

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej

BIOTECHNOLOGIA FARMACEUTYCZNA

skrypt do ćwiczeń
dla studentów kierunku Farmacja
pod redakcją Jadwigi Turło



Warszawa 2025

Warszawski Uniwersytet Medyczny

Katedra i Zakład Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej

Biotechnologia farmaceutyczna

skrypt do ćwiczeń

dla studentów kierunku Farmacja

pod redakcją Jadwigi Turło



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

Autorzy skryptu:

prof. dr hab. n. farm. Jadwiga Turło
dr n. farm. Marzenna Klimaszewska
dr n. farm. Eliza Malinowska
dr n. med. i n. o zdr. Małgorzata Kałucka
dr n. med. i n. o zdr. Sandra Górską-Jakubowska
dr n. chem. inż. Michał Nowacki

Recenzenci:

prof. dr hab. n. farm. Agnieszka Pietrosiuk, Katedra i Zakład Biologii Farmaceutycznej
dr hab. n. farm. Joanna Stefańska, Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy

Wydano za zgodą Uczelnianej Rady ds. Kształcenia WUM

ISBN 978-83-7637-663-9

Wydano w Sekcji Druków Uczelnianych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
tel. (22) 57 20 329
e-mail: wydawnictwo@wum.edu.pl
www.drukiuczelniarne.wum.edu.pl

Spis treści

I. Wstęp	5
<i>(J. Turło)</i>	
II. Cel i przebieg ćwiczeń.....	9
<i>(J. Turło)</i>	
III. Zagadnienia teoretyczne	15
1. Pozyskiwanie i ulepszanie produkcyjnych szczepów lub linii komórkowych	15
<i>(J. Turło)</i>	
2. Metody konserwacji i przechowywania szczepów	20
<i>(M. Klimaszewska)</i>	
3. Kultury mączne, przygotowanie materiału posiewowego	21
<i>(J. Turło)</i>	
4. Podłoża hodowlane	23
<i>(J. Turło)</i>	
5. Warunki prowadzenia procesów biotechnologicznych – procesy okresowe, okresowe z zasilaniem, ciągle	26
<i>(J. Turło, M. Nowacki)</i>	
6. Budowa bioreaktorów stosowanych do prowadzenia tlenowych procesów węglnych	32
<i>(J. Turło, M. Nowacki)</i>	
7. Warunki aseptyczne w biotechnologii: wyjąławianie bioreaktora i podłoża hodowlanego, zaszczepianie hodowli w warunkach aseptycznych	37
<i>(M. Klimaszewska, M. Kałucka)</i>	
8. Parametry i kontrola procesu	43
<i>(J. Turło, M. Kałucka)</i>	
9. Wzrost szczepu, metody kontroli wzrostu, wydajność właściwa wzrostu, wydajność biosyntezy, obliczenia, wzory	47
<i>(S. Górka-Jakubowska)</i>	
10. Izolacja produktu procesu biotechnologicznego, przykłady metod wydzielania i koncentracji bioproduktów	55
<i>(M. Klimaszewska, M. Kałucka)</i>	
11. Metody optymalizacji procesu	57
<i>(J. Turło, M. Nowacki)</i>	
11.1. Optymalizacje procesu metodami statystycznymi	63
<i>(E. Malinowska)</i>	

IV. Część eksperymentalna.....68

(M. Klimaszewska, J. Turło)

1. Regulamin obowiązujący w pracowni biotechnologicznej..... 68
2. Kryteria zaliczenia przedmiotu biotechnologia farmaceutyczna 69
3. Charakterystyka ćwiczeń..... 71
4. Opis ćwiczenia 1 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów..... 71
5. Opis ćwiczenia 2 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów..... 77
6. Opis ćwiczenia 3 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów..... 82
7. Opis ćwiczenia 4 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów..... 91

Piśmiennictwo 101

Spis tabel 102

Spis rycin..... 102

I. Wstęp

Biotechnologia, zgodnie z najszerszą chyba definicją, podaną w konwencji o różnorodności biologicznej ONZ, jest interdyscyplinarną dziedziną wiedzy, efektem integracji nauk przyrodniczych i inżynierskich w celu zastosowania komórek lub ich części oraz molekularnych analogów dla pozyskania produktów i usług.

Aktualna lista technik stosowanych w biotechnologii w najczęściej cytowanych kategoriach obejmuje (wskazane obiekty badań i stosowane techniki):

1. Techniki procesów biotechnologicznych: biosynteza z wykorzystaniem bioreaktorów, bioinżynieria, biokataliza, bioprosesowanie, bioługowanie, biospulchnianie, wybielanie za pomocą środków biologicznych, bioodsierczanie, bioremediacja, biofiltracja.
2. Komórki, kultury komórkowe i tkankowe, inżynieria tkankowa, fuzja komórkowa, szczepionki i immunizacja, manipulacje na zarodkach.
3. Kwasy nukleinowe (DNA/RNA): genomika, inżynieria genetyczna, farmakogenomika, sekwencjonowanie, synteza i amplifikacja DNA lub RNA, sondy DNA, ekspresja genów.
4. Białka i peptydy: sekwencjonowanie, synteza i inżynieria białek i peptydów, izolacja i oczyszczanie, proteomika, identyfikacja i badanie struktury receptorów komórkowych, opracowanie metod transportu leków wielkocząsteczkowych, przekazywanie sygnałów.
5. Geny i wektory RNA: terapia genowa, wektory wirusowe.
6. Nanobiotechnologia: zastosowanie nano- i mikroproduktów do konstrukcji służących do badań biosystemów, transportu leków i do udoskonalania metod diagnostycznych.

7. Bioinformatyka: tworzenie genomowych i białkowych baz danych, modelowanie złożonych procesów biologicznych, biologia systemowa.

Biotechnologia farmaceutyczna jest jedną z pięciu głównych dziedzin zastosowania metod biotechnologicznych. Pozostałe cztery, to technologia środków spożywczych, rolnictwo i leśnictwo, technologia środowiska i technologia procesów chemicznych. Biotechnologia farmaceutyczna jest ukierunkowana na pozyskiwanie substancji i produktów leczniczych.

Inną metodą klasyfikacji działów biotechnologii jest podział na umowne pięć „kolorów”:

- Czerwona – to biotechnologia, której głównym obszarem zainteresowania jest służba zdrowia.
- Biała – to biotechnologia zajmująca się wykorzystaniem systemów biologicznych w przemyśle.
- Zielona – agrobiotechnologia, zajmuje się aspektami związanymi z rolnictwem, rozwiązaniami stosowanymi w celach spożywczych i niespożywczych.
- Niebieska – zajmuje się szeroko rozumianą problematyką biotechnologii wód.
- Fioletowa – zajmuje się zagadnieniami społecznymi, problemami prawnymi, w tym legislacją, ochroną własności intelektualnej, jak również zagadnieniami filozoficznymi i etycznymi.

W zakresie zainteresowania biotechnologii farmaceutycznej leżą elementy zarówno biotechnologii „czerwonej” jak i „białej” oraz „fioletowej”.

Dwa najczęściej stosowane w biotechnologii farmaceutycznej typy bioprocessów to biosynteza i biotransformacja.

- pierwszy z nich polega na otrzymywaniu odpowiedniego metabolitu wytwarzanego przez namnażane drobnoustroje, komórki lub tkanki,
- drugi, na przemianie składników pożywki – substratu, w wyniku biokonwersji lub kometabolizmu.

W obydwu tych procesach jako czynniki katalityczne wykorzystywane są komórki (drobnoustrojów, roślinne, zwierzęce – naturalne lub modyfikowane), ich fragmenty, bądź izolowane enzymy (wolne lub unieruchomione).

Pozyskanie tzw. produkcyjnych szczepów lub linii komórkowych, czyli zdolnych do wydajnej biosyntezy lub biotransformacji substancji farmakologicznie czynnych wymaga zastosowania bądź nieukierunkowanych zmian genetycznych, jak mutageneza, bądź genetycznej rekombinacji szczepów, poprzez fuzję protoplastów lub zastosowanie technologii rekombinowanego DNA. Cele takich manipulacji są różne; najlepiej znane są przykłady przeniesienia całego procesu biosyntezy do lepiej przystosowanego do niej heterologicznego organizmu produkcyjnego, czyli np. biosynteza insuliny w transformowanych bakteriach *Escherichia coli*. Przykładem zastosowania z sukcesem techniki fuzji protoplastów może być uzyskanie mających zdolność biosyntezy przeciwciał monoklonalnych hybryd (hybrydom) komórek szpiczaka i komórek śledziony immunizowanych myszy.

Inną metodą podwyższenia wydajności procesu jest optymalizacja składu podłoża hodowlanego, w tym poszukiwanie starterów, promotorów wzrostu, prekursorów procesu biosyntezy i optymalizacja warunków hodowli. W biotechnologii farmaceutycznej procesy prowadzi się w warunkach sterylnych, co ma na celu uniknięcie kontaminacji hodowli obcymi szczepami i ich produktami metabolizmu. Dla wydajnego prowadzenia procesów hodowlanych stosuje się bioreaktory o specjalnej konstrukcji, dopasowanej do wymagań różnych szczepów produkcyjnych lub linii komórkowych.

Te części bioprocessów, w trakcie których w bioreaktorach hodowane są mikroorganizmy/komórki (np. linie komórek bakterii, ssaków, hybrydy) określane są jako procesy „*upstream*”.

Upstream processing składa się z etapów związanych z:

- uzyskaniem i optymalizacją szczepu produkcyjnego lub linii komórkowej,
- uzyskaniem inokulum (zaszczepu),

- opracowaniem (optymalizacją) składu podłoża,
- optymalizacją kinetyki wzrostu, warunków hodowli i aparatury,
- przeprowadzeniem hodowli.

Po zakończeniu hodowli rozpoczyna się etap „*downstream*” bioprocessu. Polega on na izolacji i oczyszczaniu produktu i często obejmuje: separację biomasy i podłoża, dezintegrację komórek, zagęszczenie podłoża, oczyszczenie i uzyskanie ostatecznej postaci produktu.

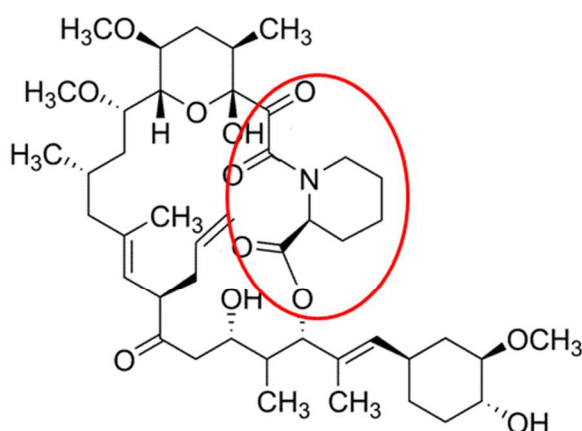
Niektóre z wymienionych powyżej zagadnień zostaną w skrótovej formie omówione w części teoretycznej tej publikacji. Należy jednak podkreślić, że funkcją niniejszego skryptu ma być wyłącznie ułatwienie studentom III roku kierunku Farmacja przygotowania do seminariów poprzedzających ćwiczenia oraz do ćwiczeń z przedmiotu *Biotechnologia farmaceutyczna*. Nie obejmuje on więc wszystkich zagadnień przewidzianych w programie nauczania tego przedmiotu. Problemy te opisane są w kilku podręcznikach wymienionych w rozdziale *Piśmiennictwo*. Omawiane są również w trakcie wykładów i seminariów z przedmiotu.

II. Cel i przebieg ćwiczeń

Jak wspomniano we wstępie, jednym z bioprocessów najczęściej stosowanych na skalę przemysłową w biotechnologii farmaceutycznej jest biosynteza. Jej celem może być uzyskanie bardzo zróżnicowanych substancji leczniczych, takich jak antybiotyki, witaminy, peptydy (np. insulina), białka (np. przeciwciała), alkaloidy (taksany) i inne.

Celem ćwiczeń z przedmiotu *Biotechnologia farmaceutyczna* prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej jest zaznajomienie studentów w praktyce z przebiegiem tego typu procesu, jego etapami, warunkami, jakie muszą być spełnione dla uzyskania substancji biologicznie czynnej, problemami – w tym również technicznymi – które mogą pojawić się w trakcie jego przebiegu. Eksperymenty prowadzone w trakcie ćwiczeń obejmują również elementy optymalizacji warunków bioprocessu, jego kontroli, izolacji produktu oraz obliczeń wydajności. Jako przykładowy proces biotechnologiczny wybrano pełny cykl biosyntezy immunosupresyjnego antybiotyku takrolimus, w wyniku hodowli szczepu promieniowca *Streptomyces tsukubaensis*. Takrolimus (Ryc. 1) jest niezwykle skutecznym immunosupresantem, stosowanym w transplantologii – w prewencji odrzucenia przeszczepu, oraz w chorobach autoimmunologicznych, np. w dermatologii (AZS, łuszczyca, łysienie plackowate, wypryski, zaburzenia keratynizacji, toczeń rumieniowaty, inne). Zaliczany jest, jeżeli chodzi o mechanizm działania, do inhibitorów kalcyneuryny. Pod względem struktury chemicznej jest to makrolid nowej generacji, 23-członowy makrolakton o bardzo złożonej izomerii optycznej, geometrycznej oraz tautomerii. Otrzymywany jest wyłącznie w drodze biosyntezy.

Tacrolimus (FK-506)



- 23-członowy makrolakton zawierający hemiketalowe ugrupowanie α,β -diketoamidowe
- Izomeria:
14 asymetrycznych atomów węgla, izomeria cis-trans, tautomeria

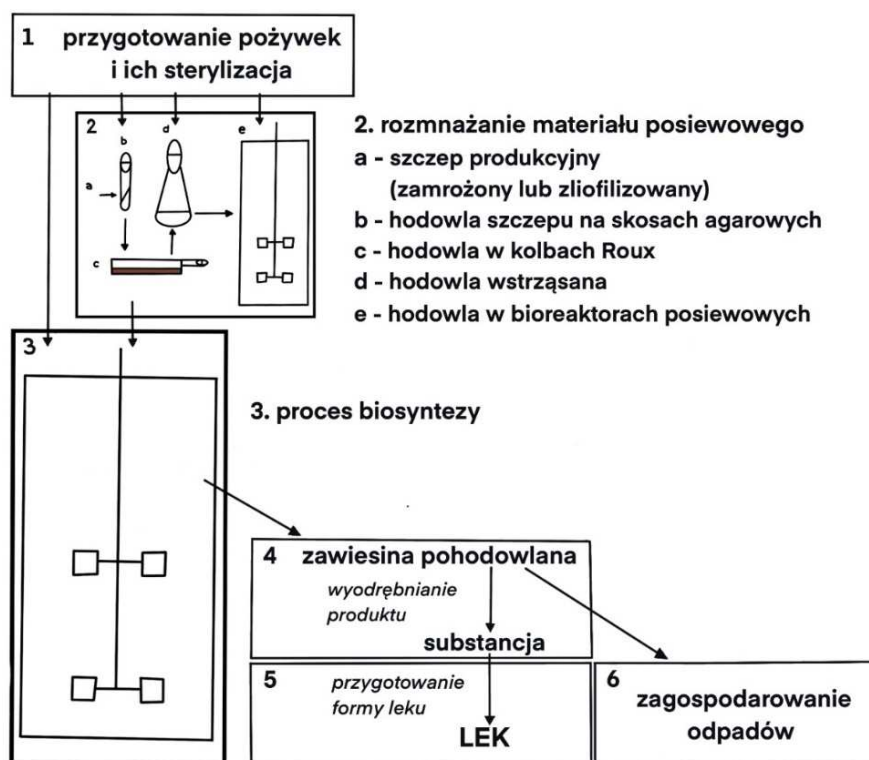
Ryc. 1. Budowa takrolimusu

Wysoka cena leków zawierających substancję czynną takrolimus jest w części spowodowana niską wydajnością procesu biosyntezy. Dla szczepu dzikiego *S. tsukubaensis* wynosiła ona kilka mg/L hodowli. W wyniku optymalizacji procesu biotechnologicznego i modyfikacji szczepu produkcyjnego osiągnięto współcześnie wartość kilkuset mg/L. Problem jest ciągle otwarty, co roku ukazuje się kilka publikacji naukowych dotyczących tego zagadnienia. Swój wkład w rozwiązywanie tego problemu, w postaci patentu i kilku publikacji naukowych ma również Katedra Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej WUM. Szczep promieniowca *S. tsukubaensis* FERM BP-927 wykorzystywany w trakcie ćwiczeń został przez Katedrę zakupiony do celów badawczych w International Patent Organism Depositary of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) Tsukuba, Ibaraki, Japonia. Prowadzone badania dotyczą optymalizacji warunków hodowli szczepu.

Bez względu na otrzymywany produkt, przemysłowy proces biosyntezy składa się z podobnych etapów:

1. Przygotowanie podłoża hodowlanych i aparatury.
2. Ożywienie i namnożenie zakonserwowanego szczepu (linii komórkowej, hybrydy itp.), hodowla inokulum (zaszczepu).
3. Podnoszenie skali procesu poprzez etapy hodowli na podłożach stałych (na płytkach Petriego lub w kolbach Roux), następnie pasaż na podłoża płynne (kolby wstrząsane, bioreaktor posiewowy).
4. Zasadniczy proces biosyntezy w bioreaktorze produkcyjnym, prowadzony przy pełnej kontroli parametrów hodowlanych.
5. Izolacja i oczyszczenie produktu biosyntezy.
6. Zagospodarowanie odpadów.

Proces blokowy biosyntezy na przykładzie antybiotyku przedstawia schemat (Ryc. 2. Schemat blokowy przemysłowego procesu biotechnologicznego [3]), cytowany wg Chmiel i Grudziński [3].



Ryc. 2. Schemat blokowy przemysłowego procesu biotechnologicznego [3]

Laboratorium z *Biotechnologii farmaceutycznej* obejmuje blok czterech ćwiczeń, które odpowiadają kolejnym etapom biotechnologicznego procesu produkcyjnego. Ćwiczenia odbywają się w odstępach tygodniowych, studenci pracują w kilkusobowych grupach. Pierwszy tydzień ćwiczeń odpowiada czynnościom objętym blokami 1-2 wg Ryc. 2. Schemat blokowy przemysłowego procesu biotechnologicznego [3].

Pierwszym krokiem jest ożywienie zakonserwowanego szczepu *S. tsukubaensis* poprzez przesiew na podłoża z agaru odżywczego na płytkach Petriego oraz na skosy agarowe. W tym celu każda z grup studenckich przygotowuje stałe podłoże hodowlane (agar słodowy), które po sterylizacji posłuży do przygotowania skosów agarowych i wylania na płytki Petriego. Po zastygnięciu podłoży agarowych zakonserwowany szczep *S. tsukubaensis* jest przesiewany w warunkach aseptycznych, w loży z nawiewem laminarnym, na przygotowane podłoża. Hodowle inkubowane są przez tydzień w cieplarni, w temperaturze 37°C.

Równocześnie przygotowywane są podłoża płynne, służące w następnym tygodniu do rozpoczęcia eksperymentu dotyczącego optymalizacji podłoża hodowlanego. Każda z grup odbywających równolegle ćwiczenia przygotowuje podłoże płynne o innym składzie. Czynnikiem różnicującym podłoża jest dodatek i stężenie substancji testowanej jako potencjalnego prekursora biosyntezy lub promotora wzrostu. Rodzaj testowanej substancji i jej stężenie w podłożu są podawane przez asystenta prowadzącego ćwiczenia i różny dla kolejnych bloków ćwiczeniowych. W dalszym przebiegu ćwiczeń zadaniem grupy jest wyciągnięcie wniosku dotyczącego celowości suplementowania podłoża testowaną substancją i funkcji, jaką dana substancja pełni w procesie biosyntezy takrolimusu (prekursor czy promotor wzrostu, obydwie funkcje, żadna z nich). Wniosek powinien być wyciągnięty na podstawie porównania wydajności wzrostu szczepu i wydajności biosyntezy takrolimusu w podłożu wzbogaconym z wynikami uzyskanymi dla podłoża niewzbogaconego.

Dla statystycznej wiarygodności uzyskanego wyniku, każdy eksperyment jest wykonywany w trzech powtórzeniach. Każda grupa przygotowuje też podłoże płynne, w którym przeprowadzona będzie hodowla inokulum do zaszczepienia podłoża w bioreaktorze. Dotyczy to etapu podnoszenia skali procesu.

Wszystkie kolby z podłożami płynnymi umieszczane są w autoklawie i uruchamiany jest program sterylizacji. W czasie oczekiwania na zestalenie się podłoży agarowych każda z grup przeprowadza próby konserwacji szczepu dwiema metodami: przez zawieszenie komórek w sterylnym roztworze 20% glicerolu i zamrożenie oraz przez posiew na skosy agarowe i przechowywanie później w temperaturze 4°C.

Drugi tydzień ćwiczeń odpowiada czynnościom objętym blokami 2-3 wg Ryc. 2. Schemat blokowy przemysłowego procesu biotechnologicznego [3].

Po tygodniu inkubacji hodowli na podłożach agarowych następuje przesiew szczepu w warunkach aseptycznych do przygotowanych i wysterylizowanych tydzień wcześniej podłoży płynnych. W tym celu hodowle na podłożach agarowych, po wyjęciu z ciepłarki, są oceniane pod względem czystości szczepu. Czyste kolonie *S. tsukubaensis* są przesiewane do podłoży płynnych przeznaczonych do prowadzenia eksperymentów nad optymalizacją podłoża i do hodowli inokulum. Kultury umieszczane są w wytrząsarce laboratoryjnej i inkubowane przez tydzień. Ze względu na zaplanowane w kolejnym etapie procesu biotechnologicznego podniesienie skali, przygotowujemy bioreaktor do hodowli wgłębnej oraz podłoże hodowlane do bioreaktora. Bioreaktor z podłożem poddawany jest sterylizacji.

Trzeci tydzień ćwiczeń odpowiada czynnościom objętym blokiem 3 wg Ryc. 2. Schemat blokowy przemysłowego procesu biotechnologicznego [3].

Po tygodniu inkubacji hodowli wstrząsanych następuje zaszczepienie przygotowanego fermentora. Wykorzystane jest inokulum szczepu *S. tsukubaensis* uprzednio (tydzień wcześniej) przygotowanego przez grupę. Po rozpoczęciu procesu biosyntezy w bioreaktorze (uruchomieniu napowietrzania,

mieszania, ogrzewania) pobrana zostaje tzw. „0” próbka brzeczki. Przez tydzień prowadzenia hodowli w głębszej w bioreaktorze, codziennie pobierane i zamrażane są próbki brzeczki hodowlanej. Zostaną one wykorzystane do analizy kinetyki biosyntezy takrolimusu na ostatnich ćwiczeniach.

Równocześnie kontynuowany jest eksperyment dotyczący optymalizacji składu podłoża hodowlanego. Dla każdej z hodowli prowadzonych w kolbach wstrząsanych przeprowadzane są oznaczenia wydajności wzrostu szczepu oraz wydajności biosyntezy produktu. Wymaga to izolacji antybiotyku i oznaczenia ilościowego metodą HPLC. Wyniki uzyskane dla trzech hodowli są uśredniane. Na podstawie porównania wyników uzyskanych dla podłoża niesuplementowanego i wzbogaconego w testowaną substancję przeprowadzona zostaje analiza funkcji, jaką dana substancja pełni w procesie biosyntezy takrolimusu (prekursor czy promotor wzrostu, obydwie funkcje, żadna z nich).

Czwarty tydzień ćwiczeń odpowiada czynnościom objętym blokami 3-4 wg Ryc. 2. Schemat blokowy przemysłowego procesu biotechnologicznego [3]. Zadaniem grupy na ostatnim ćwiczeniu jest przeprowadzenie *ex post* kontroli przebiegu procesu biosyntezy takrolimusu w bioreaktorze. Celem jest obrazowanie przebiegu procesu na wykresach zmiany stężenia źródła węgla, wydajności wzrostu biomasy oraz stężenia antybiotyku w próbkach pobranych z bioreaktora w funkcji czasu. Oznaczanie ilościowe produktu (takrolimusu) wykonywane jest metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej, po wstępnej izolacji. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzana jest analiza wydajności procesu biosyntezy, określany jest wpływ składu podłoża oraz podnoszenia skali procesu na wydajność biosyntezy. Analizowana jest również prawidłowość doboru parametrów procesu.

Każda grupa przygotowuje sprawozdanie z przeprowadzonych eksperymentów, zawierające analizę uzyskanych wyników.

III. Zagadnienia teoretyczne

1. Pozyskiwanie i ulepszanie produkcyjnych szczepów lub linii komórkowych

Do wytwarzania substancji leczniczych metodami biotechnologicznymi wykorzystuje się głównie bakterie (Gram- i Gram+), w tym promieniowce, a także grzyby strzępkowe – naturalne lub modyfikowane genetycznie. Zastosowanie w biotechnologii farmaceutycznej mają również kultury mycelialne grzybów wyższych, kultury komórek roślinnych i komórek zwierzęcych oraz hybrydy. Substancja czynna (API) otrzymywana metodami biotechnologicznymi często jest metabolitem wtórnym o złożonej strukturze, charakterystycznym tylko dla danego gatunku lub nawet szczepu (antybiotyki, immunospresanty, cytostatyki i inne). Dynamicznie rozwijającą się grupą produktów biotechnologicznych jest tzw. lek biologiczny będący związkiem wielkocząsteczkowym, często białkiem – a więc metabolitem pierwotnym (przeciwciała monoklonalne, białka fuzyjne i chimeryczne, rekombinowane białka ludzkie, antysensowne oligonukleotydy itp.). Do ich wytwarzania wykorzystuje się modyfikowane genetycznie szczepy bakterii i grzybów, a także linie komórek zwierzęcych.

Stosowane w przemyśle tak zwane produkcyjne szczepy lub linie komórkowe powinny spełniać kilka warunków. Przede wszystkim muszą wykazywać zdolność biosyntezy związku farmakologicznie aktywnego. Poza tym powinny wykazywać się zadowalającą produktywnością, być stabilne, nie podlegać łatwo mutacjom, a także być łatwe w hodowli. Cechy te uzyskuje się poprzez tzw. optymalizację szczepów i linii komórkowych, polegającą na nieukierunkowanych (mutageneza) lub ukierunkowanych (techniki z zakresu tzw. inżynierii genetycznej) modyfikacjach genomu komórek biokatalizatora. Tematyka optymalizacji

produkcyjnych szczepów i linii komórkowych jest szerzej omawiana w wykładach z przedmiotu *Biotechnologia farmaceutyczna* dostępnych na platformie e-learningowej WUM.

