

Branko M. Bugarski

**PROJEKTOVANJE PROCESA I UREĐAJA
U BIOTEHNOLOGIJI
I BIOHEMIJSKOM INŽENJERSTVU**

Akadska misao
Beograd 2014.

Branko M. Bugarski

**PROJEKTOVANJE PROCESA I UREĐAJA U BIOTEHNOLOGIJI
I BIOHEMIJSKOM INŽENJERSTVU**

Recenzenti

Prof. dr Gordana Vunjak-Novaković, Columbia State University, New York
Prof. dr Bojana Obradović, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Korektura

Mr Verica Manojlović

Dizajn korice

Zorica Marković, akademski slikar

Izdavač

Akademski misao

Štampa

Akademski misao, Beograd

Tiraž

300 kom.

ISBN 978-86-7466-507-7

NAPOMENA: Fotokopiranje ili umnožavanje na bilo koji način ili ponovno objavljivanje ove knjige u celini ili u delovima - nije dozvoljeno bez saglasnosti i pismenog odobrenja izdavača.

PREDGOVOR

Pred nama se nalazi knjiga "*Projektovanje procesa i uređaja u Biotehnologiji i Biohemijskom inženjerstvu*" profesora Branka Bugarskog, knjiga koja na moderan, detaljan i sveobuhvatan način obrađuje jednu kompleksnu i multidisciplinarnu oblast koja do sada nije u većoj meri bila zastupljena u domaćoj naučnoj literaturi. Knjiga daje širok uvid u osnove biotehnologije i biohemijskog inženjerstva, građu, strukturu i metabolizam ćelije kao osnovne jedinice u biotehnoškim procesima, zatim u osnove projektovanja uređaja u biotehnologiji gde je inženjerski pristup i način razmišljanja posebno naglašen, kao i u klasifikaciju i proračun različitih tipova bioreaktora koji su našli primenu u biotehnologiji i biohemijskom inženjerstvu. Odabrane oblasti koje su u knjizi tretirane su izvanredno teorijski obrađene i bazirane na savremenim literaturnim izvorima i podacima. Knjiga je sistematski zrelo koncipirana, pisana jasnim, razumljivim i jezgrovitim jezikom, ilustrativno i grafički znalački potkrepljena, matematički fundirana i izložena na monografskim osnovama. Kao takva daje celovitu teorijsku i inženjersku sliku o projektovanju procesa i uređaja u biotehnologiji.

Namenjena je pre svega studentima Tehnološko-metalurškog fakulteta koji u svom programu imaju ovaj kurs, ali će takođe biti od velike koristi i studentima ostalih fakulteta koji u svom programu tretiraju oblast biotehnologije i biohemijskog inženjerstva. Uz to smatram da će knjiga svoje čitaoce naći i u širokoj populaciji stručnjaka koji se u praksi bave ovom problematikom.

Uzimajući u obzir visoke naučne standarde koje ispunjava ova knjiga i atraktivnost oblasti koju tretira, nema sumnje da će ona obogatiti i osvežiti domaću izdavačku delatnost u oblasti biotehnologije i biohemijskog inženjerstva.

U Beogradu, 17.01.2014. godine.

Viktor Nedović

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	PRIMENA BIOTEHNOLOGIJE	3
1.1.1.	Primena biotehnologije u medicini	5
1.1.2.	Primena biotehnologije u veterini	6
1.1.3.	Primena biotehnologije u poljoprivredi	7
1.1.4.	Primena biotehnologije u proizvodnji specifičnih hemikalija	7
1.1.5.	Primena biotehnologije u proizvodnji hrane i pića	8
1.1.6.	Osnovni pravci istraživanja novih biotehnoloških procesa	8
1.1.6.a.	Istraživanja genoma	8
1.1.6.b.	Istraživanja proteina	9
1.1.6.c.	Farmacija i dizajn	9
1.2.	BIOHEMIJSKO INŽENJERSTVO	10
1.2.1.	Podela biohemijaskog inženjerstva	13
1.2.2.	Osnovni pravci razvoja biohemijaskog inženjerstva u oblasti regenerativne medicine	14
2.	BIOLOŠKI KONCEPT	15
2.1.	RAZNOVRSNOST ČELIJA	15
2.2.	RAZVOJ SOJEVA	15
2.3.	GENETIČKO INŽENJERSTVO	16
2.4.	BIOTEHNOLOGIJA EUKARIOTSKIH ČELIJA	17
2.5.	STRUKTURA ČELIJA	17
2.5.1.	Čelijska membrana	19
2.5.2.	Jedro	20
2.5.3.	Mitochondrije	21
2.5.4.	Citoplazmatske organele i strukture uključene u sintetske procese	22
2.5.5.	Citoplazmatske organele i strukture uključene u procese razlaganja	22
2.5.6.	Unutrašnji čelijski skelet	23
2.6.	ČELIJA I NJENA OKOLINA	23
2.6.1.	Transport kroz čelijsku membranu	27
2.6.2.	Adhezija	28
2.6.3.	Kontaktna inhibicija	30
2.6.4.	Čelijska fuzija	30
2.6.5.	Čelijski rast	31
2.6.6.	Čelijski ciklus	31
2.6.7.	Regulacija rasta čelija	32
2.6.8.	Diferencijacija	34
2.6.9.	Starenje i smrt čelija	36
3.	PROJEKTOVANJE UREĐAJA U BIOTEHNOLOGIJI	37
3.1.	PRIMENA BIOREAKTORA	40
3.2.	ZAHTEVI PRI PROJEKTOVANJU BIOREAKTORA	41
3.3.	IZBOR TIPA BIOREAKTORA	41
3.4.	VRSTA I OSOBINE BIODOKALIZATORA	42
3.5.	METABOLIČKO STANJE ČELIJA	44

