

**Εθνικό και Καποδιστριακό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
"ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ"**

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2009

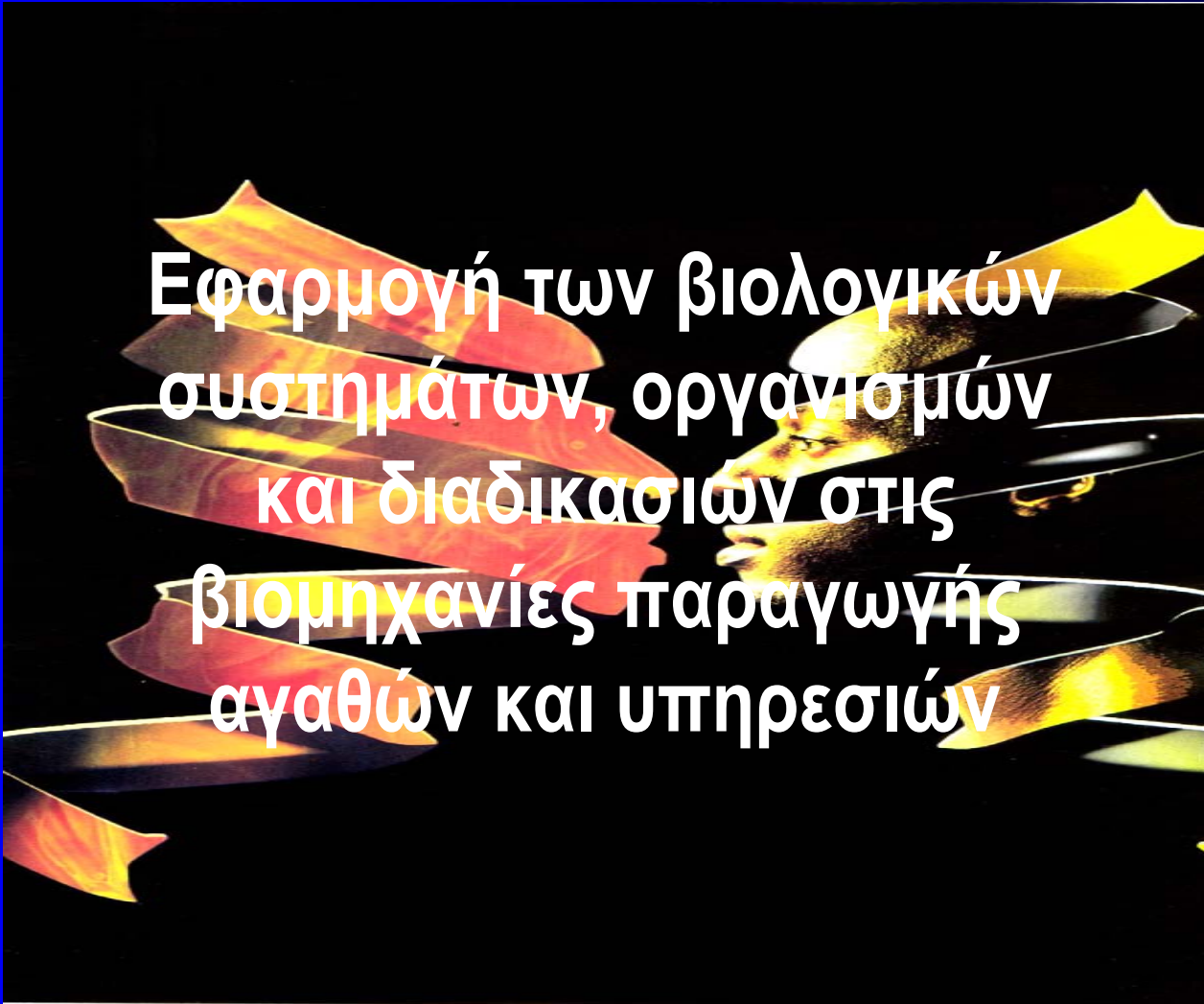
Τεχνολογία Μικροβιακών Προϊόντων

Θεματικές περιοχές

- Κύρια μικροβιακά προϊόντα
- Συστήματα καλλιέργειας μικροοργανισμών
- Κρίσιμες παράμετροι λειτουργίας βιοαντιδραστήρων
- Σχεδιασμός και επιλογή βιοαντιδραστήρων
- Ζύμωση στερεάς κατάστασης
- Γενετική αστάθεια τροποποιημένων μικροοργανισμών
- Ανάκτηση μικροβιακών προϊόντων

ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΕΙΣ

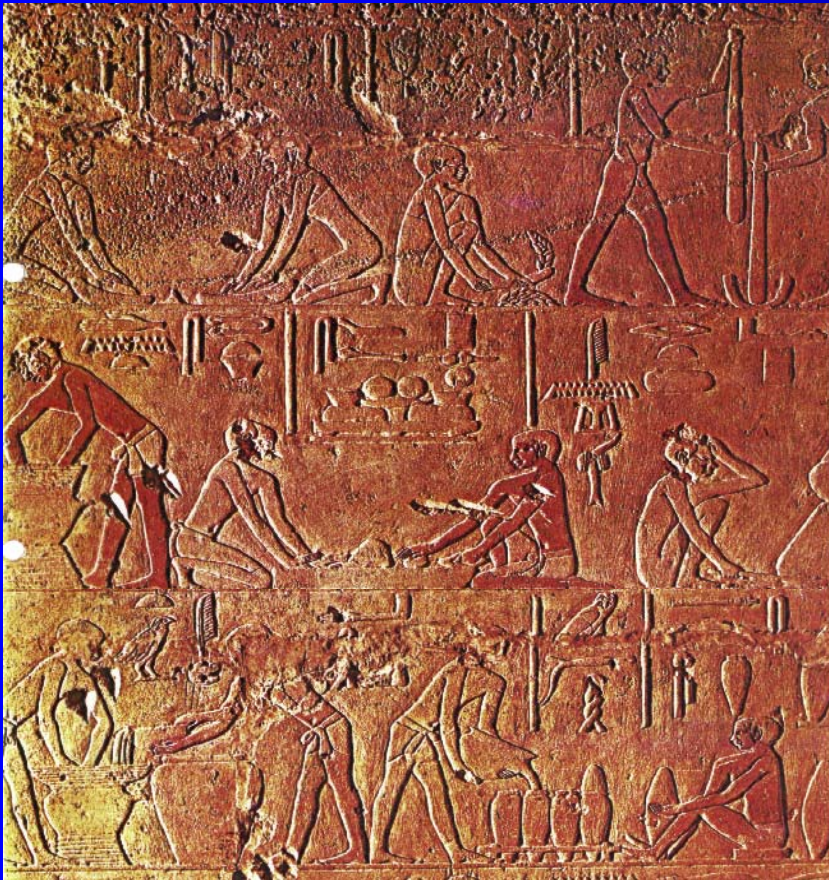
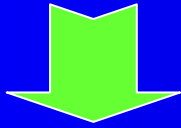
Τι είναι Βιοτεχνολογία;



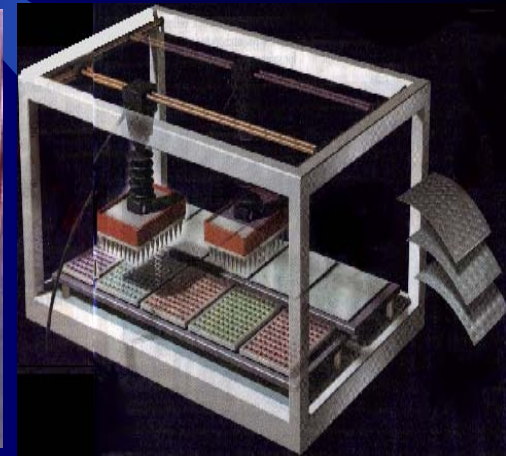
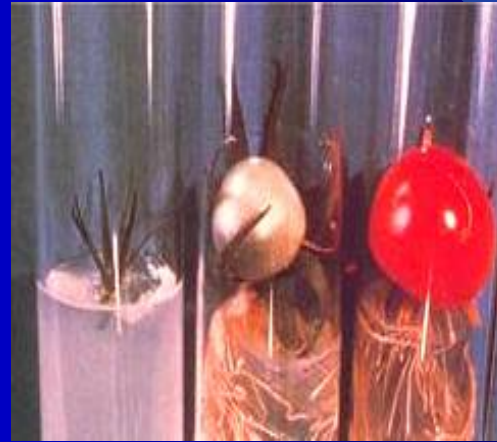
Εφαρμογή των βιολογικών
συστημάτων, οργανισμών
και διαδικασιών στις
βιομηχανίες παραγωγής
αγαθών και υπηρεσιών

Εξέλιξη της Βιοτεχνολογίας

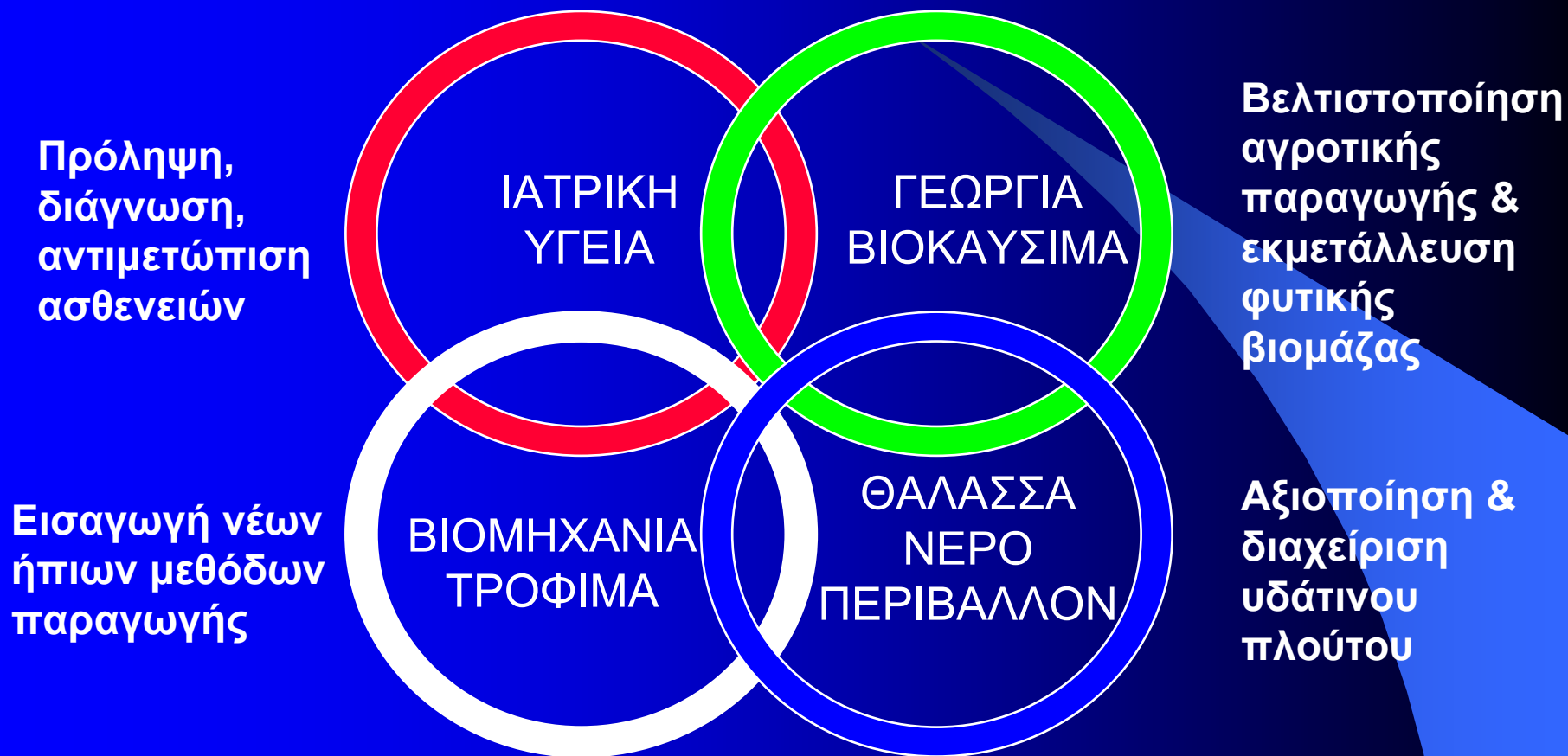
Κλασσική



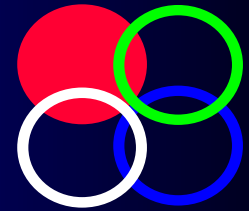
Σύγχρονη



Οι στόχοι της Βιοτεχνολογίας σήμερα

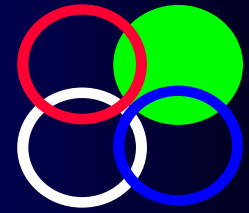


Κόκκινη Βιοτεχνολογία

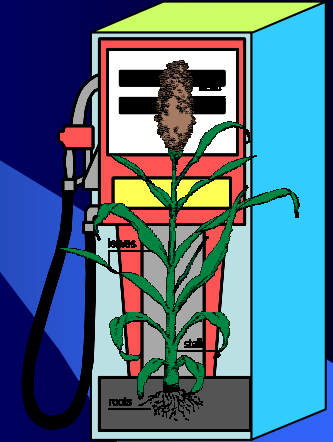


- Φάρμακα
 - Εμβόλια
 - Διαγνωστικά
 - Γονιδιακή θεραπεία
 - Μηχανική ιστών
- 325 εκατ ασθενείς
 - 418 φάρμακα και εμβόλια υπό δοκιμή: 210 καρκίνος, 50 μεταδοτικές ασθένειες, 44 αυτοάνοσα νοσήματα
 - 1600 εταιρίες στην Ευρώπη με κύκλο εργασιών 7.8 δις ευρώ το 2005

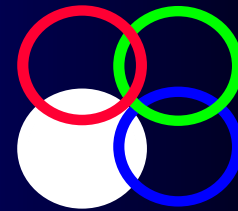
Πράσινη Βιοτεχνολογία



- Διαγονιδικά φυτά (GMOs)
- Μοριακή αναπαραγωγή φυτών
- Φυτά ως εργοστάσια παραγωγής
- Βιοκαύσιμα
- Βιοαποικοδόμηση
- Βιολογικά λιπάσματα
- Βιοέλεγχος



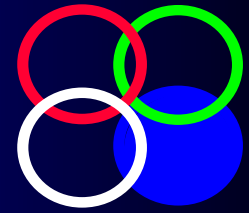
Λευκή Βιοτεχνολογία



- **Βιομηχανία τροφίμων**
 - Παραδοσιακά προϊόντα (ποτά-γαλακτοκομικά)
 - Ζύμη αρτοποιίας
 - Πρόσθετα (αμινοξέα-βιταμίνες,χρωστικές)
 - Ένζυμα
- **Παραγωγή ενζύμων**
 - Κλωστοϋφαντουργία
 - Βιομηχανία χαρτιού
 - Βιομηχανία απορρυπαντικών
 - Ζωοτροφές
- **Βιοπολυμερή**
- **Μικροβιακοί πολυσακχαρίτες**
- **Οργανικά οξέα & διαλύτες**
- **Μικροβιακή ανάκτηση μετάλλων**

McKinsey & Co

- 10-20% της παγκόσμιας χημικής βιομηχανίας με ετήσια αύξηση 11-22 εκατ \$
- 75% της παγκόσμιας παραγωγής ενζύμων στην Ευρώπη