Szczepów wykazujących zdolność biosyntezy nowych związków farmakologicznie czynnych (nieznanych dotąd metabolitów wtórnych) poszukuje się w środowisku naturalnym lub w tzw. kolekcjach szczepów. W pracach badawczych stosuje się metody skринingowe: z próbki wody lub gleby izoluje się bytujące tam gatunki mikroorganizmów, następnie w przypadku wyizolowanych nowych, nieopisanych dotąd gatunków przeprowadza się hodowlę w podłożach płynnych i testom aktywności poddaje się ekstrakty z hodowli. Podobnym testom aktywności biologicznej można poddawać metabolity znanych gatunków przechowywanych w tzw. kolekcjach szczepów. W przypadku wykrycia aktywności biologicznej ekstraktu dalsze badania prowadzone są w kierunku identyfikacji substancji biologicznie czynnej oraz opracowania metody jej biosyntezy i izolacji. W wyniku takich poszukiwań odkryto np. w próbce gleby z okolic miejscowości Tsukuba w Japonii gatunek *Streptomyces tsukubaensis*. Wstępne testy wykazały, że ma on zdolność biosyntezy metabolitu o działaniu przeciwwgrzybiczym i immunosupresyjnym. Związek ten po zaledwie 10 latach badań został wprowadzony do leczenia jako immunosupresant pod nazwą takrolimus.

Znalezione w środowisku naturalnym szczepy, określane jako szczepy dzikie, wykazują zdolność biosyntezy farmakologicznie czynnego związku, jednak wydajność biosyntezy jest zwykle bardzo niska, często poniżej 1 mg/L hodowli. Dla uzyskania wydajnego szczepu produkcyjnego konieczna jest, jak wspomniano powyżej, modyfikacja – ulepszenie szczepu dzikiego. Oznacza to taką modyfikację genotypu danego organizmu, aby uzyskać korzystne zmiany metaboliczno-fizjologiczne. Stosowanymi metodami modyfikacji genotypu szczepów są:

- mutageneza,

- genetyczna rekombinacja szczepów, poprzez fuzję protoplastów,
- technologie rekombinowanego DNA.

Mutagenizacja jest najstarszą, stosowaną od kilkudziesięciu lat metodą ulepszania szczepów produkcyjnych. Polega na uzyskaniu na drodze mutagenezy nieukierunkowanych zmian genetycznych szczepów, a następnie selekcji mutantów o korzystnych cechach fenotypowych. Dla tej metody nie jest możliwe w pełni racjonalne postępowanie mutagenizacyjno-selektywne, ponieważ niemożliwe jest jednoznaczne ustalenie korelacji pomiędzy miejscem i typem wywołanej mutacji a efektem fizjologicznym. Możliwymi do zastosowania czynnikami mutagennymi są czynniki chemiczne (np. związki alkilujące, analogi zasad azotowych, barwniki akrydynowe), promieniowanie UV (254-265 nm), promieniowanie X, promieniowanie gamma. Efektywność procesu zależy nie tylko od użytego czynnika mutagennego, ale również od fazy hodowli komórkowej, warunków hodowli, zastosowania czynników hamujących mechanizmy naprawcze. Selekcję mutantów prowadzi się jednoetapowo (już podczas izolacji kolonii) lub dwuetapowo (testując czyste wyizolowane kultury).

Genetyczna rekombinacja szczepów (proces, w którym powstają nowe kombinacje genów) poprzez fuzję protoplastów jest metodą, w wyniku której powstają hybrydy wykorzystywane np. do produkcji wielu antybiotyków oraz przeciwciał monoklonalnych. Główną barierą dla fuzji komórek, prowadzącej do powstania hybryd, stanowi ściana komórkowa, będąca również barierą niezgodności dla rekombinacji komórek różnych gatunków. Proces fuzji rozpoczyna się od hydrolizy ściany komórkowej odpowiednimi enzymami, w środowisku zapewniającym osmotyczną stabilizację protoplastu. Wydzielone przez sączenie lub wirowanie protoplasty poddaje się fuzji pod wpływem glikolu polietylenowego, jonu wapnia i odczynu zasadowego. Opracowano również metodę elektrofuzji. Plazmogamia (łączenie się komórek i zlewanie ich zawartości) prowadzi do powstania komórek heterokariotycznych. Kolejnymi etapami procesu są: kariogamia (zlewanie się jąder), w wyniku której powstają

komórki diploidalne, mitotyczna rekombinacja i wytworzenie diploidalnych rekombinantów oraz segregacja materiału genetycznego i haploidyżacja rekombinantów. Celem tak prowadzonej rekombinacji genetycznej jest uzyskanie hybryd wykazujących połączone korzystne cechy komórek wyjściowych. Przykładowo, hybrydy (hybrydomy) uzyskane z komórek śledziony immunizowanej myszy (limfocytów B) oraz komórek szpiczaka wykazują zdolności produkcji przeciwciał skierowanych przeciw antygenowi, którym immunizowana była mysz oraz typową dla komórek nowotworowych „nieśmiertelność”, czyli zdolność do nieograniczonej liczby podziałów. Selekcja uzyskanych komórek hybrydowych pozwala na izolację linii produkujących przeciwciała wykazujące swoistość względem tylko jednego epitopu danego antygeny (przeciwciała monoklonalne). Innym przykładem zastosowania techniki fuzji protoplastów w celu ulepszania szczepów produkcyjnych jest uzyskiwanie hybryd o wysokiej wydajności biosyntezy antybiotyku i równoczesnym szybkim wzroście, co ma znaczący wpływ na koszt procesu biosyntezy. Przeprowadzono fuzję protoplastów dwóch szczepów *Cephalosporium acremonium* syntetyzujących cefalosporynę C. Jeden z tych szczepów nie miał zdolności wytwarzania spor, rósł wolno, ale był wysokowydajny. Drugi ze szczepów wykazywał własności dokładnie odwrotne. W wyniku fuzji i segregacji komórek hybrydowych uzyskano szczep wysokowydajny, wytwarzający cefalosporynę z wydajnością nawet o 40% wyższą od lepszego szczepu rodzicielskiego, szybkorosnący i wytwarzający spory.

Metody i strategie inżynierii genetycznej pozwalają uzyskać szczepy o wysokiej wydajności poprzez ukierunkowane zmiany genotypu. Organizmy dobrze zbadane pod względem genetycznym, szczególnie dla biosyntezy metabolitów pierwotnych, których szlaki biosyntezy i regulacji są dobrze znane, dają możliwość projektowania metabolizmu.

Stosowane modyfikacje genotypu polegają na:

- amplifikacji genów biosyntezy szlaku,
- usunięciu etapów limitujących szybkość metabolizmu,
- manipulacjach na genach regulatorowych szlaku,
- wyłączeniu genów odpowiadających za biosyntezę produktów ubocznych,
- zwiększeniu oporności na biosyntezy metabolit wtórny przez manipulacje na genach oporności,
- manipulacjach na genach odpowiedzialnych za systemy wydzielania związane z błoną, co skutkuje zwiększeniem wydzielania produktu do podłoża.

Zastosowanie technologii rekombinowanego DNA daje z kolei możliwość przeniesienia całego procesu biosyntezy do procesu przemysłowego przystosowanego organizmu heterologicznego. Dobrym przykładem zastosowania takiej technologii jest otrzymywanie rekombinowanych leków białkowych (insuliny, erytropoetyny, interferonów, somatropiny) w wyniku hodowli w głębokiej w transformalnych szczepach *E. coli* lub poddanych modyfikacji genetycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Z punktu widzenia wydajności i kosztu procesu technologicznego zastosowanie transformowanych mikroorganizmów jest niezwykle korzystne. Prowadzenie hodowli komórkowych komórek zwierzęcych jest bardzo trudne, wymaga skomplikowanych podłoży.

Ze względu na brak ściany komórkowej, komórki te są wrażliwe na stres fizyczny i chemiczny, pH, temperaturę, obecność CO₂, ścieranie, któremu ulegają podczas procesu biotechnologicznego (mieszanie), rosną wolno. Transformowane bakterie i modyfikowane genetycznie drożdże czy grzyby strzępkowe są znacznie łatwiejsze w hodowli wykazując zdolność biosyntezy właściwego produktu. Istnieją natomiast pewne ograniczenia dotyczące biosyntezy leków białkowych w transformowanych komórkach bakteryjnych, wynikające z braku w bakteriach enzymów odpowiedzialnych za bardzo istotne dla aktywności farmakologicznej

białek procesy potranslacyjne, kluczowe dla prawidłowej aktywności białek eukariotycznych. Bakterie nie są zdolne np. do przeprowadzania cięcia enzymatycznego i glikozylacji białek, co powoduje, że białka, które są glikoproteinami identycznymi z ludzkimi nie mogą być wytwarzane w transformowanych komórkach bakteryjnych. Produkty wytwarzane w systemach bakteryjnych mogą być niestabilne lub nieaktywne biologicznie i często wymagają dalszych modyfikacji enzymatycznych prowadzonych *in vitro*. Poza ulepszaniem samego szczepu, dla podwyższenia wydajności procesu biotechnologicznego stosuje się optymalizację warunków hodowli, mających ogromny wpływ na ekspresję metabolitu. Będzie to krótko opisane w rozdziale 10.

2. Metody konserwacji i przechowywania szczepów

Czystość mikrobiologiczna i genetyczna drobnoustrojów wpływa na wydajność procesów biotechnologicznych. Częste przesiewanie drobnoustrojów przyczynia się do występowania niekorzystnych spontanicznych mutacji. Celem zahamowania procesów metabolicznych drobnoustrojów, przy zachowaniu możliwie najwyższych przeżywalności i prawidłowych cech fizjologiczno-technologicznych stosuje się różne metody konserwacji i przechowywania materiału biologicznego. Do najważniejszych metod przechowywania szczepów należą: pasażowanie, utrzymywanie w stanie wysuszenia lub zamrożenia.

Najczęściej wykorzystywane w pracach laboratoryjnych jest pasażowanie, polegające na okresowym przeszczepianiu szczepów produkcyjnych na świeże podłoże i krótkotrwałe przechowywanie (dni, tygodnie) hodowli na skosach i płytkach Petriego lub w podłożach ciekłych.

Wybór metody konserwacji szczepów uzależniony jest od typu prowadzonej hodowli:

Kultury komórkowe

Zawiesinę komórek poddaje się procesowi **liofilizacji** (suszenie ze stanu zamrożenia), który poprzedzony jest dyspersją w jałowym rozpuszczalniku np. w odtłuszczonego mleku lub DMSO w celu uzyskania jednakowego rozproszenia. Następnie poddaje się ją topieniu w próżni pod zmniejszonym ciśnieniem lub gazie obojętnym, najczęściej w ciekłym azocie i przechowuje w atmosferze ciekłego azotu.

Hodowle bakteryjne

Po **zamrożeniu** w DMSO, ciekłym azocie lub 10-20% roztworze wodnym gliceryny hodowle przechowuje się w temperaturze -70°C , co pozwala w przypadku niektórych drobnoustrojów na trwałość materiału biologicznego nawet do kilkuset lat.

Organizmy sporulujące (grzyby strzępkowe, promieniowce, laseczki)

Przechowuje się je w postaci hodowli glebowych, na glince leczniczej. Po wysuszeniu wytwarzają się formy przetrwalnikowe i tak otrzymany materiał biologiczny przechowywany jest w temperaturze 0°C .

3. Kultury mateczne, przygotowanie materiału posiewowego

Do zaszczepiania bioreaktorów wykorzystuje się tzw. inokulum (zaszczep), czyli materiał posiewowy, który musi spełniać kilka podstawowych warunków. Ilość materiału posiewowego musi być wystarczająca, powinna wynosić 3-10% objętości pożywki hodowlanej, np. dla produkcyjnego reaktora o objętości 500 l inokulum stanowi od 15 do 50 l. Komórki muszą być w stanie aktywnym, aby skrócić do minimum fazę przystosowawczą hodowli. Inokulum musi być wolne od kontaminacji, mieć właściwą formę morfologiczną i zdolność

biosyntezy właściwego produktu, czyli być wolne od mutacji zaburzających tę zdolność. Dla zachowania genetycznej identyczności hodowanych komórek czy szczepu i dla uniknięcia spontanicznych mutacji zachodzących w przypadku kolejnych pasaży (przesiewów) szczepów, tworzy się tzw. bank komórek matecznych (ang. *master cell bank*). Powstaje on przez namnożenie dużego zasobu komórek, podział ich na małe porcje a następnie konserwację metodami opisanymi w poprzednim rozdziale. Każdą z tych porcji po namnożeniu można wykorzystać do stworzenia banku komórek roboczych (ang. *working cell bank*). Najczęściej namnażanie inokulum przebiega według schematu: przesiew na podłoża stałe (płytki Petriego, kolby Roux), a następnie przesiew wybranych kolonii na skosy. Powstaje w ten sposób kultura submateczna, czyli starterowa dla każdej szarży produkcji.

Kultury te służą do inokulacji hodowli w podłożach płynnych w kolbach wstrząsanych (250-500 ml). Hodowle wstrząsane służą następnie do inokulacji podłoża w bioreaktorach laboratoryjnych. Następnie skala procesu podnoszona jest przez etap bioreaktorów posiewowych do bioreaktorów produkcyjnych. Proces przeskalowania procesu (ang. *scaling up*) prowadzi się zgodnie z ustalonymi eksperymentalnie parametrami. Najczęściej stosuje się mnożnik 10, czyli np. 200 ml hodowli wstrząsanej poprzedza hodowlę w bioreaktorze laboratoryjnym o pojemności 2 l, następnie w bioreaktorze posiewowym o pojemności 20 l i bioreaktorze produkcyjnym o pojemności 200 l. Bank komórek matecznych zawierający kilkaset ampulek przy takim schemacie postępowania może wystarczyć na cały okres obowiązywania patentu (20 lat). Problemy dotyczące przeskalowania procesu biotechnologicznego związane są w dużym stopniu z optymalizacją procesu biotechnologicznego i będą omówione w dalszych rozdziałach.

4. Podłoża hodowlane

Hodowle mikroorganizmów lub komórek organizmów wyższych mogą być prowadzone różnymi metodami: na powierzchni podłoża (hodowle powierzchniowe) lub w całej objętości podłoża hodowlanego (hodowle węgłbne). W zależności od typu hodowli i wymagań szczepu stosuje się podłoża stałe (np. podłoże z agaru odżywcze) lub pożywki płynne. W każdym z tych przypadków podłoże hodowlane powinno dostarczyć hodowanym komórkom wszystkie niezbędne do rozwoju składniki odżywcze, związki symulujące biosyntezę produktu oraz zapewnić optymalne warunki rozwoju (pH, napowietrzanie, ciśnienie osmotyczne, temperaturę). Powinno również zawierać składniki minimalizujące trudności technologiczne (np. odpieniacze, detergenty, antybiotyki).

Wśród pierwiastków niezbędnych dla rozwoju szczepu, których źródła muszą znaleźć się w podłożu hodowlanym wyróżnia się makroelementy stanowiące około 98% suchej masy komórek (C, O, H, N, P, S, K i Mg) oraz mikroelementy stanowiące pozostałe 2% suchej masy (ponad 30 pierwiastków). Zarówno niedobory, jak i nadmiary źródeł makro- i mikroelementów wpływają negatywnie na rozwój szczepu, stąd konieczne jest optymalne dobranie składu podłoża. Wstępną informacją na temat właściwego stężenia źródeł makro- i mikroelementów przy opracowaniu składu podłoża hodowlanego może być skład komórki hodowlanego szczepu. Poza składem ilościowym istotny jest również skład jakościowy podłoża: nie każde źródło pierwiastka jest przez hodowlany szczep równie dobrze wykorzystywane.

Obecnym w podłożu w nadmiarze źródłem tłenu i wodoru jest woda. Nawet podłoża stałe zawierają co najmniej 60% wody. W przypadku szczepów aerobowych podłoże hodowlane jest napowietrzane, co jest dodatkowym źródłem tlenu.

Węgiel stanowi 50% suchej masy bakterii i grzybów, źródła węgla są głównymi składnikami podłoża. Za dobrze wykorzystywane źródło węgla w podłożach uważa się sacharydy takie, jak glukoza, sacharoza, laktoza, maltoza,

skrobie (ziemniaczana, kukurydziana, owsiana, ryżowa, żytnia), inulina, celuloza, alginiany, karageniany, agary. Ze względu na koszty, cukry nie są stosowane w stanie oczyszczonym, ale np. jako hydrolizat skrobi (zawierający glukozę), melasa (zawierająca ok. 50% sacharozy), suszona lub liofilizowana serwatka (zawierająca ok. 70% laktozy), ekstrakt słodowy (zawierający maltozę), itp. Niektóre mikroorganizmy są w stanie wykorzystywać niewęglowodanowe źródła węgla, takie jak metanol, etanol, tłuszcze, kwasy karboksylowe, węglowodory (metan, butan, pentan, parafiny), gazy (CO, CO₂).

Azot stanowi około 8-14% suchej masy mikroorganizmów, stąd jego zawartość w podłożu powinna być 4-6 razy mniejsza niż węgla. Stosowanymi do przygotowania podłoży hodowlanych źródłami azotu są mąki (sojowa, bawełniana, rzepakowa, kukurydziana, mięsna, rybna), preparaty białek ziemniaka, namok kukurydziany, autolizat drożdżowy i drożdże suche, hydrolizaty białek (kazeiny i białek soi), żelatyna, mocznik i sole amonowe.

Siarkę do podłoża wprowadza się w postaci siarczanu amonu lub aminokwasów siarkowych. Źródłami fosforu są ortofosforany(V) potasu, sodu, magnezu, amonu lub fosforan glicerolu.

W większości pożywek, w których skład wchodzi różne surowce naturalne, mikroelementy są dostarczane jednocześnie z tymi surowcami oraz z wodą dodawaną do pożywki. Czasami jednak, np. w pożywkach przygotowanych z zastosowaniem *n*-parafin jako źródła węgla, może być konieczne dodanie niektórych mikroelementów. Mikroelementy są dodawane do pożywek w takich ilościach, aby w pożywce ich stężenia wahały się w granicach 0,1-100 mmol/L. Stężenia wyższe od 10⁻⁴ mol/L są często dla drobnoustrojów toksyczne. Mikroelementy są dodawane do pożywek w postaci dobrze rozpuszczalnych chlorków i azotanów(V), jony Fe³⁺ są dodawane w postaci cytrynianu, ponieważ chlorek żelaza(III) w środowisku kwaśnym ulega wytrąceniu. Molibden jest dostarczany do podłoża jako (NH₄)₆Mo₇O₂₄ lub Na₂MoO₄, a selen jako Na₂SeO₄ lub Na₂SeO₃.

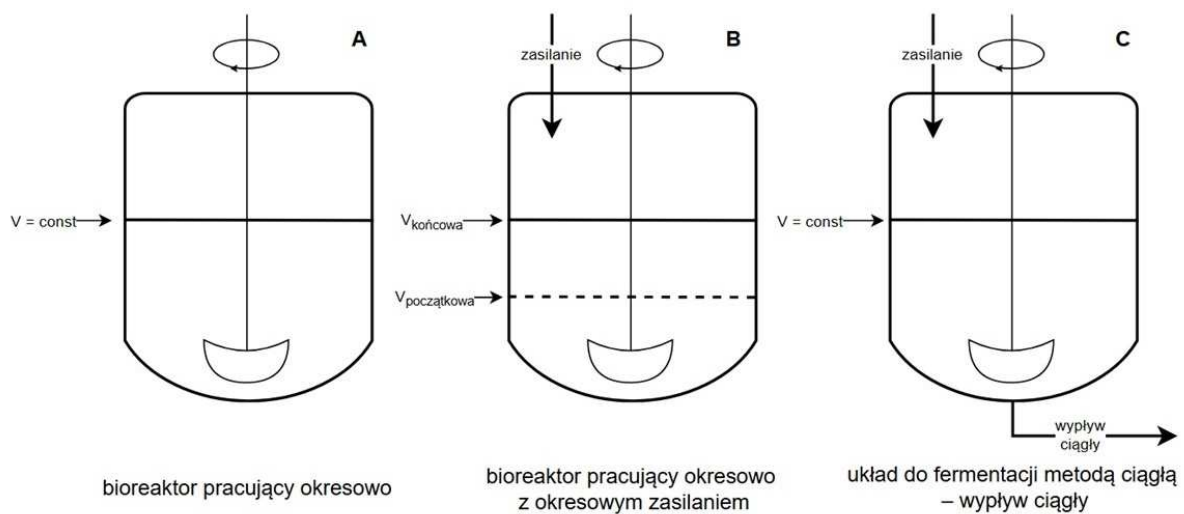
Do podłoży hodowlanych wprowadza się również stymulatory wzrostu. Są to albo grupy prostetyczne, albo związki blisko spokrewnione z grupami prostetycznymi enzymów lub koenzymy np. witaminy grupy B (biotyna, tiamina), cholina i betaina – czynniki metylujące, L-aminokwasy, zasady purynowe i pirymidynowe. W celu zwiększenia wydajności biosyntezy metabolitu (pierwotnego lub wtórnego) do podłoży hodowlanych wprowadza się również prekursory biosyntezy, które pomagają regulować syntezę produktu, nie wpływając równocześnie na wzrost mikroorganizmu. Często są wbudowywane do pożądanego produktu. Przykładowo, dla biosyntezy tryptofanu prekursorem jest indol, a dla biosyntezy witaminy B₁₂: kobalt(II), cholina, betaina i imidazol. Hodowle organizmów wyższych wymagają szczególnych dodatkowych składników podłoża, hodowle pierwotnych komórek ssaków wymagają dodatków hormonalnych, czynników wzrostu, insuliny; z kolei hodowle komórek roślinnych czynników wzrostu i prekursorów.

Podłoża hodowlane zawierają również składniki, których zadaniem jest usprawnianie procesu technologicznego. Do materiałów pomocniczych w procesach biotechnologicznych należą detergenty, których funkcją jest emulgacja nierozpuszczalnych w wodzie składników podłoża (*n*-alkany, oleje, steroidy), zwiększenie przepuszczalności membran komórki, aktywacja enzymów lub zmiana stopnia agregacji komórek. Stosowanymi materiałami pomocniczymi są również antyseptyki i antybiotyki, eliminujące skażenie podłoża, substancje buforujące, stabilizujące pH i odpieniacze, których rolą jest gaszenie powstającej w podłożu płynnym piany.

Dobór optymalnych składników podłoża prowadzi się metodami eksperymentalnymi, podobnie jak dobór optymalnych warunków prowadzenia procesu. Szerzej ten temat będzie omówiony w rozdziale *Metody optymalizacji procesu*.

5. Warunki prowadzenia procesów biotechnologicznych – procesy okresowe, okresowe z zasilaniem, ciągłe

Procesy biotechnologiczne mogą być prowadzone metodami różniącymi się między innymi czasem prowadzenia procesu (np. okresowe lub ciągłe), stałością lub zmiennością objętości pożywki w bioreaktorze (np. okresowe i okresowe z zasilaniem) oraz stałością lub zmiennością składu podłoża hodowlanego (np. ciągłe lub okresowe i okresowe z zasilaniem).

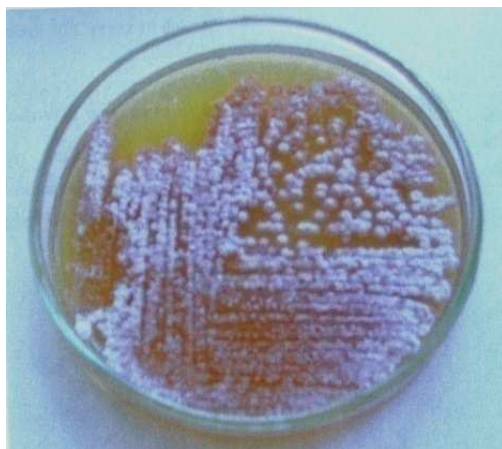


Ryc. 3. Schematyczne różnice pomiędzy warunkami prowadzenia procesów okresowych, okresowych z zasilaniem i ciągłych

Metody okresowe (ang. *batch fermentation*) są najczęściej stosowane w praktyce przemysłowej ze względu na stosunkowo prostą technologię i budowę bioreaktorów, w których prowadzi się procesy hodowlane. W procesach okresowych w czasie rozwoju kultury nie doprowadza się świeżych substancji odżywczych i nie odprowadza się końcowych produktów metabolizmu. Podłoże hodowlane zaszczepia się inokulum, następnie prowadzi proces fermentacji, w którym rozwijająca się kultura wytwarza określony produkt. Po zakończeniu procesu produkt jest izolowany z biomasy lub z podłoża pohodowlanego.

Wśród metod statycznych (okresowych) wyróżnia się metody powierzchniowe realizowane w cienkiej warstwie podłoża (przykładem może być

hodowla kultury promieniowca na podłożu agarowym (Ryc. 4)) i metody wgłębne prowadzone w całej objętości podłoża – stałego lub ciekłego (Ryc. 5).



Ryc. 4. Hodowla powierzchniowa szczepu promieniowca *Streptomyces tsukubaensis* na podłożu stałym (agarowym)

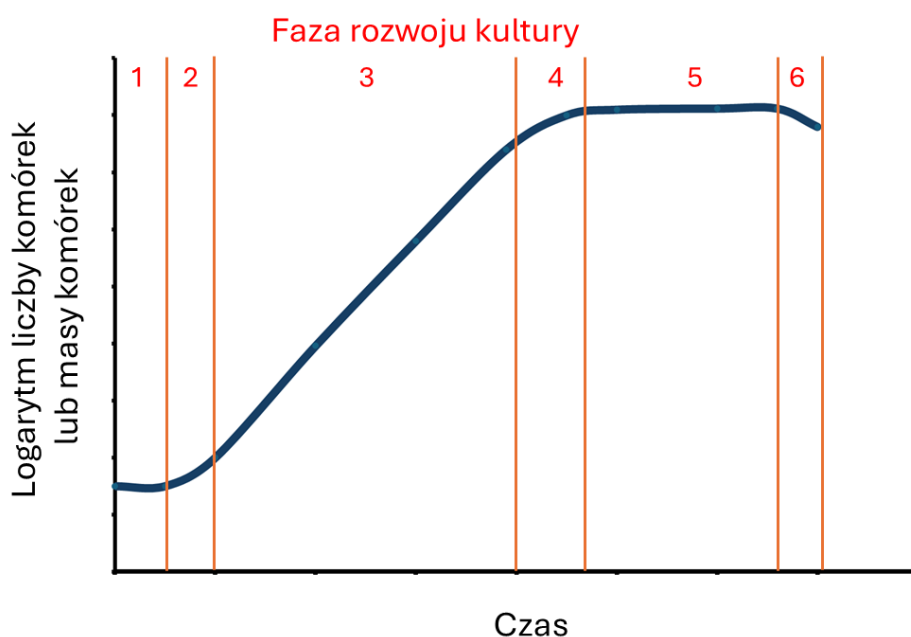


Ryc. 5. Hodowle wgłębne mycelium grzybów wyższych w podłożach płynnych w skali a.) 200 ml, hodowla wstrząsana, b.) w skali 4-7 litrów, hodowle w bioreaktorach o różnej pojemności roboczej i systemach mieszania

Każdy z tych typów hodowli może przebiegać w warunkach tlenowych lub beztlenowych (najczęściej w obecności gazów obojętnych CO₂, N₂).