3.6.	FIZIKOHEMIJSKE OSOBINE MEDIJUMA	45
3.7.	NAČIN IZVOĐENJA PROCESA	46
3.8.	SUPSTRATI	49
3.9.	STERILNOST I KONTAMINACIJA	49
3.10.	SIGURNOSNI ASPEKTI I REGULATIVA ČELIJSKE KULTURE	50
3.10.1.	Glavna banka ćelija i radna banka ćelija.....	50
3.10.2.	Karakterizacija i kvantifikacija/testovi	50
3.11.	TIM KOJI VRŠI ISPITIVANJA.....	51
3.12.	FAZE BIOTEHNOLOŠKE PROIZVODNJE.....	51
3.12.1.	Sterilisanje bioreaktora	51
3.12.2.	Pranje bioreaktora	53
3.13.	PRIPREMA SUPSTRATA	57
3.14.	BIOREAKTORSKO INŽENJERSTVO	57
3.15.	OBRADA BIOPRODUKATA	59
3.16.	PROCESI SEPARACIJE ČVRSTO-TEČNO.....	61
3.17.	PROCESI DEZINTEGRACIJE ČELIJA	62
3.18.	PROCESI KONCENTROVANJA BIOPRODUKATA	62
3.19.	IZOLACIJA I FINO PREČIŠĆAVANJE BIOPRODUKATA	63
4.	INŽENJERSKI ASPEKTI PROJEKTOVANJA SISTEMA U BIOTEHNOLOGIJI I KINETIKA PROCESA.....	65
4.1.	OSNOVNI PRINCIPI BIOHEMIJSKOG INŽENJERSTVA.....	65
4.2.	KINETIKA STERILIZACIJE MEDIJUMA	67
4.2.1.	Kinetika termičke smrti mikroorganizama	67
4.2.1.a.	Logaritamska kinetika.....	67
4.2.1.b.	Nelogaritamska kinetika	68
4.2.2.	Uticaj temperature na kinetiku sterilizacije	70
4.2.3.	Osnovi projektovanja sistema za sterilizaciju medijuma.....	72
4.2.3.a.	Šaržna sterilizacija	72
4.3.	KINETIKA ŠARŽNE KULTIVACIJE - MONODOVA KINETIKA	78
4.4.	KINETIKA ENZIMSKIH REAKCIJA	84
4.4.1.	Značaj enzima.....	84
4.4.2.	Poređenje enzima i sintetičkih katalizatora	84
4.4.3.	Faktori koji utiču na aktivnost enzima.....	85
4.4.4.	Kinetika enzimski katalizovanih reakcija – Mihaelis-Mentenova kinetika	86
4.5.	KINETIKA MIKROBIOLOŠKIH PROCESA – SLOŽENIJI MODELI	88
4.5.1.	Nestrukturani modeli.....	88
4.5.2.	Strukturani modeli.....	93
4.5.3.	Određivanje parametara koji se koriste u kinetičkim modelima u biohemijskom inženjerstvu.....	93
4.5.4.	Proračun šaržnih fermentora sa mešanjem	95
4.5.5.	Proračun kontinualnih bioreaktora sa mešanjem (hemostata)	97
4.5.6.	Kontinualni bioreaktori sa recirkulacijom ćelija	100
4.5.7.	Kinetika procesa u kombinaciji reaktora i kaskade	101
4.5.8.	Kinetika procesa sa polukontinualnim kulturama	102
5.	BIOREAKTORI	105
5.1.	KLASIFIKACIJA BIOREAKTORA	105
5.2.	BIOREAKTORI SA MEHANIČKIM MEŠANJEM	106

