

Milan M. Milivojević, Verica B. Đorđević, Branko M. Bugarski  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Viktor A. Nedović  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

# **BIOPROCESNO INŽENJERSTVO**

AKADEMSKA MISAO  
Beograd, 2013.

Milan M. Milivojević, Verica B. Đorđević, Branko M. Bugarski  
Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu

Viktor A. Nedović  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

## **BIOPROCESNO INŽENJERSTVO**

Recenzenti  
Dr Rada Pjanović  
Dr Zorica Knežević-Jugović  
Dr Miomir Nikšić

Izdavanje ove knjige pomogli su:

SHIMADZU BRANCH Beograd  
Kefo d.o.o. Beograd  
V.I.A. Beograd  
ALFATRADE ENTERPRISE d.o.o. Beograd

Izdaje i štampa  
AKADEMSKA MISAO, Beograd

Tiraž  
150 primeraka

ISBN 978-86-7466-456-8

## **PREDGOVOR**

Knjiga **Bioproceno inženjerstvo** je kao osnovna udžbenička literatura namenjena studentima osnovnih i master studija Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji slušaju predmete Osnovi farmaceutskog inženjerstva, Bioreaktori, Projektovanje procesa u farmaceutskoj industriji i Projektovanje u biotehnologiji, kao i studentima Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu koji slušaju predmete Biohemijsko inženjerstvo i Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo.

Autori se nadaju da će knjigu naći korisnom i studenti drugih odseka na pomenutim fakultetima, kao i studenti fakulteta ostalih naših univerziteta koji slušaju kurseve sa srodnom tematikom.

Beograd, 25.06.2012.

**AUTORI**

## UVOD U KNJIGU

Bez učešća inženjera biotehnologija bi ostala na nivou biologije. Nakon uključivanja bioprocasa u svrhu proizvodnje dobara za čoveka i okolinu, biotehnologija postaje industrijski značajna privredna grana, koja u poslednjih sto godina privlači sve više pažnje. Od kada se prvi put pojavila pisana definicija biotehnologije 1917. godine od strane mađarskog istraživača Karla Ekery-a, proteklo je mnogo vremena dok biotehnologija nije počela da se primenjuje u vidu iskorišćavanja bioloških agensa za proizvodnju biotehnoških proizvoda za poljoprivredu, prehranu, hemiju, medicinu ili okolinu u najširem značenju te reči.

Biotehnologija se u početku delila prema području primene, a kasnije prema vrsti organizma koji primenjuje, da bi danas, u modernom shvatanju, biotehnologiju delili po bojama, od crvene, koja obuhvata sve što se proizvodi uz pomoć animalne i humane biotehnologije, preko zelene koja obuhvata agronomiju i proizvodnju hrane i biomase, plave koja se fokusira na proizvode iz vodenih resursa, do bele koja tradicionalno obuhvata industrijsku i mikrobnu biotehnologiju.

Kako je moguće da je u nepunih 40 godina nakon početka moderne biotehnologije došlo do takvog vitalnog preobrata i podele jedne biotehnologije (koja se temelji na tehnologiji rekombinantne DNK) na brojne grane biotehnologije? Odgovor možemo tražiti u izvoru biotehnologije; biotehnologija je zapravo nastala iz tradicionalnih biotehnoških / fermentacijskih primena u prošlosti koje su prerasle u brojne druge aplikacije koje potiču iz svakodnevnih potreba čovečanstva da se obskrbi hranom, energijom, lekovima i brojnim proizvodima koji služe potrebama ili komforu savremenog potrošača. Prema ovom gledanju, biotehnologija je nauka stara koliko i tradicija pripreme piva, vina i fermentirane hrane, ali i takođe sasvim nova i savremena grana tehnologije na bazi rekombinantne DNK, tehnologije hibridoma i drugih ćelija viših organizama, tehnologije biosenzora i biočipova. Ovako široka primena biotehnologije uopšte ne bi bilo moguća da biotehnologija nije ostvarila dobru platformu na bazi prirodnih - dominantno bioloških, te tehničkih i inženjerskih- tj. dominantno hemijsko procesnih znanja, kako bi se postigla primena organizama, ćelija, njihovih delova i molekularnih analoga u dobijanju proizvoda za dobrobit čovečanstva u kontrolisanim uslovima proizvodnje.

Ova publikacija predstavlja pokušaj da se logičkim redosledom navedu sva ona znanja i veštine koji su nužni kako bi se stvorila tehnička i inženjerska platforma i obezbedila prava okolina za radni (mikro)organizam ili njegov vitalni bioproceni element, npr enzim, a sve u cilju da se sirovina pretvori u produkt, koji bi, opet, potrebnim tehničko-inženjerskim zahvatima bio izolovan i pripremljen za korišćenje od strane potrošača.