Ze względu na zmianę składu podłoża hodowlanego w czasie prowadzenia procesu (obniżanie stężenia składników odżywczych i wzrost stężenia toksycznych metabolitów), jedynie przez krótki okres w trakcie tego typu hodowli

panują optymalne warunki dla wzrostu szczepu i/lub dla biosyntezy produktu. Wzrost kultur mikroorganizmów oraz znaczącej części kultur komórek organizmów wyższych w hodowli okresowej przebiega w podobnych fazach (Ryc. 6).

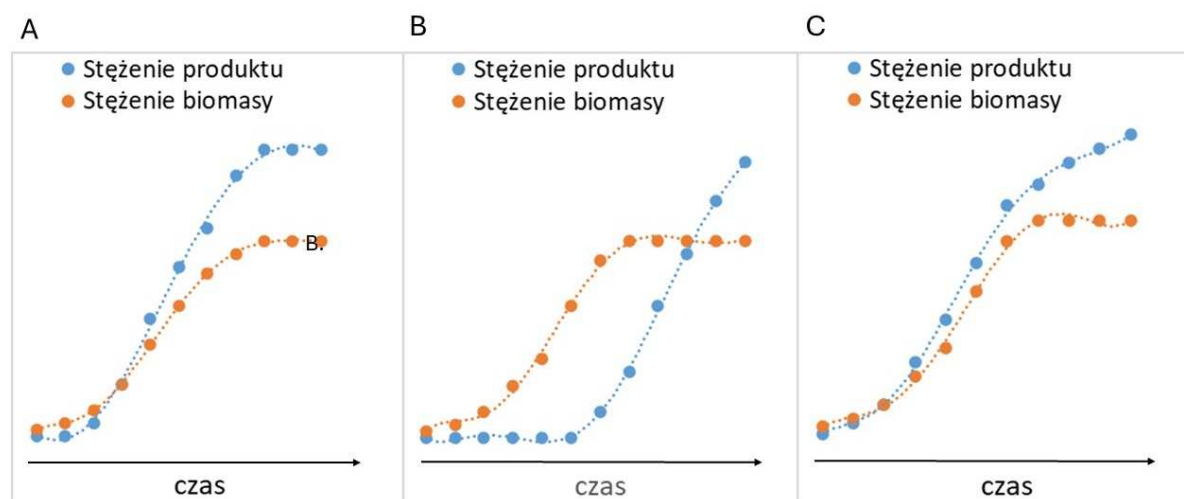


Ryc. 6. Fazy wzrostu drobnoustrojów w hodowlach okresowych [5]

- 1 – faza inkubacyjna (przystosowawcza, lagfaza),
- 2 – faza zapoczątkowanego wzrostu,
- 3 – faza logarytmicznego wzrostu (trofofaza),
- 4 – faza zahamowanego wzrostu,
- 5 – faza stacjonarna (faza produkcyjna, idiofaza),
- 6 – faza letalna.

Wzrost nieograniczony szczepu (maksymalny dla danego podłoża hodowlanego i danych warunków) można w hodowli okresowej zaobserwować wyłącznie w logarytmicznej fazie wzrostu.

Zmiany jakościowe i ilościowe aparatu enzymatycznego powodują, że w zależności od fazy hodowli z różnym nasileniem mogą funkcjonować różne szlaki metaboliczne. Różne produkty biosyntezy mogą więc powstawać w różnych fazach hodowli (Ryc. 7).



Ryc. 7. Różne modele biosyntezy: A. produkt jest tworzony przez komórki rosnące; B. produkt jest tworzony przez komórki nierosnące; C. produkt jest tworzony przez komórki rosnące i nierosnące

- Biosynteza produktu może przebiegać równolegle z intensywnym wzrostem szczepu/linii, zanikając w fazie stacjonarnej. Taki model procesu występuje w przypadku syntezy niektórych enzymów (Ryc. 7A).
- Biosynteza produktu może zachodzić zarówno w komórkach rosnących, jak i nierosnących (w fazie stacjonarnej). Ten model procesu występuje w przypadku, gdy produkty przemian katabolicznych nie zmieniają się po zahamowaniu wzrostu, np. w przypadku syntez takich produktów jak etanol czy kwas mlekowy. Podobny proces przebiega przy syntezach aminokwasów, witamin i niektórych antybiotyków (Ryc. 7B).
- Biosynteza produktu występuje tylko w komórkach nienamnażających się, po całkowitym lub częściowym zahamowaniu wzrostu szczepu. Zgodnie z tym modelem przebiegają biosyntezy większości idiolitów: toksyn, antybiotyków, ale również niektórych aminokwasów i witamin. (Ryc. 7C).

Wadą procesu okresowego jest fakt, że nie pozwala on na maksymalne wykorzystanie aparatury (pomiędzy procesami fermentacji, w trakcie opróżniania bioreaktora, czyszczenia, napełniania nowym podłożem i sterylizacji, aparatura nie realizuje funkcji produkcyjnej), jest również trudny do automatyzacji i kontroli. W procesach okresowych objętość podłoża w bioreaktorze przez cały czas trwania fermentacji nie ulega zmianie (Ryc. 3A).

Metody okresowe z zasilaniem (ang. *fed-batch fermentation*). Tego typu hodowle różnią się od hodowli okresowych dozowaniem sterylnej pożywki do fermentora w odstępach czasu wynikających z kontroli składu podłoża hodowlanego w bioreaktorze lub alternatywnie dozowaniem ciągłym. Dzięki temu uzyskuje się zmniejszenie hamującego wpływu produktów metabolizmu na rozwój drobnoustrojów i przedłużenie fazy logarytmicznego wzrostu, a więc większą wydajność wzrostu kultury. W hodowli okresowej z zasilaniem, w trakcie trwania hodowli nie odbiera się brzożki hodowlanej z bioreaktora, dlatego objętość robocza podłoża sukcesywnie zwiększa się w czasie trwania procesu (Ryc. 3B).

Metoda fermentacji ciągłej (ang. *continuous fermentation*) polega na stałym odbieraniu podłoża z bioreaktora i równoczesnym jego stałym uzupełnianiu świeżą pożywką. W efekcie objętość podłoża w bioreaktorze pozostaje niezmienną (Ryc. 3C). Tego typu hodowla wymaga urządzeń (bioreaktorów) o znacznie bardziej złożonej konstrukcji (a więc droższych) od stosowanych w procesach okresowych lub okresowych z zasilaniem. Zaletami tego typu procesów jest możliwość wyeliminowania wpływu czasu hodowli na zmiany warunków w bioreaktorze i możliwość prowadzenia hodowli dowolnie długo w ustalonych, najbardziej korzystnych warunkach. Możliwa jest automatyzacja procesu. Dla niektórych procesów zwiększa to szybkość i wydajność, przy możliwości maksymalnego wykorzystania aparatury i równomiernego jej obciążania.

Istnieją jednak liczne wady fermentacji ciągłej (poza wysokim kosztem aparatury), które powodują, że jest ona stosowana rzadziej od fermentacji okresowej: przy bardzo długiej hodowli możliwe jest np. pojawienie się niekorzystnych mutacji i opanowanie hodowli przez populacje komórek o pogorszonych właściwościach produkcyjnych. Istnieją też problemy techniczne, np. trudności w utrzymaniu warunków aseptycznych procesu przez długi czas jego trwania lub w przypadku hodowli organizmów tworzących układy wielokomórkowe (np. grzybów lub promieniowców), zachodzenie procesów obrastania przewodów i innych elementów bioreaktora skupiskami w postaci kłaczków i pelet. Tego typu hodowla wyklucza również biosyntezę metabolitów wtórnych biosyntezowanych w tzw. idiofazie, czyli fazie stacjonarnej, przez komórki nierosnące. Duża część substancji leczniczych otrzymywanych na drodze biosyntezy to właśnie idiolity (niektóre antybiotyki, immunomodulatory, cytostatyki i wiele innych). Poza tym tego typu hodowli nie można zastosować w przypadku, kiedy oczekiwany produkt pozostaje wewnątrz hodowanych komórek i jego uzyskanie wymaga izolacji biomasy a następnie dezintegracji komórek i ekstrakcji produktu (np. białka i polipeptydy terapeutyczne uzyskiwane z hodowli modyfikowanych genetycznie mikroorganizmów). Reasumując, hodowla ciągła ma najlepsze możliwości zastosowania w przypadku, kiedy tworzenie produktu przebiega równolegle ze wzrostem komórek (niektóre enzymy) lub zachodzi zarówno w komórkach rosnących jak i nierosnących (np. kwas mlekowy, etanol, niektóre witaminy, aminokwasy, czy niektóre antybiotyki (Ryc. 3C)), przy równoczesnym wydzielaniu interesującego produktu do podłoża hodowlanego.

Natomiast dla sytuacji, gdy produkt powstaje (jest biosyntezowany) tylko w komórkach nienamnażających się (czyli w idiofazie – po zahamowaniu wzrostu kultury) zastosowanie ma wyłącznie odpowiednio optymalizowana hodowla okresowa.

6. Budowa bioreaktorów stosowanych do prowadzenia tlenowych procesów wglębných

Bioreaktorami (fermentorami) nazywane są urządzenia służące do prowadzenia procesów biotechnologicznych; w biotechnologii farmaceutycznej – procesów biosyntezy lub biotransformacji z wykorzystaniem mikroorganizmów, komórek zwierzęcych, roślinnych, hybryd, enzymów. Duża liczba istniejących rozwiązań konstrukcyjnych bioreaktorów jest efektem optymalizacji warunków przebiegu procesu. Zastosowane rozwiązania techniczne zależą np. od typu procesu (okresowy, okresowy z doprowadzeniem pożywki, półciągły, ciągły), rodzaju biokatalizatora (komórki/enzymy/izolowane organelle komórkowe – wolne lub unieruchomione), rodzaju podłoża (stałe lub płynne), właściwości produktu końcowego, zapotrzebowania na tlen (proces beztlenowy lub tlenowy). Stąd też bioreaktory mogą być klasyfikowane ze względu na wiele różnych kryteriów. Nawet kolba, w której jest prowadzona hodowla mycelium grzyba (Ryc. 5A) lub hodowla wstrząsana *Streptomyces tsukubaensis* (Ryc. 8) może być zaklasyfikowana jako bioreaktor: do prowadzenia hodowli okresowej, do prowadzenia klasycznego procesu mikrobiologicznego, do prowadzenia hodowli wglębnej w podłożu płynnym, do prowadzenia procesów tlenowych, bezmieszadłowych itp.



Ryc. 8. Hodowla wstrząsana *Streptomyces tsukubaensis* (wyrząsarka orbitalna, pracownia biotechnologii farmaceutycznej Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej)

Ze względu na obszerność tematu, w niniejszym rozdziale zostanie opisana wyłącznie budowa bioreaktorów przeznaczonych do prowadzenia okresowych procesów wstępnych w podłożu płynnym. Jest to najczęściej stosowany w biotechnologii farmaceutycznej typ bioreaktorów, wykorzystywany w przemysłowej produkcji antybiotyków, witamin, przeciwciał monoklonalnych, insuliny i innych leków białkowych. Tego typu bioreaktory wykorzystywane są również w trakcie ćwiczeń do biosyntezy immunosupresanta takrolimus w wyniku hodowli szczepu *S. tsukubaensis*. Procesy fermentacyjne w biotechnologii farmaceutycznej prowadzone są w warunkach jałowych, z wykorzystaniem czystych kultur. Szczepy/linie produkcyjne są wysokowydajne, niemniej wrażliwe na zakażenia (konkurencja szczepów dzikich). Fermentory są skonstruowane w sposób, który umożliwia zachowanie warunków aseptycznych oraz zapewnia optymalny przebieg procesu, z możliwością pomiaru i regulacji parametrów procesu. Bioreaktory laboratoryjne mają pojemność roboczą od kilku mililitrów do kilkunastu litrów, wykonane są ze szkła, szkła i metalu lub metalu (Ryc. 9). Ich sterylizację wraz z podłożem hodowlanym przeprowadza się w autoklawach przy użyciu pary wodnej.



Ryc. 9. Bioreaktor firmy BioTec o pojemności całkowitej 8 l (pracownia biotechnologii farmaceutycznej Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej)

Bioreaktory do prowadzenia procesów w skali ćwierćtechnicznej, półtechnicznej, pilotażowej i przemysłowej wykonane są z metalu, mają pojemność od kilkudziesięciu litrów do kilkuset metrów sześciennych (Ryc. 10).

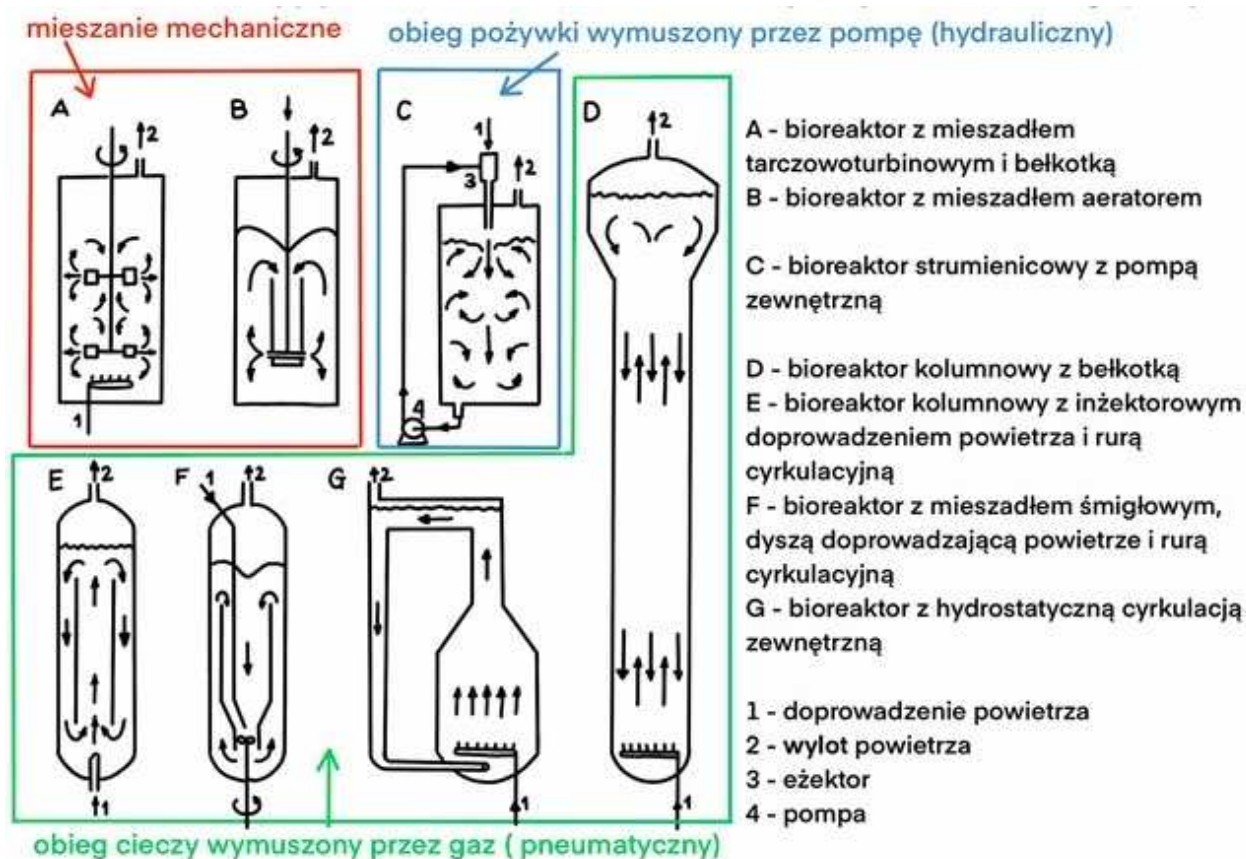


Ryc. 10. Bioreaktor firmy New Brunswick do prowadzenia procesów okresowych w skali ćwierćtechnicznej, o pojemności całkowitej 70 l (pracownia biotechnologii farmaceutycznej Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej)

Fermentory przeznaczone do tlenowych procesów wglębnych powinny mieć zapewnione efektywne systemy mieszania oraz napowietrzania, zapewniające zachowanie jednorodnego środowiska i poziom natlenienia podłoża (pO_2) wymagany przez hodowlany szczep. Istnieją różne rozwiązania techniczne zapewniające wydajny proces mieszania brzojki hodowlanej (Ryc. 11) [1]:

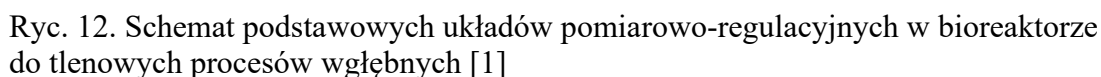
- mieszanie mechaniczne (mieszadła tarczowo-turbinowe, śmigłowe),
- mieszanie mechaniczne mieszadłem samozasysającym powietrze (mieszadło-aerator),

- mieszanie cieczą (system hydrauliczny, recyrkulacja cieczy wymuszona przez zewnętrzną pompę powoduje zasysanie powietrza w układzie eżektora),
- mieszanie gazem (system pneumatyczny); gaz jest doprowadzany przez specjalne dysze lub bełkotkę (kolumna barbotażowa), w aparatach typu air-lift cyrkulacja cieczy jest wymuszona przez zastosowanie rury cyrkulacyjnej.



Ryc. 11. Różne rozwiązania mieszania zawartości bioreaktora: mieszanie mechaniczne (A i B), mieszanie hydrauliczne (C), mieszanie pneumatyczne (D-G) [1]

Dla zapewnienia możliwości kontroli i regulacji parametrów procesu biotechnologicznego bioreaktory zaopatrzone są w systemy kontrolno-pomiarowe, umożliwiające pomiar i regulację parametrów fizycznych oraz chemicznych takich, jak temperatura, pH, stężenie niektórych składników podłoża, pO_2 , poziom piany, ciśnienie, szybkość obrotów mieszadła, szybkość dozowania cieczy, szybkość przepływu gazu.



- temperatura; pomiar prowadzony jest z wykorzystaniem czujników opornościowych lub termistorów, kontrole uzyskuje się poprzez zmianę temperatury i natężenia przepływu medium grzejno/chłodzącego w płaszczu zewnętrznym bioreaktora,
- pH; pomiar wykonuje się za pomocą elektrody pH, stabilizację uzyskuje się przez wkraplanie roztworów kwasu lub zasady,

- stężenie rozpuszczonego tlenu (pO_2); pomiar wykonuje się za pomocą elektrody tlenowej lub czujników polarograficznych, stabilizację można uzyskać przez zwiększenie przepływu sprężonego powietrza,
- poziom piany w fermentorze; pomiar prowadzony jest z wykorzystaniem czujników pojemnościowych, gaszenie piany można uzyskać przez wkraplanie odpieniacza lub metodami mechanicznymi,
- stężenie cukrów; pomiaru dokonuje się za pomocą elektrody glukozowej (enzymatycznej), stabilizacja jest możliwa przez wkraplanie roztworu cukrów,
- obroty mieszadła; stosowane są czujniki elektryczne lub optyczne,
- stężenie biomasy; dla hodowli komórkowych możliwy jest pomiar nefelometryczny, dla kultur mycelialnych jest utrudniony przez tendencję do tworzenia pelet grzybni.

Współczesne bioreaktory zaopatrzone są w elektroniczne sterowniki lub pracują pod kontrolą komputera, stąd regulacja parametrów procesu odbywa się automatycznie. W trakcie procesu biotechnologicznego z bioreaktora pobierane są próbki brzożki hodowlanej (w warunkach aseptycznych), a ich skład pozwala ocenić wiele innych parametrów procesu, w tym np. stężenie produktu biosyntezy.

7. Warunki aseptyczne w biotechnologii: wyjaławianie bioreaktora i podłoża hodowlanego, zaszczepianie hodowli w warunkach aseptycznych

Procesy biotechnologiczne muszą być prowadzone w **warunkach aseptycznych**, polegających na niezakażeniu drobnoustrojami. Czynnościami zabezpieczającymi te warunki są dezynfekcja, sterylizacja i wykorzystanie promieniowania jonizującego lub UV.

Warunki aseptyczne podczas ćwiczeń zapewnia sterylizacja agaru słodowego, pożywek płynnych, bioreaktorów, szkła laboratoryjnego oraz odpowiednie

przygotowanie do pracy pomieszczeń, narzędzi i łoży z nawiewem laminarnym, w której dokonuje się zaszczepienia pożywek materiałem biologicznym.

Dezynfekcja (odkazywanie) to proces **usuwania lub zniszczenia większości drobnoustrojów** za pomocą środków chemicznych, które działają na formy wegetatywne bakterii i innych mikroorganizmów. Na działanie większości stosowanych środków dezynfekcyjnych są odporne zarodniki i niektóre typy wirusów.

Czynności dezynfekujące wykorzystywane podczas ćwiczeń dotyczą dezynfekcji skóry rąk (do odkazywania nieuszkodzonej skóry używa się 60-70% roztworu etanolu), dezynfekcji otoczenia, głównie łoży laminarnej, otworów fermentora i powietrza wychodzącego z bioreaktora.

Główne środki dezynfekujące:

Aldehydy

Aldehydy działają najlepiej na bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne, przetrwalniki i grzyby chorobotwórcze, w pH alkalicznym (7,5–8,5) uzyskiwanym np. dzięki obecności dodatku NaHCO_3 , który powoduje alkalizację sprotonowanych grup aminowych i sulfhydrylowych białek i atomów azotu zasad purynowych. Zastosowanie aldehydów jest ograniczone ze względu na ich działanie drażniące na żywe komórki.

Stosowanie roztworów formaliny w stężeniach 3–20% ze względu na bardzo przykry zapach i działanie korozjotwórcze oraz uczulenia i podrażnienia błon śluzowych jest ograniczone. Natomiast aldehyd glutarowy stosowany jest głównie w postaci 2% roztworów do dezynfekcji materiałów medycznych.

Pochodne fenolowe

Stosowane bardzo rzadko. W zależności od stężenia mogą działać bakteriostatycznie lub bakteriobójczo, są bardziej aktywne w pH kwaśnym i w podwyższonej temperaturze. Mechanizm ich działania polega na uszkodzaniu struktur białkowych ściany komórkowej i błon biologicznych.

Pochodne guanidyny

Przedstawicielem tej grupy związków jest chlorheksydyna stosowana w postaci diglukonianu, octanu lub chlorowodoru w stężeniach 0,5–1% w roztworze 70% etanolu. Silnie działa bakteriostatycznie na bakterie Gram-dodatnie, mniej skuteczna wobec drobnoustrojów Gram-ujemnych, nie działa na grzyby i przetrwalniki.

Alkohole

Preparaty alkoholowe, głównie alkohol etylowy i izopropylowy wykazują dobrą aktywność bakteriobójczą. Mechanizm ich działania polega na denaturacji białek komórkowych. Największą aktywność obserwuje się przy stężeniach 60–70%, w stężeniu 20% mogą działać słabo bakteriostatycznie. Wadą dezynfektantów alkoholowych jest brak właściwości biobójczych w stosunku do przetrwalników bakteryjnych. Największe znaczenie ma alkohol etylowy, który działa zarówno na bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne.

Związki utleniające

- **związki chloru**

Z tej grupy związków największe zastosowanie znalazła chloramina T i chloran(I) sodu. Podczas hydrolizy preparatów chloru powstaje kwas chlorowy(I), który wykazuje aktywność biobójczą w stosunku do bakterii, grzybów, drożdży, niszczy formy przetrwalnikowe bakterii. Kwas łatwo wnika do komórek drobnoustrojów i w wyniku jego dalszych przemian następuje denaturacja enzymów, zawierających w szczególności grupy – SH. Dzięki niespecyficznemu, oddziaływaniu na komórki, mikroorganizmy nie mają możliwości uodpornienia się na działanie kwasu chlorowego(I).

Do zastosowań wprowadzono również ditlenek chloru jako środek niszczący nie tylko zarodniki, ale także przetrwalniki i wirusy.

- **jodofory**

Są to kompleksowe połączenia jodu z polimerami, biopolimerami lub związkami powierzchniowo czynnymi spełniającymi rolę nośników. Związki te uwalniają jod, który utlenia grupy sulfhydrylowe oraz tworzy kompleksy z białkami błony cytoplazmatycznej.

Związki nadtlenowe

Preparaty tej grupy, m.in. nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy, nadsiarczan potasu ($K_2S_2O_8$), odznaczają się bardzo szerokim spektrum zwalczanych organizmów, bakterii i form przetrwalnikowych.

Czwartorzędowe sole amoniowe (CSA)

Czwartorzędowe sole amoniowe są związkami jonowymi, posiadają w cząsteczce grupę hydrofobową i hydrofilową. Mechanizm działania polega na adsorpcji związku na ujemnie naładowanej błonie komórkowej i dyfuzji do wnętrza komórki drobnoustroju, powodując uszkodzenie i denaturację białka. Po przeniknięciu przez błonę komórkową dochodzi do uwolnienia jonów K^+ oraz niskocząsteczkowych składników wewnątrzkomórkowych. Niskie stężenia CSA powodują zakłócenia w obszarze błony komórkowej, wykazując działanie bakteriostatyczne. Przy wyższych stężeniach dochodzi do śmierci komórki. Preparaty zawierające CSA działają aktywniej na bakterie Gram-dodatnie niż Gram-ujemne, a także drożdże, niektóre grzyby i wirusy. Posiadają bardzo dobrą zwilżalność powierzchni i ewentualnych osadów, a przy tym wykazują właściwości myjące. Zarówno preparaty stężone, jak i roztwory robocze są stabilne i nie ulegają rozkładowi. Wadą stosowania CSA jest indukowanie tworzenia form opornych. W celu wyeliminowania narastania oporności preparaty tej grupy powinny być stosowane przemiennie ze środkami o odmiennym charakterze działania bójczego.

Innym procesem gwarantującym warunki aseptyczne w biotechnologii jest **sterylizacja** (wyjaławianie), podczas której ulegają **zniszczeniu** lub **usunięciu** **wszystkie drobnoustroje** znajdujące się w płynach lub przedmiotach.