5.2.1.	Fenomenologija procesa mešanja u laboratorijskim, poluindustrijskim i industrijskim fermentorima.....	106
5.2.1.a.	Smicanje.....	108
5.2.1.b.	Cirkulaciono vreme i vreme mešanja.....	109
5.2.1.c.	Promene snage mešanja i brzine aeracije u toku procesa fermentacije..	112
5.2.1.d.	Strujanje gasa u industrijskim fermentorima	116
5.2.1.e.	Uticaj geometrije raspodeljivača gasa na prenos mase u fermentorima	117
5.2.1.f.	Merenje viskoziteta višefaznog sistema.....	117
5.2.1.g.	Neutralizacija	118
5.2.1.h.	Prenos ugljendioksida	119
5.2.1.i.	Praćenje promena veličina u toku proizvodnog ciklusa postrojenja	119
5.2.2.	Uticaj aeracije i mešanja na mikroorganizme.....	121
5.2.3.	Potrošnja snage pri aeraciji sa mešanjem	122
5.2.3.a.	Mešanje bez aeracije, njutnovska tečnost	122
5.2.3.b.	Mešanje nenjutnovske tečnosti bez aeracije.....	124
5.2.3.c.	Mešanje tečnosti sa aeracijom, njutnovske tečnosti.....	126
5.2.3.d.	Mešanje nenjutnovske tečnosti sa aeracijom	127
5.2.4.	Prenos kiseonika u fermentacionim sistemima.....	127
5.2.4.a.	Merenje koeficijenta prenosa mase, $k_L a$	127
5.2.4.b.	Prenos mase u različitim uređajima za fermentaciju.....	130
5.2.5.	5.2.5. Osnovni principi bioreaktora sa mešanjem.....	133
5.2.6.	Konfiguracija bioreaktora sa mešanjem	135
5.3.	BIOREAKTORI SA PNEUMATSKIM MEŠANJEM.....	140
5.3.1.	Tipovi reaktora sa pneumatskim mešanjem.....	140
5.3.2.	Proračun reaktora sa barbotажom mehurova.....	143
5.3.3.	Proračun pneumatskog reaktora sa cirkulacijom	145
5.4.	POREĐENJE BIOREAKTORA.....	148
5.5.	POSEBNE PROJEKTNE KARAKTERISTIKE	150
5.6.	MERNO-REGULACIONA OPREMA	152
5.7.	UVEĆANJE RAZMERA PROCESA (<i>SCALEUP</i>)	154
5.8.	BIOREAKTORI ZA POSEBNE PRIMENE	156
5.8.1.	Bioreaktora za obradu otpadnih voda i izduvnog gasa	156
5.8.2.	Bioreaktori za površinske kulture.....	161
5.8.3.	Bioreaktori sa imobilisanim enzimima i ćelijama (imobilisani katalizatori)...	162
5.8.3.a.	Imobilizacija ćelija.....	162
5.8.3.b.	Metode imobilizacije ćelija.....	162
5.8.3.c.	Modelovanje procesa u česticama sa imobilisanim ćelijama	166
5.8.3.d.	Ekstruzione tehnike.....	169
5.8.3.e.	Bioreaktori sa imobilisanim ćelijskim kulturama	173
5.8.4.	Bioreaktori sa ćelijskim kulturama sisara i biljaka	175
5.8.5.	Bioreaktori sa integrisanim izdvajanjem proizvoda	180
6.	HROMATOGRFSKE METODE ZA PREČIŠĆAVANJE PROTEINA	185
6.1.	JONOIZMENJIVAČKA HROMATOGRAFIJA.....	186
6.1.1.	Faze jonoizmenjivačke hromatografije.....	187
6.1.2.	Analiza frakcija	190
6.1.3.	Oprema za izvođenje hromatografije.....	190
6.1.4.	Osobine jonoizmenjivačkih matriksa	191
6.2.	AFINITETNA HROMATOGRAFIJA	194

6.2.1.	Faze afinitetne hromatografije.....	195
6.2.2.	Analiza frakcija	196
6.3.	GEL FILTRACIJA	197
6.3.1.	Analiza frakcija	197
6.4.	PRIPREMA UZORAKA ZA HROMATOGRAFIJU	199
7.	DOBRA PROIZVOĐAČKA PRAKSA ZA BIOFARMACEUTSKE PROIZVODE	
	201	
7.1.	UPRAVLJANJE KVALITETOM.....	201
7.2.	PROSTORIJE I OPREMA.....	202
7.3.	DOKUMENTACIJA	204
7.4.	PROIZVODNJA	206
7.5.	KONTROLA KVALITETA.....	207
7.6.	PROIZVODNJA STERILNIH MEDICINSKIH PROIZVODA	207
8.	DIZAJN I EKONOMSKA EVALUACIJA PROCESA	211
8.1.	PROCESNI SIMULATORI	212
8.2.	PRIMER DIZAJNIRANJA BIOTEHNOLOŠKOG PROCESA – PROIZVODNJA LIMUNSKKE KISELINE ²¹⁴	
8.2.1.	Opis procesa	215
8.2.2.	Materijalni bilans.....	217
8.2.3.	Ekonomska evaluacija	217
9.	NOMENKLATURA	221
10.	INDEKSI	224
11.	LITERATURA.....	225

1. UVOD

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 proizvodnjom hibridoma i drugih ćelija viših organizama, 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 poloklanja rezultat je u velikoj meri dostignuća moderne biologije, a pre svega genetičkog inženjerstva 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 *Pseudomonas*.
- 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.** Wotson i Krik otkivaju strukturu DNK. Ovo otkriće je utrla 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 - humaniinsulin.
- 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.