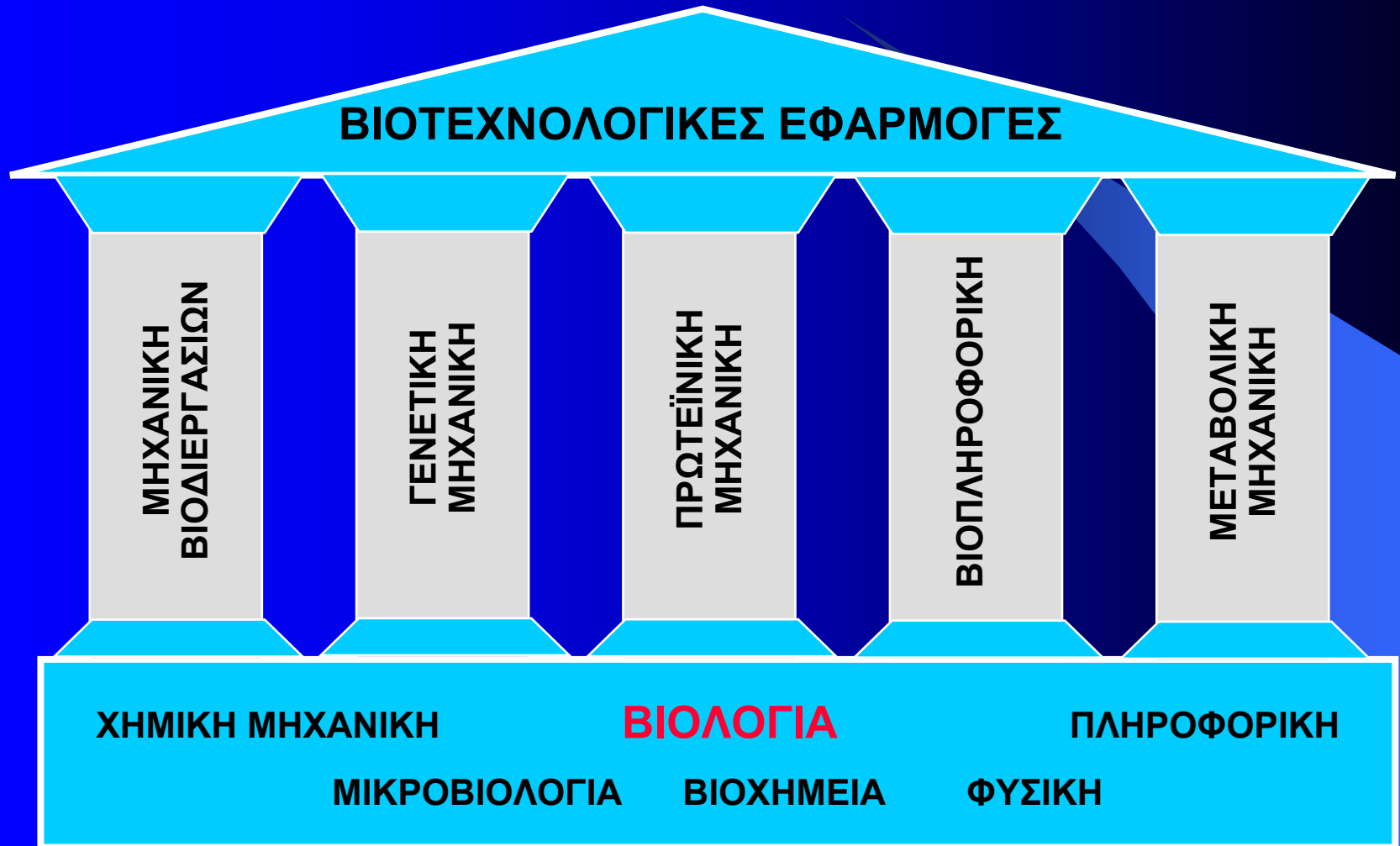
- Διαγονιδιακά ψάρια
- Βιοκαύσιμα από φύκη
- Έλεγχος υδρόβιων παθογόνων

Η μπλέ Βιοτεχνολογία αποτελεί το λιγότερο ανεπτυγμένο τομέα μέχρι σήμερα

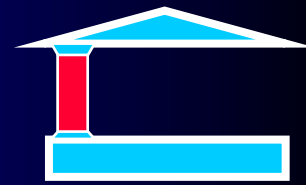
Κατανομή πωλήσεων μικροβιακών προϊόντων

Κατηγορία	Ποσοστό (%)	Τυπικά προϊόντα
Αντιβιοτικά	42	πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες
Θεραπευτικές πρωτεΐνες	25	ιντερφερόνη, ινσουλίνη, αντισώματα
Άλλα φάρμακα	17	στεροειδή, αλκαλοειδή
Αμινοξέα	8	λυσίνη, γλουταμινικό
Ένζυμα	3	πρωτεάσες, κυτταρινάσες, λιπάσες
Οργανικά οξέα	3	γαλακτικό οξύ, κιτρικό οξύ
Βιταμίνες	1	B2, B1, βιοτίνη
Πολυσακχαρίτες	1	ξανθάνη, δεξτράνη

Η προσέγγιση των στόχων της Βιοτεχνολογίας

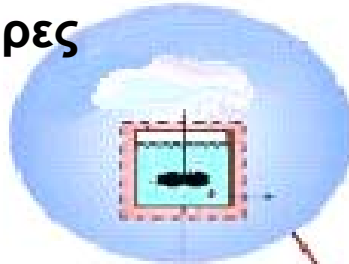


Μηχανική Βιοδιεργασιών

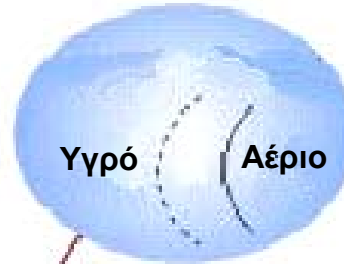


Εφαρμογή των αρχών της μηχανικής με στόχο τη βελτιστοποίηση βιοκαταλυτικών διεργασιών

**Βιοαντιδραστήρες
& κινητική**



**Φαινόμενα
μεταφοράς**



Ρεολογία



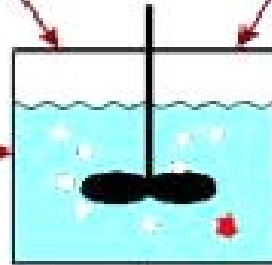
**Ανάκτηση
προϊόντων**



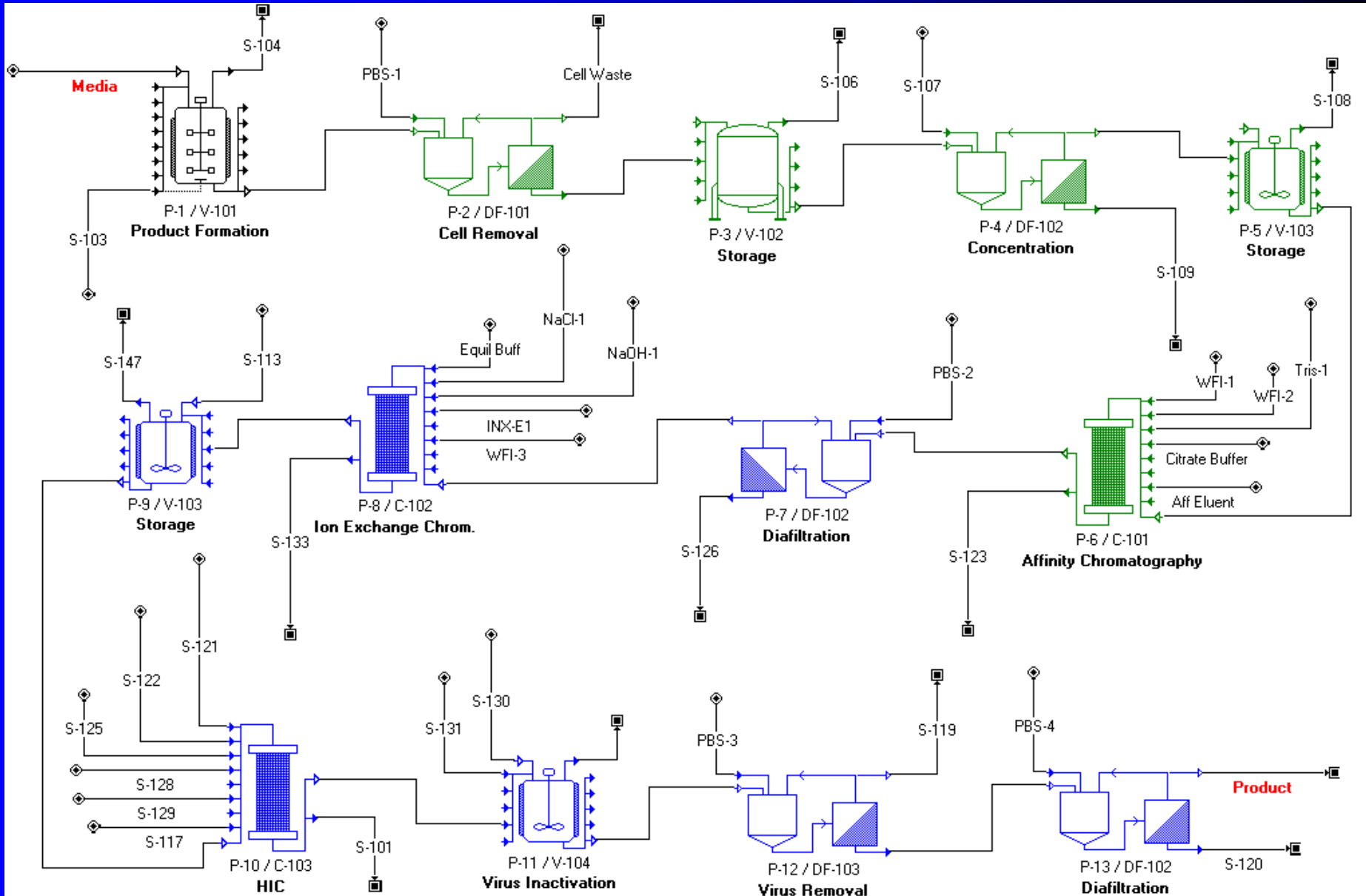
**Ρύθμιση
διεργασιών**



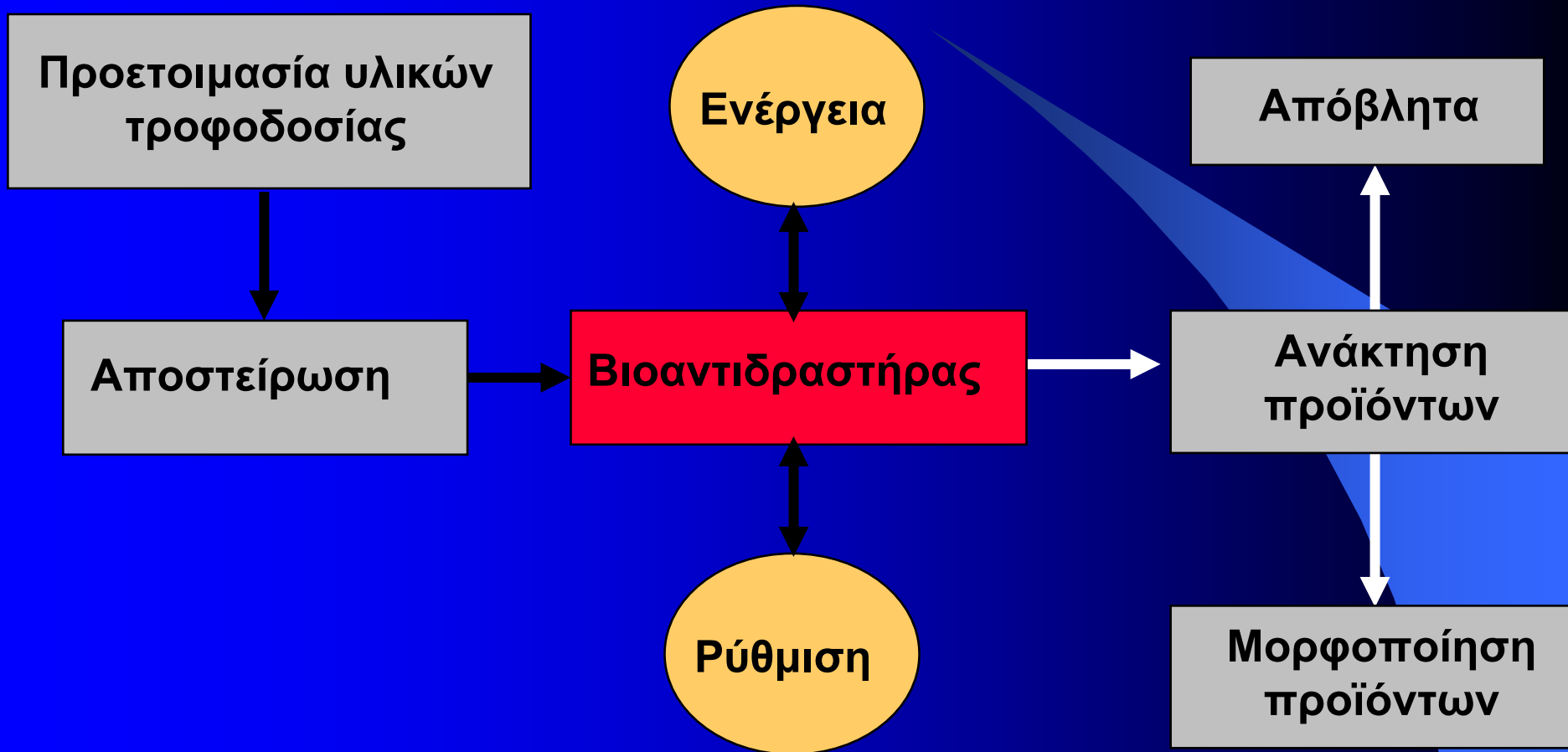
**Οικονομοτεχνική
ανάλυση**



Διάγραμμα παραγωγής ινσουλίνης



Βιοδιεργασία

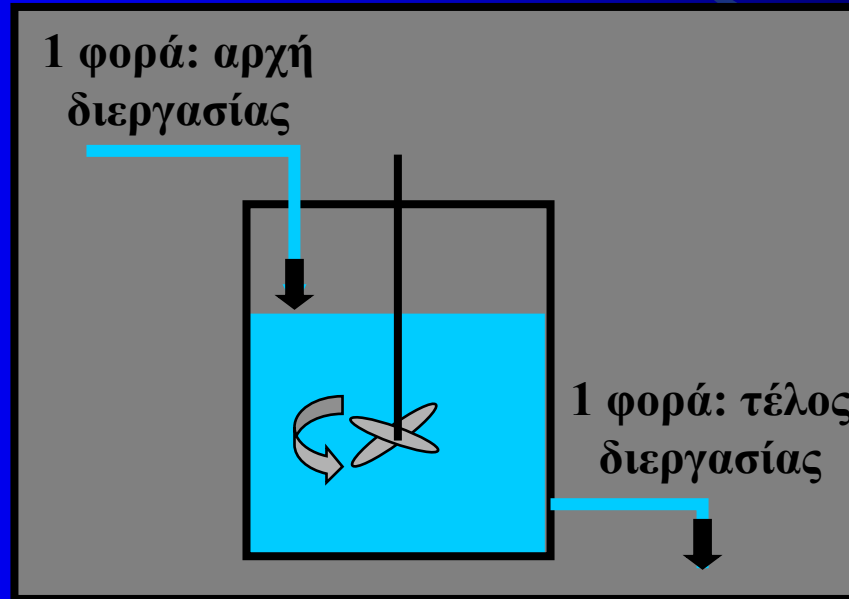


Βιοαντιδραστήρες

Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο λειτουργίας

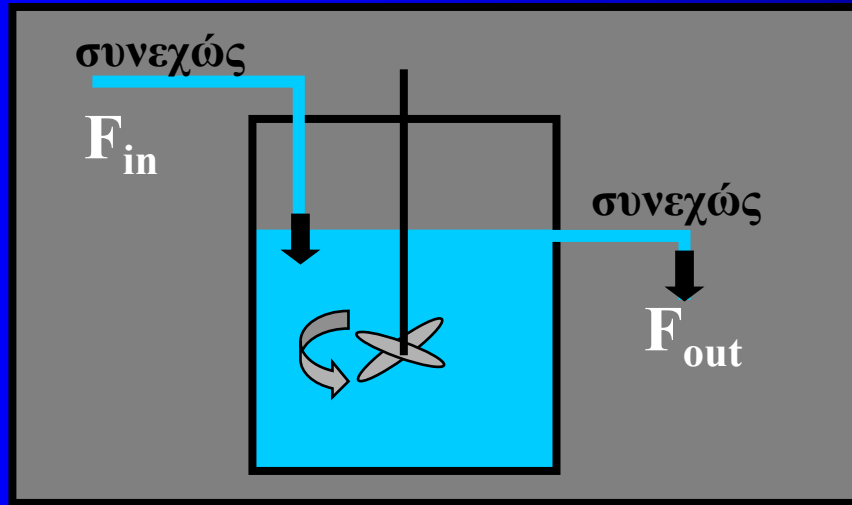
- Διαλείποντος έργου
- Συνεχούς έργου
- Ημιδιαλείποντος έργου

Βιοαντιδραστήρες διαλείποντος έργου



Video

Βιοαντιδραστήρες συνεχούς έργου



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

ΤΑΧΥΤΗΤΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

(Dilution rate)