Steryлизację przeprowadza się za pomocą czynników fizycznych lub mechanicznych (filtracja). Wyjaławianiu poddaje się płyny używane do hodowli komórek, szkło i przybory laboratoryjne.

Wyjaławianie pod ciśnieniem w parze nasyconej

Proces wykonuje się w aparatach zwanych autoklawami wykorzystując parę nasyconą pod ciśnieniem. Najczęściej wyjaławianie prowadzi się w temperaturach 117–121°C, przez 20 minut, pod ciśnieniem do 0,3–0,4 MPa. W procesie wyjaławiania giną drobnoustroje i ich formy przetrwalnikowe (endospory) oraz zarodniki i wirusy. Tę metodę wykorzystuje się do rozpuszczania agaru, sterylizacji płynów, roztworów i pożywek, narzędzi, materiałów opatrunkowych i operacyjnych oraz odpadów i zużytych materiałów medycznych.

Stosując tę metodę należy pamiętać, że pożywki hodowlane poddane dłuższemu działaniu wysokich temperatur mogą być przyczyną powstawania produktów toksycznych dla drobnoustrojów. Reakcja cukrów z aminokwasami (reakcja Maillarda) jest źródłem powstawania toksycznych związków typu *N*-podstawionej glukozaminy. W celu uniknięcia tego zjawiska bardzo często cukry poddaje się osobnej sterylizacji.

W przemyśle proces sterylizacji przeprowadza się bezpośrednio w bioreaktorach metodą ciągłą w temperaturach znacznie wyższych (ok. 140°C) i w krótszym czasie (rzędu 1-3 min.).

Wyjaławianie w gorącym powietrzu (sterylizacja sucha)

Do tego celu wykorzystuje się suszarki, w których proces sterylizacji w temperaturze 180°C musi trwać 2 godziny. Wyjaławianie suchym powietrzem stosowane jest głównie do sterylizacji szkła laboratoryjnego, niektórych narzędzi i przyborów laboratoryjnych.

Wyżarzanie w płomieniu

Ta czynność wykonywana jest głównie przy szczepieniu pożywek materiałem biologicznym. Używane do tego celu ezy lub inne narzędzia

wprowadza się do płomienia palnika gazowego lub spirytusowego powodując natychmiastowe zniszczenie drobnoustrojów. Metoda ta jest także stosowana przy opalaniu szyj kolb.

Działanie promieni o krótkiej długości fali

Do wyjaławiania używane są promienie nadfioletowe i promienie gamma.

- **Promieniowanie nadfioletowe**

Mechanizm działania silnie bakteriobójczego polega na przenikaniu promieni o długości fali od 230 nm do 290 nm do wnętrza komórki i niszczeniu struktury kwasów nukleinowych, szczególnie DNA. Ze względu na to, że promienie nie przenikają głęboko wykorzystuje się je do wyjaławiania powietrza w pomieszczeniach.

- **Promieniowanie gamma**

Ten rodzaj promieniowania magnetycznego ma zdolność głębokiego przenikania przez przedmioty i płyny niszcząc struktury kwasów DNA i RNA.

Wyjaławianie przez sączenie (sterylizacja mechaniczna)

Przy zastosowaniu filtrów dochodzi do mechanicznego oddzielenia drobnoustrojów od płynów lub gazów. Na filtry zatrzymywane się cząsteczki lub komórki drobnoustrojów większe niż wielkość porów przegrody.

W procesach biotechnologicznych metoda ta jest wykorzystywana do wprowadzania do bioreaktora jałowego powietrza, otrzymywanego z kompresora, które przechodzi przez warstwę filtracyjną i nie jest źródłem wtórnych infekcji. Często jako materiały filtracyjne wykorzystuje się węgiel aktywny o silnych właściwościach adsorpcyjnych i watę szklaną. Ze względu na dużą higroskopijność i większe prawdopodobieństwo rozwoju drobnoustrojów nie stosuje się waty bawełnianej. Oprócz wymienionych stosowane są filtry z acetylowanego alkoholu poliwinylowego powleczonego żywicą silikonową oraz filtry membranowe wykonane z estrów celulozy (octan, azotan), teflonu

(filtry o największej trwałości), ceramiki, szkła (lejki filtracyjne Schotta o odpowiedniej gęstości) i porowatych spieków metalowych.

8. Parametry i kontrola procesu

Zachodzące w bioreaktorach procesy są niezwykle złożone. Na ich przebieg ma wpływ wiele czynników środowiskowych oraz wewnątrzkomórkowych, szczególnie dla procesów, w których biokatalizatorami są żywe komórki. Projektując proces biotechnologiczny, ustala się jego parametry wyjściowe, opierając na wynikach uzyskanych w trakcie badań nad optymalizacją procesu. Parametry te, określane **parametrami sterowanymi**, odgrywają zasadniczą rolę w przebiegu procesu i w jego sterowaniu. Parametry sterowane można podzielić na trzy grupy: parametry biologiczne, chemiczne i fizyczne.

Parametry biologiczne charakteryzują materiał posiewowy i obejmują:

- genotyp szczepu,
- ilość inokulum,
- jakość inokulum (stan fizjologiczny, wiek komórek, potencjał metaboliczny itp.).

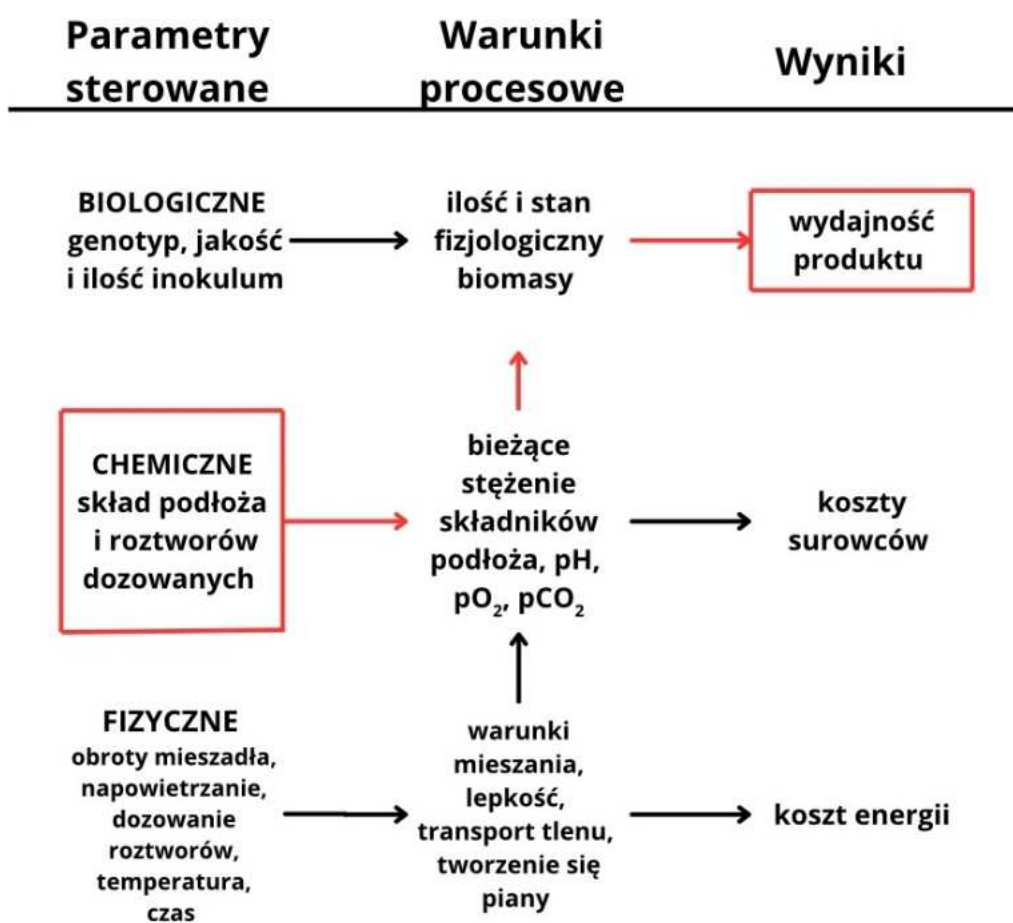
Parametry chemiczne obejmują:

- skład podłoża hodowlanego (ilość i rodzaj źródła węgla, azotu, fosforu, siarki, magnezu, mikroelementów, prekursorów produktu, promotorów wzrostu, substancji pomocniczych),
- skład roztworów dozowanych do bioreaktora w trakcie procesu (odpieniacze dla procesów z dozowaniem składników podłoża, a dla procesów półciągłych i ciągłych składniki odżywcze podłoża).

Parametry fizyczne to z kolei: obroty mieszadła (dla procesów prowadzonych w bioreaktorze z mieszaniem mechanicznym), temperatura, przepływ powietrza

lub innego gazu (wyrażany w litrach gazu na litr podłoża na jednostkę czasu), czas prowadzenia procesu.

Ustalone w momencie rozpoczynania hodowli w bioreaktorze parametry sterowane mają złożony, wielokierunkowy wpływ na istniejące w trakcie hodowli **warunki efektywne** (parametry procesowe), a warunki te wpływają na efekt końcowy procesu, czyli **parametry wynikowe** (Ryc. 13).



Ryc. 13. Relacje pomiędzy grupami parametrów procesu biosyntezy (schemat uproszczony). Podkreślona na czerwono przykładowa droga wpływu zmiany składu podłoża hodowlanego na wydajność produktu [3]

Przykładowo, przepływ sprężonego powietrza przez podłoże płynne (parametr fizyczny) wyrażany w litrach na minutę na litr podłoża i mierzony aerometrem wpływa na bieżące stężenie (ciśnienie parcjale) tlenu w podłożu (parametr chemiczny). Z kolei wpływa to na ilość i stan fizjologiczny biomasy (parametr biologiczny), od którego zależy wydajność biosyntezy produktu,

a w efekcie końcowym na jego koszt. Napowietrzanie (parametr fizyczny) wpływa równocześnie na pienienie podłoża i związane z tym warunki transportu tlenu (parametry fizyczne), powodując np. konieczność wkroplenia odpieniacza i wpływając jednocześnie na zmianę składu podłoża hodowlanego (parametr chemiczny).

Jak widać, współzależności pomiędzy parametrami procesu są niezwykle złożone i nie dają się w pełni przewidywać. Stąd proces optymalizacji warunków procesu biotechnologicznego opiera się na wynikach badań eksperymentalnych.

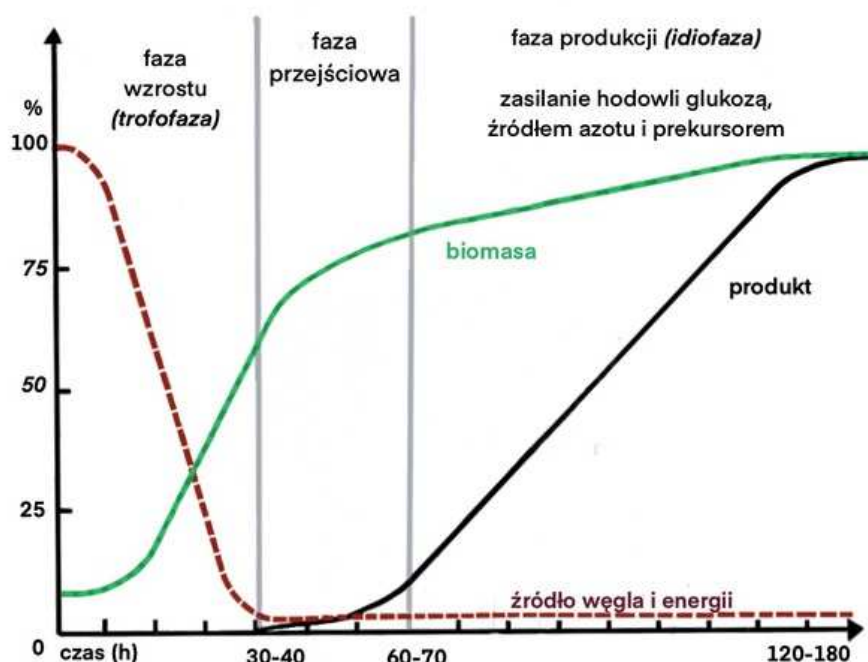
W przypadku procesu okresowego prowadzonego bez odprowadzania podłoża hodowlanego, składniki podłoża ulegają wyczerpaniu w trakcie trwania hodowli, obniża się stężenie źródła węgla, azotu, itp., a nagromadzeniu ulegają produkty metabolizmu. Zmiany te wpływają na stan fizjologiczny i stężenie biomasy hodowanego szczepu czy komórek. Obrazuje to typowy dla większości mikroorganizmów i linii komórkowych wykres rozwoju hodowli okresowej wraz z podanymi nazwami faz rozwoju opisany w rozdziale 5. (Ryc. 6).

Warunki procesowe zmieniają się w trakcie prowadzenia hodowli okresowej, wpływając na efekt procesu. Kontrola procesu biotechnologicznego polega na ciągłym (ang. *on-line*) lub okresowym badaniu warunków procesowych panujących w bioreaktorze poprzez analizę składu próbek brzeczki hodowlanej pobranych z bioreaktora w trakcie trwania hodowli. Ich zmianę obrazuje się na wykresach. Możliwa jest kontrola parametrów fizycznych i niektórych chemicznych *on-line*, np. temperatury, stężenia tlenu (za pomocą elektrody tlenowej), przepływu gazu (za pomocą aerometru), pH brzeczki (za pomocą elektrody do pomiaru pH), obrotów mieszadła. Możliwe jest też wykrywanie i ocena poziomu tworzącej się piany. Większe kłopoty sprawia oznaczanie aktualnego stężenia źródła węgla (np. mieszaniny cukrów), źródła azotu, stężenia produktu, stężenia biomasy (zwykle wyrażanej w gramach suchej masy komórek w 1 litrze hodowli), ale są też inne metody opisane w następnym rozdziale. Zwykle wykonuje się analizę próbek pobranych z bioreaktora w ustalonych

odstępach czasu. Minimalna liczba parametrów biologicznych i chemicznych oznaczanych w pobranych próbkach ogranicza się do 3 czynników: aktualnego stężenia biomasy, stężenia źródła węgla i energii (najczęściej różnego rodzaju sacharydów, ale z rozdziału dotyczącego składu podłoża hodowlanych wynika, że możliwe są też inne źródła) oraz stężenia produktu. Analiza uzyskanych danych jest prowadzona następnie w celu optymalizacji procesu – np. ustalenia optymalnego czasu hodowli, sprawdzenia czy właściwie dobrane zostało źródło węgla i azotu, podjęcia decyzji o zmianie typu hodowli np. z okresowej na okresową z dożywianiem, oraz wprowadzenia koniecznych interwencji (np. zadozowanie odpieniacza). We współczesnych bioreaktorach interwencje takie, jak zadozowanie kwasu lub zasady do utrzymania pH na zaprogramowanym poziomie, zwiększenie przepływu powietrza w celu podwyższenia stężenia tlenu w podłożu, wkroplenie odpieniacza celem wygaszenia piany, obniżenie lub podwyższenie temperatury medium grzejno-chłodzącego, aby utrzymać temperaturę na zaprogramowanym poziomie, wykonywane są automatycznie przez systemy kontrolno-pomiarowe.

Na rysunku poniżej (Ryc. 14) przedstawiony jest przykładowy wykres obrazujący kinetykę zużycia źródła węgla (mieszanina glukozy i maltozy), przyrostu biomasy komórek i biosyntezy penicyliny przez szczep *Penicillium chrysogenum* w hodowli wglębnej w podłożu płynnym. Wyniki uzyskane zostały z analizy próbek pobieranych z bioreaktora w ustalonych przedziałach czasowych. Z wykresu można wyciągnąć wnioski np. na temat optymalnego czasu hodowli w zaprogramowanych warunkach (ok. 120 h); można stwierdzić, że penicylina jest typowym idiolitem, biosyntezywanym przez niemnożące się komórki (w idiofazie) oraz że źródło węgla jest doskonale wykorzystywane przez szczep powodując intensywny przyrost biomasy (w rzeczywistości dotyczy to tylko jednego z dwóch użytych do przygotowania podłoża cukrów – glukozy). Można też stwierdzić, że zadozowanie świeżej pożywki do hodowli po 30 godzinach (dożywienie hodowli) spowodowałoby przedłużenie fazy

logarytmicznego wzrostu szczepu, ale równocześnie odsunęłoby w czasie fazę produkcyjną.



Ryc. 14. Wykres obrazujący kinetykę procesu biosyntezy penicyliny przez szczep *Penicillium chrysogenum*. Wykres znormalizowany – wartości stężeń źródła węgla i energii, biomasy i penicyliny podane są w % wartości maksymalnych [3]

9. Wzrost szczepu, metody kontroli wzrostu, wydajność właściwa wzrostu, wydajność biosyntezy, obliczenia, wzory

Obiektem badań w trakcie ćwiczeń z przedmiotu *Biotechnologia farmaceutyczna* jest szczep promieniowca *S. tsukubaensis*, dlatego dane zawarte w tym rozdziale dotyczą głównie pomiaru wzrostu kultur mikroorganizmów, jak i grzybów (w tym też modyfikowanych genetycznie), oraz wydajności biosyntezy ich produktów metabolizmu.

Wzrost populacji obejmuje równocześnie dwa zjawiska: wzrost pojedynczych komórek oraz ich rozmnażanie. W przypadku organizmów jednokomórkowych wzrost populacji można mierzyć poprzez pomiar liczby komórek w jednostce objętości (np. poprzez pomiar gęstości optycznej hodowli) lub poprzez pomiar stężenia masy komórek (zwykle wyrażany w gramach mokrej

lub suchej masy na 1 litr hodowli). W przypadku kultur grzybów strzępkowych, promieniowców czy kultur mycelialnych grzybów wyższych pierwsza z wymienionych powyżej metod nie może mieć zastosowania, ponieważ rozwój wegetatywny tych organizmów polega na tworzeniu rozgałęzionych układów wielokomórkowych, natomiast proces rozmnażania związany jest z fragmentacją grzybni lub sporulacją. Metodą stosowaną do pomiaru wzrostu takiej kultury pozostaje więc pomiar stężenia biomasy.

Najczęściej stosowanym parametrem do oceny wzrostu kultury zarówno dla organizmów jednokomórkowych, jak i wielokomórkowych jest stężenie biomasy – wzrost populacji wyraża się szybkością zmiany stężenia suchej masy komórkowej (g/L·h).

W zależności od typu prowadzonej hodowli (hodowla powierzchniowa lub wgłębna) oraz charakterystyki hodowanych komórek (organizmy jednokomórkowe czy tworzące wielokomórkowe struktury) można stosować inne, często mniej dokładne metody pomiaru wzrostu kultury poprzez pomiar:

- średnicy kolonii w hodowli powierzchniowej,
- gęstości optycznej hodowli organizmów jednokomórkowych,
- wysokości warstwy biomasy odwirowanej w wykalibrowanych probówkach,
- przyrostu świeżej/wilgotnej biomasy komórkowej (zawierającej zwykle 10-15% suchej masy).

W **hodowli okresowej**, w jej początkowym okresie istnieją warunki, które umożliwiają wzrost z szybkością maksymalną, zależną tylko od składu jakościowego podłoża hodowlanego, temperatury i pH. Wzrost nie jest limitowany niedoborem substratów czy obecnością toksycznych produktów metabolizmu. Wzrost taki jest określany jako nieograniczony i może przebiegać ze stałą, maksymalną w tych warunkach szybkością. Zdeterminowany jest wyłącznie szybkością biosyntezy składników biomasy, pozyskiwania energii metabolicznej, transportu komórkowego oraz zależy od mechanizmów koordynacji metabolizmu. Wzrost nieograniczony przebiega zgodnie z kinetyką

procesów autokatalitycznych (szybkość jest proporcjonalna do stężenia autokatalizatora, czyli np. w hodowlach mikroorganizmów – komórek zdolnych do samoreprodukcji). Tego typu wzrost w hodowli okresowej występuje w fazie logarytmicznej. Natomiast po zakończeniu fazy logarytmicznej, kiedy w podłożu następuje spadek stężeń składników odżywczych (limitacja wzrostu) lub nagromadzenie metabolitów wpływających hamująco na rozwój kultury, występuje zjawisko wzrostu ograniczonego.

Podstawowym parametrem charakteryzującym wzrost drobnoustrojów, zarówno nieograniczony, jak i ograniczony, jest szybkość właściwa wzrostu, wyrażana jako stosunek szybkości przyrostu masy komórkowej ($\frac{dX}{dt}$) do biomasy już istniejącej (X)

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

lub, po przekształceniu równania:

$$\mu = \frac{\ln(X_2 - X_1)}{t_2 - t_1}$$

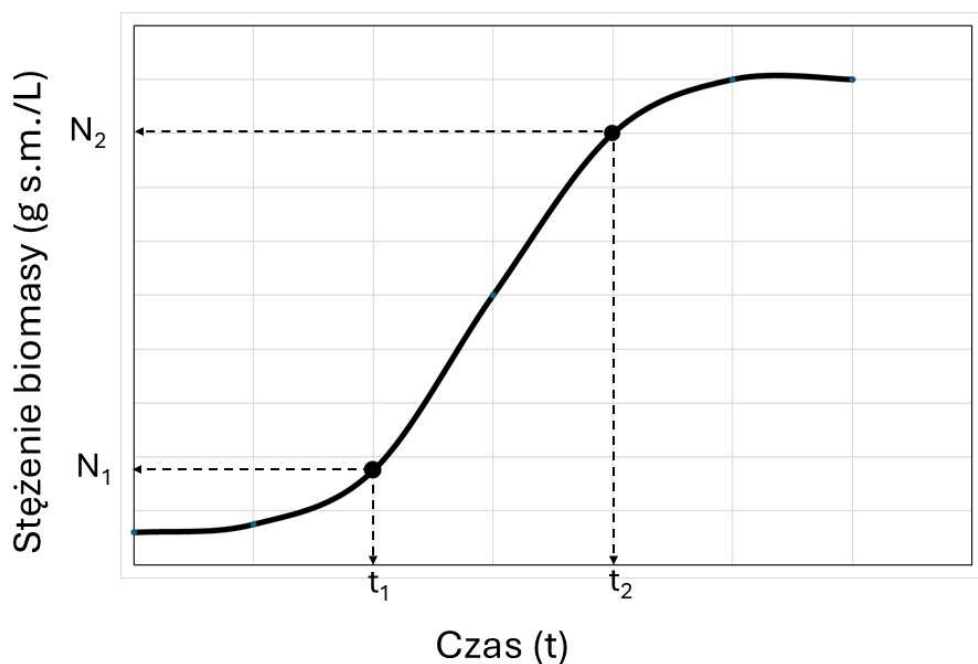
gdzie:

X_2 – stężenie biomasy w czasie t_2 ,

X_1 – stężenie biomasy w czasie t_1 .

Szybkość właściwa wzrostu, maksymalna dla danej kultury – $\mu_{\max}$ charakteryzuje wzrost nieograniczony, czyli w przypadku hodowli okresowej – szybkość wzrostu w logarytmicznej fazie.

Stąd eksperymentalne wyznaczenie $\mu_{\max}$ możliwe jest przez pomiar stężenia biomasy na początku i na końcu fazy logarytmicznego wzrostu i wstawienie uzyskanych wartości do podanego powyżej wzoru.



Ryc. 15. Eksperymentalna metoda oznaczenia maksymalnej właściwej szybkości wzrostu $\mu_{\max}$

Jak wspomniano powyżej wzrost nieograniczony przebiega ze stałą maksymalną szybkością i jest zależny wyłącznie od szybkości biosyntezy składników biomasy, pozyskiwania energii metabolicznej, transportu komórkowego oraz mechanizmów koordynacji metabolizmu. Ujmując to inaczej, dla danego gatunku czy szczepu zależy od warunków hodowli, w tym składu podłoża.

W przypadku wspomnianego powyżej zjawiska limitacji wzrostu, np. przez niskie stężenie limitującego składnika podłoża hodowlanego, następuje spadek szybkości wzrostu, opisywany równaniem:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S}{Ks + S}$$

Gdzie:

X – stężenie biomasy,

S – stężenie substratu,

Ks – stała półnasycenia (stężenie substratu, przy którym $\mu = 0,5 \mu_{\max}$).

Z przekształcenia równania wynika, że dla wzrostu limitowanego stężeniem substratu (S) szybkość właściwa wzrostu jest opisana równaniem:

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

W **hodowli ciągłej**, jak opisano w rozdziale 5, do fermentora w sposób stały doprowadzana jest świeża pożywka, a jednocześnie usuwana jest równoważna objętość medium zawierającego komórki, metabolity oraz niewykorzystane składniki odżywcze. Dzięki temu objętość robocza pozostaje stała, a w fermentorze utrzymywane są stabilne warunki fizykochemiczne. Hodowla taka prowadzona jest zazwyczaj w tzw. chemostatach – specjalistycznych fermentorach zaprojektowanych do pracy w trybie przepływowym. W przeciwieństwie do hodowli okresowej, w hodowli ciągłej można przez dłuższy czas utrzymywać populację mikroorganizmów w fazie logarytmicznego (wykładniczego) wzrostu. Przekłada się to na szereg korzyści technologicznych i ekonomicznych, takich jak:

- pominięcie etapu przygotowania inokulum,
- zwiększenie wydajności w porównaniu z metodami okresowymi,
- zmniejszenie powierzchni użytkowej instalacji przy tej samej wielkości produkcji,
- łatwiejsze utrzymanie stałych parametrów procesu (pH, temperatura, stężenie substratu, dostępność tlenu),
- stabilność i powtarzalność procesu w czasie.

Prowadzenie procesu w sposób ciągły wymaga jednak zachowania stanu równowagi pomiędzy tempem wzrostu komórek a ich usuwaniem z układu. Sytuacja taka opisywana jest warunkiem:

$$D = \mu$$

Gdzie:

D – szybkość rozcieńczania [h^{-1}],

μ – rzeczywista szybkość wzrostu drobnoustrojów [h^{-1}].

Szybkość rozcieńczania (D), zdefiniowana jako stosunek objętościowego dopływu świeżej pożywki (F) do objętości roboczej fermentora (V), oblicza się według wzoru:

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

Gdzie:

F – objętość świeżej pożywki doprowadzanej do fermentora w jednostce czasu [L/h],

V – objętość robocza fermentora.

Zachowanie równowagi w hodowli ciągłej oraz utrzymanie stabilnych warunków środowiskowych umożliwia ilościową analizę procesu na podstawie parametrów kinetycznych. W szczególności, przy znajomości podstawowych wielkości takich jak: szybkość rozcieńczania, stężenie substratu w pożywce oraz w fermentorze, a także wydajność wzrostu biomasy, możliwe jest obliczenie kluczowych parametrów opisujących przebieg hodowli.