MEDICINA	antibiotici vaccine hormoni imunoproteini
VETERINA	antibiotici vaccine hormoni rasta
POLJOPRIVREDA	pesticidi fungicidi herbicidi veštačko seme
BIOLOŠKI AKTIVNI MOLEKULI	vitamini amino kiseline enzimi peptidi
HRANA I PIĆE	mleko i mlečni proizvodi alkoholna pića zaslađivači baze za sokove 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 tehnologija zaštite životne sredine i da će biti osnova farmaceutske, biohemijske industrije, kao i zaštite životne sredine.

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.

Tabela 1.2. Najvažniji biotehnološki procesi u industriji

FERMENTACIONI PROCESI SA MIKROORGANIZMIMA		
Proces	Sojevi	Proizvod
PROIZVODNJA BIOMASE	<p><i>Bacillus thuringlensis,</i> <i>B.penentrans</i> <i>Verticillum thompsoni,</i> <i>Hirsutella thompsol</i></p> <p><i>Lactobacillus sp.</i> <i>Streptococcus cremoris sp.</i> <i>Penicillium roquerfortil</i></p>	<p>Mikrobiološki insekticidi</p> <p>Prerada mleka, jogurt, sir</p>
PROIZVODNJA MALIH BIOMOLEKULA	<p>a) primarni metaboliti:</p> <p>b) biotransformacije</p>	<p>produkti metabolizma: (etanol, aceton, butanol, mlečna kiselina) osnovni metaboliti: (amino kiseline, vitamin B, nukleotidi, pigmenti)</p> <p>steroidi, amino kiseline, sorboza, vitamin C antibiotici, mikotoksin, pigmenti,</p>
PROIZVODNJA SLOŽENIJH BIOMOLEKULA	<p>polisaharidi:</p> <p>proteini:</p>	<p>ksantan, dekstran, pulan, gelan, emulsan</p> <p>enzimi, interferon, interleukin, hormon rasta, urokinaza, tumorski faktor</p>

PROCESI SA ŽIVOTINJSKIM I BILJNIM ĆELISKIM KULTURAMA	
<i>Proces</i>	<i>Proizvod</i>
PROIZVODNJA VAKCINA	ljudske – humane vakcine
PROIZVODNJA VAKCINA PROTIV VIRUSA	veterinarske vakcine za žuticu kunića canine hepatitis
PROIZVODNJA SKUPIH FARMAKOLOŠKIH PREPARATA	eritropoetin monoklonska antitela
PROIZVODNJA SKUPIH HEMIKALIJA	kodein, atropin, mentol
BIOKATALITIČKI PROCESI	
Proces	Proizvod
PROIZVODNJE HEMIKALIJA	Proizvod L-amino kiseline, fruktozni sirup, 6-aminopenicilanska kiselina, maleinska kiselina, aspartamska kiselina
MIKROBIOLOŠKI PROCESI U ZAŠTITI ŽIVOTNE SREDINE	
PRERADA OTPADNIH MATERIJIA IZLUŽIVANJE METALA U RUDARSTVU	voda mulijevi

1.1.1. 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 potrebe 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 inženjerstvo je ponudilo nov i neograničen izvor za dobijanje hormona, među kojima su insulin, hormon rasta (HGH) i plasminogen aktivator (TPA, sprečava emboliju i stoga se koristi u terapiji srčanih i koronarnih bolesti).

Specifični lekovi čije je dobijanje zasnovano na primeni genetičkog inženjerstva obuhvataju interferon (alfa, beta i gama), interleukine i limfotoksin. Veliki značaj ovih lekova vezan je za njihovo stimulatorno dejstvo na imuni sistem i potencijal u terapiji kancerogenih bolesti i opštih infekcija.

1.1.2. Primena biotehnologije u veterini

Postoji značajna sličnost pojedinih oblasti u veterinarstvu sa humanom medicinom. Sve što je rečeno o vakcinama za primenu u humanoj medicini važi i za vakcine koje se koriste za lečenje životinja. Genetičko inženjerstvo je do sada ponudilo vakcine nove generacije za više bolesti krupne stoke, svinja i živine. Hormoni su od potencijalno najvećeg tržišnog značaja, s obzirom da se ne koriste samo za terapiju (kao u humanoj medicini), nego prevashodno i za ubrzanje rasta životinja, povećanje proizvodnje mleka i poboljšanje kvaliteta mesa.