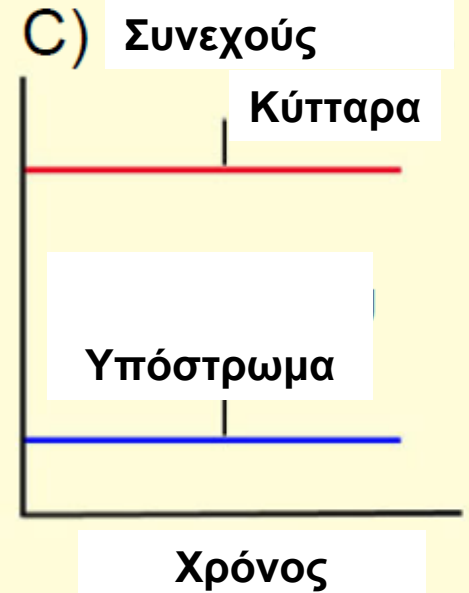
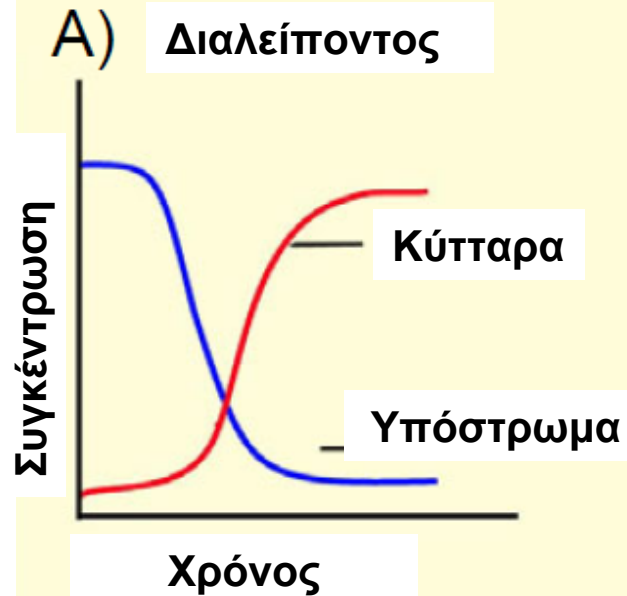
Σταθερός όγκος $F_{in} = F_{out}$

Συγκεντρώσεις ρεύματος εξόδου = Συγκεντρώσεις βιοαντιδραστήρα

Σταθερές τιμές συγκεντρώσεων

Video

Μικροβιακή ανάπτυξη ανάλογα με τον τύπο λειτουργίας



Επιλογή τρόπου λειτουργίας

ΔΙΑΛΕΙΠΟΥΣΑ



- Σχετική απλότητα και χαμηλότερο κόστος εξοπλισμού
- Χαμηλότερος κίνδυνος μολύνσεων
- Μικρότερος κίνδυνος μετάλλαξης επιστροφής
- Ευελιξία στον προγραμματισμό της βιομηχανικής παραγωγής
- Μικρότερη ευαισθησία σε έκτακτα περιστατικά και διαταραχές

ΣΥΝΕΧΗΣ

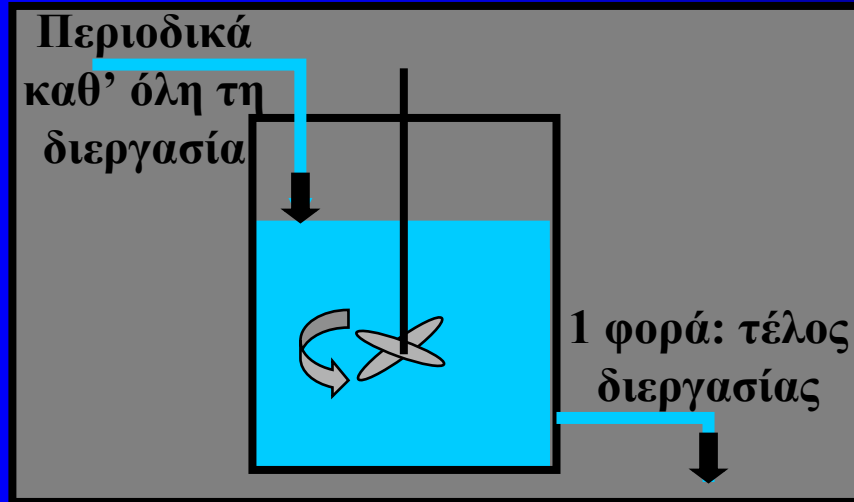
- Μικρότερος χρόνος μη παραγωγικών διαδικασιών (downtime)
- Ομοιογενές προϊόν
- Ευκολότερος έλεγχος ρυθμού ανάπτυξης
- Αύξηση παραγωγικότητας διεργασιών επεξεργασίας προϊόντος



- Μεγαλύτερο μέγεθος βιοαντιδραστήρων
- Μείωση παραγωγικότητας λόγω χρόνου προσαρμογής

- Δυσκολότερη διατήρηση ασηπτικών συνθηκών
- Έλλειψη συμμόρφωσης με απαιτήσεις ποιότητας (ξεχωριστές παρτίδες)
- Πιθανή ελάττωση απόδοσης λόγω απώλειας πλασμιδίων
- Κάποια προϊόντα δεν παράγονται ικανοποιητικά
- Πιθανή διαφοροποίηση απόδοσης λόγω μεταβολής ρεύματος τροφοδοσίας

Βιοαντιδραστήρες ημιδιαλείποντος έργου



Video

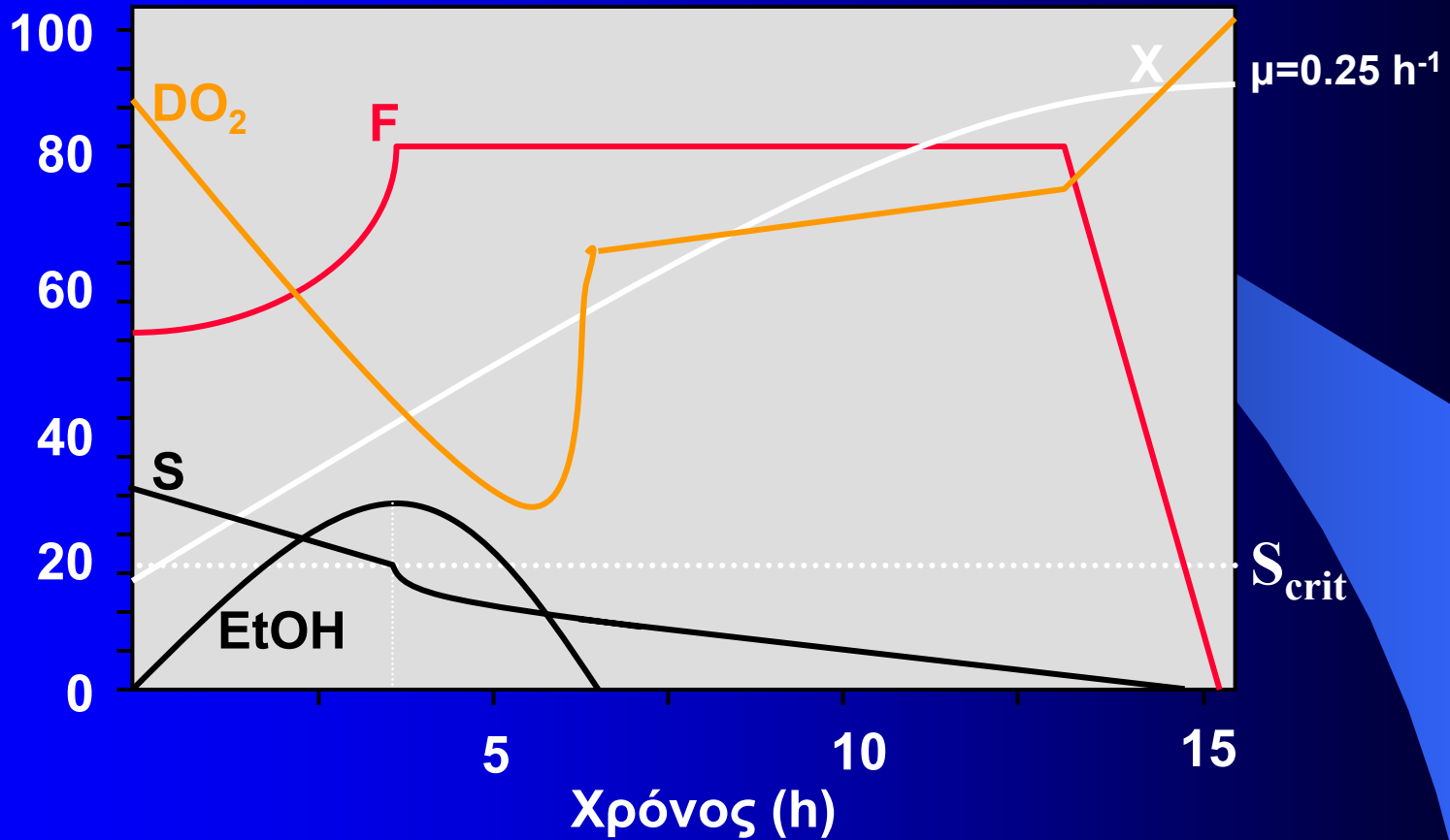
Διεργασίες ημιδιαλείποντος έργου - Παράδειγμα παραγωγής ζύμης αρτοποιίας

Ύπαρξη ρυθμοκαθοριστικού σταδίου στο μεταβολισμό του πυροσταφυλικού μέσω της αναπνευστικής δραστηριότητας. Πάνω από μια κρίσιμη τιμή του S (30-40 g/l) παρατηρείται αερόβια παραγωγή αιθανόλης με σκοπό την αναγέννηση του NAD^+ .

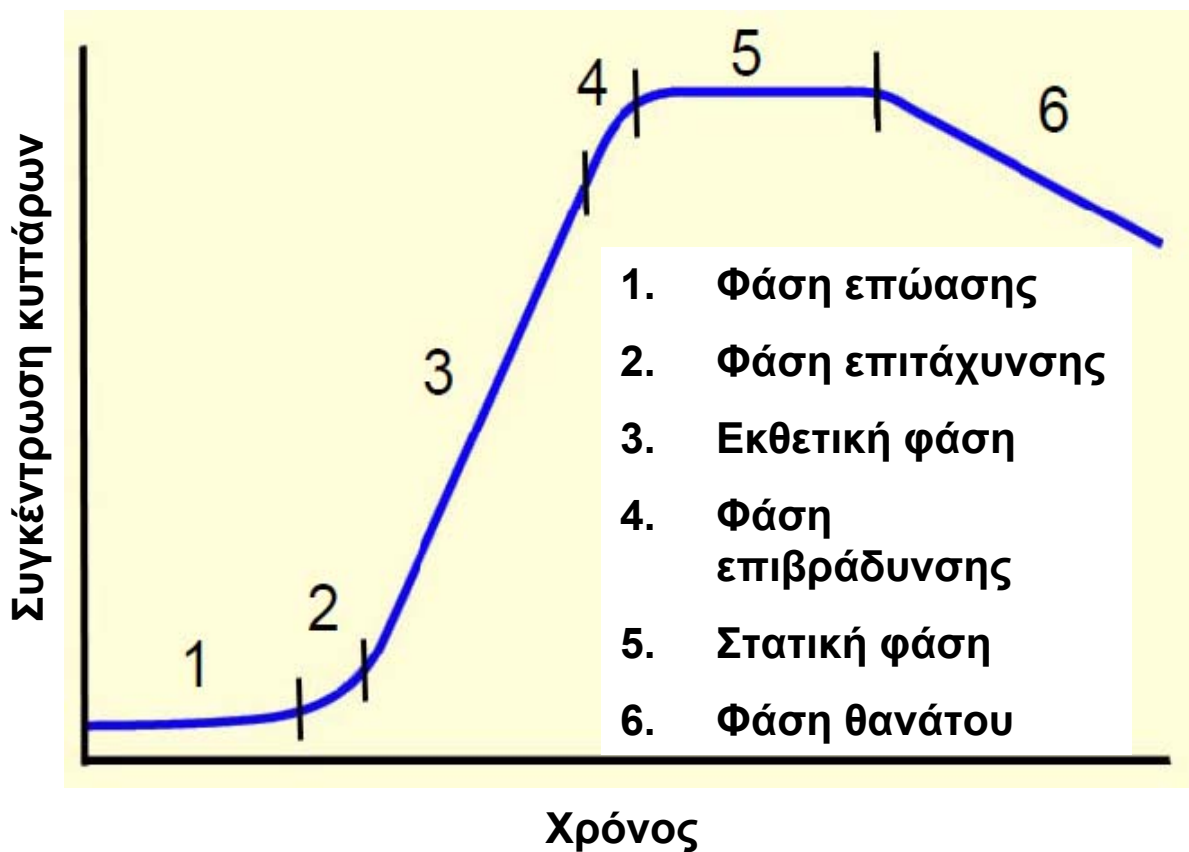
Σε διεργασία διαλείποντος έργου:

- Για την επίτευξη μεγάλης συγκέντρωσης κυττάρων απαιτείται μεγάλη συγκέντρωση υποστρώματος
- Οι απαιτήσεις σε O_2 δεν μπορούν να καλυφθούν
- Παράγεται αιθανόλη λόγω μεταβολικής υπερχύλισης (φαινόμενο Crabtree) μειώνοντας την απόδοση και προκαλώντας αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης

Εξέλιξη διεργασίας ημιδιαλείποντος έργου



Μικροβιακή ανάπτυξη σε συνθήκες διαλείποντος έργου



εκθετική φάση

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

μ : ειδικός ρυθμός ανάπτυξης

Εξίσωση Monod

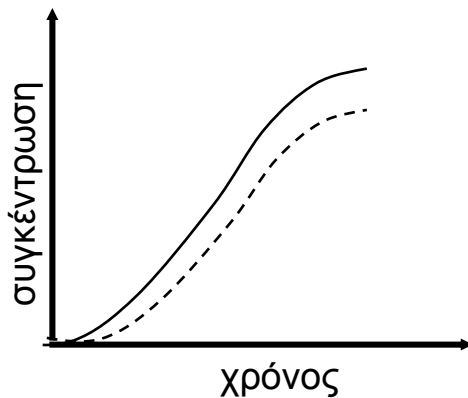
$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S}$$

S: συγκέντρωση υποστρώματος

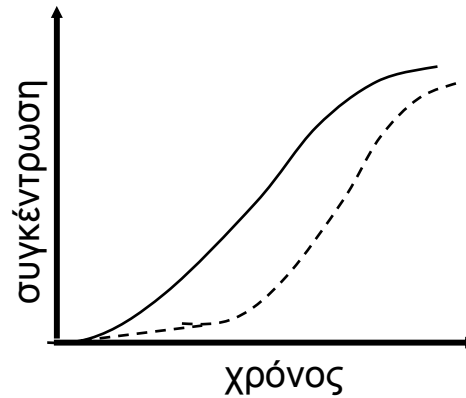
Μοντέλα παραγωγής μικροβιακών προϊόντων

ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Σχετιζόμενο με την
κυτταρική ανάπτυξη

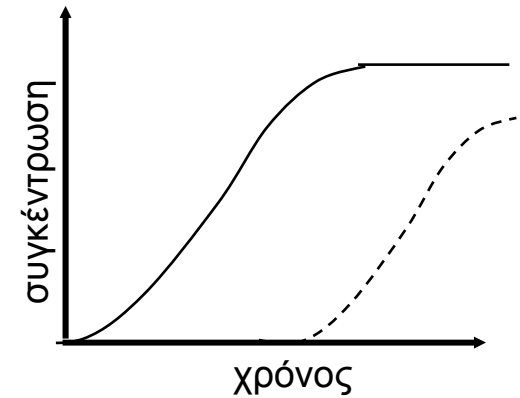


Μικτό μοντέλο



ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Μη σχετιζόμενο με την
κυτταρική ανάπτυξη