W stanie stacjonarnym, gdy szybkość wzrostu komórek (μ) zrównuje się z szybkością ich usuwania z układu (D), możliwe staje się wyprowadzenie zależności pozwalających na oszacowanie stężenia substratu oraz biomasy w fermentorze.

Na tej podstawie można obliczyć stężenie substratu w fermentorze:

$$S = \frac{D \cdot K_s}{\mu_{\max} - D}$$

Gdzie:

S – stężenie substratu w fermentorze [g/L],

D – szybkość rozcieńczania [h^{-1}],

K_a – stała półnasycenia [g/L] (wartość substratu, przy której $\mu = 0,5 \mu_{\max}$),

$\mu_{\max}$ – maksymalna szybkość wzrostu [L/h].

Znając wydajność wzrostu biomasy względem substratu oraz różnicę między stężeniem substratu w pożywce świeżej a jego stężeniem w fermentorze, można obliczyć stężenie biomasy (gęstość komórek):

$$X = Y_{x/s} \left(S_0 - \frac{D \cdot K_s}{\mu_{\max} - D} \right)$$

Gdzie:

X – stężenie biomasy [g/L],

$Y_{x/s}$ – wydajność biomasy względem substratu [g biomasy /g substratu],

S_0 – stężenie substratu w dopływającej pożywce [g/L],

D – szybkość rozcieńczania [h^{-1}],

K_a – stała półnasycenia [g/L] (wartość substratu, przy której $\mu = 0,5 \mu_{\max}$),

$\mu_{\max}$ – maksymalna szybkość wzrostu [L/h].

Hodowle okresowe i ciągłe to dwa podstawowe tryby prowadzenia bioprocessów mikrobiologicznych, różniące się sposobem zasilania pożywką, stabilnością warunków oraz możliwościami kontroli procesu. Hodowla okresowa umożliwia obserwację wszystkich faz wzrostu mikroorganizmów i jest szczególnie użyteczna w badaniach laboratoryjnych. Z kolei hodowla ciągła pozwala na utrzymanie komórek w fazie wzrostu logarytmicznego, co sprzyja długotrwałej i powtarzalnej produkcji biomasy lub metabolitów wtórnych.

Szczegółowe porównanie metod okresowych i ciągłych przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie hodowli okresowej i ciągłej

Cecha	Hodowla okresowa	Hodowla ciągła
Zasilanie pożywką	Jednorazowe, na początku procesu	Ciągłe, przez cały czas trwania procesu
Objętość robocza	Zmienia się w trakcie hodowli	Stała
Fazy wzrostu	Wyraźnie wyodrębnione fazy (lag, log, stacjonarna)	Faza logarytmiczna
Czas trwania hodowli	Ograniczony (kilkanaście – kilkadziesiąt godzin)	Potencjalnie nieograniczony
Możliwość śledzenia zmian faz	Tak	Nie, warunki są utrzymywane na stałym poziomie
Szybkość komórek wzrostu	Zmienna w czasie	Stała, szybkość wzrostu równa szybkości rozcieńczania ($\mu = D$)
Parametry środowiskowe (pH, O ₂ itd.)	Zmienne	Utrzymywane na stałym poziomie
Możliwość oceny $\mu_{\max}$	Tak, w fazie logarytmicznej	Nie, bezpośrednio – proces prowadzony poniżej $\mu_{\max}$
Zastosowanie	Skala laboratoryjna, procesy nieciągłe	Produkcja przemysłowa, procesy długotrwałe
Ryzyko kontaminacji	Mniejsze, krótki czas trwania	Większe, proces długotrwały
Sterowanie i kontrola	Proste	Wymaga precyzyjnych systemów automatyki
Typowe produkty	Metabolity wtórne, enzymy, biomasa	Enzymy, biomasa, metabolity przy stałych warunkach

10. Izolacja produktu procesu biotechnologicznego, przykłady metod wydzielania i koncentracji bioproduktów

Wydzielenie produktu bioproduktu ze względu na charakter płynu pochodowlanego jest trudne. Na dobór metod wyodrębniania, oczyszczania i rozdzielania produktu procesu biotechnologicznego mają wpływ:

- a. lokalizacja produktu (gromadzenie w komórkach, częściowe związanie ze ścianą komórkową i częściowe wydzielanie do podłoża),
- b. właściwości produktu (reaktywność, charakter jonowy, polarność, hydrofilowość lub hydrofobowość),
- c. wrażliwość produktu na warunki wyodrębniania (temperatura, pH, warunki jonowe).

Celem wyizolowania produktu ze ściany komórkowej poddaje się ją zniszczeniu poprzez mechaniczne rozrywanie komórek (ucieranie, rozcinanie, mielenie), działanie czynnikami fizycznymi (ultradźwięki, szok osmotyczny, gwałtowna dekompresja, zamrożenie i rozmrożenie) i czynnikami chemicznymi (użycie rozpuszczalników organicznych, detergentów, kwasów).

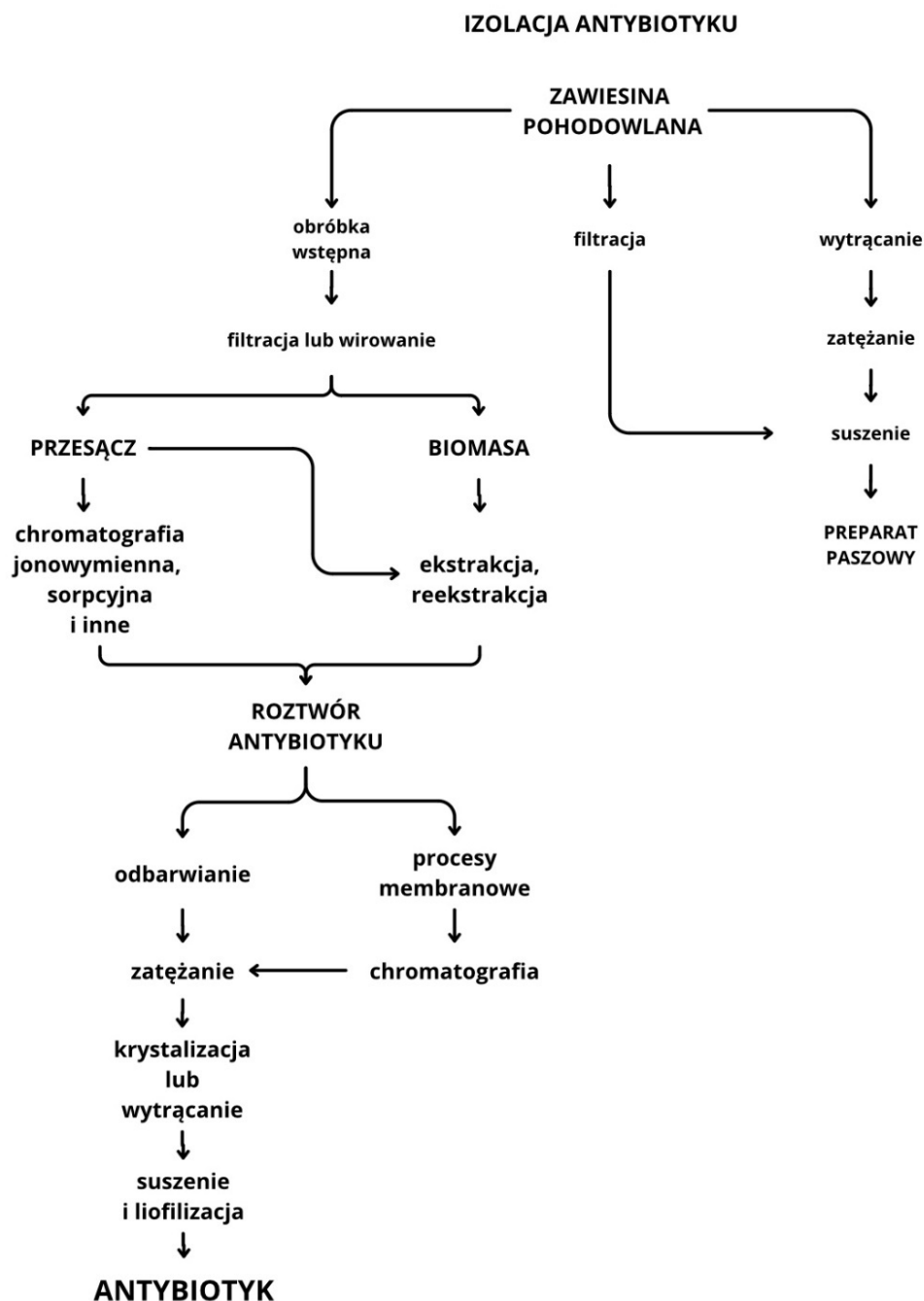
Najczęściej izolacja bioproduktu poprzedzona jest wykonaniem poniższych czynności:

- a. cieplna koagulacja białek,
- b. zakwaszenie w celu zmiany ładunku na powierzchni komórek i osiągnięcia punktu izoelektrycznego,
- c. dodanie substancji filtracyjnych np. ziemi okrzemkowej, rozpuszczalników organicznych lub detergentów czy elektrolitów (NaCl , CaCl_2).

Po przeprowadzonej hodowli zawiesinę drobnoustrojów (biomasę) oddziela się z wykorzystaniem procesów **filtracji** na obrotowych filtrach bębnowych lub w procesie **wirowania** w separatorach lub wirówkach bębnowych. Następnie wykorzystywane są różne techniki separacyjne, do których należą: ekstrakcje (klasyczna, jonowymienna), chromatografie (jonowymienna, sorpcyjna,

wysokosprawna cieczerw), filtracja żelowa, wytrącanie, sączenie, wirowanie, zateżanie, krystalizacja, suszenie, liofilizacja.

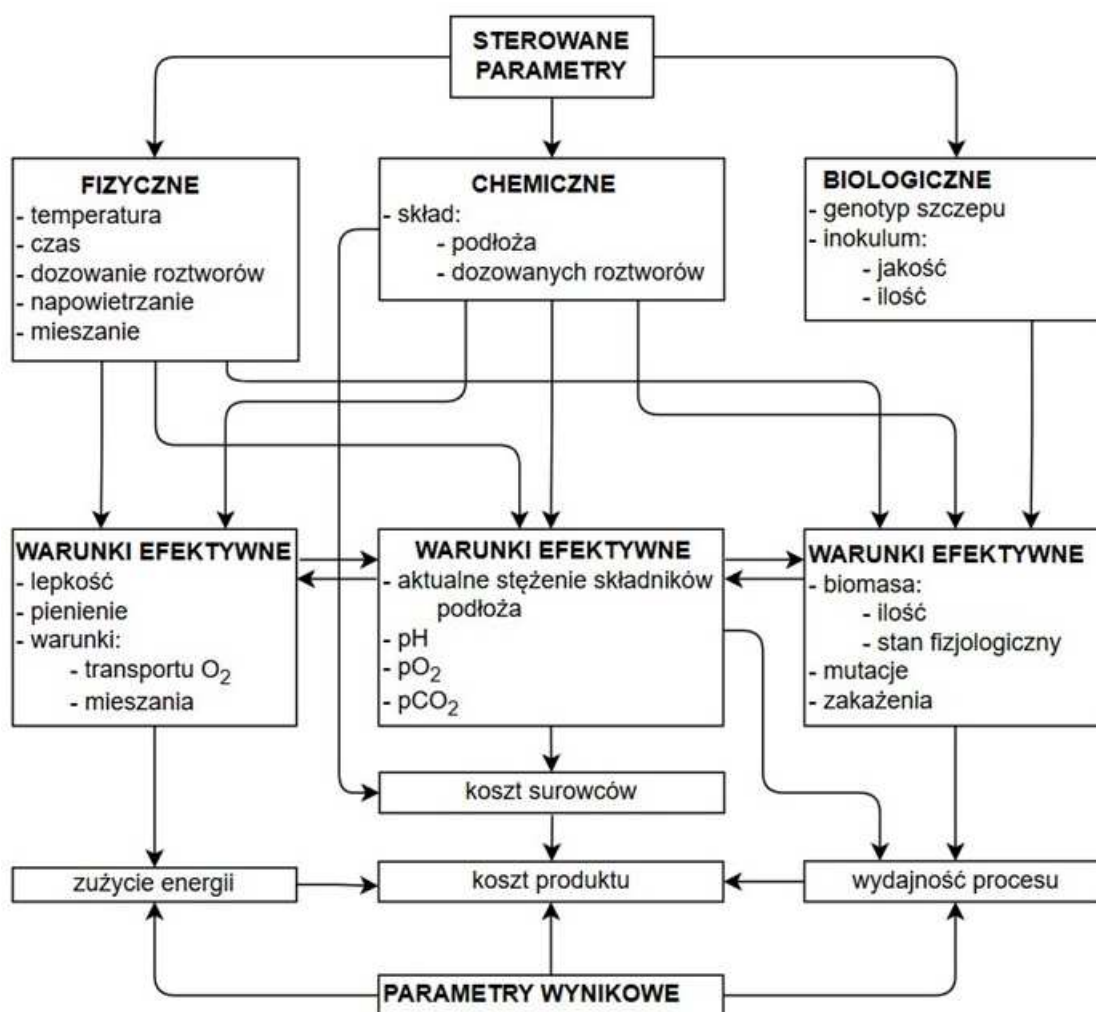
Schemat wyodrębniania i oczyszczania bioproduktu na przykładzie antybiotyku przedstawia zamieszczony poniżej schemat (Ryc. 16).



Ryc. 16. Schemat wyodrębniania i oczyszczania bioproduktu z mieszaniny pohodowlanej na przykładzie antybiotyku [3]

11. Metody optymalizacji procesu

Podstawowym zadaniem w każdym procesie technologicznym, w tym również w biotechnologii farmaceutycznej, jest osiągnięcie założonego celu w optymalnych warunkach i przy minimalnych nakładach. Na wynik prowadzonego procesu wpływ mają zarówno czynniki wewnątrzkomórkowe (parametry biologiczne), jak i środowiskowe (parametry chemiczne i fizyczne). Optymalizacja przebiegu procesu wymaga przeprowadzenia analizy współzależności pomiędzy wyżej wymienionymi parametrami i wyboru tych, które odgrywają podstawową rolę w osiągnięciu optymalnego wyniku procesu, czyli uzyskania jak najwyższej wydajności produktu, przy jak najniższym koszcie (Ryc. 17).



Ryc. 17. Wpływ różnych grup parametrów podlegających optymalizacji na wynik procesu biotechnologicznego [1]

Optymalizuje się zarówno parametry biologiczne (optymalizacja szczepu lub linii komórkowej), jak i chemiczne (skład podłoża hodowlanego) i fizyczne (temperatura, mieszanie, napowietrzanie, czas hodowli).

Optymalizację procesu prowadzi się najpierw podczas opracowania nowego procesu w skali laboratoryjnej a później, powtórnie, podczas podnoszenia skali do warunków produkcyjnych. Parametry biologiczne (genotyp szczepu oraz jakość i ilość inokulum wyrażana w procentach objętości hodowli), parametry chemiczne (skład podłoża hodowlanego, w tym składniki odżywcze oraz obecność substancji pomocniczych) i temperatura pozostają w zasadzie niezmiennie bez względu na skalę procesu.

- Proces optymalizacji zaczyna się od udoskonalenia biokatalizatorów – szczepów mikroorganizmów lub linii komórkowych wykorzystywanych w bioprodukcji. Jak opisano w rozdziale 1. części teoretycznej, obejmuje to zastosowanie różnych technik ingerencji w genom „biokatalizatora”, czyli szczepu lub linii komórkowej (np. mutageneza, fuzja protoplastów, techniki rekombinowanego DNA) w celu wzmocnienia określonych cech, takich jak wyższa produktywność, lepsze wykorzystanie substratu lub wyższa odporność na stres środowiskowy. Możliwe jest też projektowanie i konstruowanie szczepów czy linii komórek dostosowanych do pożądanego bioprocessu. Przykładem mogą być hybrydy wykorzystywane do biosyntezy przeciwciał monoklonalnych czy transformowane bakterie wykorzystywane do biosyntezy białek terapeutycznych.
- Poza optymalizacją biokatalizatora bardzo istotna jest optymalizacja składu podłoża hodowlanego, polegająca na znalezieniu optymalnych źródeł makroelementów, czyli węgla, azotu, fosforu, siarki (patrz rozdział 4.) oraz mikroelementów. Różne szczepy czy linie komórkowe różnią się zdolnością wykorzystania danego składnika podłoża hodowlanego do biosyntezy składników biomasy i pozyskiwania energii metabolicznej. Przykładowo, niektóre szczepy drożdży wykorzystują z powodzeniem

jako źródło węgla węglowodory, pochodne ropy naftowej, podczas gdy wykorzystywane w biotechnologii farmaceutycznej szczepy promieniowców i grzybów oraz linie komórek roślinnych i zwierzęcych wymagają źródeł węglowodanowych (cukrów). Tolerancja i wykorzystywanie konkretnych węglowodanów są też różne dla różnych szczepów i linii komórkowych; np. optymalnym źródłem węgla dla *S. tsukubaensis* jest glukoza lub maltoza, natomiast wzrost na podłożu z sacharozą lub melasą jest znacznie słabszy. Wstępną optymalizację składu podłoża prowadzi się metodą OFAT (ang. *One Factor At a Time*), zmieniając w kolejnych eksperymentach tylko jeden czynnik, np. źródło węgla lub jego stężenie.

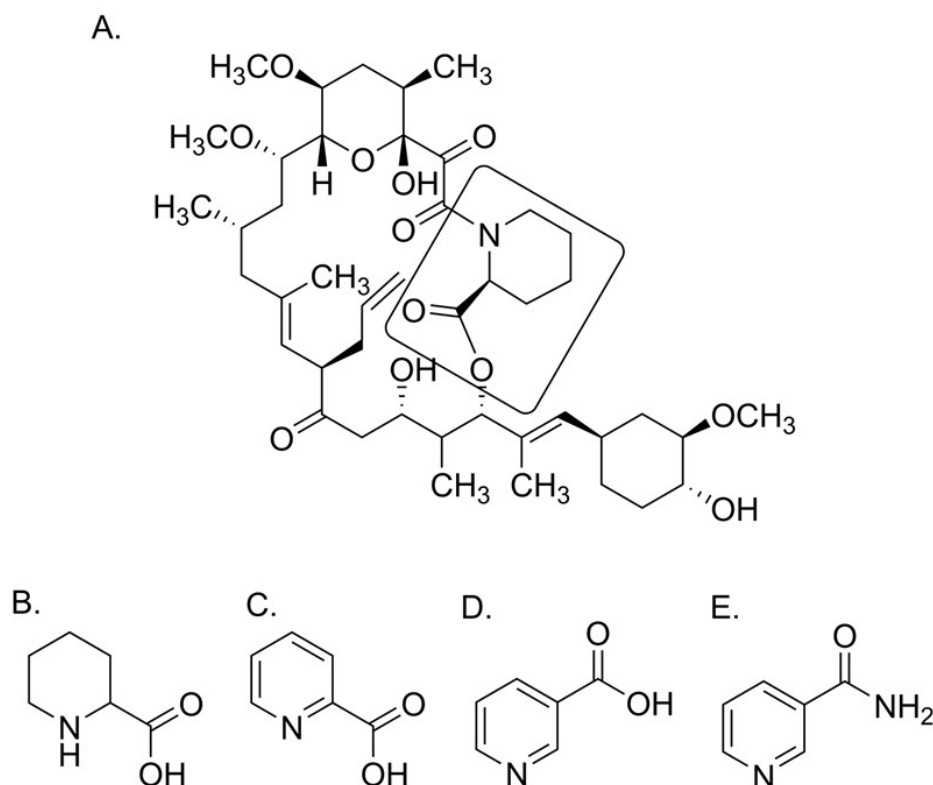
W podobny sposób poszukuje się innych niż składniki odżywcze komponentów podłoża hodowlanego, w tym stymulatorów wzrostu czy prekursorów procesu biosyntezy.

Prekursorami w procesach biosyntezy są związki, które są substratami lub reagentami w tych procesach. Wprowadzenie do podłoża hodowlanego związków, często o złożonej strukturze, które stanowią materiał wyjściowy (starter) lub „gotowe elementy” do budowy bardziej złożonych cząsteczek organicznych może znacząco podwyższać wydajność procesu.

Wybór potencjalnych prekursorów biosyntezy produktu opiera się na znajomości jego biogenezy lub jeżeli szlak biosyntezy jest jeszcze nieznan, na znajomości struktury danego związku.

Na przykład dla takrolimusu, 23-członowego makrolaktonu będącego produktem biosyntezy szczepu promieniowca *S. tsukubaensis*, zarówno opisana biogeneza tego związku, jak i wzór strukturalny (Ryc. 18, związek A.) wskazują na sensowność testowania jako potencjalne prekursory kwasów, pochodnych układów heterocyklicznych pirydyny i piperydyny. Jednym z ostatnich etapów biosyntezy tego związku jest wbudowanie do tworzącej się cząsteczki takrolimusu pochodnej kwasu pipekolinowego (Ryc. 18B), powstającej

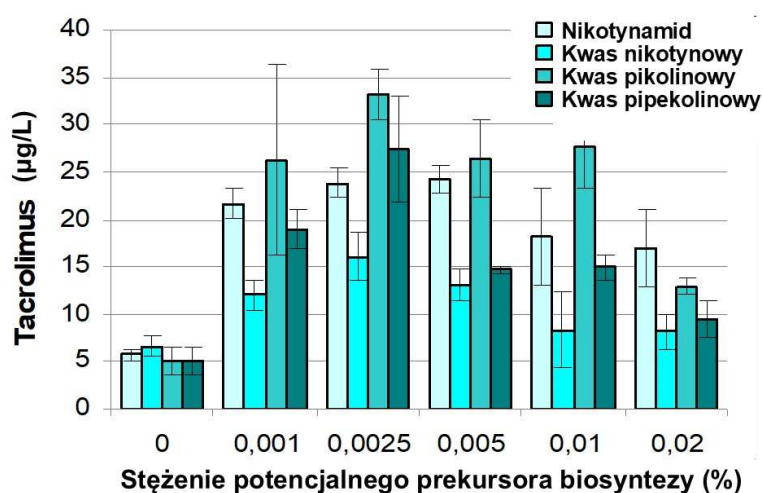
w komórce promieniowca w wyniku przemiany histydyny. Układ ten jest zaznaczony w strukturze takrolimusu ramką (Ryc. 18A).



Ryc. 18. Typowanie potencjalnych prekursorów biosyntezy takrolimusu na podstawie analizy jego struktury

Można więc sądzić, że wprowadzenie do podłoża hodowlanego np. soli kwasu pipekolinowego (Ryc. 18B) lub innego związku zawierającego podobny układ heterocykliczny (np. soli kwasu pikolinowego – Ryc. 18C, soli kwasu nikotynowego – Ryc. 18D lub nikotynamidu – Ryc. 18E) poprzez prekursorowanie ułatwi i przyspieszy proces biosyntezy, czyli podwyższy jego wydajność.

Ryc. 19 przedstawia wyniki opisanych powyżej eksperymentów, mających na celu znalezienie efektywnych prekursorów biosyntezy takrolimusu, przeprowadzonych w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej WUM. W tym przypadku wszystkie testowane związki znacząco wpływały na wydajność biosyntezy produktu, przy czym wpływ ten był zależny od stężenia suplementu w podłożu.



Ryc. 19. Wyniki poszukiwania efektywnych prekursorów biosyntezy takrolimusu pomiędzy pochodnymi kwasów heterocyklicznych

W podobny sposób, analizując biogenezę produktu biosyntezy, a następnie optymalizując skład podłoża hodowlanego typuje się i testuje potencjalne prekursory biosyntezy innych związków. Innymi składnikami podłoża, które znacząco mogą wpłynąć na wydajność procesu są **promotory** wzrostu. To substancje, które w przypadku mikroorganizmów stymulują rozwój kultury poprzez przyspieszanie podziałów komórkowych i zwiększanie populacji mikroorganizmów. Niektóre z tych związków, takie jak np. witaminy czy aminokwasy mogą przyspieszać procesy metaboliczne w komórkach mikroorganizmów, w tym np. syntezę białek, kwasów nukleinowych, co prowadzi do szybszego wzrostu.

Pewne związki chemiczne, mogą być niezbędne dla konkretnych gatunków mikroorganizmów a ich brak może hamować wzrost. Dostarczenie tych związków do podłoża może działać jako promotor wzrostu. Związki promujące i regulujące wzrost są zależne od rodzaju kultury i inne dla kultur komórek zwierzęcych (np. czynniki wzrostu, hormony, cytokiny, bydlęca surowica płodowa) czy roślinnych (np. auksyny, gibereliny, cytokiny), niemniej szersze omówienie tego tematu wykracza poza zakres tego skryptu.

Czynnikiem chemicznym mającym bardzo istotny wpływ na rozwój kultury jest pH podłoża hodowlanego. Ogólne preferencje różnego typu organizmów, jeżeli chodzi o pH podłoża, są znane (np. kultury grzybów zwykle preferują środowisko lekko kwaśne, natomiast kultury bakterii – bliskie obojętnemu), jednak różnice pomiędzy odmiennymi gatunkami, a nawet szczepami, są na tyle istotne, że na etapie wstępnej optymalizacji składu podłoża przeprowadza się testy rozwoju kultury w podłożach o różnym pH, z dokładnością do 0,1 jednostki. W trakcie hodowli pH podłoża może ulegać zmianie ze względu na powstawanie metabolitów o różnym charakterze chemicznym, ale bioreaktory stosowane do prowadzenia procesów przemysłowych mają możliwość kontroli *on-line* pH podłoża oraz korekty przez dozowanie kwasu lub zasady.

