za varna živila;
- f) živila in sestavine živil, pridobljene s proizvodnim postopkom, ki povzroči pomembne spremembe v sestavi ali strukturi živila in sestavine živil, kar vpliva na njihovo prehransko vrednost, presnovo ali raven neželenih snovi, in se do sedaj še ni uporabljal.

Več o tem preberite na spletnem naslovu:

<http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=2002105&stevilka=5225>

## 6.1 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA PREVERJANJE RAZUMEVANJA

Zaradi hitrega razvoja biotehnologije so se začeli pojavljati novi pojmi v okviru tradicionalne in moderne biotehnologije. Tradicionalna biotehnologija vključuje proizvodnjo fermentirane hrane, bioprocese za čiščenje okolja in bioprocese za proizvodnjo antibiotikov. Moderna biotehnologija vključuje tehnike genskega inženiringa. Danes se tradicionalne tehnologije plemenitijo z modernimi biotehnološkimi tehnikami. Na področju prehrane se kot proizvodi moderne biotehnologije pojavljajo: nova funkcionalna hrana za specifične prehranske potrebe, novi dodatki, barvila, arome, antioksidanti.

Glede na to lahko v prihodnosti pričakujemo številne spremembe v načinu prehrane in hranilih, izkoriščanju in ohranjanju okolja, pri načinih zdravljenja bolezni, pri načinih odkrivanja bolezni. Socialni, etični in pravni vidiki uporabe biotehnologije so pomembni za uporabnike biotehnoloških metod in za uporabnike bioproizvodov.

1. Kakšni so trendi razvoja biotehnologije v prihodnosti?
2. Ali lahko v Sloveniji kupimo GSO živila?

## **7 KAZALO TABEL**

Tabela 1: Najnižje vrednosti aktivnosti vode ( $a_w$ ), ki še omogočajo rast mikroorganizmov .....	7
Tabela 2: Sestava melase .....	8
Tabela 3: Parametri merjenja s pripadajočimi napravami in principom merjenja .....	21

## 8 KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna shema bioprocasa .....	2
Slika 2: Kloniranje fragmentov DNA s plazmidnim vektorjem.....	5
Slika 3: Območja občutljivosti nekaterih mikrobov oziroma njihovih oblik na toploto .....	9
Slika 4: Avtomatski laboratorijski bioreaktor Lara.....	10
Slika 5: Bioreaktor z mešalom .....	11
Slika 6: Bioreaktor z mešanjem z vstopnim curkom zraka in membransko filtracijo .....	12
Slika 7: Shematični prikaz Fringsovega generatorja .....	13
Slika 8: Shematični prikaz acetatorja.....	14

## 9 VIRI

1. Adams M. R. 1985. Vinegar. V: Microbiology of fermented foods, vol. 1. Wood B. J. (ur.). London, Elsevier Applied science Publishers: 1–47.
2. ARZENŠEK PINTER, Rosvita. 2010. *Živilska mikrobiologija in biotehnologija: 1. letnik. Del 2, Biotehnologija, Laboratorijske vaje*, (Zbirka Višješolski izobraževalni program Živilstvo in prehrana). Dopolnjena 1. izd. Maribor: Izobraževalni center Piramida, Višja strokovna šola, 1–24.
3. ARZENŠEK PINTER, Rosvita. 2010. *Živilska mikrobiologija in biotehnologija: 1. letnik. Del 2, Biotehnologija, Študijsko gradivo*, (Zbirka Višješolski izobraževalni program Živilstvo in prehrana). Prenovljena 1. izd. Maribor: Izobraževalni center Piramida, Višja strokovna šola, 1–77.
4. Crommelin, D. J. A. in Sindelar, R. D. Pharmaceutical Biotechnology: An Introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. 2<sup>nd</sup> ed. London: Taylor&Francis, 2002.
5. <http://www.uradni-list.si/1/objava.jsp?urlid=2002105&stevilka=5225> (Dostopno online 5. 7. 2012).
6. [http://www.gene.com/Minnesota University:Biotechnology, Society and the Environment](http://www.gene.com/Minnesota%20University:Biotechnology,%20Society%20and%20the%20Environment) (Dostopno online 5. 7. 2012).
7. Raspor, P. Biotehnologija. Ljubljana: BIA d. o. o., 1992.
8. Raspor, P. Biotehnologija. Ljubljana: BIA d. o. o., 1996.
9. Raspor, P. In Smole Možina, S. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana: BIA d. o. o., 1993.
10. Sambrook, J. in Russel, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual . 3<sup>rd</sup> ed., New York: Cold Spring Harbor, 2001.
11. Sambrook, J. in Russel, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual* . 3<sup>rd</sup> ed., New York: Cold Spring Harbor, 2001.
12. Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi, Ur.l. RS št. 67/2002.