Leudeking-Piret

$$\frac{dP}{dt} = a * \frac{dx}{dt}$$

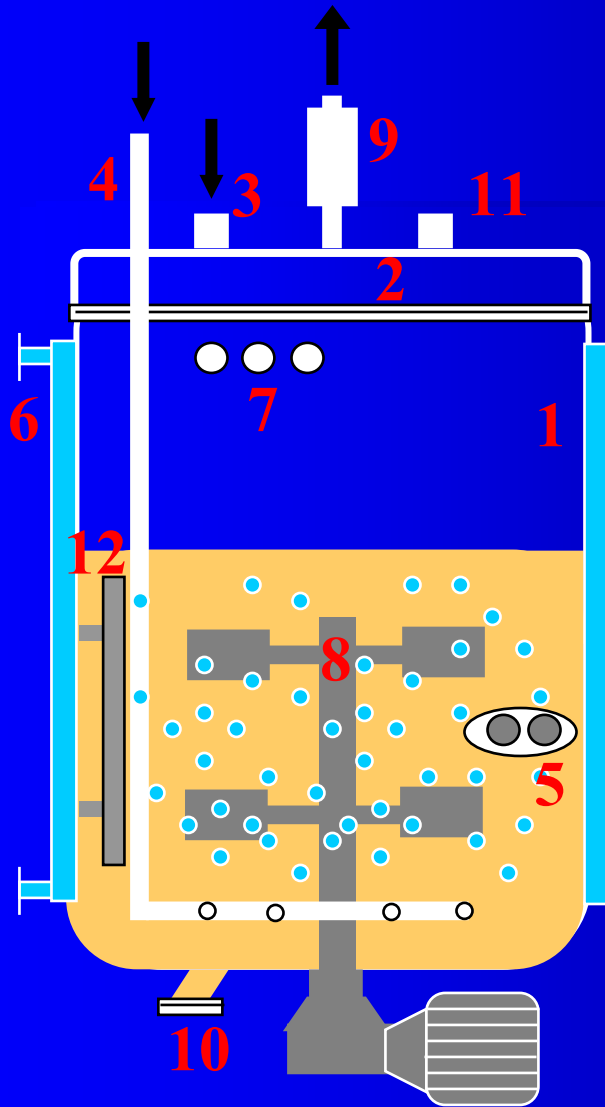
$$\frac{dP}{dt} = \left(a * \frac{dx}{dt} \right) + (b * x)$$

$$\frac{dP}{dt} = b * x$$

Brown - Vass

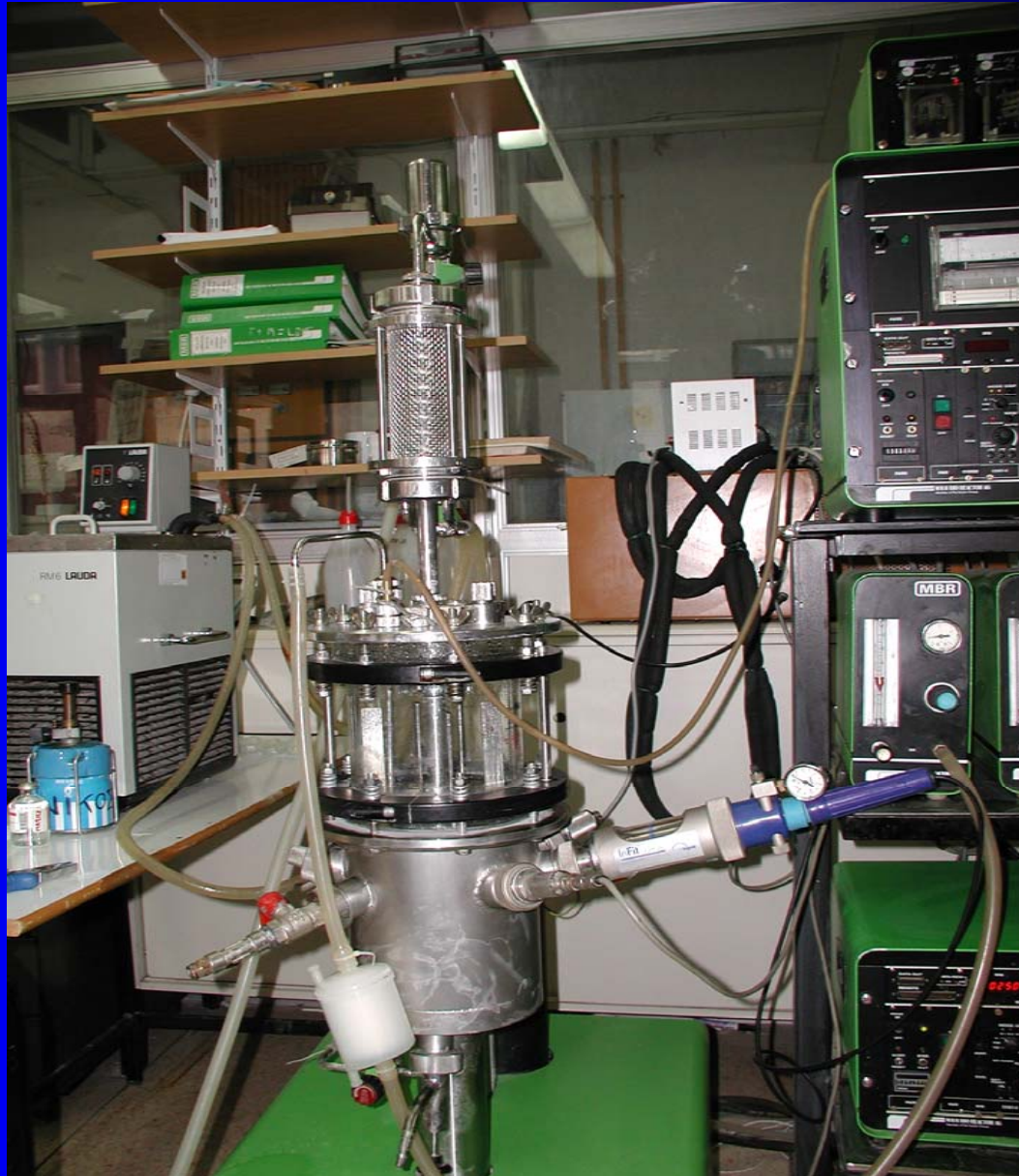
$$\frac{dP}{dt} = a * \frac{dx(t-t_m)}{dt}$$

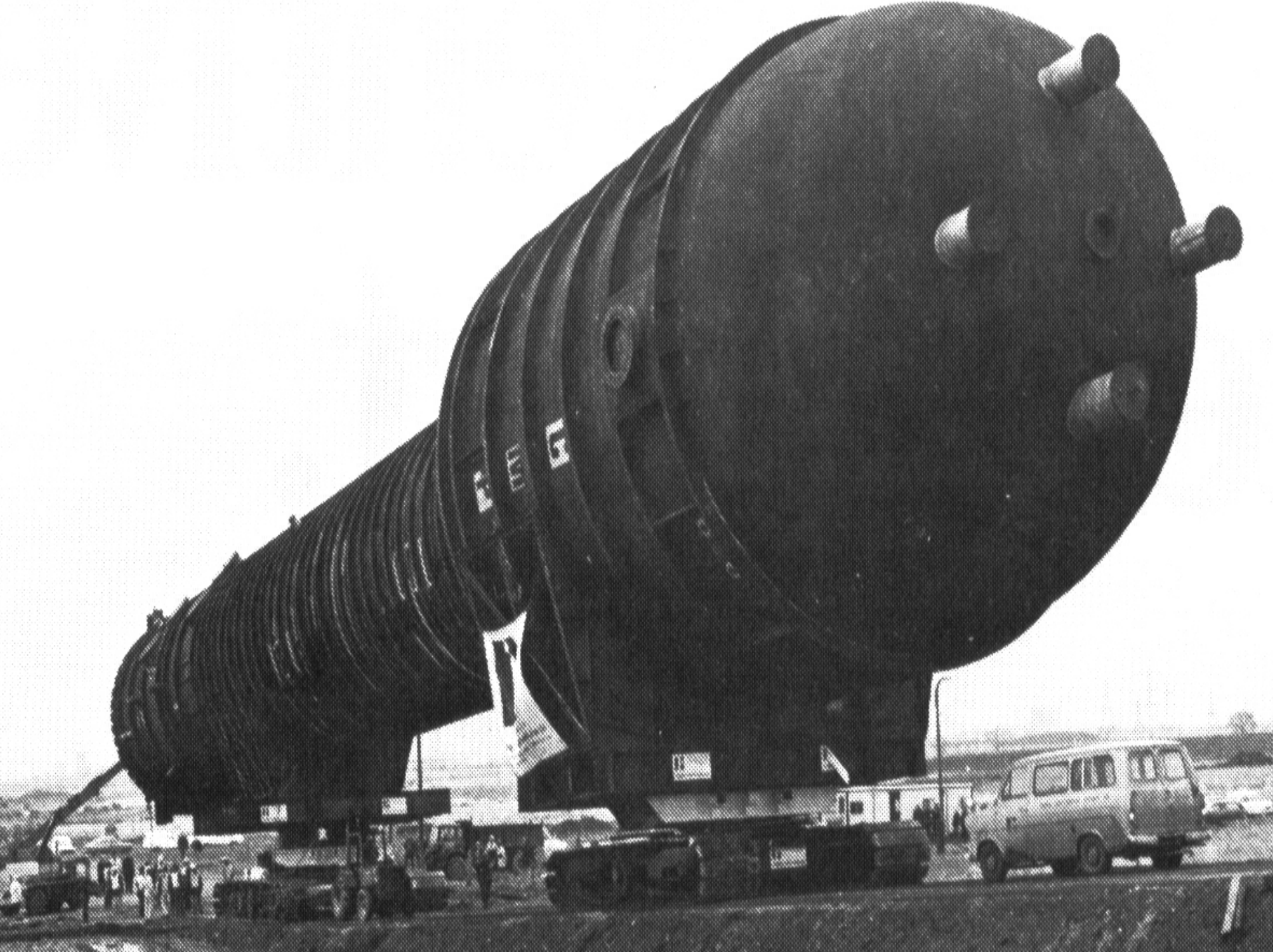
Ένας τυπικός ζυμωτήρας (πλήρους αναμίξεως)



1. Δοχείο ζύμωσης
2. Μετακινούμενο σκέπασμα
3. Είσοδος υποστρώματος-εμβολίου
4. Σύστημα εισόδου αέρα
5. Θυρίδες αισθητηρίων
6. Μανδύας ελέγχου T
7. Θυρίδες εισόδου (οξύ, βάση)
8. Αναδευτήρας
9. Έξοδος αέρα
10. Θυρίδα εξόδου
11. Βαλβίδα εκτόνωσης πίεσης
12. Πτερύγια εκτροπής ροής (baffles)

Ζυμωτήρας πλήρους αναμίξεως





Προϊόν: Pruteen (ζωοτροφή)

Υποστρώματα: CH_3OH , NH_3

Όγκος: 750 m^3 , **Ύψος:** 42 m, **Πλάτος:** 11 m

Καταλύτης: *Methylophilus methylotrophus*

ICI, Μ. Βρετανία (1981)



Τυπικές λειτουργίες ζυμωτήρα

Βασικές λειτουργίες

- Εμποδίζει την ανταλλαγή μικροοργανισμών ανάμεσα στο χώρο της ζύμωσης και το περιβάλλον (μολύνσεις)
- Διασφαλίζει την τροφοδότηση των κυττάρων με τα απαραίτητα για την επιβίωσή τους συστατικά
- Διατηρεί τις κρίσιμες μεταβλητές του περιβάλλοντος των κυττάρων στο επιθυμητό επίπεδο (T, pH)

Άλλες λειτουργίες

- Επιτρέπει την παρακολούθηση ενδεικτικών για την πορεία της διεργασίας παραμέτρων
- Εγγυάται την ασφάλεια των χειριστών κατά τη διάρκεια λειτουργίας της συσκευής

Κρίσιμες παράμετροι

- Αποστείρωση
- Μεταφορά O₂
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH
- Αντιμετώπιση αφρισμού

Αποστείρωση: Πώς ορίζεται και γιατί είναι απαραίτητη;

Αποστείρωση: Καταστροφή ή απομάκρυνση όλων των μικροοργανισμών που είναι δυνατό να έρθουν σε επαφή με τα θρεπτικά συστατικά ή τον εξοπλισμό μιας διεργασίας

Προβλήματα από την παρουσία ανεπιθύμητων μικροοργανισμών

- Παρεμπόδιση ανάπτυξης του παραγωγού στελέχους από τοξίνες
- Μείωση της απόδοσης της διεργασίας λόγω κατανάλωσης υποστρωμάτων ή αποικοδόμησης του προϊόντος από ένζυμα
- Αρνητική επίδραση στη διαδικασία ανάκτησης των προϊόντων

● Αποστείρωση

- Μεταφορά O_2
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH
- Αντιμετώπιση αφρισμού

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ

Κινητική αποστείρωσης

$$N = N_0 e^{-kt} \quad k = \alpha * e^{-\frac{E}{RT}}$$

όπου

N: αριθμός ζωντανών κυττάρων

k (ή kd): ειδικός ρυθμός θερμικής καταστροφής (min^{-1} ή h^{-1})

α : παράγοντας συχνότητας (min^{-1} ή h^{-1})

E: ενέργεια ενεργοποίησης θερμικής καταστροφής (cal mol^{-1})

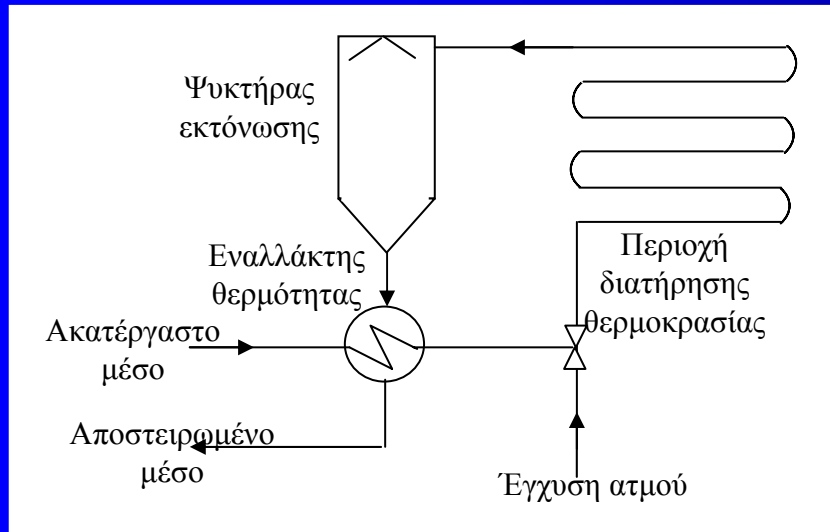
T: θερμοκρασία ($^{\circ}\text{K}$)

R: σταθερά του νόμου των αερίων ($1.98 \text{ cal mol}^{-1} \text{ }^{\circ}\text{K}^{-1}$)

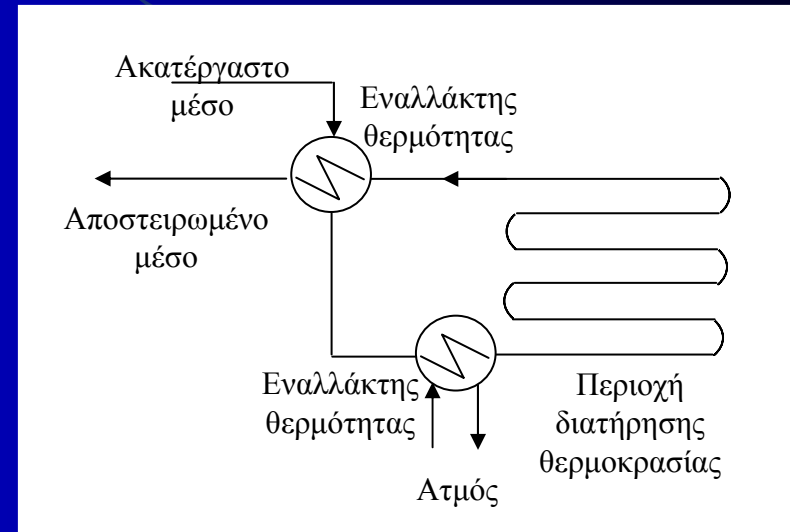
$$\nabla_{\text{ΟΛΙΚΟ}} = \ln \frac{N_0}{N}$$