Poza optymalizacją parametrów biologicznych i chemicznych, optymalizacji podlegają również parametry fizyczne: temperatura, mieszanie, wymiana masy, napowietrzanie (wyrażane w litrach powietrza na litr podłoża na jednostkę czasu), czas hodowli. Optymalizacja tych parametrów nie jest szczególnie skomplikowana, ale niestety dla większości z nich (poza temperaturą procesu) dotyczy danego bioreaktora, o zdefiniowanej geometrii, pojemności roboczej, typie mieszania i napowietrzania (dla procesów tlenowych). Przy podnoszeniu skali procesu od bioreaktorów laboratoryjnych do przemysłowych pojawiają się poważne problemy z zachowaniem na tym samym poziomie takich istotnych parametrów jak: zapotrzebowanie mocy na jednostkę objętości podłoża (związanego m.in. z mieszaniem) oraz objętościowego czynnika przenikania tlenu (związanego z napowietrzaniem). Okazuje się, że przy podniesionej skali procesu zachowanie tej samej geometrii bioreaktora, tych samych obrotów mieszadła oraz tej samej szybkości napowietrzania nie zapewnia podobnych warunków fizycznych środowiska, co ma wpływ na wydajność procesu. Innym poważnym problemem przy podnoszeniu skali procesu biotechnologicznego jest opracowanie metody odbierania ciepła powstającego w wyniku przebiegu hodowli. Jego ilość może być tak duża, że stosowany w mniejszej skali procesu płaszcz chłodzący może

nie mieć wystarczającej wydajności chłodzenia. Stąd przyjęta jest ponowna optymalizacja warunków fizycznych procesu dla bioreaktorów o powiększonej skali: przebieg procesu jest sprawdzany przy stopniowym podwyższaniu skali bioreaktorów, od skali laboratoryjnej przez podwyższoną laboratoryjną ćwierć i półtechniczną do skali pilotażowej i produkcyjnej.

Odrębnym problemem jest wieloparametryczna optymalizacja procesu biotechnologicznego, polegająca na jednoczesnym ulepszaniu wielu jego parametrów w celu osiągnięcia optymalnego wyniku. Często musi ona brać pod uwagę sprzeczne cele (np. wydajność procesu *versus* jego koszt) i uwzględniać różne ograniczenia. W procesie produkcyjnym należy jednocześnie optymalizować czas realizacji, wydajność i jakość produktu oraz koszty.

11.1. Optymalizacje procesu metodami statystycznymi

Jak wspomniano w poprzednim rozdziale, tradycyjnym podejściem do prowadzenia eksperymentów jest metoda jednoczynnikowa, znana jako OFAT, polegająca na badaniu wpływu pojedynczego czynnika na wynik eksperymentu, przy jednoczesnym utrzymywaniu pozostałych zmiennych na stałym poziomie. Chociaż OFAT jest techniką prostą i intuicyjną, jej ograniczenia sprawiają, że w przypadku bardziej złożonych systemów staje się nieefektywna i nie dostarcza pełnej informacji o badanym procesie. OFAT nie umożliwia analizy interakcji między czynnikami, co oznacza, że zależności pomiędzy różnymi zmiennymi mogą pozostać niezauważone. W rzeczywistości czynniki często wpływają na siebie nawzajem, a ich współdziałanie może istotnie zmieniać wynik eksperymentu. Dodatkowo, OFAT nie pozwala na budowanie matematycznych modeli opisujących relacje między zmiennymi, przez co nie gwarantuje właściwego wyboru optymalnych warunków bioprocessu, a jej zdolność do przewidywania wyników dla nowych warunków jest ograniczona. Metoda ta wymaga przeprowadzenia dużej liczby prób, co zwiększa czas i koszty badań.

Z wymienionych względów do optymalizacji wykorzystuje się obecnie na coraz większą skalę bardziej zaawansowane, statystyczne podejście, znane jako planowanie doświadczeń (ang. *Design of Experiments*, DoE) lub teoria eksperymentu. Jego celem jest uzyskanie odpowiedzi na pytanie: jak zaplanować doświadczenie, aby możliwie szybko i przy kosztach ograniczonych do niezbędnego minimum uzyskać jak najwięcej użytecznej informacji?

Wydajność procesów biotechnologicznych jest wynikiem działania wielu czynników (zmiennych wejściowych) oraz złożonych zależności pomiędzy nimi, które często wpływają na rezultat w sposób nieliniowy. Dlatego jednym z obszarów, w którym planowanie DoE znajduje szczególnie szerokie zastosowanie, jest biosynteza z wykorzystaniem mikroorganizmów i grzybów. Metoda ta stanowi skuteczne narzędzie do optymalizacji warunków hodowli i zwiększania wydajności produkcji pożądaných metabolitów. Procesy biosyntezy mogą przebiegać w różny sposób i zależą od licznych parametrów, takich jak skład pożywki, temperatura, pH, czas inkubacji czy obecność prekursorów. Kluczowe w badaniach biotechnologicznych jest zatem precyzyjne określenie wpływu tych czynników na przebieg procesów biologicznych. DoE umożliwia równoczesną analizę wielu zmiennych oraz ich wzajemnych zależności, co stanowi istotną przewagę w porównaniu do klasycznego podejścia, jakim jest metoda OFAT. Dzięki temu pozwala nie tylko na skrócenie czasu eksperymentowania i zmniejszenie liczby wymaganych prób, ale także na głębsze zrozumienie badanych procesów. DoE pozwala również na budowę modeli matematycznych (np. równań regresyjnych), które umożliwiają prognozowanie efektów modyfikacji zmiennych wejściowych bez konieczności przeprowadzania dodatkowych testów. To z kolei pozwala na bardziej precyzyjne prognozowanie wyników, co jest niemożliwe w tradycyjnym podejściu OFAT.

Porównanie zalet i ograniczeń metod OFAT oraz DoE w kontekście badań biotechnologicznych przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Porównanie metod eksperymentalnych OFAT (One Factor At a Time) i DoE (Design of Experiments)

Kryterium	OFAT	DoE
Podejście	Jeden czynnik zmieniany na raz	Wiele czynników badanych jednocześnie
Złożoność	Prosta i intuicyjna	Bardziej złożona, wymaga planowania i analizy statystycznej
Liczba prób	Zazwyczaj większa, szczególnie przy wielu zmiennych	Zazwyczaj mniejsza, większa efektywność eksperymentu
Czas i koszty	Wysokie dla złożonych systemów	Niższe przy dobrej optymalizacji
Wykrywanie interakcji	Nie pozwala na analizę interakcji między czynnikami	Pozwala na identyfikację i analizę interakcji
Optymalizacja warunków	Trudna lub niedokładna	Umożliwia dokładną optymalizację wielu parametrów jednocześnie
Budowanie modeli matematycznych	Brak możliwości	Możliwość tworzenia modeli predykcyjnych (np. równań regresji)
Dokładność i wiarygodność	Niska, w złożonych systemach	Wysoka, umożliwia analizę wariancji (ANOVA) i testy statystyczne
Zastosowania	Proste, jednoczynnikowe badania	Złożone procesy biologiczne, inżynierskie, przemysłowe
Przykład z biotechnologii	Zmiana tylko temperatury inkubacji przy produkcji enzymu	Jednoczesna optymalizacja pH, czasu inkubacji i stężenia substratu

Metody DoE obejmują różne strategie planowania eksperymentów. Każda z nich ma swoje zalety i ograniczenia, które należy wziąć pod uwagę przy

planowaniu eksperymentów, a wybór odpowiedniego rozwiązania zależy od liczby badanych czynników, dostępnych zasobów oraz celów eksperymentu. Poniżej przedstawiono najważniejsze metody DoE, wykorzystywane w badaniach biotechnologicznych.

1. Pełny plan czynnikowy (ang. *Full Factorial Design*) – „Jaki wpływ mają wszystkie czynniki oraz ich wzajemne interakcje na wynik eksperymentu?”

Pełny plan czynnikowy jest jedną z najstarszych i najbardziej kompleksowych metod projektowania eksperymentów. Polega na przeprowadzeniu eksperymentów dla wszystkich możliwych kombinacji poziomów wszystkich badanych czynników. Jest to podejście idealne, gdy celem jest zrozumienie interakcji między czynnikami.

2. Plany czynnikowe frakcyjne (ułamkowe) (ang. *Fractional Factorial Design*) – Jak zbadać najważniejsze czynniki przy ograniczonej liczbie prób?

Analizują jedynie część możliwych kombinacji czynników, co pozwala ograniczyć liczbę eksperymentów. Umożliwiają oszacowanie głównych efektów oraz wybranych interakcji, jednak kosztem pominięcia interakcji wyższego rzędu. Stosowane są przy dużej liczbie czynników, np. w przemyśle farmaceutycznym. Szczególnym przypadkiem tej metody jest, stosowany głównie na etapie wstępnego przesiewu, **plan Placketta-Burmana (ang. *Plackett-Burman Design*)** odpowiadający na pytanie – *Które czynniki są najważniejsze?*

Jest to stosunkowo prosta metoda, używana głównie do identyfikacji najważniejszych czynników w eksperymencie. Nie analizuje on interakcji między czynnikami, lecz skupia się na efekcie głównym każdego z nich. Metoda ta jest bardziej oszczędna pod względem liczby eksperymentów, dlatego stosowana jest głównie na etapie wstępnych badań.

3. Metody powierzchni odpowiedzi (ang. *Response Surface Methodology, RSM*) – stosowane po etapie selekcji czynników, służą do modelowania i optymalizacji.

3.1. Plan centralny kompozycyjny (ang. *Central Composite Design*; CCD) – *Jak znaleźć najlepszą kombinację poziomów czynników i zbudować model odpowiedzi?*

CCD jest jedną z najczęściej stosowanych metod optymalizacji w biotechnologii. Umożliwia precyzyjne opracowanie modelu odpowiedzi na podstawie danych eksperymentalnych. Metoda ta sprawdza się szczególnie wtedy, gdy celem jest stworzenie zaawansowanego modelu matematycznego procesu. Eksperymenty są projektowane w sposób umożliwiający wyznaczenie powierzchni odpowiedzi (ang. *Response Surface*), co pozwala na ocenę wpływu poszczególnych czynników oraz ich interakcji na wynik.

3.2. Plan Boxa-Behnkena (ang. *Box-Behnken Design*; BBD)

– *Jak zoptymalizować proces, znając już najważniejsze czynniki?*

Plan Boxa-Behnkena to metoda eksperymentalna stosowana w celu optymalizacji procesów. BBD jest uzupełnieniem pełnego planu czynnikowego, umożliwiającym przeprowadzenie mniejszej liczby eksperymentów, przy jednoczesnym dokładnym określeniu wpływu zmiennych na proces. Plany Boxa-Behnkena pozwalają na uzyskanie modeli matematycznych, które mogą być następnie wykorzystane do prognozowania wyników.

4. Alternatywne strategie projektowania eksperymentów

Metoda Taguchiego (ang. *Taguchi Design*) – *Jak uzyskać stabilne wyniki?*

Metoda Taguchiego skupia się na minimalizacji wpływu zakłóceń (szumów) na wynik eksperymentu. Głównym celem jest optymalizacja odporności procesu na zmiany warunków zewnętrznych, a nie tylko maksymalizacja wydajności. Jest szczególnie przydatna w produkcji, gdzie ma się do czynienia z różnymi źródłami zmienności, a celem jest poprawa jakości przy minimalnych kosztach.

IV. Część eksperymentalna

1. Regulamin obowiązujący w pracowni biotechnologicznej

1. Student/ka musi posiadać aktualne ubezpieczenie zdrowotne i fartuch laboratoryjny dla ochrony ubrania przed zniszczeniem oraz zmienione obuwie.
2. Student/ka wykonujący/a ćwiczenia jest odpowiedzialny/a za utrzymanie miejsca pracy w czystości i porządku.
3. Sprzęt i odczynniki potrzebne do wykonywania ćwiczeń znajdują się na stołach laboratoryjnych.
4. Nie wolno pipetować ustami, należy korzystać z pipetorów.
5. W przypadku oparzenia chemicznego lub termicznego należy miejsce oparzenia obficie spłukać wodą i zgłosić zdarzenie asystentowi prowadzącemu zajęcia.
6. Podczas procesu filtracji, destylacji oraz mycia szkła i sprzętu laboratoryjnego należy zwrócić szczególną uwagę na zabezpieczenie oczu; **używać okularów ochronnych.**
7. Ze względu na pracę z wykorzystaniem łóży laminarnej student/ka powinien/powinna zachować szczególną ostrożność, tak aby nie narażać siebie i innych na niebezpieczeństwo:
 - musi również przestrzegać zasad pracy jałowej, **pracować przy wyłączonej lampie UV,**
 - wszelkie czynności związane z posiewami wykonywać przy zapalonym palniku, **długie włosy muszą być spięte,**
 - drobny sprzęt metalowy (np. ezy, pęsety) należy zarówno przed, jak i po użyciu opalić w palniku w celu zniszczenia drobnoustrojów,
 - po zakończeniu pracy należy umyć ręce.

8. Z pracowni nie można wynosić na zewnątrz hodowli mikroorganizmów, odczynników, szkła laboratoryjnego.
9. Odpady powinny być pozostawiane w miejscach oznaczonych lub wskazanych przez prowadzącego.
10. W pracowni niedopuszczalne jest spożywanie posiłków, picie napojów, żucie gumy.
11. Podczas zajęć nie należy używać telefonów komórkowych.
12. Po zakończonym ćwiczeniu sprzęt i miejsce pracy muszą być pozostawione w porządku i czystości, aby kolejna grupa ćwiczeniowa mogła z nich korzystać.
13. Student/ka przebywający/a na zajęciach z biotechnologii farmaceutycznej w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej jest obowiązany/a dbać o sprzęt i urządzenia oddane do użytku, a za wszelkie poczynione szkody odpowiada materialnie.
14. Wszelkie wypadki przy pracy laboratoryjnej należy bezzwłocznie zgłosić osobie prowadzącej zajęcia, nie wolno samodzielnie podejmować środków zaradczych.
15. Założone hodowle należy dokładnie opisywać.

2. Kryteria zaliczenia przedmiot biotechnologia farmaceutyczna

Warunkiem dopuszczenia do zaliczenia końcowego jest obecność na seminariach i ćwiczeniach. Każda nieobecność studenta musi być usprawiedliwiona okazaniem zwolnienia lekarskiego. Nieobecność na seminariach i/lub ćwiczeniach student odrabia na odpowiednich zajęciach z inną grupą dziekańską. W przypadku ostatniego bloku ćwiczeniowego nie istnieje możliwość odrobienia seminarium i/lub ćwiczeń, wówczas student otrzymuje dodatkowe pytanie z materiału seminaryjnego i/lub ćwiczeniowego na zaliczeniu końcowym.

Wykłady prowadzone są w formie zdalnej, a seminaria i ćwiczenia w formie stacjonarnej.

Przedmiot kończy się zaliczeniem pisemnym, które zawiera 4 pytania otwarte, obejmujące materiał wykładowy, seminaryjny i dotyczący tematyki ćwiczeniowej. Każde pytanie punktowane jest w skali od 0 do 5. Średnia liczba uzyskanych punktów decyduje o ocenie. Na ostateczną ocenę z przedmiotu ma wpływ uzyskanie liczby punktów z zaliczenia pisemnego (maksymalnie 20 punktów) oraz przedstawienie w sprawozdaniu otrzymanych podczas ćwiczeń wyników z ich interpretacją (maksymalnie 4 punkty).

Ocena, kryteria: 2,0 (niedostateczny) poniżej 15 pkt., 3,0 (dostateczny) 15–16 pkt., 3,5 (dość dobry) 17–18 pkt., 4,0 (dobry) 19–20 pkt., 4,5 (ponad dobry) 21–22 pkt., 5,0 (bardzo dobry) 23–24 pkt.

Studentowi przysługują dwa terminy zdawania zaliczenia, z czego drugi termin jest terminem poprawkowym. W przypadku usprawiedliwionej nieobecności na zaliczeniu, studentowi przysługuje dodatkowy termin. O przyczynie nieprzystąpienia do zaliczenia student powiadamia koordynatora przedmiotu najpóźniej w ciągu trzech dni roboczych po terminie zaliczenia. Zaświadczenie lekarskie usprawiedliwiające nieobecność student dostarcza do koordynatora przedmiotu w terminie 7 dni roboczych od dnia wystawienia zaświadczenia, ale nie później niż w ciągu trzech dni roboczych po terminie zaliczenia. Dodatkowy termin zaliczenia ustala koordynator przedmiotu w porozumieniu z Kierownikiem Jednostki. Zaliczenie traktuje się jako zaliczenie uzyskane w pierwszym terminie.

W przypadku nieuzyskania zaliczenia z przedmiotu w pierwszym i drugim terminie student może złożyć wniosek, w ciągu 7 dni od daty zaliczenia, do Dziekana o zgodę na przystąpienie do zaliczenia komisyjnego.

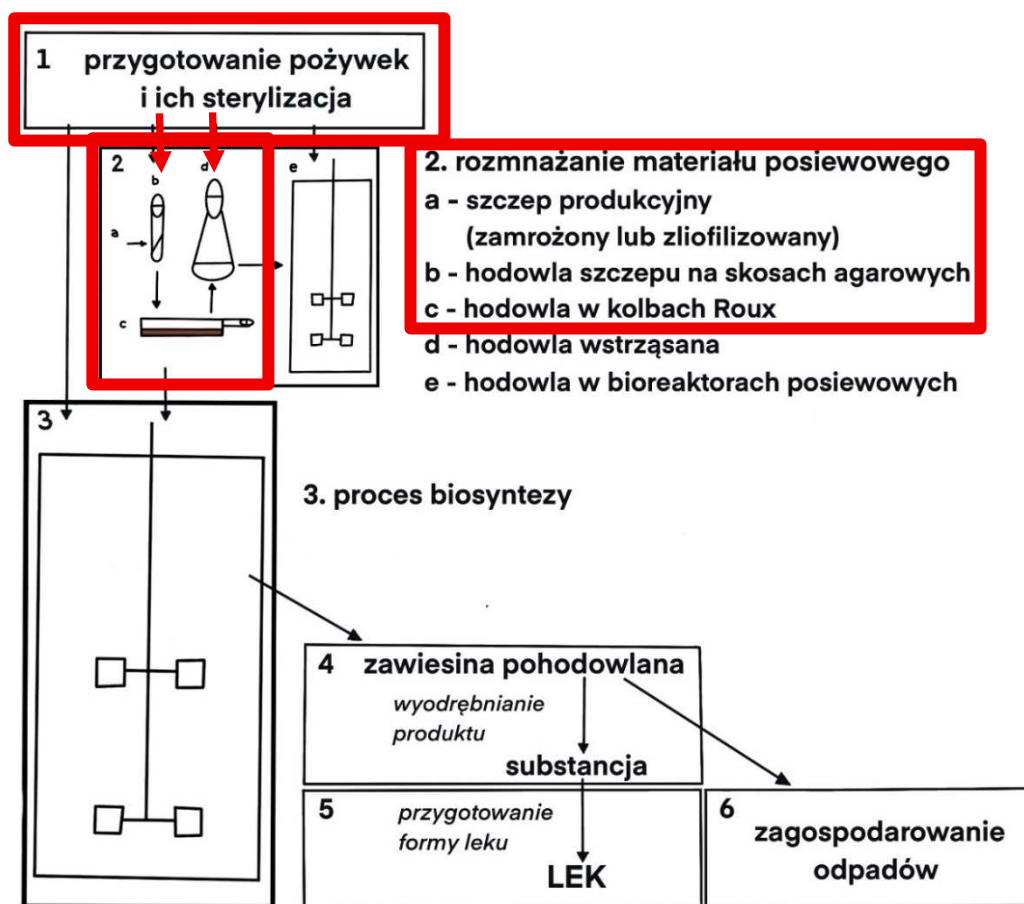
3. Charakterystyka ćwiczeń

Ćwiczenia z biotechnologii farmaceutycznej prowadzone są w grupach studenckich, których liczebność jest ustalona w zarządzeniu Rektora WUM, dotyczącym liczebności grup studenckich uczestniczących w zajęciach dydaktycznych. Grupy studenckie podzielone są na dwie lub trzy podgrupy. Po wykonaniu czterech ćwiczeń każda podgrupa składa asystentowi sprawozdanie, w którym zawarte są informacje o uzyskanych wynikach oraz wnioski. Istotne są informacje o składzie stosowanych podłoży hodowlanych (są różne dla różnych grup), o parametrach prowadzonych procesów oraz o uzyskanych wynikach dla hodowli wstrząsanych i w bioreaktorze (wzrost szczepu, wydajność biosyntezy produktu). W sprawozdaniu musi być przeprowadzona analiza kinetyki rozwoju szczepu w bioreaktorze, podane wyniki eksperymentu, dotyczącego optymalizacji składu podłoża oraz analiza wpływu podnoszenia skali procesu na wydajność. Szczególnie istotne są wnioski z uzyskanych wyników, również w przypadkach, kiedy wyniki eksperymentów nie są zgodne z oczekiwaniami. Przy opisach poszczególnych ćwiczeń podane są wzory obliczeń i sugestie na temat metody przedstawienia wyników.

4. Opis ćwiczenia 1 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów

Jak wspomniano we wstępie do skryptu, w czasie ćwiczeń z przedmiotu *Biotechnologia farmaceutyczna* studenci przeprowadzają w praktyce uproszczony przemysłowy proces biotechnologiczny biosyntezy immunosupresanta takrolimus, zgodnie z podanym w rozdziale II schematem blokowym (Ryc. 2. str. 11).

Ćwiczenie 1 obejmuje czynności zawarte w 1 i 2 bloku schematu blokowego przemysłowego procesu biotechnologicznego (na rysunku poniżej zaznaczone kolorem czerwonym).



Ryc. 20. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 1 (kolor czerwony)

W trakcie ćwiczenia zapoczątkowany jest również eksperyment dotyczący optymalizacji składu podłoża hodowlanego przez poszukiwanie nowych prekursorów biosyntezy lub promotorów wzrostu szczepu.

Cel ćwiczenia: ożywienie zakonserwowanego szczepu *Streptomyces tsukubaensis* przez posiew na przygotowane podłoża stałe, przygotowanie podłoży płynnych do powiększenia skali hodowli na następnych ćwiczeniach, przygotowanie podłoża do hodowli inokulum *S. tsukubaensis* wykorzystywanego do zaszczepienia hodowli wgłębnej w fermentorze (dalszy etap powiększania

skali hodowli), konserwacja testowanego szczepu dwiema metodami: zawieszenie w 20% roztworze glicerolu i zamrożenie w temperaturze -18°C oraz posiew na skosy agarowe i ich inkubacja, a następnie przechowanie w 4°C .

Czynności wykonywane przez podgrupę ćwiczeniową:

- przygotowanie 100 ml agaru słodowego w kolbie stożkowej (wg podanego poniżej przepisu) i sterylizacja w szybkowarze,
- przygotowanie 3 probówek zabezpieczonych korkami z waty i folią aluminiową z przeznaczeniem do wykonania skosów agarowych,
- wylanie agaru słodowego w łoży z nawiewem laminarnym na wcześniej przygotowane sterylne 3 płytki Petriego,
- przygotowanie 3 skosów agarowych przez wlanie sterylnego agaru do wysterylizowanych probówek zabezpieczonych korkami z waty i folią,
- przygotowanie 3 kolb stożkowych podłoża płynnego o pojemności 500 ml zawierających po 200 ml podłoża płynnego, wg składu pożywki podanej przez asystenta (podłoże 1, 2 lub 3), które posłuży do przeprowadzenia eksperymentu dotyczącego optymalizacji składu podłoża; umieszczenie odpowiednich naważek CaCO_3 w każdej kolbie, ustalenie pH roztworu powstałego ze zmieszania pozostałych składników (łącznie dla 3 kolb) i rozlanie do poszczególnych kolb,
- przygotowanie jednej kolby o pojemności 500 ml zawierające 200 ml podłoża płynnego (inokulum) przeznaczonego do zaszczepienia fermentora (skład podany poniżej),
- przesianie szczepu na płytki i skosy agarowe i umieszczenie ich w cieplarni w temperaturze 37°C na 7 dni,
- przygotowanie trzech fiolek do konserwacji szczepu w glicerynie oraz sterylnego 80% roztworu gliceryny,
- konserwacja szczepu w 20% roztworze gliceryny w warunkach jałowych w łoży laminarnej, w sterylnych fiolkach, z wykorzystaniem 80% roztworu

sterylnej gliceryny i zawiesiny komórek szczepu oraz umieszczenie wykonanych próbek w temperaturze -18°C,

- opisanie płytek, probówek i kolb nazwą szczepu, datą posiewu i kodem składającym się z: numeru grupy (wg planu zajęć, czyli np. 1, 2 itd.), litery przypisanej podgrupie (A, B, C), numeru pożywki (1, 2, 3); np. *S. tsukubaensis*, 12 III 2025, 1A1. Przygotowanym kolbom należy przypisać dodatkowo **numery próbek** (1, 2, 3), a kolbie z pożywką do zaszczepienia fermentora wyrażenie „**inokulum**”.

Czynności wykonywane przez grupę ćwiczeniową:

- sterylizacja w autoklawie kolb stożkowych z podłożami płynnymi i inokulum, probówek zabezpieczonych korkami z waty i folią oraz tubusów z pipetami i płytkami Petriego przeznaczonymi dla następnej grupy (hala maszyn).

Skład podłoży hodowlanych:

Agar słodowy

Ekstrakt słodowy 0,5%

Ekstrakt drożdżowy 0,4%

Glukoza 0,4%

Agar 2%

pH = 7,3

Podłoże do hodowli inokulum

Glukoza 2%

Hydrolizat kazeiny 3%

MgSO₄ • 7H₂O 0,05%

KH₂PO₄ 0,2%

Na₂HPO₄ • 12H₂O 0,4%

CaCO₃ 0,3%

pH = 7,3

Pożywki płynne 1-3

Uwaga: testowany suplement podłoża jest różny dla różnych grup, informację o rodzaju związku chemicznego i jego stężeniu w podłożu podaje asystent prowadzący seminarium poprzedzające ćwiczenie. Podłoże nr 1 jest podłożem referencyjnym (porównawczym, niesuplementowanym).