Tako su autori u uvodnom delu dali potrebne informacije koje su nužne za shvatanje istorijskog razvoja ovog područja, da bi u drugom delu dovoljno široko objasnili biološke osnove bioprocasa, potrebne za shvatanje velikog broja industrijski važnih biohemijskih procesa koji su vezani za širok spektar različitih jednoćelijskih ili višećelijskih organizama. Pošto su optimalni zahtevi za izvođenje bioprocasa u najvećoj meri određeni biološkim karakteristikama biokatalizatora, a obezbeđivanje tih uslova u

toku industrijskog procesa predstavlja zadatak bioprocenog inženjera, logičan nastavak u poglavlju tri je usmeren na projektovanje bioprocasa. Ovo poglavlje obuhvata sve elemente procesnog toka od polaznih sirovina, kroz odgovarajuće fizičke i/ili (bio)hemijske transformacije do produkta u odgovarajućoj količini i čistoći koja je potrebna za bezbedan proizvod. Projektovanje i dizajniranje, kao i postavljanje tehničkih elemenata (bio)procasa je srž (bio)hemijskog inženjerstva i objedinjuje procesne operacije iz svih oblasti proizvodnje farmaceutskih i dijagnostičkih preparata, prehrambenih suplemenata i tradicionalnih prehrambenih proizvoda, da posebno ne podvlačim postupke u zaštiti životne sredine (obrada otpadnih voda, biološka razgradnja organskog čvrstog otpada, biodeodorizacija) i mogućnosti primene biotehnologije u agrokompleksu. Iz ovoga proizlazi da je neophodno poznavati sve elemente dizajna, odnosno sve korake od razvoja projekta, laboratorijskih istraživanja, razvoja procesa, dizajniranja procesa, projektovanja i izgradnje postrojenja, rada postrojenja do marketinga. Saglasno tome, inženjer mora imati dovoljno znanja da se uključi u bilo koji od ovih koraka i ovaj udžbenik daje potrebne osnove za sve navedene aktivnosti. U operacijama pripreme procesa potrebno je pripremiti supstrate i opremu za biotehnoški proces. Tu će čitalac steći znanja o pripremi bioreaktora i pomoćne opreme, pripremi supstrata i pripremi inokuluma do novoa koji omogućuje da se kvalitetno i bezbedno rukuje opremom i upravlja procesima i tako obezbedi adekvatan bioprocen i time kvalitetan bioproizvod. Nakon pripreme sledi bioprocen, koji može da bude jednostavan ili kompleksan, pa je shodno tome, u poglavlju koji se odnosi na procese biokonverzije detaljno predstavljena problematika od jednostepenih enzimskih reakcija do složenih biohemijskih reakcija koje se dešavaju u mikroorganizmima, uključujući i njihovo razmnožavanje i kinetiku bioprocasa sa elementima stehiometrije bioprocasa, brzinama bioprocasa, kao i termodinamikom bioprocasa. Za dobijanje većine modernih bioproizvoda, nakon zavšetka bioprocasa počinje najskuplji deo proizvodnog ciklusa, tj. proces odvajanja, koji obuhvataju separacione procese. Oni treba da omoguće da se iz bioprocenih ili fermentacionih smeša koje su vrlo složene, izdvoji kvalitetan i bezbedan bioproizvod. Problemi izdvajanja proizvoda, kako po fizičko-hemijskim karakteristikama proizvoda, tako i u pogledu njihovog sastava i stabilnosti nisu jednostavni, pa je i izdvajanje i prečišćavanje željenih proizvoda najčešće dosta složeno i podrazumeva od svega nekoliko do desetak koraka, kako bi se uklonile sve nečistoće u produktima. Saglasno tome, detaljno su predstavljene sve operacije i procesi potrebni za rešavanje ove problematike biohemijskog inženjera. Predstavljene su savremeni pristupi novih tehnologija koje se temelje na reciklaciji, a takođe i na rešenjima za jednokratnu primenu.

Inženjerski aspekti projektovanja bioreaktora su posebno obrađeni kroz osnovne tipove bioreaktora i neke tipove bioreaktora za posebne svrhe, što daje širok pregled mogućnosti različitih primena u biotehnologiji. Rešenja predstavljenih sistema bioreaktorskih uređaja i karakterističnih jednačina daju dovoljno informacija o karakteristikama uređaja za odabrane bioprocene. Na taj način su analizirani bioreaktor, vreme zadržavanja, površina, materijali, koncentracija supstrata i druge značajne karakteristike bioreaktorskog sistema i procesa u njemu. Posebno su se autori osvrnuli na anaerobne bioprocene, što nije uobičajeno u tradicionalnim inženjerskim knjigama. Skladno tome su, kao primer, obradili imobilisane bioreaktorske sisteme za najširu

primenu u fermentacionim procesima, te ilustrovali aplikaciju na primeru tehnologije proizvodnje piva.