Θερμική αποστείρωση συνεχούς έργου

Έγχυση ατμού και ταχύτατη ψύξη



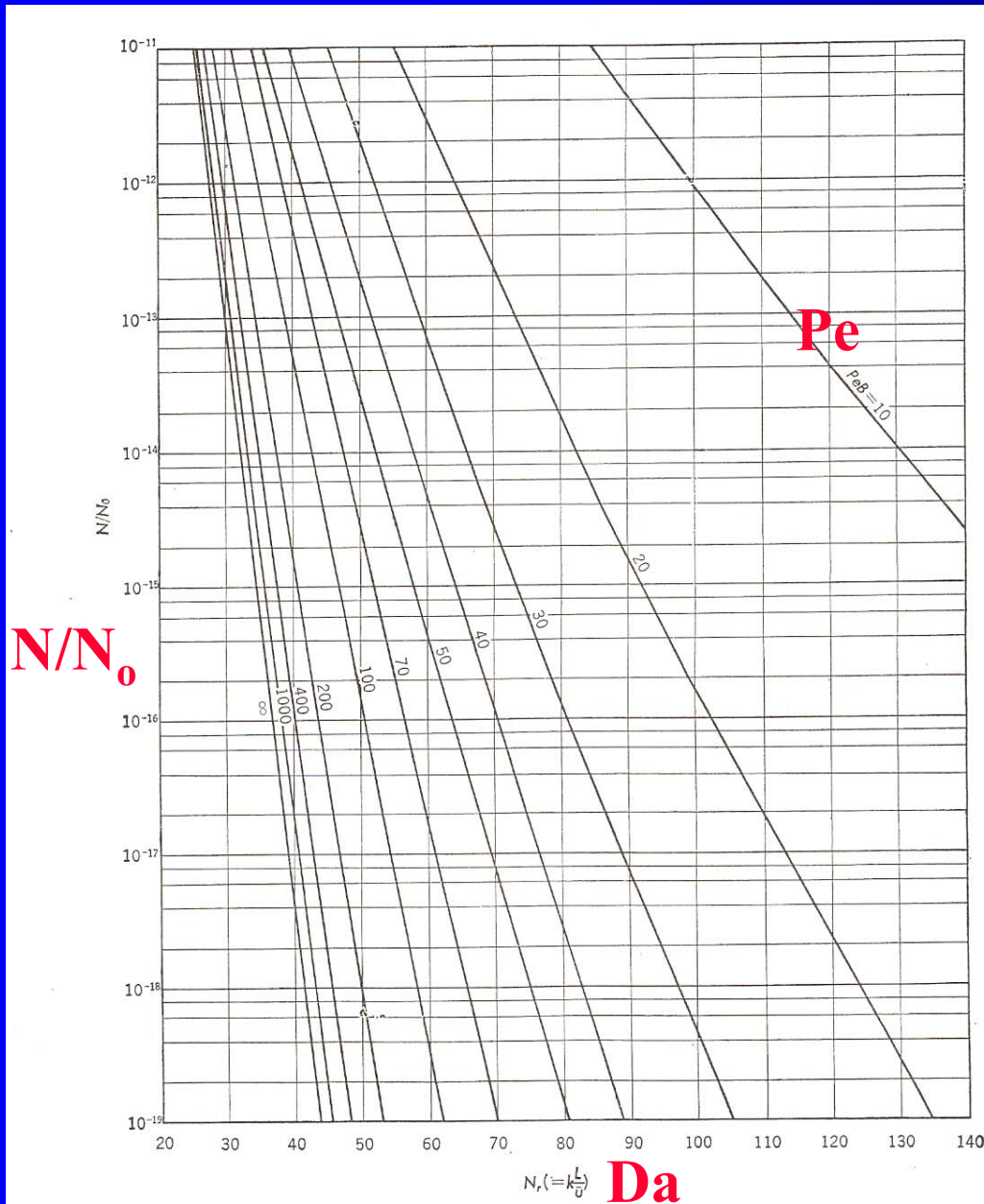
Ανταλλαγή θερμότητας μέσω εναλλακτών



- μειώνει σημαντικά τις αλλοιώσεις των συστατικών του μέσου
- επιτυγχάνεται οικονομία κατά 20-25% λόγω μικρότερης κατανάλωσης ατμού
- απαιτείται μικρότερος χρόνος αφού τα στάδια θέρμανσης & ψύξης είναι ακαριαία
- περισσότερο αξιόπιστη διεργασία ως προς την κλιμάκωση μεγέθους.

ΜΗΚΟΣ - ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Διάγραμμα θερμικής καταστροφής κυττάρων



Εξάρτηση της θερμικής καταστροφής κυττάρων από τους αριθμούς Peclet και Damkohler. N_0 N : αριθμός ζωντανών κυττάρων που εισέρχονται και εξέρχονται από το τμήμα διατήρησης της θερμοκρασίας αποστείρωσης, αντίστοιχα.

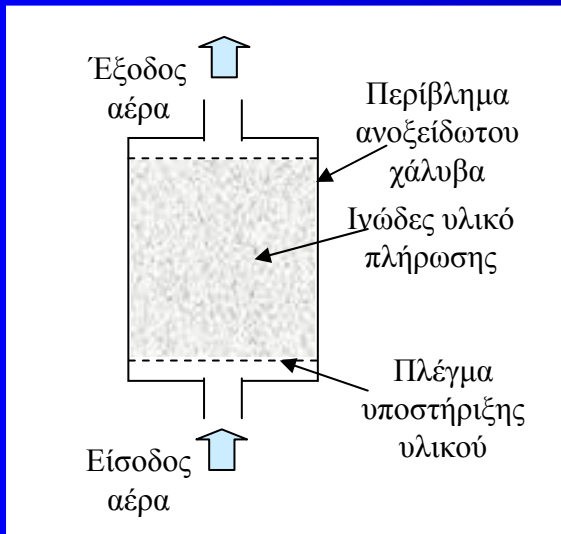
$$Pe = \frac{uL}{D_z}$$

u = μέση γραμμική ταχύτητα ρευστού
 L = μήκος σωλήνα
 k_d = ειδικός ρυθμός θερμικής καταστροφής
 D_z = συντελεστής αξονικής διασποράς

$$Da = \frac{k_d L}{u}$$

Αποστείρωση αέριων ρευμάτων

- φίλτρα μεμβρανών
- πύργοι σταθερής κλίνης (packed tower) κάποιου ινώδους υλικού, όπως χαρτί, βαμβάκι, υαλοβάμβακας



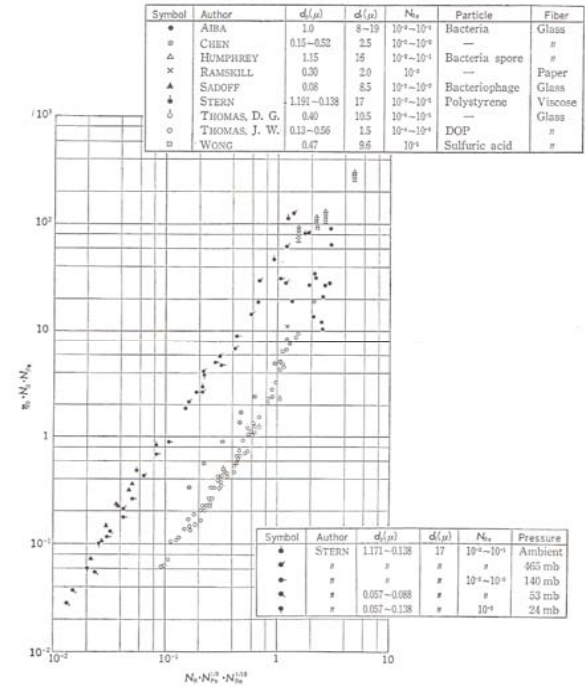
ΜΗΚΟΣ

- Άμεση ανάσχεση από τις ίνες (direct interception)
- Αδρανειακή ενσφήνωση (inertial impaction)
- Ανάσχεση λόγω διάχυσης (diffusional interception)
- Ηλεκτροστατική έλξη (electrostatic attraction)

Προσδιορισμός του συντελεστή συγκράτησης (η_o)

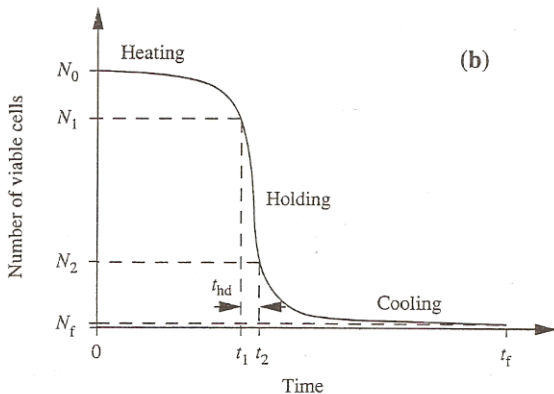
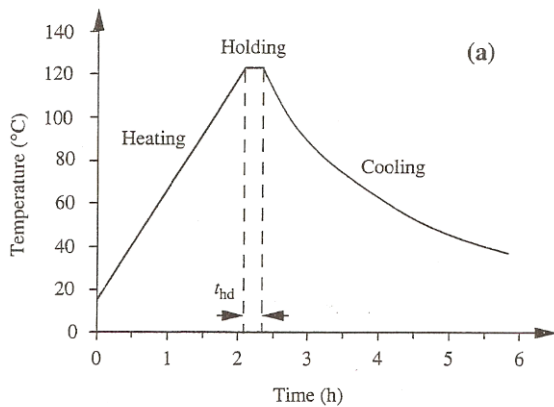
$$\ln\left(\frac{N_o}{N}\right) = \frac{4\eta_o(1 + 4.5 \times a)aL}{\pi d_f(1 - a)}$$

$$n_o N_R Pe$$



$$N_R \sqrt[3]{Pe} \sqrt[18]{Re}$$

Θερμική αποστείρωση διαλείποντος έργου



$$\nabla_{\text{ΟΛΙΚΟ}} = \ln \frac{N_0}{N} = a \int_0^t e^{\frac{-E}{RT}} dt = \nabla_{\text{ΘΕΡΜΑΝΣΗ}} + \nabla_{\text{ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ}} + \nabla_{\text{ΨΥΞΗ}}$$

Τύπος μεταφοράς θερμότητας	Συνάρτηση T=f(t)	Σταθερές εξισώσεων
Απευθείας εισαγωγή ατμού	$T = T_o \left[1 + \frac{At}{1 + \Gamma t} \right]$	$A = \frac{hM_s}{M_m c_p T_o} \quad \Gamma = \frac{M_s}{M_m}$
Θέρμανση με ηλεκτρική αντίσταση	$T = T_o (1 + At)$	$A = \frac{Q}{M_m c_p T_o}$
Θέρμανση με ατμό	$T = T_{ci} (1 + Be^{-At})$	$A = \frac{-US}{M_m c_p} \quad B = \frac{T_o - T_s}{T_o}$
Ψύξη	$T = T_s (1 + Be^{-At})$	$A = \left(\frac{M_w c_{pw}}{M_m c_p} \right) \left(1 - e^{\left[\frac{-US}{M_w c_{pw}} \right]} \right)$ $B = \frac{T_o - T_{ci}}{T_{ci}}$

Μεταφορά οξυγόνου

Στόχος

Παροχή του απαραίτητου για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στοιχείου

- Αποστείρωση
- Μεταφορά O_2
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH

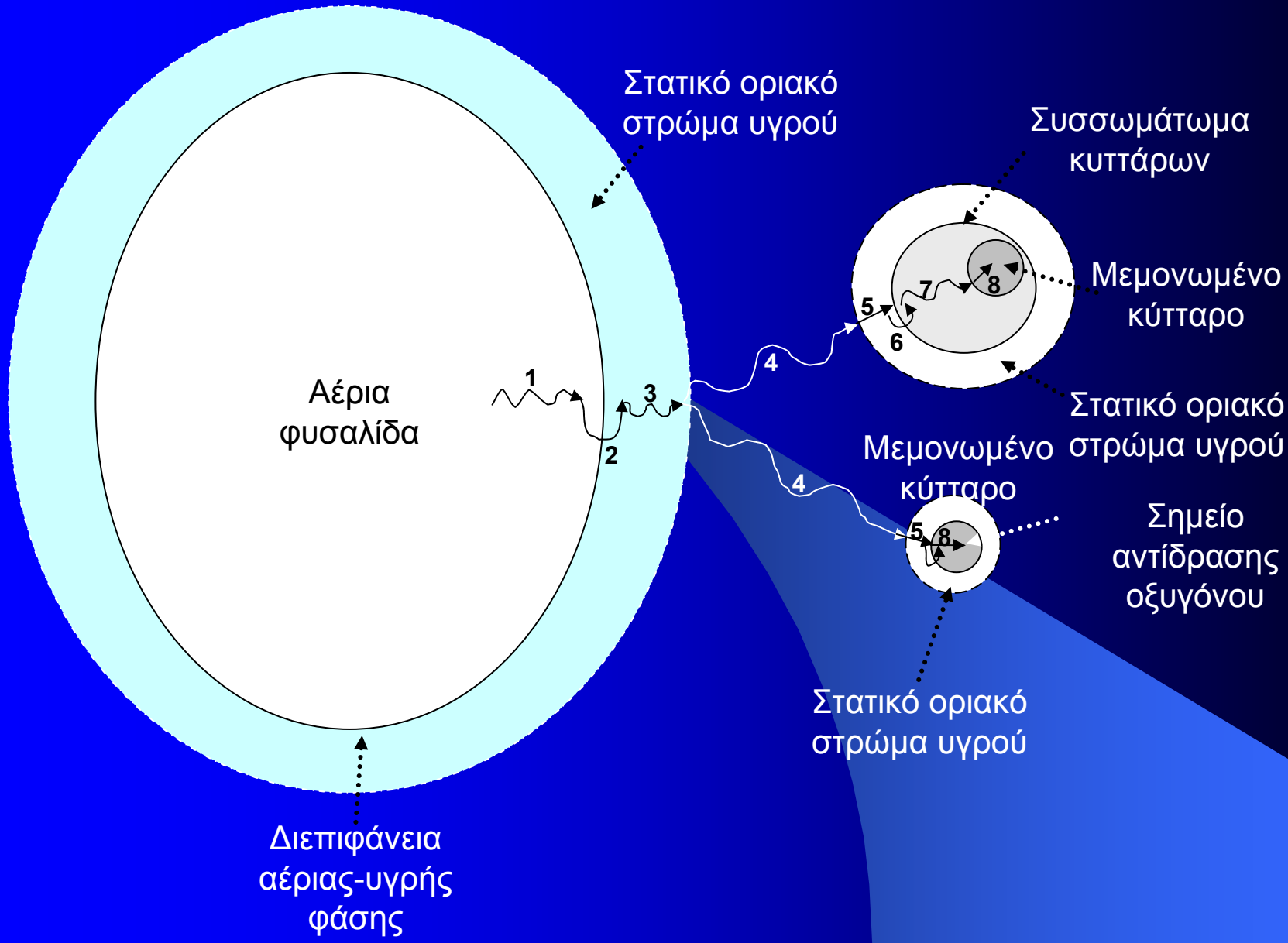
Μέθοδοι

- Διέλευση αέρα μέσα από τη μάζα του θρεπτικού μέσου

Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταφορά O_2

- Ρυθμός παροχής αέρα
- Ταχύτητα ανάδευσης
- Διάταξη αερισμού
- Γεωμετρία βιοαντιδραστήρα

Μεταφορά O_2 σε καλλιέργειες κυττάρων



Συντελεστής μεταφοράς O_2 σε ζυμωτήρες

- Αποστείρωση
- Μεταφορά O_2
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH

$$N_A = k_L * a * (m \times C_{AG} - C_{AL})$$



Διαλυτότητα $O_2 = C_{AL}^*$

1. Φυσαλίδες (**ΑΝΑΔΕΥΣΗ-ΜΕΣΟ**)
2. Αντιαφριστικές ουσίες
3. Θερμοκρασία
4. Πίεση και μερική πίεση O_2
5. Συγκέντρωση και μορφολογία κυττάρων