Pożywka płynna nr 1

Glukoza	2%
Ekstrakt drożdżowy	3%
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,05%
KH ₂ PO ₄	0,2%
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	0,4%
CaCO ₃	0,3%
pH = 7,3	

Pożywki płynne nr 2 i 3

Glukoza	2%
Ekstrakt drożdżowy	3%
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,05%
KH ₂ PO ₄	0,2%
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	0,4%
CaCO ₃	0,3%
pH = 7,3	

Testowana substancja w podanym przez asystenta stężeniu, różnym dla podłoży płynnych 2 i 3;

Przygotowanie sprawozdania z przebiegu pierwszego ćwiczenia
(wykonuje każda podgrupa):

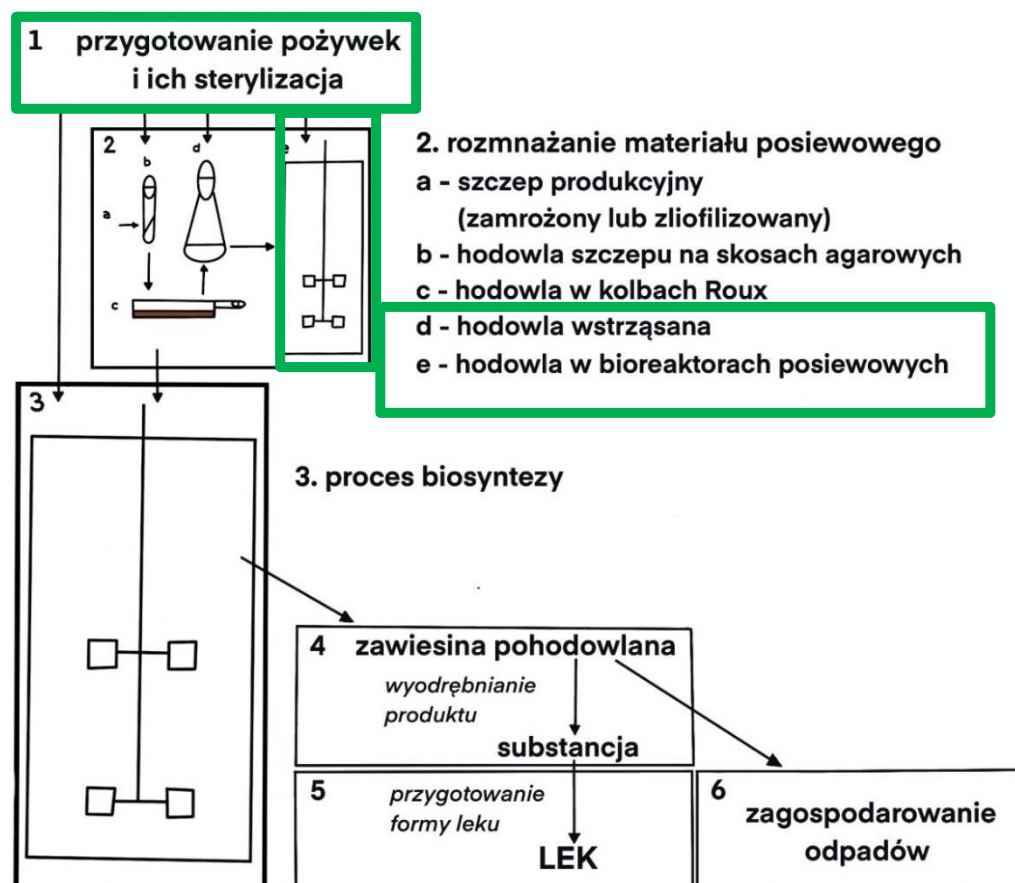
Numer grupy studenckiej i litera przypisana podgrupie ćwiczeniowej	
---	--

Imiona i nazwiska studentów przypisanych do podgrupy	1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.
---	--

Nazwa szczepu	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> FERM BP-927
Numer i skład pożywki płynnej	
Skład podłoża do hodowli inokulum	

5. Opis ćwiczenia 2 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów

Ćwiczenie 2 obejmuje dalsze czynności zawarte w 1 i 2 bloku schematu blokowego przemysłowego procesu biotechnologicznego (na rysunku poniżej zaznaczone kolorem zielonym).



Ryc. 21. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 2 (kolor zielony)

W trakcie ćwiczenia kontynuowany jest również eksperyment dotyczący optymalizacji składu podłoża hodowlanego przez poszukiwanie nowych prekursorów biosyntezy lub promotorów wzrostu szczepu.

Cel ćwiczenia: optymalizacja składu podłoża hodowlanego, zapoczątkowanie procesu podnoszenia skali hodowli *Streptomyces tsukubaensis* – wyprowadzenie czystych hodowli poprzez przesiew z płytek z podłożem stałym na przygotowane

w poprzednim ćwiczeniu płynne podłoża testowe. Przygotowanie bioreaktora, podłoża i osprzętu do hodowli wglębnej z kontrolą parametrów biosyntezy.

Czynności wykonywane przez podgrupę ćwiczeniową:

- kontrola czystości i wzrostu szczepu na podłożach agarowych (posiew wykonany na poprzednim ćwiczeniu),
- przesiew szczepu na podłoża płynne, przygotowane w poprzednim tygodniu: podłoża testowe oraz podłoże do hodowli inokulum. Umieszczenie zaszczerpiionych płynnych podłoży w wytrząsarce laboratoryjnej.

Czynności wykonywane przez grupę ćwiczeniową:

- przygotowanie fermentora i osprzętu,
- przygotowanie pożywki płynnej do fermentora (skład pożywki zostanie podany przez asystenta),
- sterylizacja fermentora z podłożem w autoklawie.

Opis hodowli wglębnej:

1. Badany gatunek mikroorganizmu: *Streptomyces tsukubaensis* FERM BP-927.
2. Typ hodowli: hodowla okresowa wglębna w pożywce płynnej.
3. Typ fermentora: fermentor z mieszaniem mechanicznym, zaopatrzony w mieszadło mechaniczne, belkotkę i grzałkę lub fermentor typu air-lift z mieszadłem pneumatycznym.
4. Skład i ilość pożywki płynnej.

W hodowlach prowadzonych w bioreaktorach, podobnie jak w hodowlach wstrząsanych, testowany suplement podłoża jest inny dla różnych grup. Informację o rodzaju związku chemicznego i jego stężeniu w podłożu podaje asystent prowadzący seminarium poprzedzające ćwiczenia. Podłoże 1 jest podłożem referencyjnym (porównawczym, niesuplementowanym). Ze względu na różne pojemności bioreaktorów wykorzystywanych w czasie trwania ćwiczeń, objętości pożywek zostaną również podane w trakcie seminarium.

W czasie sterylizacji podłoża, zawierającego glukozę mogą się tworzyć związki Maillarda, dlatego glukoza odważona w odpowiedniej ilości powinna być rozpuszczona i dopełniona do objętości 1 litra wodą destylowaną i sterylizowana w osobnej kolbie. Resztę składników rozpuszczonych w pozostałej objętości wody umieszcza się bezpośrednio w fermentorze i poddaje sterylizacji w autoklawie.

Podłoże nr 1

Glukoza	2%
Ekstrakt drożdżowy	3%
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,05%
KH ₂ PO ₄	0,2%
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	0,4%
CaCO ₃	0,3%
pH = 7,3	

Podłoża nr 2 i 3

Glukoza	2%
Ekstrakt drożdżowy	3%
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,05%
KH ₂ PO ₄	0,2%
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	0,4%
CaCO ₃	0,3%
pH = 7,3	

Testowana substancja w podanym przez asystenta stężeniu, różnym dla podłoży płynnych 2 i 3

5. Ilość inokulum *S. tsukubaensis* użyte do zaszczepienia podłoża w bioreaktorze: 10% (v/v)
6. Warunki hodowli: temperatura 30°C, obroty mieszadła ok. 110 obr/min, napowietrzanie ok. 1 L/min/1 L podłoża.

Przygotowanie pożywki i aparatury:

- * Odważyć na wadze z dokładnością do 0,1 g składniki podłoża w ilości właściwej do przygotowania pożywki (objętość pożywki zależy od typu fermentora i zostanie podana przez asystenta). W oddzielnej kolbie przygotować 1 l roztworu glukozy o stężeniu odpowiadającym pojemności fermentora. Odważyć odpowiednią ilość CaCO_3 i umieścić we flizelinowym woreczku.
- * Odważone składniki dopełnić wodą i umieścić w przygotowanym fermentorze (umytym i zabezpieczonym zaciskami na rurkach doprowadzających i odprowadzających powietrze oraz służących do pobierania próbek). Saszetkę flizelinową z CaCO_3 zamocować w fermentorze. Do pożywki dodać 2 krople odpieniacza (Breox). Fermentor zamknąć dokładnie i zabezpieczyć wszystkie doprowadzenia i odprowadzenia korkami z waty i folią. Zawór na odpowietrzeniu zostawić otwarty.
- * Przygotować do sterylizacji lejek, zabezpieczyć (owinąć) go folią aluminiową.
- * Fermentor z pożywką oraz kolbę z roztworem glukozy sterylizować w autoklawie przez 20 minut w temperaturze 121°C.

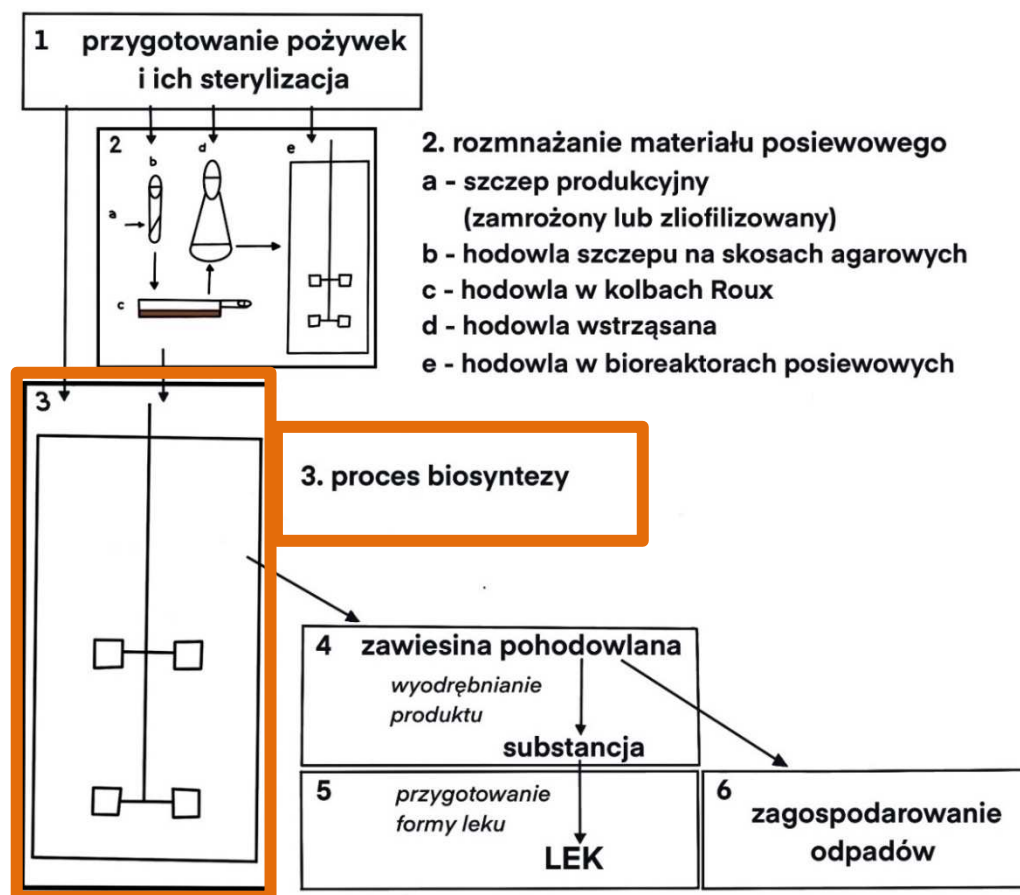
Przygotowanie sprawozdania z przebiegu drugiego ćwiczenia

(wykonuje każda podgrupa):

Ocena kontroli czystości i wzrostu szczepu na podłożach agarowych
Opis:

6. Opis ćwiczenia 3 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów

Ćwiczenie 3 obejmuje czynności zawarte w 3 bloku schematu blokowego przemysłowego procesu biotechnologicznego (na rysunku poniżej zaznaczone kolorem pomarańczowym).



Ryc. 22. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 3 (kolor pomarańczowy)

W trakcie ćwiczenia zakończony jest również eksperyment dotyczący optymalizacji składu podłoża hodowlanego przez poszukiwanie nowych prekursorów biosyntezy lub promotorów wzrostu szczepu.

Cel ćwiczenia: zbadanie wpływu składu podłoża hodowlanego (obecności i stężenia użytego suplementu podłoża) na wzrost szczepu *S. tsukubaensis* w hodowlach wstrząsanych, wyrażany w gramach suchej masy komórek

uzyskanych z 1 litra brzeczki pohodowlanej, izolacja takrolimusu, wyliczenie wydajność biosyntezy takrolimusu wyrażonej w μg antybiotyku/l brzeczki, ocena przeprowadzonej optymalizacji procesu biotechnologicznego poprzez określenie wpływu użytego suplementu podłoża: promotor wzrostu, prekursor biosyntezy, obydwie funkcje, żadna z nich, na podstawie porównania wyników uzyskanych biomas i biosyntezy makrolidu takrolimusu, powiększenie skali biosyntezy przez przesiew szczepu do bioreaktora.

Czynności wykonywane przez podgrupę ćwiczeniową:

- oznaczenie wydajności wzrostu szczepu dla każdej z trzech kolb z hodowlami testowymi,
- oznaczenie wydajności biosyntezy takrolimusu (metoda oznaczenia idiolitu – RP HPLC) dla każdej z trzech kolb z hodowlami testowymi, po wstępnej izolacji z brzeczki pohodowlanej.

Uwaga: eksperymenty prowadzone są oddzielnie dla wszystkich trzech kultur (kolb)!

Zawartości każdej z trzech kolb z hodowlami zdjętymi z wytrząsarki laboratoryjnej dokładnie wymieszać.

Odmierzyć cylindrem do kolb Erlenmayera o pojemności 100 ml próbki o objętości równej 40 ml, w których będzie wyznaczana wydajność biosyntezy takrolimusu. Następnie dokładnie oznaczyć objętości pozostałych próbek, w których będzie wyznaczany wzrost szczepu.

Metodyka oznaczeń:

Wyznaczanie wydajności wzrostu szczepu

Odmierzone próbki brzeczki należy poddać odwirowaniu, a następnie, po zdekantowaniu supernatantu przesączyć przez podwójny sączek bibułowy na lejku Büchnera. Oznaczyć masy sączone dla każdej z trzech próbek na wadze laboratoryjnej oraz procenty suchych mas na wagosuszarce. Wyliczyć wydajności wzrostu hodowli wyrażone w g s.m./L. Wyniki zamieścić w sprawozdaniu.

Przykład obliczenia wydajności wzrostu szczepu:

140 ml brzeczki poddano wirowaniu a następnie sączeniu, uzyskując 0,3 g masy sączonej (mokrej masy komórek promieniowca). Próbkę masy sączonej zawierała 15% suchej masy (odczyt z wagosuszarki).

Ze 140 ml brzeczki uzyskano więc $0,3 \text{ g} \times 0,15 = 0,045 \text{ g}$ suchej masy

Z 1 litra uzyskano by: $1000 \text{ ml} \times 0,045 \text{ g} / 140 \text{ ml} = 0,321 \text{ g/l}$

Izolacja makrolidu takrolimus i wyznaczanie wydajności jego biosyntezy

Kolbki z pobranymi próbkami hodowli testowych o objętości równej 40 ml umieścić na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej. Następnie do kolbek dodać po 40 ml acetonu i umieścić je na mieszadle magnetycznym na 30 minut. Po ekstrakcji zawartości kolb przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem przez warstwę ziemi okrzemkowej (o grubości około 1 cm) umieszczonej na filtrze Schotta, nie dopuszczając do jej przesuszenia. Warstwę ziemi okrzemkowej na lejku filtracyjnym przemyć następnie 40 ml acetonu. Połączone przesące po ekstrakcji takrolimusu (80 ml) i roztwór acetonowy z przemycia ziemi okrzemkowej (40 ml) zagęścić na wyparce do sucha. Suche pozostałości rozpuścić w 20 ml metanolu, mieszając zawartości kolb na mieszadle magnetycznym. Po 10 minutach mieszania zawartości kolb przesączyć przez sączonek karbowany i w otrzymanych roztworach oznaczyć stężenie makrolidu takrolimus metodą RP HPLC.

Oznaczenie wykonuje się metodą standardu zewnętrznego w warunkach:

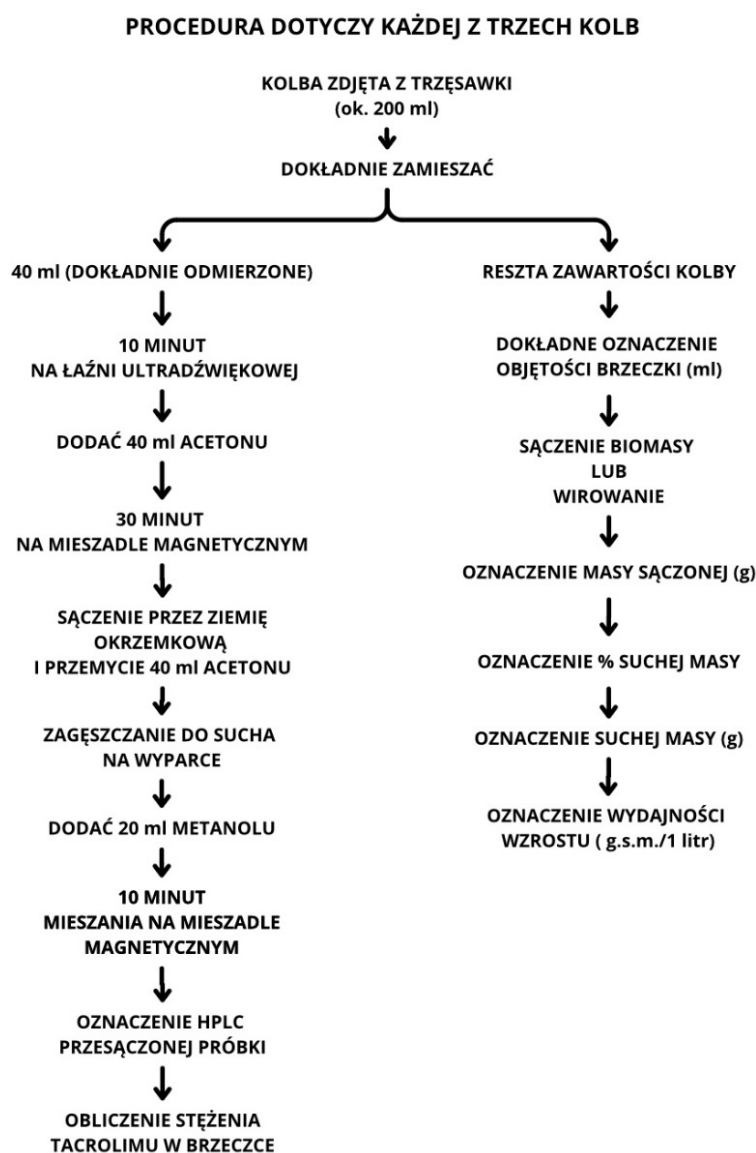
- kolumna ODS, detekcja UV przy długości fali 214 nm, przepływ 1 ml/min, faza ruchoma acetonitryl/woda 75/25, objętość iniekcji 20 µl.

Wykorzystując pole powierzchni pod krzywą w chromatogramie i równanie regresji opisujące krzywą kalibracji obliczyć zawartość takrolimusu w każdej próbce. Uzyskane wyniki przeliczyć na stężenie produktu w brzeczce pohodowlanej. Wyniki zamieścić w sprawozdaniu.

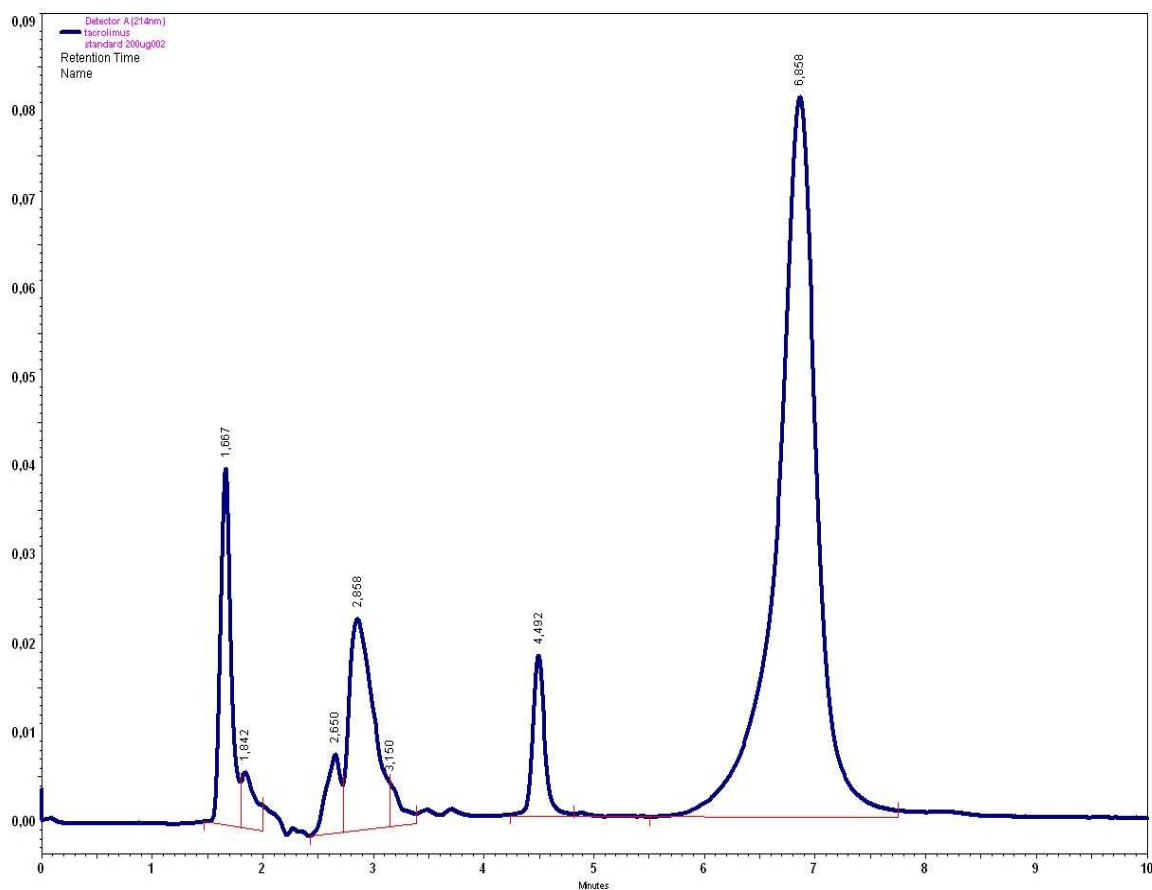
Uwaga! Powyższą procedurę zastosować dla pozostałych dwóch próbek

Jeżeli oznaczenie makrolidu metodą HPLC po zakończeniu izolacji takrolimusu z brzezki nie jest możliwe, kolbkę z uzyskanym roztworem zabezpieczyć parafilmem i pozostawić do momentu możliwości przeprowadzenia oznaczenia w temperaturze 4°C.

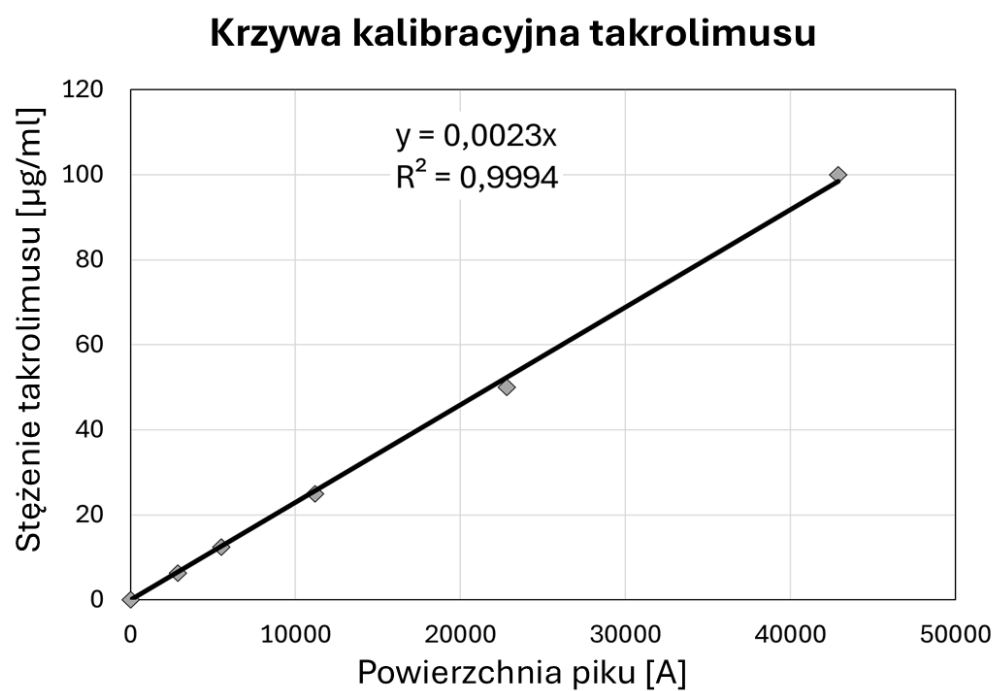
Poniżej przedstawiono tok postępowania z kulturami wstrząsanymi *S. tsukubaensis* (Ryc. 23) podczas izolacji makrolidu takrolimusu i wyznaczania wydajności jego biosyntezy oraz wydajności wzrostu szczepu w hodowlach wstrząsanych. Zamieszczono także przykładowe widmo wzorca takrolimusu (Ryc. 24) i krzywą kalibracyjną do jego oznaczenia (Ryc. 25).



Ryc. 23. Schemat postępowania z testowanymi próbkami hodowli wstrząsanych



Ryc. 24. Przykładowe widmo wzorca takrolimusu (akronim FK-506)



Ryc. 25. Krzywa kalibracyjna do oznaczania takrolimusu

Przykład obliczenia wydajności biosyntezy makrolidu takrolimus:

- powierzchnia pików odczytana z chromatogramu: $A = x$
- obliczenie stężenia takrolimusu (y) [$\mu\text{g/ml}$] w próbce badanej (w ekstrakcie metanolem) z równania: $y = 0,0023x$ ($R^2 = 0,9994$)
- obliczenie zawartości takrolimusu (m_1) w próbce o objętości 20 ml (w ekstrakcie metanolem): $m_1 = y \times 20 [\mu\text{g}]$
- obliczenie wydajności biosyntezy takrolimusu (m_2) [$\mu\text{g/l}$] w brzoście hodowlanej:
 $m_1 [\mu\text{g}] \rightarrow 40 \text{ ml}$
 $m_2 [\mu\text{g}] \rightarrow 1000 \text{ ml}$
 $m_2 = ?$
 $m_2 [\mu\text{g/l}] = m_1 [\mu\text{g}] \times 1000 \text{ ml} / 40 \text{ ml}$

Czynności wykonywane przez grupę ćwiczeniową:

- zaszczepienie hodowli w fermentorze.

Metodyka eksperymentu:

W warunkach sterylnych (spryskując roztworem etanolu otwór fermentora, opalając palnikiem lejek i szyjki kolb) wprowadzić do fermentora zawartości kolb z inokulum (odpowiednią ilość, zależną od pojemności fermentora) oraz sterylny roztwór glukozy. Uruchomić napowietrzanie, mieszanie i ogrzewanie fermentora. Odpowietrzenie fermentora umieścić w płuczce zawierającej roztwór wodny alkoholu etylowego.