Merenje i upravljanje bioprocasa je od presudnog značaja za njegov tok, prinos, brzinu i efikasnost, pa su autori tome dali važnost u posebnom poglavlju ove knjige. Ovde su obradili osnovne principe sagledavanja bioprocasa kao sistema, koji zbog velike složenosti, nije uvek moguće održavati u optimalnom funkcionisanju. Tako su posvetili pažnju optimalnom režimu bioprocasa analizom promene ulaznih veličina, imajući u vidu izlazne veličine, pa je filozofija „ono što nije moguće meriti nije moguće ni kontrolisati“ dobro integrisana u kontekst i daje dobru osnovu za sledeće poglavlje o uvećanju razmera procesa. Uvećanje razmera procesa (“scale-up”) predstavlja uvećanje količine dobijenog proizvoda u industrijskom postrojenju na osnovu podataka dobijenih sa laboratorijskih ili pilot postrojenja. Ista filozofija može da se primeni za “scale-down” kada je reč o rešavanju aktuelnih inženjerskih problema u datoj idustrijskoj proizvodnji. Ovde dolazi do izražaja sva problematika i kompleksnost bioprocasa, pa su autori taj problem dobro ilustrovali sa nekoliko konvencionalih primera rešenja. U poslednjem poglavlju su inovativno uključili u udžbenik i dobru proizvođačku praksu, što će omogućiti čitaocima da povežu sve potrebne radne elemente sa higijenom i problemima u relalnim pogonskim uslovima rada. Dobra proizvođačka praksa obuhvata zahteve koji se odnose na samo proizvodno postrojenje, kao i na zahteve koje treba da ispuni proizvodna dokumentacija i pravila ponašanja radnika koji učestvuju u procesu proizvodnje.

Udžbenik kao celina daje dobar i jasan uvid u znanja i veštine koji su neophodni da bi se bioproces izveo kvalitetno i bezbedno, kako s gledišta radnika inženjera, tako i u pogledu proizvoda i okoline u kojoj treba taj bioroces da se izvede, od idejnog rešenja, pa do njene konačne aplikacije i proizvoda za dobro krajnjeg potrošača.

Prof. dr. Peter Raspor, dd Hc

Ljubljana, 3. jun 2012.

## SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. Uvod u biotehnologiju .....  | 1  |
| 1.1. Primena biotehnologije .....   | 2  |
| 1.2. Osnovni pravci istraživanja novih biotehnoloških procesa .....             | 6  |
| 1.3. Biohemijsko inženjerstvo .....   | 8  |
| 2. Biološke osnove bioprocesa .....   | 12 |
| 2.1. Raznovrsnost ćelija .....  | 12 |
| 2.2. Razvoj sojeva .....  | 13 |
| 2.3. Genetičko inženjerstvo .....   | 13 |
| 2.4. Biotehnologija biljnih i životinjskih eukariotskih ćelija .....            | 14 |
| 2.5. Struktura ćelija .....   | 14 |
| 2.5.1. Ćelijska membrana .....  | 15 |
| 2.5.2. Jedro .....  | 17 |
| 2.5.3. Mitohondrije .....   | 17 |
| 2.5.4. Citoplazmatske organele i strukture uključene u sintetske procese .....  | 18 |
| 2.5.5. Citoplazmatske organele i strukture uključene u procese razlaganja ..... | 18 |
| 2.5.6. Unutrašnji ćelijski skelet .....   | 18 |
| 2.6. Ćelija i njena okolina .....   | 19 |
| 2.6.1. Transport kroz ćelijsku membranu .....                                   | 22 |
| 2.6.2. Adhezija .....   | 23 |
| 2.6.3. Kontaktna inhibicija .....   | 24 |
| 2.6.4. Ćelijska fuzija .....  | 25 |
| 2.6.5. Ćelijski rast .....  | 25 |
| 2.6.6. Ćelijski ciklus .....  | 26 |
| 2.6.7. Regulacija rasta ćelija .....  | 26 |
| 2.6.8. Diferencijacija i transformacija ćelija .....                            | 28 |
| 2.6.9. Starenje i smrt ćelija .....   | 29 |
| 3. Projektovanje bioprocesa .....   | 30 |
| 3.1. Razvoj procesnog dijagrama .....   | 32 |
| 3.2. Analiza procesa .....  | 36 |
| 3.3. Dimenzionisanje procesnih jedinica .....                                   | 37 |
| 3.3.1. Podaci za projektovanje .....  | 38 |
| 3.3.2. Informacije za projektovanje .....                                       | 39 |
| 3.3.3. Izvori informacija za projektovanje .....                                | 41 |
| 3.4. Procena troškova proizvodnje i profitabilnosti - Ekonomski bilans .....    | 42 |
| 3.5. Projektovanje biotehnoloških procesa .....                                 | 42 |
| 3.5.1. Specifičnosti bioloških procesa .....                                    | 43 |
| 3.6. Projektovanje uređaja u biotehnologiji .....                               | 44 |
| 4. Procesi pripreme .....   | 48 |
| 4.1. Priprema bioreaktora .....   | 48 |
| 4.1.1. Pranje i sterilizacija opreme .....                                      | 48 |
| 4.1.1.1. Pranje bioreaktora .....   | 48 |
| 4.2. Priprema supstrata .....   | 53 |
| 4.2.1. Sterilizacija medijuma i vazduha .....                                   | 55 |
| 4.2.1.1. Kinetika sterilizacije medijuma .....                                  | 61 |
| 4.2.1.2. Sterilizacija vazduha .....  | 63 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.2.2. Doziranje supstrata .....  | 65  |
| 4.3. Priprema inokuluma .....   | 66  |
| 4.3.1. Sigurnosni aspekti i regulativa ćelijske kulture .....   | 66  |
| 4.3.2. Karakterizacija i kvantifikacija/testovi .....   | 67  |
| 5. Procesi biokonverzije .....  | 68  |
| 5.1. Kinetika bioprocasa .....  | 68  |
| 5.1.1. Stehiometrija bioprocasa .....   | 68  |
| 5.1.2. Enzimski procesi .....   | 70  |
| 5.1.2.1. Značaj enzima .....  | 70  |
| 5.1.2.2. Poređenje enzima i sintetičkih katalizatora .....  | 70  |
| 5.1.2.3. Faktori koji utiču na aktivnost enzima .....   | 71  |
| 5.1.2.4. Kinetika enzimski katalizovanih reakcija – Michaelis-Menten-ova<br>kinetika .....                  | 72  |
| 5.1.2.5. Inhibicija enzimskih reakcija .....  | 73  |
| 5.1.2.6. Kinetika imobilisanih enzima .....   | 74  |
| 5.1.3. Mikrobnii procesi .....  | 75  |
| 5.1.3.1. Mikrobnii rast .....   | 75  |
| 5.1.3.2. Brzina mikrobnog rasta .....   | 77  |
| 5.1.3.3. Modeli za opisivanje mikrobnog rasta .....   | 78  |
| 5.1.3.4. Uticaj spoljašnje okoline na mikrobnii rast .....  | 84  |
| 5.1.3.5. Kinetika odumiranja mikroorganizama .....  | 86  |
| 5.1.3.6. Kinetika odžavanja mikroorganizama u životu .....  | 86  |
| 5.1.3.7. Kinetika nastajanja proizvoda .....  | 86  |
| 5.1.3.8. Specifična brzina potrošnje supstrata .....  | 88  |
| 5.1.3.9. Brzina generisanja toplote .....   | 88  |
| 5.1.3.10. Brzina rasta micelijskih mikroorganizama .....  | 89  |
| 5.1.3.11. Strukturni modeli .....   | 89  |
| 5.1.3.12. Određivanje parametara koji se koriste u kinetičkim modelima u<br>biohemijskom inženjerstvu ..... | 89  |
| 5.2. Aerobni procesi .....  | 91  |
| 5.2.1. Parametri koji utiču na prenos kiseonika .....   | 92  |
| 5.2.2. Zapreminski koeficijent prenosa kiseonika .....  | 98  |
| 5.3. Izbor i projektovanje bioreaktora .....  | 103 |
| 5.3.1. Primena bioreaktora .....  | 103 |
| 5.3.2. Podela bioreaktora .....   | 104 |
| 5.3.3. Izbor bioreaktora .....  | 105 |
| 5.3.4. Izbor načina izvođenja biokonverzije .....   | 106 |
| 5.3.5. Izbor tipa bioreaktora .....   | 112 |
| 5.3.6. Projektovanje bioreaktora .....  | 121 |
| 5.3.7. Modeli osnovnih tipova bioreaktora .....   | 127 |
| 5.3.7.1. Matematički model bioreaktora .....  | 127 |
| 5.3.7.2. Proračun šaržnih fermentora sa mešanjem .....  | 127 |
| 5.3.7.3. Proračun kontinualnih bioreaktora sa mešanjem (hemostata) .....                                    | 129 |
| 5.3.7.4. Kontinualni bioreaktori sa recirkulacijom ćelija .....   | 130 |
| 5.3.7.5. Kinetika procesa u kombinaciji reaktora i kaskade .....  | 131 |
| 5.3.7.6. Kinetika procesa sa polukontinualnim kulturama .....   | 132 |
| 5.3.7.7. Osnovni modeli aerobnih bioreaktora .....  | 134 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.3.8. Najčešće korišćeni tipovi bioreaktora .....                              | 137 |
| 5.3.9. Bioreaktori sa imobilisanim biokatalizatorima .....                      | 140 |
| 6. Procesi odvajanja - Separacioni procesi .....                                | 142 |
| 6.1. Izdvajanje nerastvornih supstanci .....                                    | 146 |
| 6.1.1. Filtracija .....   | 147 |
| 6.1.2. Taloženje i centrifugiranje .....  | 150 |
| 6.1.3. Koagulacija i flokulacija .....  | 156 |
| 6.1.4. Izdvajanje unutarćelijskih jedinjenja .....                              | 156 |
| 6.2. Koncetrovanje - primarno prečišćavanje .....                               | 161 |
| 6.2.1. Destilacija .....  | 161 |
| 6.2.2. Ekstrakcija .....  | 172 |
| 6.2.3. Uparavanje .....   | 177 |
| 6.2.4. Taloženje – precipitacija .....  | 177 |
| 6.2.5. Adsorpcija .....   | 180 |
| 6.2.6. Membranski procesi .....   | 182 |
| 6.2.6.1. Dijaliza .....   | 187 |
| 6.2.6.2. Reversna osmoza (Hiperfiltracija) .....                                | 188 |
| 6.2.6.3. Ultrafiltracija .....  | 189 |
| 6.2.6.4. Mikrofiltracija .....  | 200 |
| 6.2.6.5. Elektrodijaliza .....  | 200 |
| 6.2.6.6. Elektroforeza .....  | 202 |
| 6.3. Prečišćavanje i uklanjanje nečistoća .....                                 | 203 |
| 6.3.1. Kristalizacija .....   | 203 |
| 6.3.2. Hromatografija .....   | 207 |
| 6.3.2.1. Teorijska razmatranja razdvajanja komponenata hromatografijom .....    | 210 |
| 6.3.2.2. Analiza frakcija .....   | 216 |
| 6.3.2.3. Oprema potrebna za izvođenje hromatografije .....                      | 216 |
| 6.3.2.4. Izbor metoda .....   | 217 |
| 6.3.2.5. Priprema uzorka za hromatografiju .....                                | 218 |
| 6.3.2.6. Detektori .....  | 219 |
| 6.3.2.7. Tipovi hromatografija .....  | 219 |
| 6.3.2.7.1. Adsorpciona hromatografija .....                                     | 220 |
| 6.3.2.7.2. Podela (particiona) hromatografija .....                             | 221 |
| 6.3.2.7.3. Gasna hromatografija (GC) .....                                      | 223 |
| 6.3.2.7.4. Superkritična hromatografija (SFC) .....                             | 225 |
| 6.3.2.7.5. Hromatografija na papiru (PC) .....                                  | 225 |
| 6.3.2.7.6. Tankoslojna hromatografija (TLC) .....                               | 226 |
| 6.3.2.7.7. Hidrofobna hromatografija (HIC) .....                                | 227 |
| 6.3.2.7.8. Reverzno fazna hromatografija (RPC) .....                            | 229 |
| 6.3.2.7.9. Jonoizmenjivačka hromatografija (IEX) .....                          | 230 |
| 6.3.2.7.10. Afinitetna hromatografija (AC) .....                                | 246 |
| 6.3.2.7.11. Gel filtracija/Hromatografija na molekulskim sitima (GPC/SEC) ..... | 252 |
| 6.3.2.7.12. Visoko performantna tečna hromatografija HPLC .....                 | 260 |
| 6.3.3. Konačno prečišćavanje i priprema produkta – formulacija .....            | 261 |
| 6.3.3.1. Sušenje .....  | 261 |
| 6.3.3.2. Liofilizacija .....  | 263 |
| 6.3.3.3. Sušenje raspršivanjem .....  | 263 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.3.4. Izbor metoda i redosled procesa odvajanja .....   | 265 |
| 7. Inženjerski aspekti projektovanja bioreaktora .....   | 270 |
| 7.1. Bioreaktori sa mehaničkim mešanjem .....  | 270 |
| 7.1.1. Osnovni principi bioreaktora sa mešanjem .....  | 270 |
| 7.1.2. Konfiguracija bioreaktora sa mešanjem .....   | 271 |
| 7.1.3. Fenomenologija procesa mešanja u laboratorijskim, poluindustrijskim i<br>industrijskim fermentorima ..... | 275 |
| 7.1.3.1. Mešanje .....   | 276 |
| 7.1.3.2. Strujanje gasa u industrijskim fermentorima .....   | 281 |
| 7.1.3.3. Ostale karakteristike fermentora .....  | 282 |
| 7.2. Bioreaktori sa pneumatskim mešanjem .....   | 284 |
| 7.2.1. Tipovi reaktora sa pneumatskim mešanjem .....   | 284 |
| 7.2.2. Proračun reaktora sa barbotažom mehurova .....  | 287 |
| 7.2.3. Proračun pneumatskog reaktora sa cirkulacijom .....   | 288 |
| 7.3. Poređenje bioreaktora .....   | 291 |
| 7.4. Posebne projektne karakteristike .....  | 292 |
| 7.5. Bioreaktori za posebne primene .....  | 294 |
| 7.5.1. Bioreaktori za obradu otpadnih voda i izduvnih gasova .....   | 294 |
| 7.5.2. Bioreaktori za površinske kulture .....   | 299 |
| 7.5.3. Bioreaktori sa imobilisanim enzimima i ćelijama (imobilisani<br>biokatalizatori) .....                    | 299 |
| 7.5.3.1. Imobilizacija ćelija .....  | 300 |
| 7.5.3.2. Modelovanje procesa u česticama sa imobilisanim ćelijama .....  | 304 |
| 7.5.3.3. Ekstruzione tehnike .....   | 306 |
| 7.5.3.4. Konfiguracija bioreaktora sa imobilisanim ćelijskim kulturama .....                                     | 309 |
| 7.5.4. Bioreaktori sa ćelijskim kulturama biljaka i životinja .....  | 311 |
| 7.5.5. Bioreaktori sa integrisanim izdvajanjem proizvoda .....   | 315 |
| 7.6. Primena imobilisanih bioreakorskih sistema u fermentacionim procesima .....                                 | 318 |
| 7.6.1. Tehnologija dobijanja piva .....  | 318 |
| 7.6.2. Metabolizam kvasca i formiranje proizvoda tokom alkoholne fermentacije .....                              | 320 |
| 7.6.2.1. Metabolizam ugljenih hidrata i nastajanje etanola .....   | 321 |
| 7.6.2.2. Nastajanje i razgradnja sporednih proizvoda fermentacije .....  | 322 |
| 7.6.2.3. Nastajanje i razgradnja vicinalnih diketona .....   | 324 |
| 7.6.2.4. Nastajanje aldehida .....   | 325 |
| 7.6.2.5. Nastajanje viših alkohola .....   | 325 |
| 7.6.2.6. Nastajanje estara .....   | 326 |
| 7.6.2.7. Metabolizam azota .....   | 328 |
| 7.6.3. Kontinualna fermentacija u pivarstvu - ideja i prvobitni pokušaji .....                                   | 328 |
| 7.6.3.1. Kontinualni procesi .....   | 328 |
| 7.6.3.2. Kontinualni procesi u pivarstvu .....   | 330 |
| 8. Merenje i upravljanje u bioprocima .....  | 344 |
| 8.1. Merenja u bioprocima .....  | 345 |
| 8.2. Merno-regulaciona oprema .....  | 347 |
| 8.3. Upravljanje bioprocima .....  | 350 |
| 9. Uvećanje razmera bioprocima .....   | 352 |
| 9.1. Osnovne metode za uvećanje razmera procesa .....  | 355 |
| 9.2. Analiza režima u kome se odvija proces (utvrđivanje limitirajućeg procesa) .....                            | 360 |