Κρίσιμη συγκέντρωση O_2

$$Q_o = q_o * x$$

Q_o : απαίτηση κυττάρων σε O_2 ($g\ l^{-1}\ s^{-1}$)

q_o : ειδικός ρυθμός κατανάλωσης O_2 ($g\ g^{-1}\ s^{-1}$)

$$N_A = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) = q_o * x$$

$$x_{\max} = \frac{k_L a C_{AL}^*}{q_o}$$

$$(k_L a)_{crit} = \frac{q_o x}{(C_{AL}^* - C_{crit})}$$

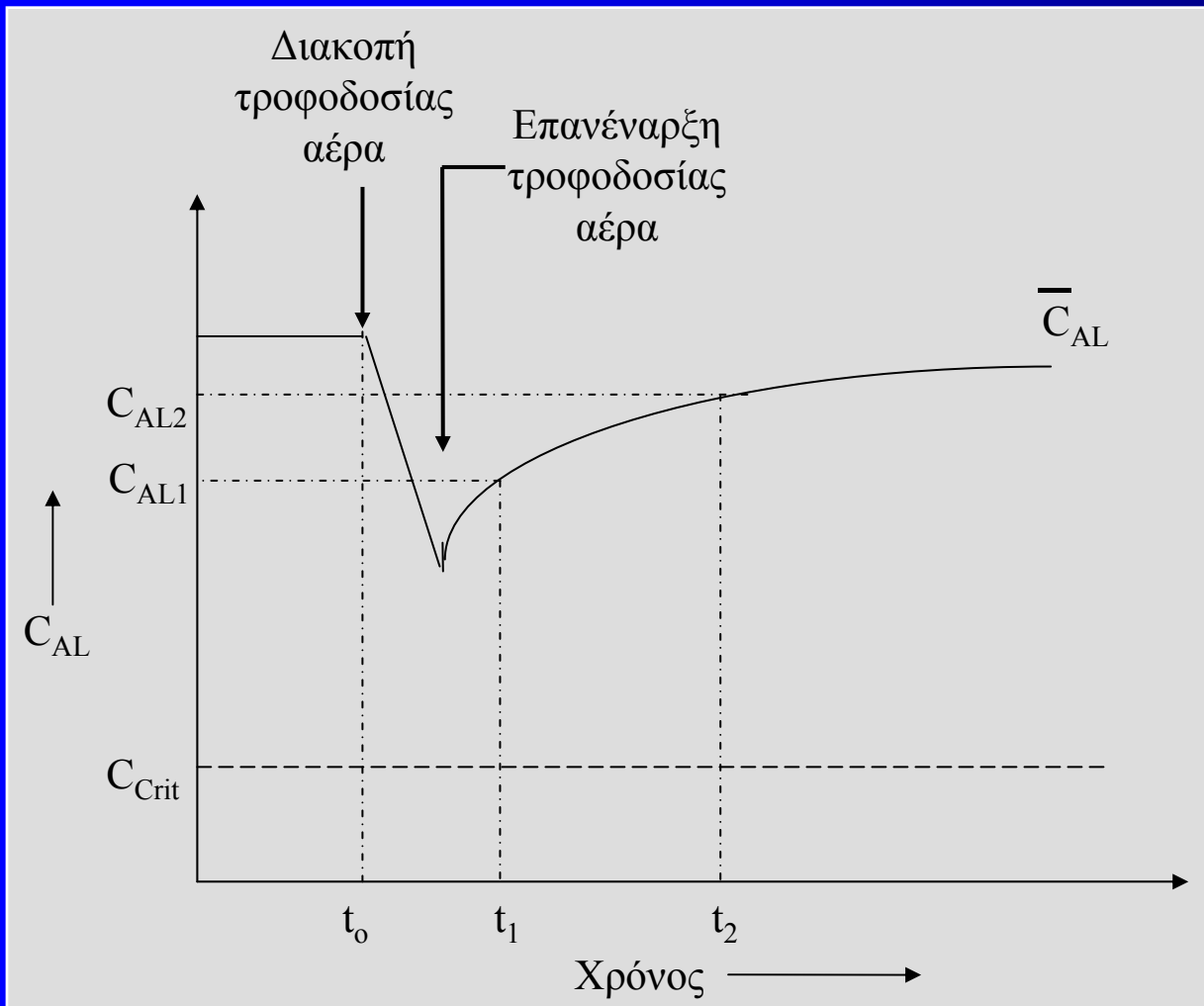
Υπολογισμός $k_L \alpha$ - Μέτρηση O_2 σε σταθερή κατάσταση

$$N_A = \frac{1}{V_L} \left[(F_g C_{AG})_i - (F_g C_{AG})_o \right]$$

όπου V_L : όγκος του υγρού στο ζυμωτήρα
 F_g : ογκομετρική παροχή αέρα
 C_{AG} : συγκέντρωση O_2 στην αέρια φάση
 i, o : δείκτες που υποδηλώνουν το ρεύμα εισόδου και εξόδου, αντίστοιχα

$$N_A = k_L \alpha (C_{AL}^* - C_{AL})$$

Υπολογισμός $k_L a$ - Μέθοδος Δυναμικής Απόκρισης



C_{AL}^* Διαλυτότητα O_2

\bar{C}_{AL} Συγκέντρωση ισορροπίας O_2

Στο στάδιο διακοπής της τροφοδοσίας δεν υπάρχει μεταφορά μάζας

Μέθοδος Δυναμικής Απόκρισης

$$\frac{dC_{AL}}{dt} = k_L a (C_{AL}^* - C_{AL}) - q_o x$$

$$q_o x = k_L a (C_{AL}^* - \bar{C}_{AL})$$

$$k_L a = \frac{\ln \left(\frac{\bar{C}_{AL} - C_{AL 1}}{\bar{C}_{AL} - C_{AL 2}} \right)}{t_2 - t_1}$$

Μεταφορά θερμότητας

- Αποστείρωση
- Μεταφορά O₂
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH
- Αντιμετώπιση αφρισμού

Στόχος

Διατήρηση της βέλτιστης για την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος θερμοκρασίας

Μέθοδοι

- Εξωτερικός μανδύας
- Εσωτερικό σπείρωμα με κλειστό κύκλωμα κυκλοφορίας

Παράγοντες που επηρεάζουν το ρυθμό μεταφοράς θερμότητας

- Έκλυση θερμότητας από τον αναπτυσσόμενο μικροοργανισμό
- Είσοδος/έξοδος αέριων ή υγρών ρευμάτων
- Μηχανική ανάδευση
- Ρυθμός απωλειών ενέργειας στο περιβάλλον

Σκοπός της ανάδευσης

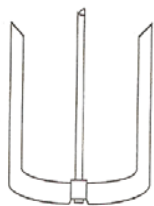
- Αποστείρωση
- Μεταφορά O₂
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH
- Αντιμετώπιση αφρισμού

- ✓ ανακάτεμα διαλυτών συστατικών του θρεπτικού μέσου
- ✓ διασπορά αερίων (π.χ. αέρας) μέσα σε υγρό με τη μορφή μικρών φυσαλίδων
- ✓ διατήρηση στερεών σωματιδίων (π.χ. κυττάρων) σε αιώρηση
- ✓ διασπορά μη αναμείξιμων υγρών με σχηματισμό γαλακτώματος ή αιωρήματος σταγονιδίων
- ✓ ενίσχυση της μεταφοράς θερμότητας από και προς το υγρό μέσο

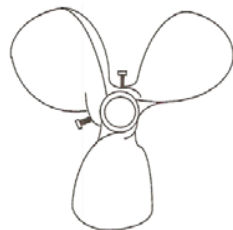
Διατάξεις ανάμειξης – Επιλογή με βάση το ιξώδες

ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΑΝΑΔΕΥΣΗ

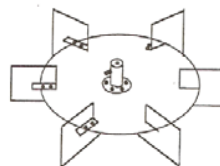
Τάρακτρα (impellers)



Άγκυρα



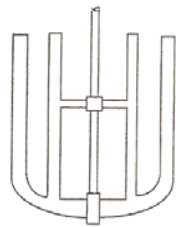
Προπέλα



Τουρμπίνα 6 επίπεδων πτερυγίων



Πτερύγιο ή Κώπη



Άγκυρα με θύρα



Έλικας

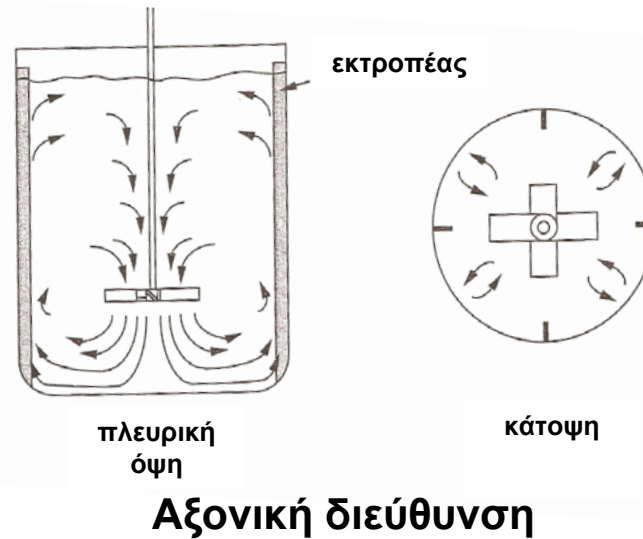
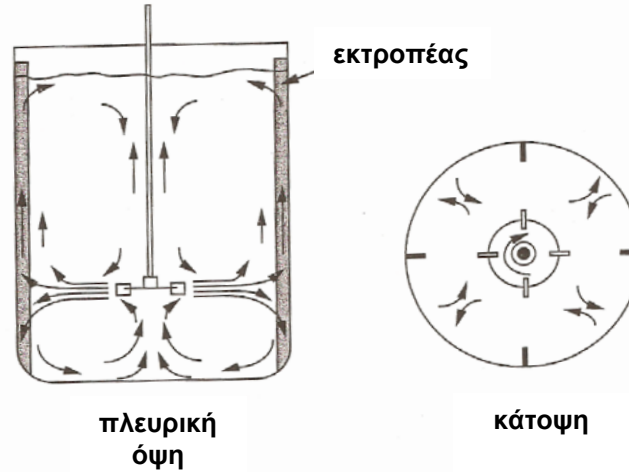
Ιξώδες vs Τύπος τάρακτρου

1	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶
		Άγκυρα				
		προπέλα				
		τουρμπίνα επίπεδων πτερυγίων				
			πτερύγιο			
				Άγκυρα θύρα		
					έλικας	

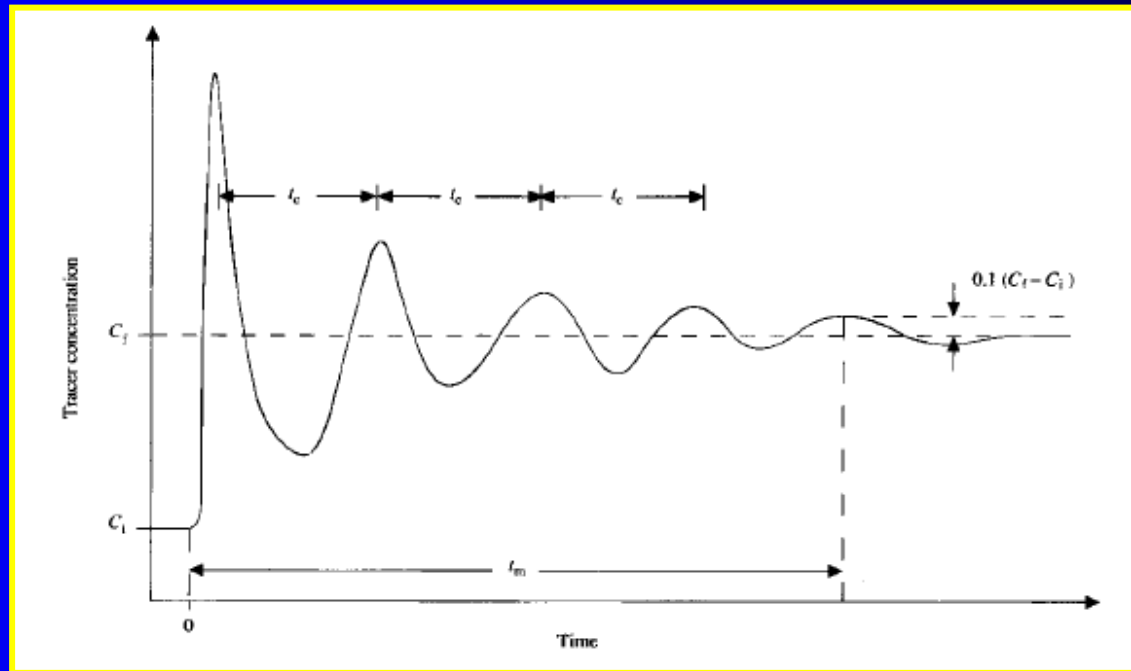
Εκτός από τα τάρακτρα για την ενίσχυση της ανάδευσης υπάρχουν οι εκτροπείς (baffles)

Πρότυπα & μηχανισμοί ανάδευσης

Ακτινική διεύθυνση



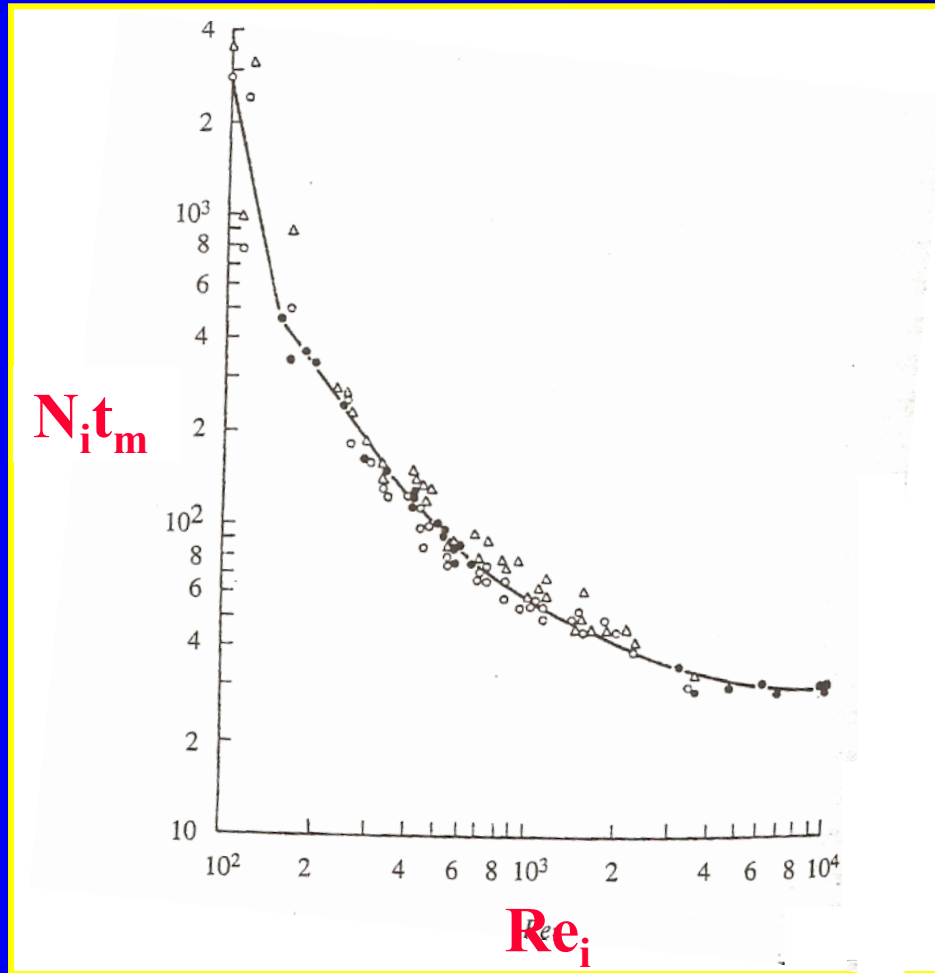
Χρόνος ανάμειξης



Εξαρτάται από:

- ✓ μέγεθος βιοαντιδραστήρα
- ✓ μέγεθος τράκτρου
- ✓ ταχύτητα περιστροφής τράκτρου
- ✓ ιδιότητες υγρού (π.χ ιξώδες)

Χρόνος Ανάμειξης & Re_i



Απαιτούμενη Ισχύς

$$P = N_p \rho N_i^3 D_i^5$$

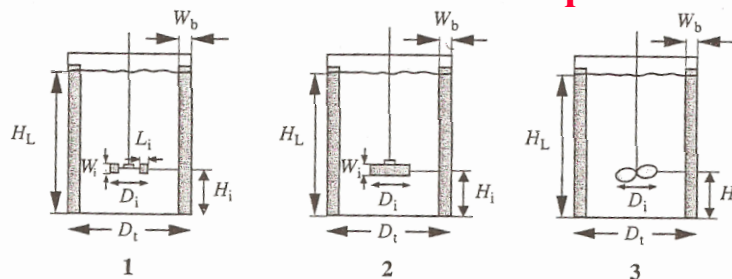
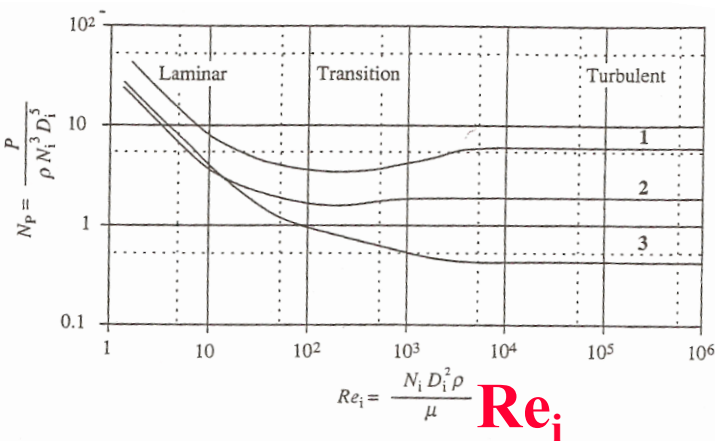
P: απαιτούμενη ισχύς