1.1.3. Primena biotehnologije u poljoprivredi

Hemikalije za primenu u poljoprivredi predstavljaju još jedno veliko tržište za biotehnologiju. Glavni motiv za prelaz na hemikalije dobijene metodama moderne biotehnologije je zamena klasičnih pesticida, herbicida i fungicida za koje je utvrđeno da su kancerogeni, a neosporno je da ugrožavaju okolinu (dugotrajno zagađenje voda i tla).

U ovoj oblasti se primenjuju različite strategije, kao na primer: (a) ekspresija bakterijskih gena direktno u biljkama, tako da one proizvode supstance toksične za insekte i-ili stiču herbicidnu otpornost; (b) promena mikrookoline biljaka unošenjem u tlo bakterija sa biopesticidnim genima.

1.1.4. Primena biotehnologije u proizvodnji specifičnih hemikalija

U kategoriju specifičnih hemikalija može se uvrstiti široka skala proizvoda, od hemijskih intermedijera do bioloških katalizatora, a najznačajniji proizvodi su: vitamini, amino kiseline i enzimi koji se dobijaju uglavnom fermentacijom uz upotrebu specifičnih mikroorganizama. Za vitamine se pri tome koristi ili kombinacija hemijskih i biohemijskih postupaka (C vitamin) ili fermentacija (B2, B12). Amino kiseline se, izuzev metionina, dobijaju fermentacijom, a koriste se kao dodaci za hranu ili kao biološki aktivne supstance. Na primer, dodatkom lizina kukuruzu koji je diferenciran u lizinu za ishranu stoke, povećava se njegova prehrambena vrednost, pošto dolazi do potpunog metaboličkog iskorišćenja. Metionin, lizin i triptofan su tri amino kiseline koje se proizvode u najvećim količinama. Ovom proizvodnjom na svetskom nivou (450,000 tona od 1992 god. sa godišnjim rastom od 4 - 10% do 2002 godine) dominira Japan. Interesantno je i da ove sintetičke amino kiseline učestvuju u ukupnoj svetskoj proizvodnji amino kiselina sa 1 % po količini, ali sa čitavih 18% po tržišnoj vrednosti.

Enzimi imaju ogroman komercijalni značaj i proizvode se za primenu u proizvodnji deterdženata (proteaze), bistrenju piva i voćnih sokova, prevođenju skroba u fermentabilne šećere (glukoamilaze, alfaamilaze), za dobijanje alkohola kao i dobijanje fruktoznog sirupa (glukoza izomeraza) u proizvodnji sira (renin) itd. Renin je trenutno najpogodniji enzim za prelazak na rekombinantnu tehnologiju proizvodnje, zbog velike potrebe za ovim enzimom, ali i činjenice da je jedini metod za njegovo dobijanje ekstrakcija iz životinja.

1.1.5. Primena biotehnologije u proizvodnji hrane i pića

Proizvodnja alkoholnih pića je ogromna po količinama i odvija se klasičnim tehnologijama u koje se veoma sporo probijaju inovacije vezane za unapređivanje soja ili tehnologije. O zaslađivačima se manje zna, mada od 1970. godine doživljavaju ogromnu ekspanziju i smatraju se velikim uspesima biotehnoške proizvodnje, posebno fruktozni sirup i veštački zaslađivači (aspartam, 200 puta slađi od šećera). Proteini iz jednoćelijskih organizama, naprotiv, nikada nisu bili prihvaćeni na tržištu iz psiholoških razloga, ali i zbog soje kao alternativnog izvora proteina niske cene.

1.1.6. Osnovni pravci istraživanja novih biotehnoloških procesa

Pravci istraživanja u savremenoj biotehnologiji su veoma raznovrsni i dostignuća iz ove oblasti počinju da nalaze svoju primenu u najrazličitijim sferama nauke i svakodnevnog života. Ipak, istraživanja koja u ovom trenutku privlače najveću pažnju i koja su najatraktivnija, kako za javnost, tako i za privlačenje kapitalnih investicija su istraživanja genoma i proteina (prvenstveno ljudskih) sa ciljem primene u medicini radi razvijanja novih lekova i terapija. U ta istraživanja spadaju proučavanje kompletnih genoma, proučavanje proteina i pronalaženje proteinskih targeta za lekove i na kraju, praktična primena tako dobijenih rezultata ostvarena kroz sintezu lekova.

1.1.6.a. Istraživanja genoma

Izraz genom (*genomics*) prvi put je upotrebio genetičar Tom Roderik (Tom Roderick) 1987 godine da bi opisao pristup proučavanju DNK na nivou hromozoma, celih genoma ili velikih grupa gena. Ovaj pristup se u velikoj meri razlikovao od dotadašnjeg pristupa proučavanju DNK koje se uglavnom odvijalo na nivou pojedinačnih gena. U okviru ovih istraživanja vrše se sistematska ispitivanja genoma, odnosno kompletnog hromozomskog seta određenog organizma. U današnje vreme takva istraživanja podrazumevaju kreiranje i upotrebu velikih baza podataka i adekvatnu laboratorijsku opremu i samim tim, velika ulaganja. Postoje dva aspekta istraživanja genoma - strukturni i funkcionalni.