|  |     |
|--|-----|
| 9.4. Metoda umanjenja razmera .....  | 361 |
| 9.5. Uvećanje razmera procesa pripreme sirovina i obrade proizvoda .....                             | 362 |
| 10. Dobra proizvođačka praksa.....   | 363 |
| 10.1. Pravila za projektovanje i konstrukciju postrojenja .....                                      | 363 |
| 10.2. Validacija .....   | 364 |
| 10.3. Osnovni principi dobre proizvođačke prakse u biotehnologiji .....                              | 365 |
| 10.3.1. Osnovni principi dobre proizvođačke prakse pri skladištenju materijala.....                  | 365 |
| 10.3.2. Osnovni principi dobre proizvođačke prakse pri inokulaciji.....                              | 366 |
| 10.3.3. Osnovni principi dobre proizvođačke prakse pri izvođenju procesa u<br>bioreaktoru .....      | 369 |
| 10.3.4. Osnovni principi dobre proizvođačke prakse pri izdvajanju i<br>prečišćavanju proizvoda.....  | 367 |
| 10.3.5. Održavanje prostorija za proizvodnju.....  | 367 |
| 10.3.6. Osnovni principi dobre proizvođačke prakse pri projektovanju<br>proizvodnog postrojenja..... | 367 |
| 10.4. Dobra proizvođačka praksa u proizvodnji sterilnih proizvoda .....                              | 369 |
| 10.5. Kontrola kvaliteta.....  | 379 |
| 10.6. Reklamacije i povlačenje proizvoda.....  | 382 |
| SPISAK OZNAKA.....   | 384 |
| LITERATURA .....   | 391 |