ρ : πυκνότητα ρευστού

N_i : ταχύτητα περιστροφής αναδευτήρα

D_i : διάμετρος τaráκτρου

Αριθμός
ισχύος



Impeller	D_t/D_i	H_L/D_i	H_i/D_i	Baffles	
				W_b/D_t	Number
1. Rushton turbine $W_i/D_i = 0.2, L_i/D_i = 0.25$	3	3	1	0.1	4
2. Paddle $W_i/D_i = 0.25$	3	3	1	0.1	4
3. Marine propeller Pitch = D_i	3	3	1	0.1	4

Ρύθμιση pH

- Αποστείρωση
- Μεταφορά O₂
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- **Ρύθμιση pH**
- Αντιμετώπιση αφρισμού

Στόχος

Διατήρηση του βέλτιστου για την παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος pH

Μέθοδοι

- Προσθήκη διαλυμάτων οξέος και βάσεως
- Χρήση ουσιών με ρυθμιστική ικανότητα (buffering capacity) στο μέσο ανάπτυξης
- Χρήση κατάλληλης πηγής αζώτου (π.χ. NH₃ ή αλάτων με NH₄⁺)

Δυνατότητα αυτόματης
ρύθμισης

Αντιμετώπιση αφρισμού

- Αποστείρωση
- Μεταφορά O₂
- Μεταφορά θερμότητας
- Ανάδευση
- Ρύθμιση pH
- Αντιμετώπιση αφρισμού

Στόχος

Πρόληψη μολύνσεων και απωλειών του περιεχομένου του βιοαντιδραστήρα

Μέθοδοι

- Προσθήκη αντιαφριστικών ουσιών (ελάχιστη δυνατή ποσότητα)
- Χρήση αντιαφριστικών πτερυγίων
- Ρύθμιση ανάδευσης
- Ρύθμιση παροχής αέρα

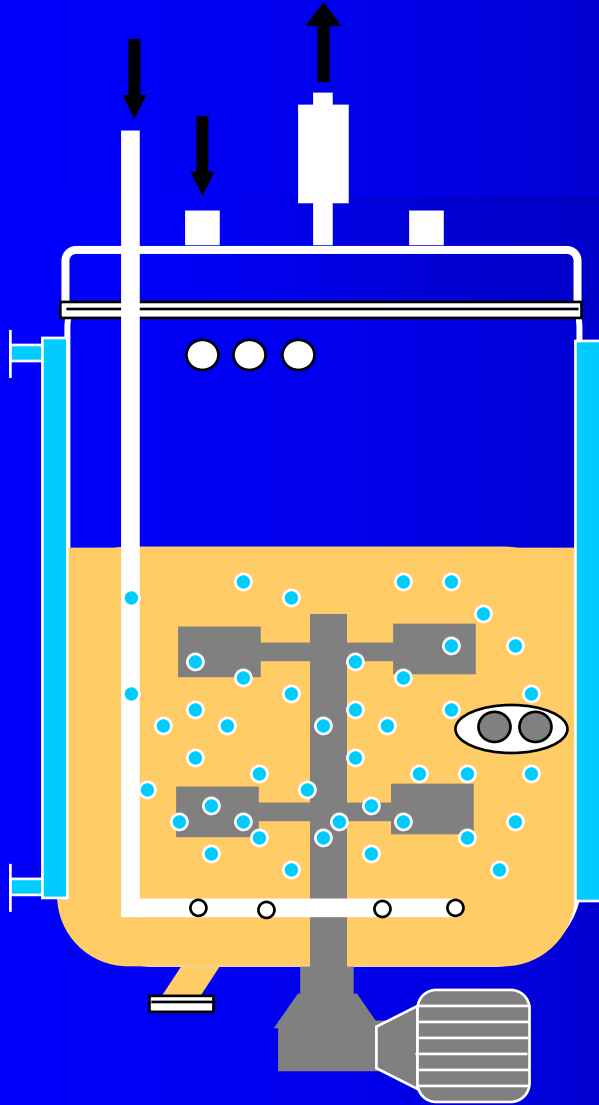
Δυνατότητα αυτόματης
ρύθμισης

Τύποι βιοαντιδραστήρων

Από τη μεγάλη ποικιλία βιοαντιδραστήρων που έχουν σχεδιαστεί, οι ακόλουθοι τύποι είναι οι περισσότερο διαδεδομένοι:

- Πλήρους αναμίξεως (stirred tank bioreactor)
- Στήλης φυσαλίδων (bubble column bioreactor)
- Βρόχου (loop bioreactor)
- Κλίνης (bed bioreactor)
- Μεμβρανών (membrane bioreactor)
- Ζύμωσης στερεάς κατάστασης (solid-state fermentor)

Βιοαντιδραστήρες πλήρους αναμίξεως

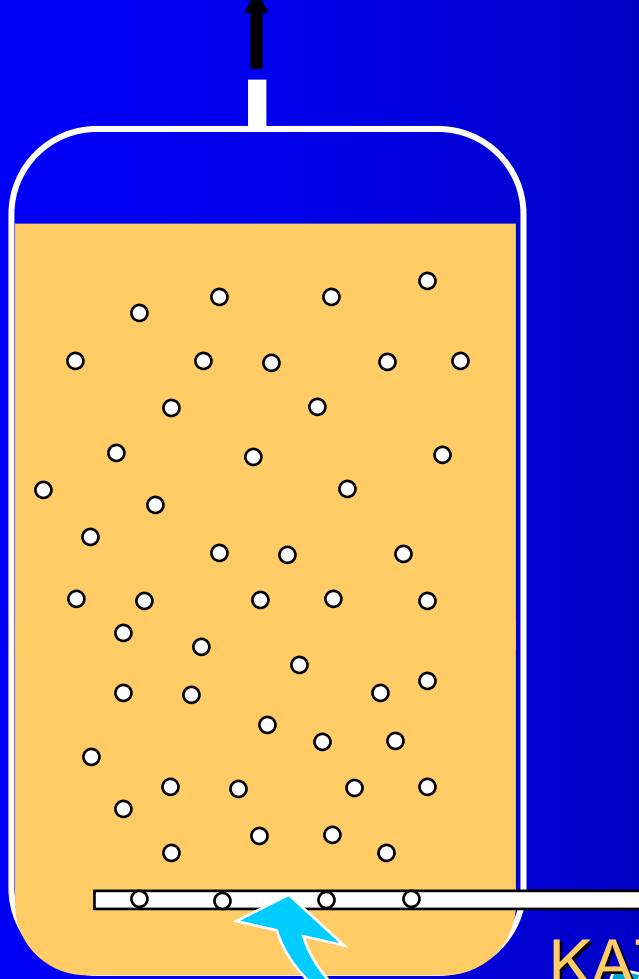


- Καλός έλεγχος και ρύθμιση μεταβλητών
- Μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών

- ✓ Αντιβιοτικά
- ✓ Αμινοξέα
- ✓ Βιομηχανικά ένζυμα

Βιοαντιδραστήρες στήλης φυσαλίδων

ΕΞΟΔΟΣ ΑΕΡΑ



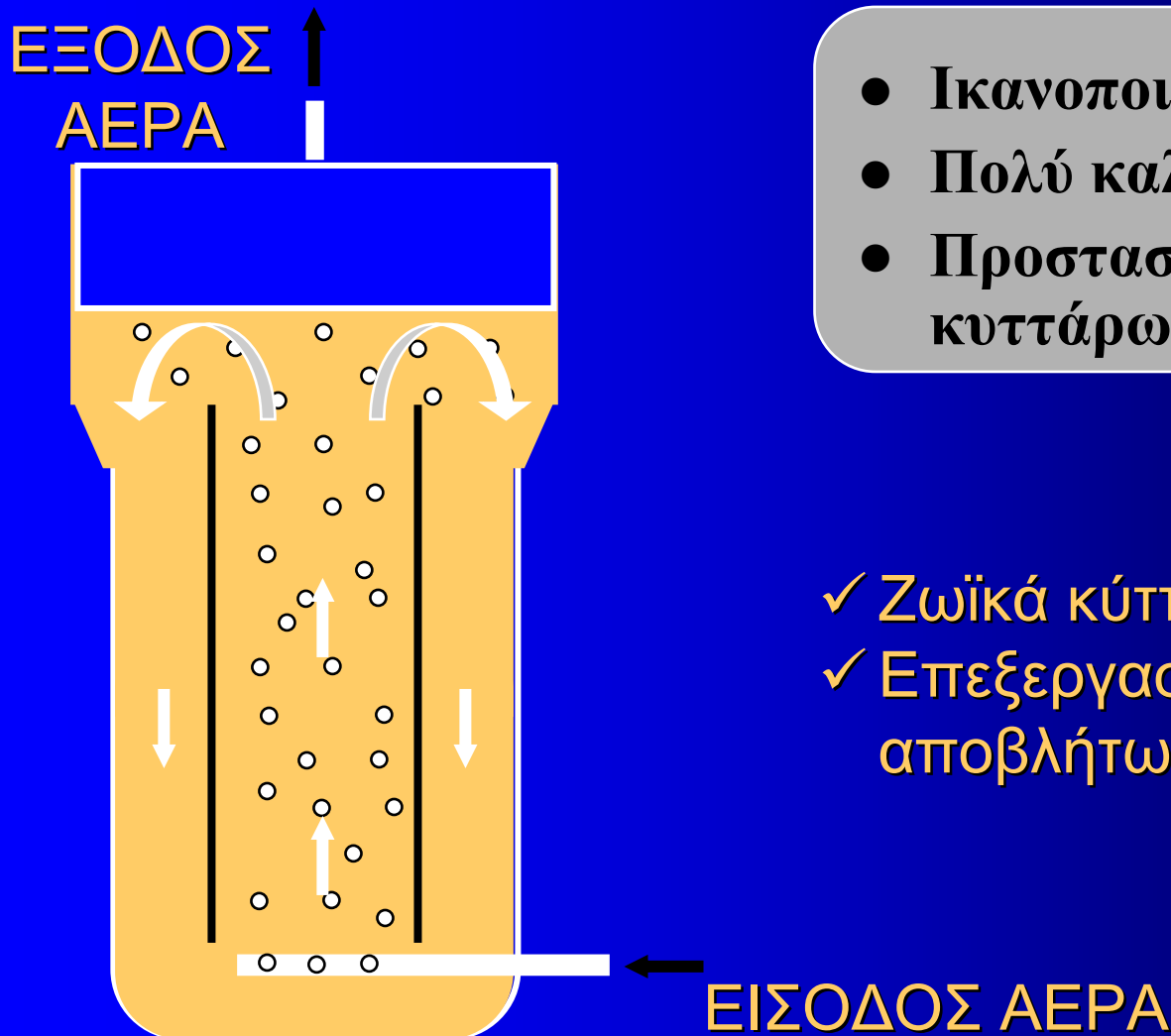
- Χαμηλό κόστος κατασκευής
- Ικανοποιητική μεταφορά μάζας & θερμότητας

- ✓ Ζύμη αρτοποιίας
- ✓ Κιτρικό οξύ

ΕΙΣΟΔΟΣ ΑΕΡΑ

ΚΑΤΑΝΕΜΗΤΗΣ ΑΕΡΑ
(sparger)

Βιοαντιδραστήρας βρόχου



- Ικανοποιητική ανάδευση
- Πολύ καλή μεταφορά μάζας
- Προστασία ευαίσθητων κυττάρων

- ✓ Ζωϊκά κύτταρα
- ✓ Επεξεργασία βιομηχανικών αποβλήτων

Βιοαντιδραστήρες κλίνης

Σταθερής κλίνης
(packed bed)

Video

Ρευστοποιημένης κλίνης
(fluidized bed)

Video

- Δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας
- Αυξημένη διεπιφάνεια

- Μεγάλη συγκέντρωση βιοκαταλύτη
- Αντιμετώπιση αναστολής από προϊόν

- Εύκολη ρύθμιση pH και T
- Δυνατότητα χρήσης κολλοειδών υποστρωμάτων

- ✓ Παραγωγή οξικού οξέος (ξίδι)
- ✓ Παραγωγή βιοαερίου από στερεά απόβλητα

- ✓ Επεξεργασία υγρών αποβλήτων
- ✓ Πιλοτική παραγωγή μπύρας χωρίς αιθανόλη (alcohol-free)
- ✓ Πιλοτική παραγωγή anti-HIV αντισωμάτων

Βιοαντιδραστήρες ρευστοποιημένης κλίνης

Ύψος: 21 m

Όγκος: 390 m³

Υπόστρωμα: απόβλητα
εργαστασίου παραγωγής ζύμης

Βιοκαταλύτης: ακινητοποιημένα
βακτηριακά κύτταρα σε άμμο

Συνθήκες: αναερόβιες

Gist-brocades, Delft - Ολλανδία



Βιοαντιδραστήρες μεμβρανών

Βιοαντιδραστήρας κοίλων ινών

Θρεπτικά
συστατικά



- Απομάκρυνση παρεμποδιστικού προϊόντος ή άλλων παρεμποδιστών
- Δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας

- ✓ Ενζυμικοί βιοαντιδραστήρες
- ✓ Ανάπτυξη ζωικών κυττάρων
- ✓ Ανάπτυξη αρχαιοβακτηρίων

Βιοαντιδραστήρες ζύμωσης στερεάς κατάστασης

Ζύμωση στερεάς κατάστασης: ανάπτυξη μικροοργανισμών σε στερεά υποστρώματα απουσία ελεύθερου νερού

- Με δίσκους
- Στερεάς κλίνης
- Περιστρεφόμενου τυμπάνου
- Με ανάδευση

- Χαμηλό κόστος εγκατάστασης & λειτουργίας
- Ευκολότερη ανάκτηση προϊόντων

- ✓ Αμυλάση
- ✓ Πρωτεάση
- ✓ Παραδοσιακά τρόφιμα
Α. Ανατολής (soy sauce)

Φωτοβιοαντιδραστήρες

Τύπος: Βιοαντιδραστήρας με λήψη πολλαπλών σωληνώσεων

96 σωλ. πολυαιθυλενίου (μήκος 120 m, διάμετρος 25 cm, όγκος: 600 m³)

Καταλύτης: κύτταρα κυανοβακτηρίου *Arthrospira platensis*

Τροφοδοσία: αντλία & σωλήνας ανακυκλοφορίας

Hidrobiologica SA, La Rioja, Αργεντινή



Επιλογή & σχεδιασμός βιοαντιδραστήρων

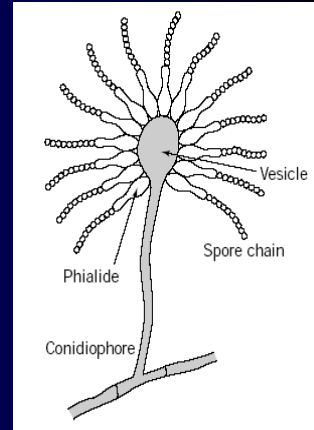
Κριτήρια - Περιορισμοί

- Μικροοργανισμός (είδος, φυσιολογία, γενετική αστάθεια)
- Υπόστρωμα (τύπος, παρεμπόδιση)
- Προϊόν (φάση παραγωγής, αξία)

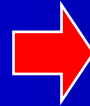
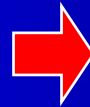
Κάθε περίπτωση αποτελεί ένα μοναδικό πρόβλημα και πρέπει να εξετάζεται με βάση τους συγκεκριμένους περιορισμούς

Παραγωγή κιτρικού οξέος

Aspergillus niger



- ✓ Ο μικροοργανισμός παράγει κιτρικό οξύ σε συνεχή παροχή O_2
- ✓ Το προϊόν έχει χαμηλή τιμή



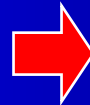
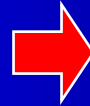
- ✓ Ικανοποιητικός ρυθμός μεταφοράς O_2
- ✓ Μεγάλος όγκος & απλή δομή αντιδραστήρα