- Strukturna ispitivanja predstavljaju određivanje sekvence DNK i mapiranje gena.
- Funkcionalna istraživanja su usmerena na ispitivanje funkcionalnih aktivnosti utvrđenih genetičkih sekvenci. Kako se bude privodilo kraju iščitavanje ljudskog

genoma, tako će se i težiste rada pomerati sa strukturnih prema funkcionalnim aspektima istraživanja, sa ciljem dobijanja rezultata konkretno primenljivih u praksi.

1.1.6.b. Istraživanja proteina

Identifikacija svih proteina u ćelijama i analiza njihovih interakcija predstavlja trenutno jedno od najatraktivnijih polja u biotehnoškoj industriji, kako u velikim kompanijama tako i kod kompanija u osnivanju. Naziv *proteom* nastao je tek 1994. godine kada ga je Mark Wilkins (Willkins), doktorant na Univerzitetu u Sidneju, prvi put upotrebio da bi opisao skup svih ljudskih proteina. Proteini predstavljaju "radnu snagu" ćelije i metu za potencijalne lekove. Međutim, identifikacija i sekvencioniranje gena ne obezbeđuju u ovom trenutku dovoljno podataka za razvoj novih terapija. Tako je razvijena nova oblast istraživanja "*proteomics*" koja se bavi istraživanjem strukture proteina i njihovih međusobnih veza. Ova oblast postaje sve atraktivnija za investiranja. Samo od juna 2000. do oktobra 2001 godine više od 700 miliona dolara investitorskog kapitala uloženo je u firme koje se bave ispitivanjem proteoma.

Posle objavljivanja prve potpune analize ljudskog genoma biomedicinska istraživanja će se skoro u potpunosti prebaciti sa *genomics*-a na *proteomics* kao ključne tehnologije za transformaciju informacija u farmaceutske proizvode. Potreba za unapređenjem brzine i efikasnosti pronalaženja novih lekova će biti primarna vodilja u okviru ovih istraživanja. Trenutne metode postepenih i hemijski optimizovanih metoda su vremenski duge (u proseku 10-12 godina da bi se otkrio novi lek) i skupe (u proseku 500-750 miliona US dolara). Takođe, postoji veliki procenat neuspešnosti prilikom kliničkog testiranja usled toksičnosti ili niske efikasnosti potencijalnih novih lekova, što rezultuje u sve većem interesovanju za bio-markere pogodne za korišćenje kod terapijskog planiranja i dizajniranja personalizovanih lekova.

Za proteomsku industriju predviđa se rast sa 565 miliona US dolara u 2001 godini, na preko 3.3 milijarde US dolara u 2006 godini. Ovo predstavlja prosek godišnjeg rasta od 40% i očekuje se da će potražnja za proteomičkim proizvodima biti velika tokom ovog vremenskog perioda. Očekuje se da će stopa rasta u ovom tržišnom segmentu početi da opada posle 2005 godine kada sledeća generacija proteomičkih proizvoda bude izbačena na tržište.

1.1.6.c. Farmacija i dizajn

Na osnovu informacija dobijenih u okviru genomskih i proteomskih istraživanja u toku narednih deset godina očekuje se značajan napredak u farmaceutskoj industriji. Određivanje targeta za lekove u okviru proteomskih ispitivanja dovelo bi do znatnog

napretka i kreiranja takvih lekova, koji bi blokirali tačno one proteine koji prouzrokuju određene bolesti. Pored poboljšanja u laboratorijskim ispitivanjima očekuje se takođe i ubrzavanje procedure izvođenja novih lekova na tržište. Budući da je ovaj proces trenutno veoma spor i skup, to bi farmaceutskim kompanijama u velikoj meri umanjilo troškove. Stotine miliona dolara se godišnje troši na istraživanje i razvoj novih lekova. Pri tome, samo jedno od hiljadu eksperimentalnih jedinjenja prođe preklinička ispitivanja, a jedan od pet klinički ispitanih lekova stiže na tržište.

Dobijanje konkretnih informacija iz pročitanoog genetičkog koda i otkrivanje ćelijskih mehanizama koji dovode do stvaranja određenih patoloških stanja ili pojave bolesti (naročito kada su u pitanju nasledne bolesti), moglo bi da bude teorijska osnova za dizajn novih, usko specifičnih lekova koji bi bili u skladu sa genetičkim kodom pojedinca i samim tim, neuporedivo efikasniji od postojećih lekova. Postoje prognoze da bi plasman ovakvih lekova na tržište mogao uvećati prihode farmaceutskih kompanija do 50 i više procenata.