## 1. UVOD U BIOTEHNOLOGIJU

Prema definiciji Evropske federacije za biotehnologiju iz 1992. godine, biotehnologija "povezuje prirodne i inženjerske naučne discipline da bi se postigla primena organizama, ćelija, njihovih delova i molekularnih entiteta u dobijanju proizvoda za dobrobit čovečanstva".

Prema toj definiciji, biotehnologija je disciplina stara koliko i tradicija pravljenja piva, vina i hrane, ali i sasvim nova i savremena sa tehnologijom na osnovi rekombinantne DNK, tehnologijom primene hibridoma i drugih ćelija viših organizama, tehnologijom proizvodnje biosenzora i biočipova. Spektar proizvoda širi se svakim danom od proizvoda tradicionalne biotehnologije, kao što su pekarski kvasac, mlečni proizvodi, pivo, vino, alkohol i organske kiseline, do nekoliko stotina novih, farmaceutskih i dijagnostičkih preparata. Takođe su značajni biotehnološki postupci u zaštiti životne sredine (obrada otpadnih voda, biološka razgradnja organskoga čvrstog otpada, biodeodorizacija) i mogućnosti primene biotehnologije u agrokompleksu. Zbog izuzetnog značaja biotehnologija je 1990. godine uvrštena među 12 visoko razvijenih tehnologija koje bi trebalo da budu udarni pravci razvoja Evropske unije.