Natychmiast po uruchomieniu fermentora pobrać próbkę „0”.

Pobieranie próbek i ich badanie.

Próbki o objętościach ok. 100 ml będą pobierane w warunkach sterylnych co 24 godziny (od pobrania próbki „0” z fermentora) do butelek laboratoryjnych, które po opisaniu datą pobrania i zabezpieczeniu parafilmem będą przechowywane w temperaturze -18°C do oznaczenia na następnych ćwiczeniach.

Przygotowanie sprawozdania z przebiegu trzeciego ćwiczenia

(wykonuje każda podgrupa):

Wyznaczanie wydajności wzrostu szczepu:

Numer próbki	1	2	3
Objętość próbki [ml]			
Masa sączona [g]			
% Zawartości suchej masy			
Sucha masa [g]			
Wydajność wzrostu hodowli [g s.m./L]			

Wyznaczanie wydajności biosyntezy makrolidu takrolimus:

Numer próbki	1	2	3
Powierzchnia piku odczytana z widma chromatograficznego			
Stężenie takrolimusu w próbce z równania krzywej kalibracyjnej $Y = \dots\dots\dots [\mu\text{g/ml}]$			
Zawartość takrolimusu w 20 ml ekstraktu metanolowego ($m_x = c_x \times 20 [\mu\text{g}]$)			
Stężenie takrolimusu w brzeczce hodowlanej [$\mu\text{g/L}$]			

Ocena optymalizacji hodowli wstrząsanej

Określenie wpływu obecności suplementu i jego stężenia na pełnienie odpowiednich funkcji w procesie biosyntezy (promotor wzrostu, prekursor biosyntezy, obydwie funkcje, żadna z nich) na podstawie porównania wyników

wzrostu wydajności hodowli i wydajności biosyntezy uzyskanych przez poszczególne podgrupy.

Numer/y grupy ćwiczeniowej (X) i oznaczenie podgrupy	XA	XB	XC
Stężenie użytego suplementu [%]			
Wydajność wzrostu hodowli [g s.m./L] (wartość średnia dla n = 3)			
Wydajność biosyntezy makrolidu takrolimus [$\mu\text{g/L}$] (wartość średnia dla n = 3)			

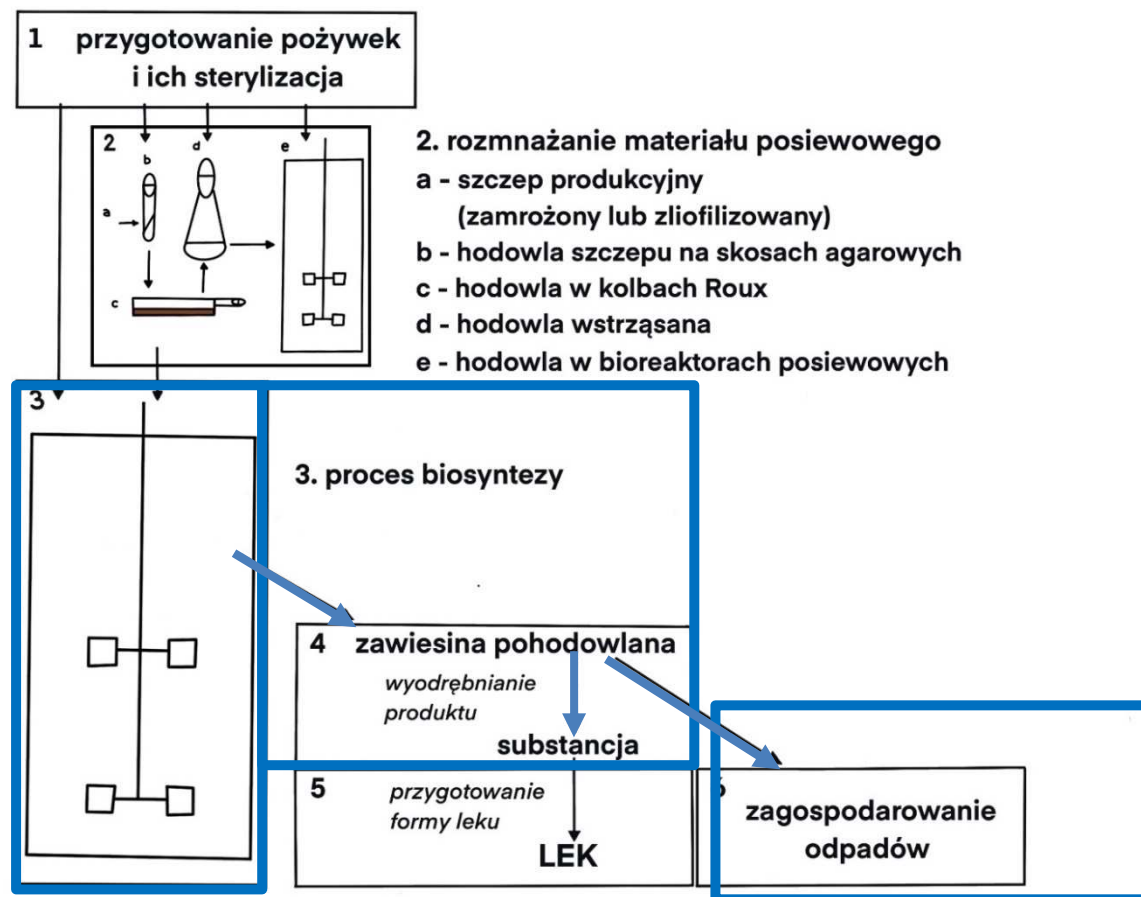
Wniosek:

Opis prowadzonej hodowli wglębnej:

Badany gatunek mikroorganizmu:	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> FERM BP-927
Typ hodowli:	hodowla okresowa wglębna w pożywce płynnej
Typ fermentora:	
Data posiewu:	
Numer i skład pożywki:	
Objętość [ml] dodanego inokulum <i>S. tsukubaensis</i> (teoretycznie 5–10% v/v)	
Warunki hodowli:	temperatura 30°C, obroty mieszadła ok. 110 obr/min, napowietrzanie ok. 1 L/min/1 L podłoża

7. Opis ćwiczenia 4 i wzór sprawozdania z przeprowadzonych eksperymentów

Ćwiczenie 4 obejmuje czynności zawarte w 3, 4 i 6 bloku schematu blokowego przemysłowego procesu biotechnologicznego (na rysunku poniżej zaznaczone kolorem niebieskim).



Ryc. 26. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 4 (kolor pomarańczowy)

Cel ćwiczenia: badanie kinetyki procesu wzrostu szczepu i biosyntezy makrolidu takrolimus w hodowli wgłębnej szczepu *S. tsukubaensis* na podłożu testowym.

Obliczenie właściwej (specyficznej) szybkości wzrostu szczepu, optymalizacja procesu biotechnologicznego poprzez określenie wpływu zmiany skali prowadzenia procesu.

Czynności wykonywane przez podgrupę ćwiczeniową:

- oznaczenie wydajności wzrostu hodowli dla 2 (lub 3) z 6 próbek pobranych w czasie pracy fermentora (**uwaga: dokładnie opisywać próbki, identyfikując czas ich pobrania z fermentora**)
- oznaczenie metodą RP HPLC zawartości takrolimusu w tych samych próbkach, dla których wyznaczana była wydajność wzrostu szczepu
- oznaczenie aktualnego w chwili pobrania próbki stężenia glukozy (źródło węgla) w tych samych próbkach, dla których wyznaczana była wydajność wzrostu szczepu.

Uwaga: eksperymenty prowadzone są oddzielnie dla każdej próbki pobranej podczas pracy fermentora!

Zawartości każdej z kolb dokładnie wymieszać (**uwaga na opis kolbek!**). Odmierzyć cylindrem do kolb Erlenmayera o pojemności 100 ml, próbki o objętości równej 40 ml, przeznaczone do izolacji makrolidu takrolimusu. Następnie dokładnie oznaczyć objętości pozostałych próbek, wykorzystywanych do wyznaczenia wydajności przyrostu biomasy.

Metodyka oznaczeń:

Wyznaczanie wydajności przyrostu biomasy

Odmierzone próbki pobrane z bioreaktora należy poddać odwirowaniu, a następnie, po zdekantowaniu supernatantu przesączyć przez podwójny sączone bibuły na lejku Büchnera. Oznaczyć masy sączone dla każdej z trzech próbek na wadze laboratoryjnej oraz procenty suchych mas na wagosuszarce. Wyliczyć wydajności wzrostu hodowli wyrażone w g s.m./L. Przykład wykonania obliczeń znajduje się w opisie ćwiczenia trzeciego. Wyniki zamieścić w sprawozdaniu.

Uwaga! Procedurę powtórzyć dla każdej z badanych próbek.

Izolacja makrolidu takrolimusu

Kolbki Erlenmajera z próbkami pobranymi z fermentora, o objętości równej 40 ml umieścić na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej. Następnie dodać po 40 ml

acetonu i umieścić je na mieszadle magnetycznym na 30 minut. Zawartości kolbek przesączyć pod zmniejszonym ciśnieniem przez warstwę ziemi okrzemkowej (o grubości około 1 cm) umieszczonej na filtrze Schotta, nie dopuszczając do jej przesuszenia. Warstwę ziemi okrzemkowej na filtrze przemyć następnie 40 ml acetonu. Przesącz po ekstrakcji i roztwór acetonowy z przemywania ziemi okrzemkowej zagęścić na wyparce do sucha.

Suche pozostałości po odparowaniu rozpuszczalnika rozpuścić w 20 ml metanolu, mieszając zawartości kolb na mieszadle magnetycznym. Po 10 minutach mieszania zawartości kolb przesączyć przez sącze karbowany i w otrzymanych roztworach oznaczyć stężenie makrolidu takrolimus metodą HPLC.

Uwaga! Procedurę powtórzyć dla każdej badanej próbki.

Oznaczenie wykonuje się metodą standardu zewnętrznego w warunkach:

- kolumna ODS, detekcja UV przy długości fali 214 nm, przepływ 1 ml/min, faza ruchoma acetonitryl/woda 75/25, objętość iniekcji 20 µl.

Wykorzystując pole powierzchni pod krzywą w chromatogramie i równanie regresji opisujące krzywą kalibracji obliczyć zawartość takrolimusu w każdej próbce oraz stężenie makrolidu w 20 ml ekstraktu metanolowego i przeliczyć na stężenie w 1 l brzożki pohodowlanej Przykład wykonania obliczeń znajduje się w opisie ćwiczenia trzeciego. Wyniki zamieścić w sprawozdaniu.

Schemat postępowania z próbkami:

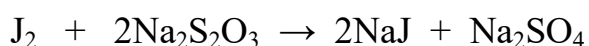
Tok postępowania z próbkami podczas izolacji makrolidu takrolimus i wyznaczania wydajności jego biosyntezy oraz wydajności wzrostu hodowli próbek pobranych z bioreaktora jest identyczny z postępowaniem podczas oznaczeń dla kultur z hodowli wstrząsanych. Schemat postępowania z próbkami znajduje się w opisie ćwiczenia trzeciego.

Podczas czwartego ćwiczenia należy także oznaczyć w próbkach pobranych z fermentora zawartość cukrów metodą Schoorla – opis przedstawiony jest poniżej.

Oznaczanie zawartości cukrów (źródło węgla) metodą Schoorla, w próbkach pobranych z fermentora

Metoda Schoorla umożliwia oznaczenie stężenia źródła węgla w podłożu hodowlanym dla mieszaniny obecnych w nim cukrów – mono-, di-, oligo- i polisacharydów. Metoda obejmuje wstępną hydrolizę w środowisku kwaśnym i w podwyższonej temperaturze, cukrów złożonych do prostych, a następnie, po zmianie środowiska na zasadowe, wykorzystuje wspólną dla wszystkich monosacharydów (nawet dla ketoz, które ulegają epimeryzacji w tym środowisku) zdolność do redukcji miedzi(II) do miedzi(I). Do próbki podłoża hodowlanego poddanego wstępnej hydrolizie dodaje się ściśle odmierzony nadmiar odczynnika Fehlinga (jony miedzi(II)).

Jony miedzi(II) zostają zredukowane do jonów miedzi(I) w ilości proporcjonalnej do stężenia monosacharydów w próbce, a nadmiar soli miedzi(II) oznacza się (po ponownej zmianie środowiska na kwaśne) na podstawie reakcji z jodkiem potasu. Wydzielający się wolny jod odmiareczkuje się mianowanym roztworem tiosiarczanu sodu wobec skrobi:



Oznaczenie prowadzi się wobec „ślepej próby odczynnikowej” czyli próby odniesienia polegającej na oznaczeniu ilości jodu wydzielonego przez całkowitą ilość soli miedzi(II) dodanej jako odczynnik Fehlinga. Z różnicy ilości zużytego tiosiarczanu sodu w próbie odniesienia i próbie oznaczanej oblicza się zawartość cukrów, w przeliczeniu na glukozę.

Odczynniki:

- roztwór Fehlinga I (69,3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$)
- roztwór Fehlinga II (346 g winianu sodowo-potasowego, 100g NaOH; 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$)
- 25% roztwór H_2SO_4 (250 ml H_2SO_4 stęż.; 750 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$)
- 10% roztwór KJ (100 g KJ; 900 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$)

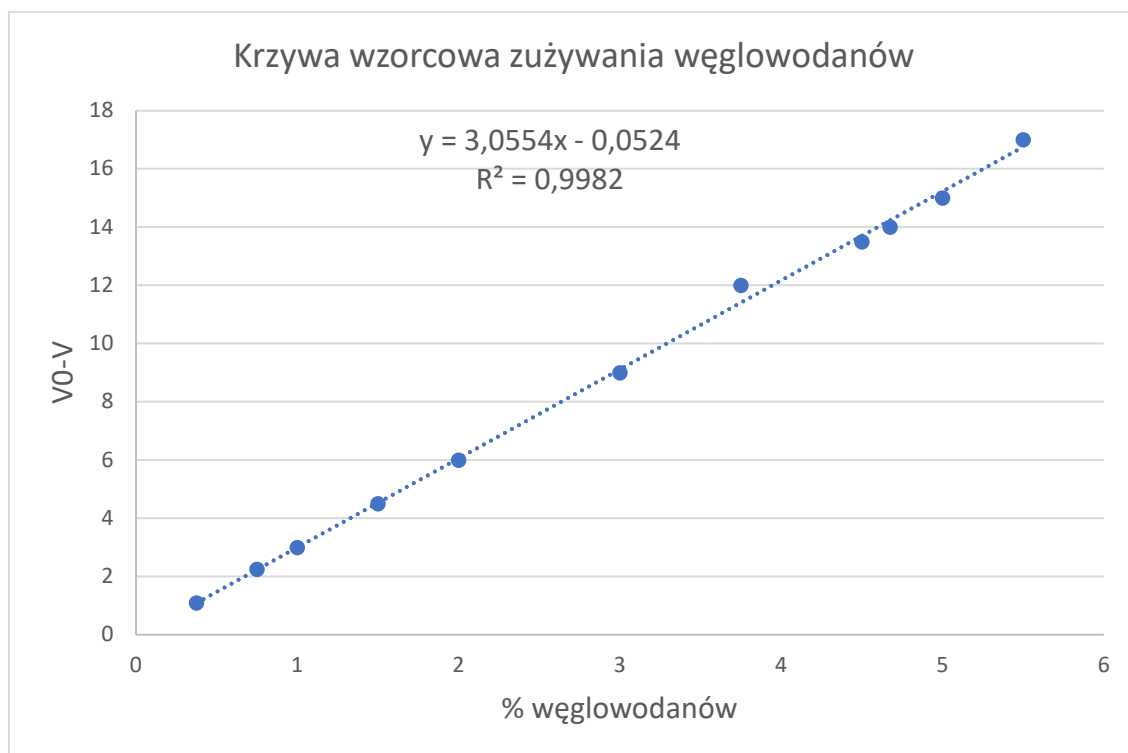
- 0,1 N roztwór $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (1 fiksanal, 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$)
- 1% roztwór skrobi,

Wykonanie oznaczenia

- Do próbki z 10 ml odsączonego podłoża hodowlanego dodać 0,75 ml stężonego HCl w celu przeprowadzenia hydrolizy cukrów złożonych do cukrów prostych. Próbkę należy przykryć lejkiem i wstawić do wrzącej łąźni wodnej na ok. 1–1,5 h.
- 1 ml hydrolizatu odmierzyć do kolby stożkowej i dodać dokładnie **po 10 ml** roztworów **Fehlinga I** i **Fehlinga II** oraz 29 ml H_2O . Ogrzać do wrzenia i utrzymywać w tym stanie przez 2 min.
- Po oziębieniu dodać 10 ml 25% roztworu H_2SO_4 i 30 ml 10% roztworu KJ .

Wydzielony jod odmiareczkować 0,1 N roztworem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ w obecności skrobi, którą należy dodać pod koniec miareczkowania.

- Próbę kontrolną stanowi analogicznie wykonana próba nie zawierająca próby badanej tylko 1 ml H_2O .
- Znając różnicę ilości ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ jaką zużyto w próbie kontrolnej (V_0) i próbie badanej (V) należy wyznaczyć zawartość procentową cukrów w próbkach w przeliczeniu na glukozę (x) z krzywej kalibracyjnej (Ryc. 27) i podanego wzoru (Ryc. 28). Wyniki zamieścić w sprawozdaniu.



Ryc. 27. Krzywa wzorcowa do oznaczania cukrów w przeliczeniu na glukozę

$$x = \frac{(v_0 - v) + 0,0524}{3,0554}$$

Ryc. 28. Wzór do oznaczenia zawartości cukrów w przeliczeniu na glukozę

Czynności wykonywane przez grupę ćwiczeniową:

- likwidacja hodowli w fermentorze połączona z pobraniem ostatniej (6-tej) próbki,
- wyznaczanie wydajności wzrostu szczepu, obliczenie właściwej (specyficznej) szybkości wzrostu szczepu oraz wydajności biosyntezy makrolidu takrolimus i oznaczenie stężenia cukrów w przeliczeniu na glukozę w badanych próbkach. Obliczenie szybkości właściwej (specyficznej) wzrostu szczepu powinno być przeprowadzone na podstawie danych dotyczących wzrostu szczepu dla próbek pierwszej i szóstej, pobranych w czasie prowadzonej hodowli, oznaczonych jako próbki 0 i 5. Jeśli jest to

niemożliwe, należy do obliczeń uwzględnić biomasy, i czasy pobrań próbek, które udało się oznaczyć np. 1 i 4, 2 i 3.

- zestawienie danych uzyskanych przez wszystkie podgrupy w jeden wspólny wykres, obrazujący wzrost szczepu, zużycie źródła węgla z podłoża i biosyntezę idiolitu w funkcji czasu.
- wyciągnięcie wniosków dotyczących kinetyki wzrostu szczepu i biosyntezy takrolimusu, które są elementami optymalizacji procesu biosyntezy.

Przygotowanie sprawozdania z przebiegu czwartego ćwiczenia

(wykonuje każda podgrupa):

Wyznaczanie wydajności wzrostu szczepu:

Numer próbki	0	1	2	3	4	5
Objętość próbki [ml]						
Masa sączona [g]						
% Zawartości suchej masy						
Sucha masa [g]						
Wydajność wzrostu hodowli [g s.m./L]						

Obliczenie właściwej (specyficznej) szybkości wzrostu szczepu:

Dane próbek	N ₀ = t ₀ =	N ₅ = t ₅ =
Obliczenie właściwej (specyficznej) szybkości wzrostu szczepu ze wzoru: $K = \ln (N_5 / N_0 / (t_5 - t_0))$		

Wyznaczanie wydajności biosyntezy makrolidu takrolimus:

Numer próbki pobranej z fermentora	0	1	2	3	4	5
Powierzchnia pików odczytana z widma chromatograficznego						
Stężenie takrolimus w próbce z równania krzywej kalibracyjnej $Y = \dots\dots\dots [\mu\text{g/ml}]$						
Zawartość takrolimus w 20 ml ekstraktu metanolowego ($m_x = c_x \times 20 [\mu\text{g}]$)						
Stężenie takrolimus w brzeczce hodowlanej [$\mu\text{g/L}$]						

Oznaczenie stężenia glukozy dla badanych próbek:

Zużycie 0,1 N roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ do próby kontrolnej						
Numer próbki	0	1	2	3	4	5
Różnica w ilości 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zużytego na zmiareczkowanie próby kontrolnej i badanej						
Stężenie cukrów w przeliczeniu na glukozę, obliczone w oparciu o krzywą kalibracyjną [%]						

Uzyskane wyniki oznaczeń i obliczeń wykonanych przez podgrupy ćwiczeniowe (dotyczące wszystkich próbek pobranych z fermentora) należy wykorzystać do sporządzenia wykresu obrazującego kinetykę rozwoju szczepu i biosyntezy takrolimusu. Na wykresie powinna być zobrazowana zmiana stężenia źródła węgla, stężenia takrolimusu i zmiany biomasy w funkcji czasu.

Wykres:

Przedstawienie wniosków dotyczących kinetyki wzrostu szczepu i biosyntezy takrolimusu.

Wnioski:

Ocena optymalizacji hodowli *Streptomyces tsukubaensis*:

Określenie wpływu zmiany skali prowadzenia procesu na podstawie porównania uzyskanych wydajności wzrostu hodowli i wydajności biosyntezy takrolimusu w hodowlach wstrząsanej i wgłębnej (porównywanie hodowli wstrząsanych prowadzonych z testowanym suplementem podłoża o tym samym stężeniu, który został użyty w hodowli wgłębnej w fermentorze).

Wniosek:

Piśmiennictwo

1. A. Chmiel; *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
2. *Biotechnologia farmaceutyczna* pod redakcją O. Kaysera i R.H. Mullera. PZWL, Warszawa 2003.
3. A. Chmiel, S. Grudziński; *Biotechnologia i chemia antybiotyków*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998.
4. O. Kayser; *Podstawy biotechnologii farmaceutycznej*. Wydawnictwo UJ, Kraków 2006.
5. *Biotechnologia żywności* pod redakcją W. Bednarskiego, A. Repsa. Wydawnictwo WNT, Warszawa 2015.
6. StatSoft. Elektroniczny Podręcznik Statystyki PL, Planowanie doświadczeń (DOE), Kraków 2006, WEB: <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>.

Spis tabel

Tabela 1. Porównanie hodowli okresowej i ciągłej.....	54
Tabela 2. Porównanie metod eksperymentalnych OFAT (One-Factor-At-a-Time) i DoE (Design of Experiments).....	65

Spis rycin

Ryc. 1. Budowa takrolimusu	10
Ryc. 2. Schemat blokowy przemysłowego procesu biotechnologicznego.....	11
Ryc. 3. Schematyczne różnice pomiędzy warunkami prowadzenia procesów okresowych, okresowych z zasilaniem i ciągłych	26
Ryc. 4. Hodowla powierzchniowa szczepu promieniowca <i>Streptomyces tsukubaensis</i> na podłożu stałym (agarowym)	27
Ryc. 5. Hodowle wgłębne mycelium grzybów wyższych w podłożach płynnych w skali a.) 200 ml, hodowla wstrząsana, b.) w skali 4-7 litrów, hodowle w bioreaktorach o różnej pojemności roboczej i systemach mieszania	27
Ryc. 6. Fazy wzrostu drobnoustrojów w hodowlach okresowych	28
Ryc. 7. Różne modele biosyntezy: A. produkt jest tworzony przez komórki rosnące; B. produkt jest tworzony przez komórki nie rosnące; C. produkt jest tworzony przez komórki rosnące i nie rosnące	29
Ryc. 8. Hodowla wstrząsana <i>Streptomyces tsukubaensis</i> (wyrząsarka orbitalna, pracownia biotechnologii farmaceutycznej Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej)	32
Ryc. 9. Bioreaktor firmy BioTec o pojemności całkowitej 8 l (pracownia biotechnologii farmaceutycznej Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej)	33
Ryc. 10. Bioreaktor firmy New Brunswick do prowadzenia procesów okresowych w skali ćwierćtechnicznej, o pojemności całkowitej 70 l (pracownia biotechnologii farmaceutycznej Katedry i Zakładu Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej)	34
Ryc. 11. Różne rozwiązania mieszania zawartości bioreaktora: mieszanie mechaniczne (A i B), mieszanie hydrauliczne (C), mieszanie pneumatyczne (D-G).....	35
Ryc. 12. Schemat podstawowych układów pomiarowo-regulacyjnych w bioreaktorze do tlenowych procesów wgłębnych	36

Ryc. 13. Relacje pomiędzy grupami parametrów procesu biosyntezy (schemat uproszczony). Podkreślona na czerwono przykładowa droga wpływu zmiany składu podłoża hodowlanego na wydajność produktu	44
Ryc. 14. Wykres obrazujący kinetykę procesu biosyntezy penicyliny przez szczep <i>Penicillium chrysogenum</i> . Wykres znormalizowany – wartości stężeń źródła węgla i energii, biomasy i penicyliny podane są w % wartości maksymalnych.....	47
Ryc. 15. Eksperymentalna metoda oznaczenia maksymalnej właściwej szybkości wzrostu $\mu_{\max}$	50
Ryc. 16. Schemat wyodrębniania i oczyszczania bioproduktu z mieszaniny pohodowlanej na przykładzie antybiotyku.....	56
Ryc. 17. Wpływ różnych grup parametrów podlegających optymalizacji na wynik procesu biotechnologicznego	57
Ryc. 18. Typowanie potencjalnych prekursorów biosyntezy takrolimus na podstawie analizy jego struktury	60
Ryc. 19. Wyniki poszukiwania efektywnych prekursorów biosyntezy takrolimus pomiędzy pochodnymi kwasów heterocyklicznych.....	61
Ryc. 20. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 1 (kolor czerwony)	72
Ryc. 21. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 2 (kolor zielony)	77
Ryc. 22. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 3 (kolor pomarańczowy).....	82
Ryc. 23. Schemat postępowania z testowanymi próbkami hodowli wstrząsanych	85
Ryc. 24. Przykładowe widmo wzorca takrolimus (akronim FK-506)	86
Ryc. 25. Krzywa kalibracyjna do oznaczania takrolimus	86
Ryc. 26. Zakres działań dotyczących biosyntezy makrolidu takrolimus prowadzonych w trakcie ćwiczenia 4 (kolor niebieski).....	91
Ryc. 27. Krzywa wzorcowa do oznaczania cukrów w przeliczeniu na glukozę.....	96
Ryc. 28. Wzór do oznaczenia zawartości cukrów w przeliczeniu na glukozę.....	96