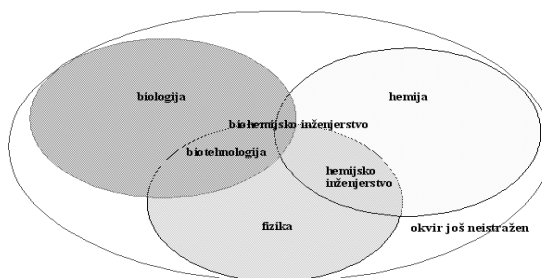
1.2. BIOHEMIJSKO INŽENJERSTVO

Biohemijsko inženjerstvo se formira sa počecima razvoja moderne biologije, kada je (posle matematike, fizike i hemije) ova izvedena nauka počela da dobija obrise savremene kvantitativne nauke izdavajući se iz “opštosti biotehnologije” spremne za primenu egzaktnih inženjerskih pristupa. Ova oblast integriše biološke principe sa termodinamikom, fenomenima prenosa, konceptima reaktorskog inženjerstva i separacionih procesa i u velikoj meri preuzima "alate" hemijskih inženjera kojima se oni služe u analizi i projektovanju opreme i procesa.

Definicija biohemijskog inženjerstva

U preseku skupova biologije, hemije i fizike kao osnovnih nauka, nalaze se izvedene tehničke discipline kao što se biotehnologija, biohemijsko inženjerstvo i hemijsko inženjerstvo neophodne za industrijsku realizaciju bioprocasa (Slika 1.1.)

Prema definiciji “Biohemijsko inženjerstvo je primena inženjerstva, odnosno uže hemijskog inženjerstva, na biološke i biohemijske procese i u tom je kontekstu, kao i biohemija ili mikrobiologija, posebna naučna disciplina koja se nalazi na granici između biologije, fizike i hemije”.



Slika 1.1. Biohemijsko inženjerstvo kao izvedena naučna disciplina.

Za razliku od klasičnih disciplina, kao što je npr. fizička hemija, **biohemijsko inženjerstvo je multidisciplinarno, a i granično područje** u koje zadiru biologija, hemija, fizika kao i matematičko modelovanje, odnosno opisivanje i predviđanje fenomena korišćenjem matematičkog formalizma .

Zadatak biohemijskog inženjerstva je da teorijski definiše pojedine tehnološke operacije u biotehnologiji (npr. mešanje, aeraciju, filtraciju, sušenje) kao i sam proces, da bi se na temelju tog opisa moglo projektovati i vršiti selekcija aparata i uređaja u kojima će se proces industrijski izvoditi na najekonomičniji način. Svrha biohemijskog inženjerstva je primena znanja iz više naučnih disciplina koja će omogućiti razumevanje i analizu celog tehnološkog procesa na osnovu čega će se biološki procesi razvijati i racionalno sprovesti u industriji.

Inženjerska analiza biološkog procesa zahteva razvoj kvantitativnog matematičkog prikaza procesa na osnovu njegovog kvalitativnog-fenomenološkog razumevanja. Često su ti prikazi, koje nazivamo matematičkim modelima, samo vrlo pojednostavljene i idealizovane slike stvarnih zbivanja u biološkim procesima, ali neophodni pri razvoju i projektovanju industrijskog procesa. Tako npr. za izračunavanje optimalnih uslova industrijskih bioloških procesa treba poznavati veliki broj parametara u živoj ćeliji koji kontrolišu određeni metabolički put. Te je parametre, međutim, ponekad nemoguće eksperimentalno odrediti i zato ih je na osnovu matematičkog modela potrebno predvideti.

Prema tome, za razvoj biotehnologije nije dovoljno poznavati samo molekulsku strukturu biološkog sastava i otkriti mogućnosti biološkog materijala, već treba znati i ekonomično realizovati biotehnološke procese u industriji, a za to su potrebna znanja i metode kojima raspolaže biohemijsko inženjerstvo.

Osnova biohemijskog inženjerstva su pristupi na kojima se temelji hemijsko inženjerstvo, koje se naročito razvijalo poslednjih 40 godina uz ubrzani razvoj velikih

hemijskih industrija. Prema tome, može se pojednostavljeno reći da je biohemijско inženjerstvo primena hemijskog inženjerstva na biološke procese.

Biološki materijali su vrlo složeni, a njihova se posebnost ogleda u karakteristikama biohemijskih reakcija u biološkim procesima. Osnovna karakteristika ovih procesa je da se mogu odvijati u »fiziološkim uslovima«, odnosno pri normalnom pritisku, temperaturi od 20-50°C, pH oko 7 i u vrlo razređenim, uglavnom vodenim rastvorima u kojima se postiže relativno mala produktivnost.