Biotehnologija se danas smatra poslednjom velikom tehničkom inovacijom dvadesetog veka. Velika pažnja koja joj se poklanja rezultat je u velikoj meri dostignuća moderne biologije, a pre svega genetičkog inženjersva i hemije proteina, koje su omogućile primenu savremenih inženjerskih koncepta u ovoj, inače veoma staroj oblasti ljudske delatnosti.

Istorija biotehnologije se sažeto može opisati sledećim glavnim događajima:

| Godina            | Događaj  |
|-------------------|--|
| 6000. pre Hrista. | Dobijanje alkoholnih pića, hleba i sira fermentacionim procesima   |
| 1857.             | Luj Paster dokazuje da je fermentacija izazvana mikroorganizmima. Izoluje kvasac i povezuje ga sa alkoholnom fermentacijom. Proučava povezanost bolesti sa dejstvima mikroorganizama.  |
| 1900.             | Početak razvoja industrijskih fermentacija. Prvi antibiotik, piokinaza, izolovan je 1901. godine iz bakterije <i>Pseudomonas</i> .   |
| 1923.             | Počinje industrijska proizvodnja limunske kiseline.  |
| 1928.             | Fleming otkriva penicilin, ali njegovo otkriće ne privlači gotovo nikakvu pažnju. Tek pod teškim uslovima za vreme II Svetskog rata, u traganju za antibakterijskim preparatom koji bi imao širu skalu aktivnosti od do tada korišćenih sulfo-preparata, Flori i Šejn reaktiviraju Flemingovo otkriće.           |
| 1944.             | Uspostavlja se industrijska proizvodnja penicilina za potrebe rata u Normandiji, u saradnji engleskih i američkih naučnika i inženjera. Ova proizvodnja označava početak moderne biotehnologije pošto je nastala kao rezultat nekoliko značajnih inovacija: razvijen je 200 puta aktivniji soj, sa površinske se |

- prešlo na submerznu kulturu, uspostavljena je masovna industrijska proizvodnja bazirana na velikim fermentorima i pratećoj opremi za pripremu i finalizaciju proizvoda. Sledilo je osvajanje industrijske proizvodnje drugih antibiotika, po već razvijenoj tehnologiji, a zatim i druge fermentacije čiji su proizvodi vitamini (B2, B12, C), kao i amino kiseline.
- 1953.** Watson i Krik otkrivaju strukturu DNK. Ovo otkriće je utrlo put razvoju moderne biologije.
- 1966.** Otkrivanje genetskog koda što je omogućilo hemijsku sintezu gena.
- 1973.** Razvoj tehnologije rekombinantne DNK. Nastaje genetičko inženjerstvo kao novi alat savremene biotehnologije.
- 1982.** Nastaje prvi komercijalni proizvod rekombinantne tehnologije – humani insulin.
- 2000** Počinje sekvencioniranje humanog gena (genom-projekat).

### 1.1. PRIMENA BIOTEHNOLOGIJE

Biotehnologija se deli na tradicionalnu i novu biotehnologiju. U tabeli 1.1 data su osnovna područja razvoja biotehnologije i njeni najvažniji proizvodi u okviru ovih disciplina. U tabeli 1.2 dat je pregled važnijih industrijskih biotehnoloških procesa tradicionalne i nove biotehnologije.

**Tabela 1.1. Osnovana područja razvoja biotehnologije i njeni najznačajniji proizvodi.**

|  |  |
|--|--|
| <b>MEDICINA</b>                          | antibiotici<br>vaccine<br>hormoni<br>imunoproteini                                     |
| <b>VETERINA</b>                          | antibiotici<br>vaccine<br>hormoni rasta  |
| <b>POLJOPRIVREDA</b>                     | pesticidi<br>fungicidi<br>herbicidi<br>veštačko seme                                   |
| <b>BIOLOŠKI<br/>AKTIVNI<br/>MOLEKULI</b> | vitamini<br>amino kiseline<br>enzimi<br>peptidi  |
| <b>HRANA I PIĆE</b>                      | mleko i mlečni proizvodi<br>alkoholna pića<br>zaslađivači<br>baze za sokove<br>aditivi |

U tradicionalnoj biotehnologiji dominira proces fermentacije i ona je osnova prehrambene industrije (proizvodnja etanola, organskih kiselina, piva mleka i mlečnih proizvoda). Novom biotehnologijom dominiraju danas procesi obrade bioprodukata, a ona je osnova farmaceutske industrije (proizvodnja antibiotika, insulina, interleukina,

hormona rasta). Predviđa se da će biotehnologija budućnosti biti osnova farmaceutske, biohemijske industrije, kao i zaštite životne sredine.

**Tabela 1.2. Najvažniji biotehnološki procesi u industriji.**

| <b>FERMENTACIONI PROCESI SA MIKROORGANIZMIMA</b>   |  |
|--|--|
| <i>Proces</i>  | <i>Proizvod</i>  |
| <b>PROIZVODNJA BIOMASE</b><br><b>Sojevi</b><br><i>Bacillus thuringlensis</i><br><i>B. penentrans</i><br><i>Verticillum thompsoni</i><br><i>Hirsutella thompsol</i><br><br><i>Lactobacillus sp.</i><br><i>Streptococcus cremoris sp.</i><br><i>Penicillium roquerfortil</i> | mikrobiološki insekticidi<br><br>prerada mleka,<br>jogurt, sir   |
| <b>PROIZVODNJA MALIH BIOMOLEKULA</b><br><br>a) primarni metaboliti<br><br>b) biotransformacije   | <b>produkti metabolizma:</b><br>(etanol, aceton, butanol, mlečna kiselina),<br>osnovni metaboliti:<br>(amino kiseline, vitamin B, nukleotidi, pigmenti)<br><br>steroidi, amino kiseline, sorboza, vitamin C, antibiotici, mikotoksin, pigmenti |
| <b>PROIZVODNJA SLOŽENIJIH BIOMOLEKULA</b><br><br>a) polisaharidi<br><br>b) proteini  | ksantan, dekstran, pulan, gelan, emulsan<br><br>enzimi, interferon, interleukin, hormon rasta, urokinaza, tumorski faktori   |
| <b>PROCESI SA ŽIVOTINJSKIM I BILJNIM ĆELISKIM KULTURAMA</b>  |  |
| <i>Proces</i>  | <i>Proizvod</i>  |
| PROIZVODNJA VAKCINA  | humane vakcine   |
| PROIZVODNJA VAKCINA PROTIV VIRUSA  | veterinarske vakcine za žuticu kunića<br>canine hepatitis  |
| PROIZVODNJA SKUPIH FARMAKOLOŠKIH PREPARATA   | eritropoetin<br>monoklonska antitela   |
| PROIZVODNJA SKUPIH HEMIKALIJA  | kodein, atropin, mentol  |

| <b>BIOKATALITIČKI PROCESI</b>                          |   |
|--|---|
| <i>Proces</i>  | <i>Proizvod</i>   |
| PROIZVODNJA HEMIKALIJA                                 | L-amino kiseline,<br>fruktozni sirup,<br>6-aminopenicilanska kiselina,<br>maleinska kiselina,<br>aspartamska kiselina |
| <b>MIKROBIOLOŠKI PROCESI U ZAŠTITI ŽIVOTNE SREDINE</b> |   |
| <i>Proces</i>  | <i>Proizvod</i>   |
| PRERADA OTPADNIH<br>MATERIJA                           | prečišćena voda,<br>mulijeви  |
| IZLUŽIVANJE METALA<br>U BIOMETALURGIJI                 | metali  |

Treba još naglasiti da biotehnologija nije zasebna nauka, već je multidisciplinarna grana nauke, čiji je osnovni zadatak ekonomična realizacija biološkog procesa u industriji, za koje su potrebna znanja biologije, mikrobiologije, biohemije, hemije i inženjerstva.

#### ▪ **Primena biotehnologije u medicini**

Danas je najaktivnije područje primene biotehnologije svakako dobijanje proizvoda za primenu u humanoj medicini (dijagnostici i terapiji). Ova oblast je ujedno najviše vezana za primenu rekombinantne tehnologije.

Kloniranje gena za različite antigen-proteine osnov je za sintezu viralnih proteina i dobijanje vakcina. Virusi su sačinjeni od različitih antigen - proteina koji mogu biti upotrebljeni za stimulaciju imunog sistema u cilju proizvodnje antitela. Tradicionalne vakcine se zasnivaju na stvaranju antitela, kao odgovora na prisustvo virusa (vakcine) implementiranih u organizam. Ta ista antitela napadaju i deaktiviraju eventualno prisutne žive viruse. Vakcine dobijene genetičkim inženjerstvom su jednostavno preparati sintetizovanih viralnih proteina koji na isti način stimulišu imuni sistem. Masovna proizvodnja tradicionalnih vakcina zahteva osvajanje postupaka za gajenje živih virusa, prevenciju njihovog oslobađanja u okolinu i razvoj metoda testiranja vakcine u kojoj ne sme biti živih virusa. Sinteza viralnih proteina izbegava potrebu za izolovanjem virusa, nema mogućnosti za kontaminaciju okoline, a smanjuje potrebu za testiranjem rezidualne aktivnosti vakcine. Zato se očekuje da će u budućnosti vakcine dobijene tehnologijom genetičkog inženjerstva dominirati tržištem. Od najvećeg interesa su, na primer, vakcine za hepatitis, AIDS, herpes, malariju, koleru i boginje.

**Humani hormoni** su druga klasa proizvoda sa kojima je ostvaren veliki tehnološki progres. Hormoni su regulatori metabolizma koje proizvode organi endokrinog sistema. Hormoni se mogu dobiti ili hemijskom sintezom (uspešna samo za najjednostavnije hormone, npr. steroide) ili ekstrakcijom iz tkiva. Insulin dobijen ekstrakcijom iz pankreasa životinja izazivao je često kod ljudi alergijske reakcije, zbog razlika u strukturi između humanih i životinjskih hormona. Genetičko