Sa jedne strane, ovi uslovi predstavljaju prednost u odnosu na hemijske procese, jer nisu potrebne mere sigurnosti zbog visokih pritisaka i temperatura. Sa druge strane, to je nedostatak, jer se ti parametri moraju kontrolisati sa vrlo velikom tačnošću usled uskog područja u kojem je biološki materijal stabilan. Te posebnosti bioloških svojstava dovele su do različitosti hemijskog i biohemijskog inženjerstva koje su vezane za karakteristike reaktorskog medijuma, uslove rada bioloških procesa, obradu bioprodukata, merenje, regulaciju i vođenje procesa.

U biohemijском inženjerstvu se kao poseban problem nameću specifična reološka svojstva reakcionog medijuma i fenomen rasta biomase kome mora biti prilagođen bioreaktor. Mešanje u bioreaktoru mora biti prilagođeno, zavisno od osetljivosti ćelijske vrste na tangencijalne napone.

Drugi problem biohemijskog inženjerstva je uzimanje uzoraka i merenje parametara reakcionog medijuma u sterilnim uslovima, kako u laboratorijskom, tako i u poluindustrijskim i industrijskim razmerama.

Tabela 1.3. Karakteristike biotehnoških procesa

Reakcioma smeša	složena reologija fenomen rasta biološkog materijala mala mehanička čvrstoća temperaturna osetljivost
Uslovi rada	sterilnost efikasan dovod kiseonika
Merenje i kontrola procesa	specifični senzori
Obrada bioprodukata	izdvajanje biomase (medijum) ili izdvajanje proizvoda iz ćelije specifičnim separacionim tehnikama

Može se zaključiti da usled prisutnosti ćelija kao biološkog materijala, biotehnološki procesi imaju posebne karakteristike (Tabela 1.3.) po kojima se razlikuju od hemijskotehnoloških procesa.

1.2.1. Podela biohemijskog inženjerstva

Danas se obično biohemijsko inženjerstvo deli na (Tabela 1.4.): inženjerstvo farmaceutskih procesa (uvek sterilni uslovi, ćelija se posmatra kao mali bioreaktor koji reprodukuje sam sebe ili u kojem se proizvode druge biološki aktivne supstance, a procesi tog tipa u industriji su uglavnom diskontinualni), inženjerstvo enzimskih procesa (uslovi mogu biti sterilni ukoliko se radi o proizvodnji enzima i nesterilni, ako se enzim koristi kao biokatalizator kao na primeru hidrolize masti ili transesterifikacije u prehrambenoj industriji) i ekološko inženjerstvo (gde su uslovi procesa biološkog prečišćavanja otpadnih voda nesterilni, a procesi se izvode uglavnom kontinualno).

Tabela 1.4. Podela biohemijskog inženjerstva

INŽENJERSTVO FARMACEUTSKOG PROCESA	INŽENJERSTVO ENZIMSKIH PROCESA	EKOLOŠKO INŽENJERSTVO
uslovi procesa sterilni apirojeni	uslovi procesa sterilni (prizvodnja enzima), nesterilni (biokataliza)	uslovi procesa nesterilni
ćelija: bioreaktor i proizvod	ćelija ili čist enzim: biokatalizator	ćelija: reaktor

U osnovi, svaki biotehnološki proces obuhvata tri faze: pripremu supstrata, proces u bioreaktoru (biokonverzija, kinetika rasta i nastajanje proizvoda, CIP – čišćenje *in situ*, SIP – sanitacija *in situ*) i obradu bioprodukta.

Ekonomičnost celog biotehnološkog procesa, koja će u nastavku knjige biti detaljnije razmatrana, veoma zavisi od procesa obrade bioprodukta i zato se čine veliki naponi da se procesi u bioreaktoru integrišu sa procesima obrade bioprodukta i na taj način poveća produktivnost biotehnološkog procesa, a time i njegova ekonomičnost.

Biohemijsko inženjerstvo je uključeno u razvoj celokupnog biotehnološkog procesa tako da je teško precizno razdvojiti domen biohemijskog inženjerstva od domena biotehnologije. Pojednostavljeno, biotehnologija kao starija disciplina obuhvata (bio)tehnološke »recepture«, dok biohemijsko inženjerstvo primenjuje inženjerske alate projektovanja (prenos mase, toplote i količine kretanja) na konkretne slučajeve u biološkim sistemima.

1.2.2. Osnovni pravci razvoja biohemijskog inženjerstva u oblasti regenerativne medicine

Biohemijsko inženjerstvo u oblasti medicine zasniva se na gajenju *in vitro* kulture tkiva: mikroinkapsulacija i bioreaktorska kultivacija. Istraživanja *in vitro* kultivacije funkcionalnih tkiva baziraju se na autognim ćelijama. Razvijaju se nove metode za imobilizaciju/inkapsulaciju bazirane na novim biokompatibilnim biomaterijalima. Projektuju se novi bioreaktori koji pored kontrole mikrookoline obezbeđuju: stacionarne uslove kultivacije, efikasan transport mase i toplote do kulture tkiva, kao i adekvatne fluidodinamičke zahteve, a omogućavaju i primenu biomehaničkih i električnih signala u sistemu.