Βιοαντιδραστήρας στήλης φουσαλίδων

Παραγωγή ενζύμων από θερμόφιλους μύκητες

Thermoascus aurantiacus

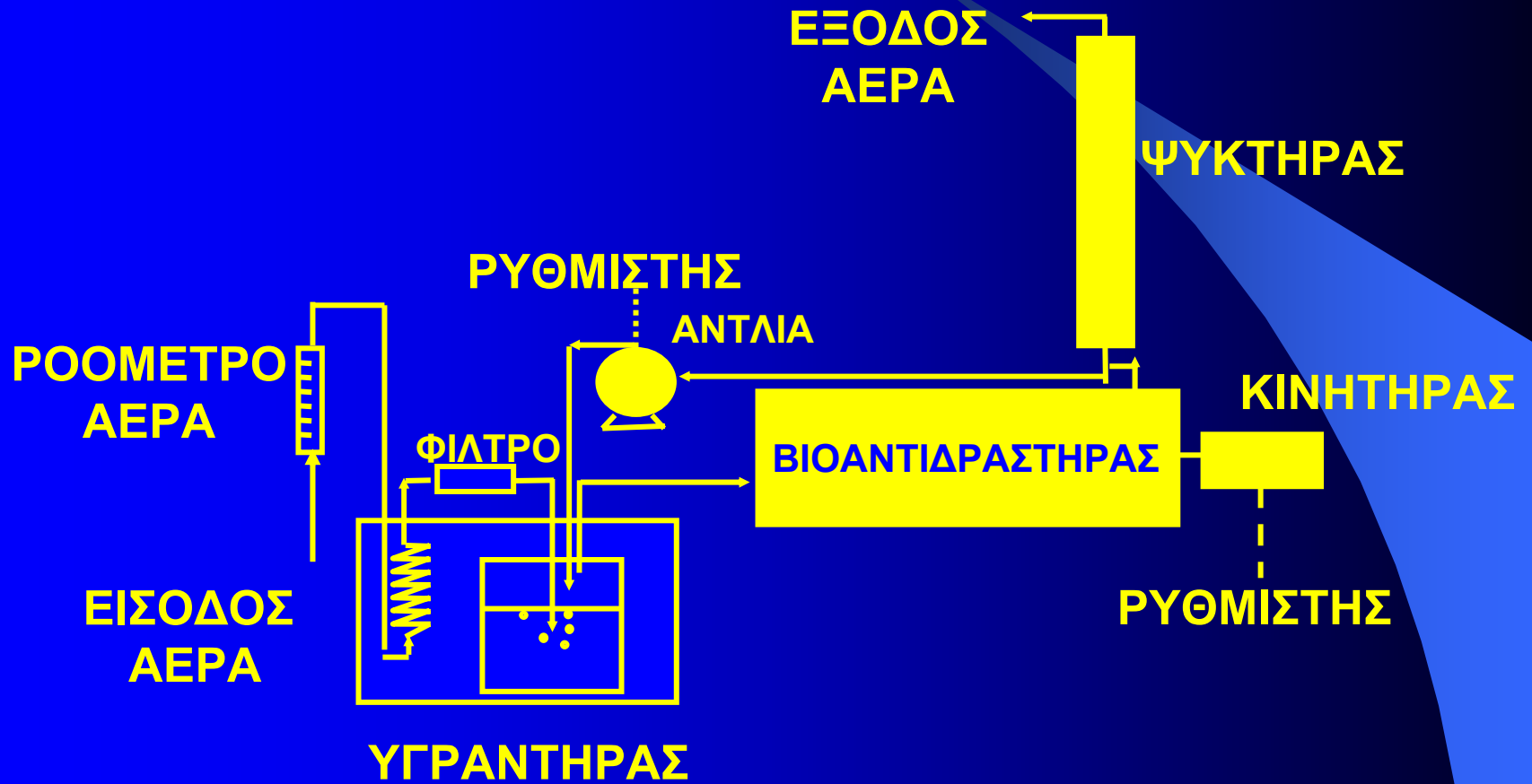
- ✓ Στερεό υπόστρωμα
- ✓ Ευαισθησία σε διατμητικές τάσεις
- ✓ Υψηλός ρυθμός εξάτμισης λόγω υψηλής T



- ✓ Ζύμωση στερεάς κατάστασης
- ✓ Ήπιες συνθήκες ανάδευσης
- ✓ Διατήρηση της υγρασίας του θρεπτικού μέσου

Ζυμωτήρας στερεάς κατάστασης με
περιστρεφόμενο τύμπανο

Ζυμωτήρας περιστρεφόμενου τυμπάνου - διάγραμμα ροής



Γενετική αστάθεια – Η περίπτωση της λιγάσης

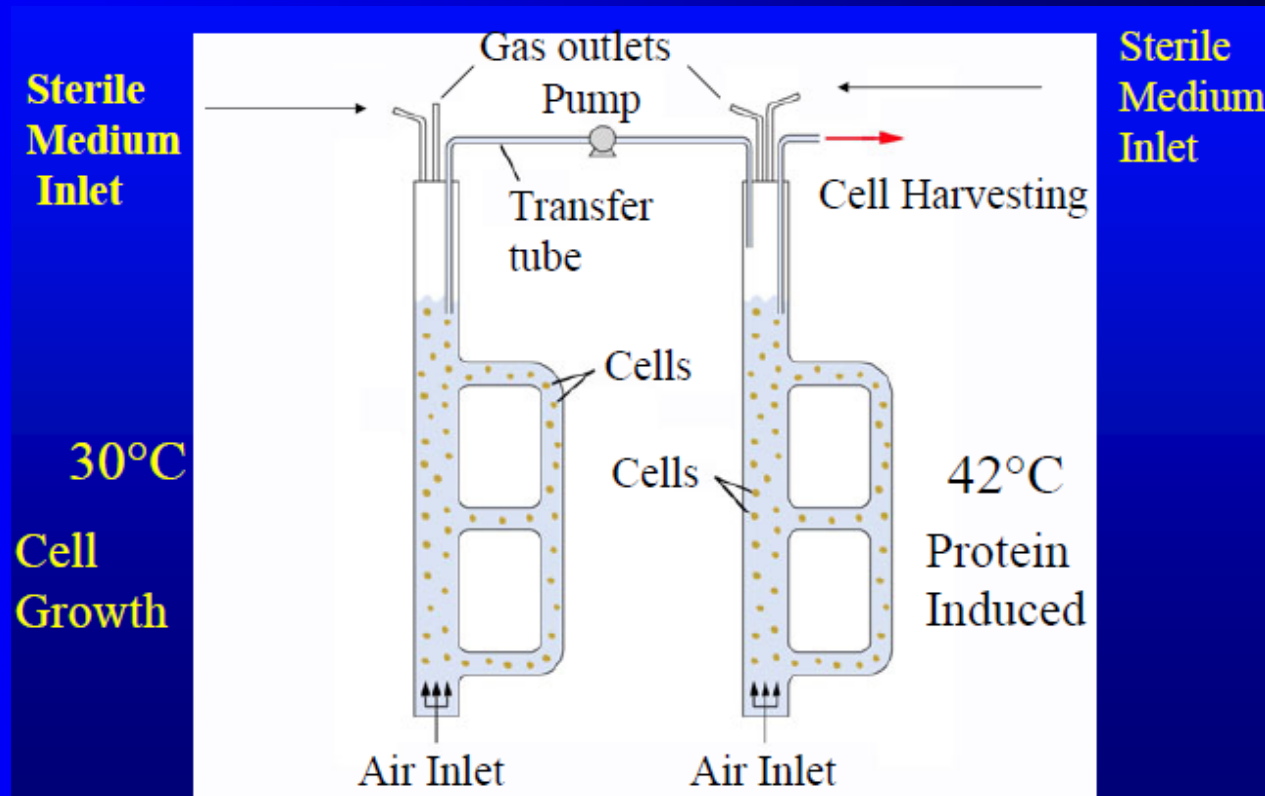
Escherichia coli

Παραγωγή της λιγάσης του φάγου T4

- PL προαγωγός του φάγου λ
- Ρύθμιση από τον θερμοελεγχόμενο καταστολέα cI του φάγου λ
- 30°C ανεκτική θερμοκρασία – απουσία έκφρασης
- 42°C περιοριστική θερμοκρασία - έκφραση

Συστοιχία βιοαντιδραστήρων βρόχου
συνεχούς διεργασίας

Γενετική αστάθεια – Η περίπτωση της λιγάσης



Γενετική αστάθεια

- Απώλεια διαχωρισμού
- Δομική αστάθεια πλασμιδίων
- Μεταλλάξεις κυττάρων-ξενιστών

ΑΣΚΗΣΗ

Ποια η πιθανότητα δημιουργίας ελεύθερου από πλασμίδιο κυττάρου σε μία καλλιέργεια που

α. όλα τα κύτταρα έχουν 40 πλασμίδια σε κάθε διαίρεση;

β. τα μισά κύτταρα έχουν 10 αντίγραφα του πλασμιδίου και τα άλλα μισά 70 αντίγραφα (Μ.Ο. 40);

α. $P=2^{(1-2)}=2^{-39}=1.8 \times 10^{-12}$ κύτταρα ανά διαίρεση

β. $P = 1/2 * 2^{(1-10)} + 1/2*2^{-(1-70)} = 9.8 \times 10^{-4} + 8.5 \times 10^{-22} =$

9.8×10^{-4} κύτταρα ανά διαίρεση

Ανάκτηση μικροβιακών προϊόντων

Τα μικροβιακά προϊόντα είναι συνήθως ευαίσθητες ουσίες περιέχονται σ' ένα πολύπλοκο ρευστό σύστημα (κύτταρα, υπόστρωμα, διαλυτές μεταβολικές ουσίες κ.ά.)

Η ανάκτηση των προϊόντων αυτών είναι πολύπλοκη διαδικασία που εξαρτάται από ορισμένες ιδιότητες του προϊόντος όπως :

- Σταθερότητα, συγκέντρωση, διαλυτότητα, μέγεθος και φορτίο του μορίου, προδιαγραφές του τελικού προϊόντος (υγρό, σκόνη, κρυσταλλικό προϊόν, κλπ.)

Οι διεργασίες ανάκτησης των προϊόντων περιλαμβάνουν :

● Διήθηση

● Φυγοκέντριση

● Κυτταρική διάρρηξη

● Εκχύλιση

● Κατακρήμνιση

● Διαπίδυση

● Υπερδιήθηση

● Χρωματογραφία

● Ηλεκτροφόρηση

Τεχνικές που χρησιμοποιούνται στην προσομοίωση καθαρισμού πρωτεϊνών

Κατακρήμνιση

- Θερμική κατεργασία
- Εξαλάτωση

Χρωματογραφία

- Μοριακή διήθηση
- Ανταλλαγή ιόντων
- Συγγένειας
- Υδροφοβων αλληλεπιδράσεων
- Ισοηλεκτρική εστίαση

Ηλεκτροφόρηση

- Μίας διάστασης
- Δύο διαστάσεων

Εκτίμηση αποτελέσματος

- Απόδοση
- Εμπλουτισμός

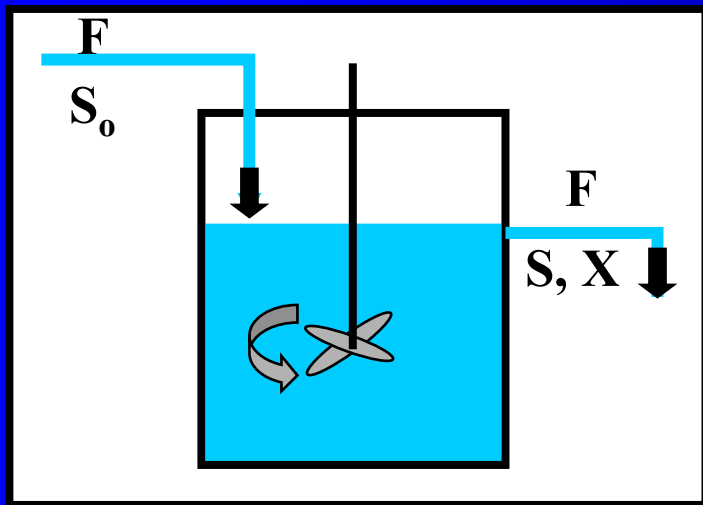
Για περισσότερες πληροφορίες

- M. Shuler, F. Kargi, Μηχανική Βιοδιεργασιών, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα 2005
- Μ. Καλογερό, Δ. Κέκου, Στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής, ΕΜΠ, 2008
- Χ. Σταμάτη, Στοιχεία Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας και Παραγωγής Βιοτεχνολογικών Προϊόντων, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 2005
- Γ. Αγγελή, Μικροβιολογία & Μικροβιακή Τεχνολογία, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, 2007
- P. Doran, Bioprocess Engineering Principles, Academic Press, San Diego, 1995
- C. Ratledge, C. Kristiansen, Basic Biotechnology, 2nd edition, Cambridge University Press, 2001
- H. Reim, G. Reed, A. Puhler, P. Stadler, Biotechnology, 2nd edition, VCH, Weinheim, 1993
- M. Flickinger & S. Drew - Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis & Bioseparation, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1999

BACK UP

mkalog@mail.ntua.gr

Κινητική ζυμωτήρων συνεχούς έργου



ΜΟΝΙΜΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \longrightarrow \mu = D$$

Μεταβολή D

Μεταβάλλοντας την τιμή του D (με αλλαγή της παροχής F), ο ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να λάβει την επιθυμητή τιμή μ

Κρίσιμη τιμή

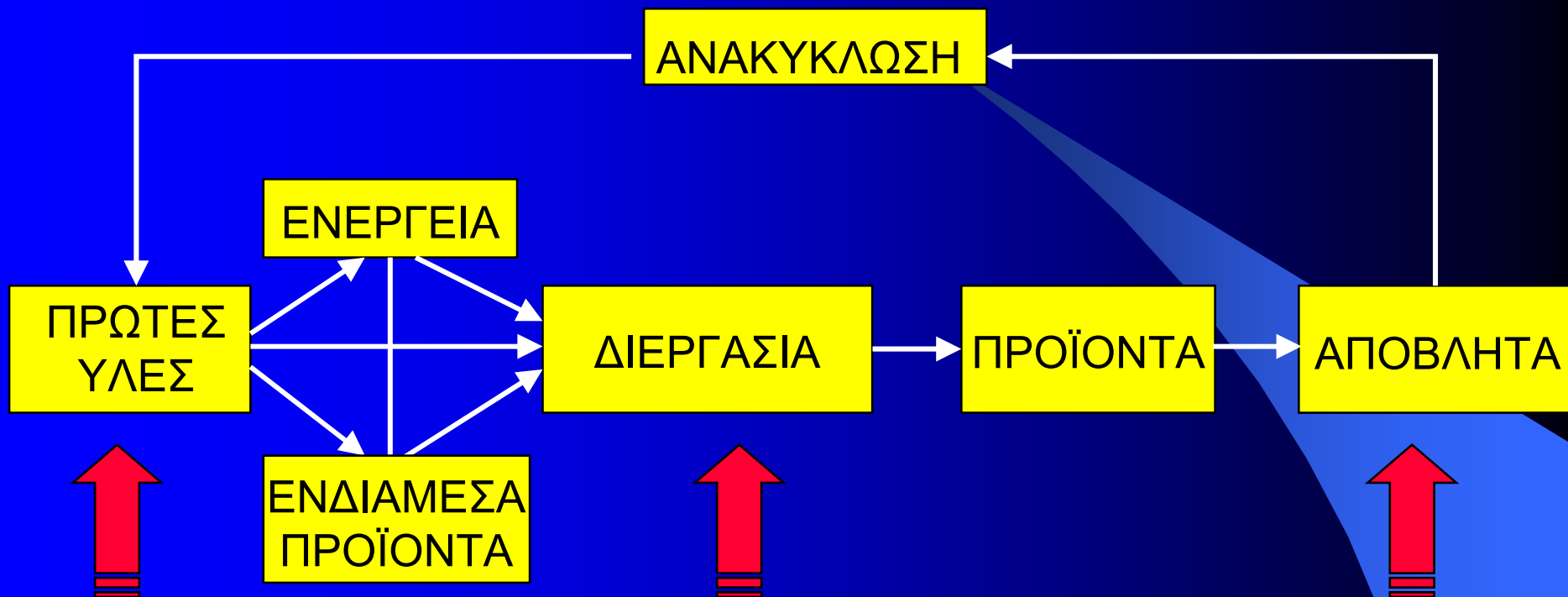
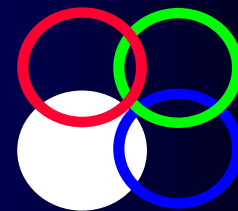
$$D_{\text{crit}} = \frac{\mu_{\text{max}} [S_0]}{K_s + S_0} \longrightarrow S = S_0$$

Βέλτιστη τιμή

(παραγωγικότητα ως προς X)

$$D_{\text{opt}} = \mu_{\text{max}} \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}} \right)$$

Λευκή Βιοτεχνολογία

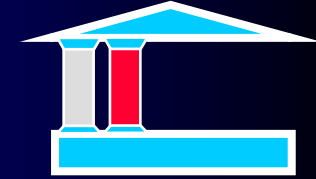


ΑΝΑΝΕΩΣΙΜΕΣ
ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ
ΠΗΓΕΣ

ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ
ΜΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
(π.χ. ένζυμα ως καταλύτες)

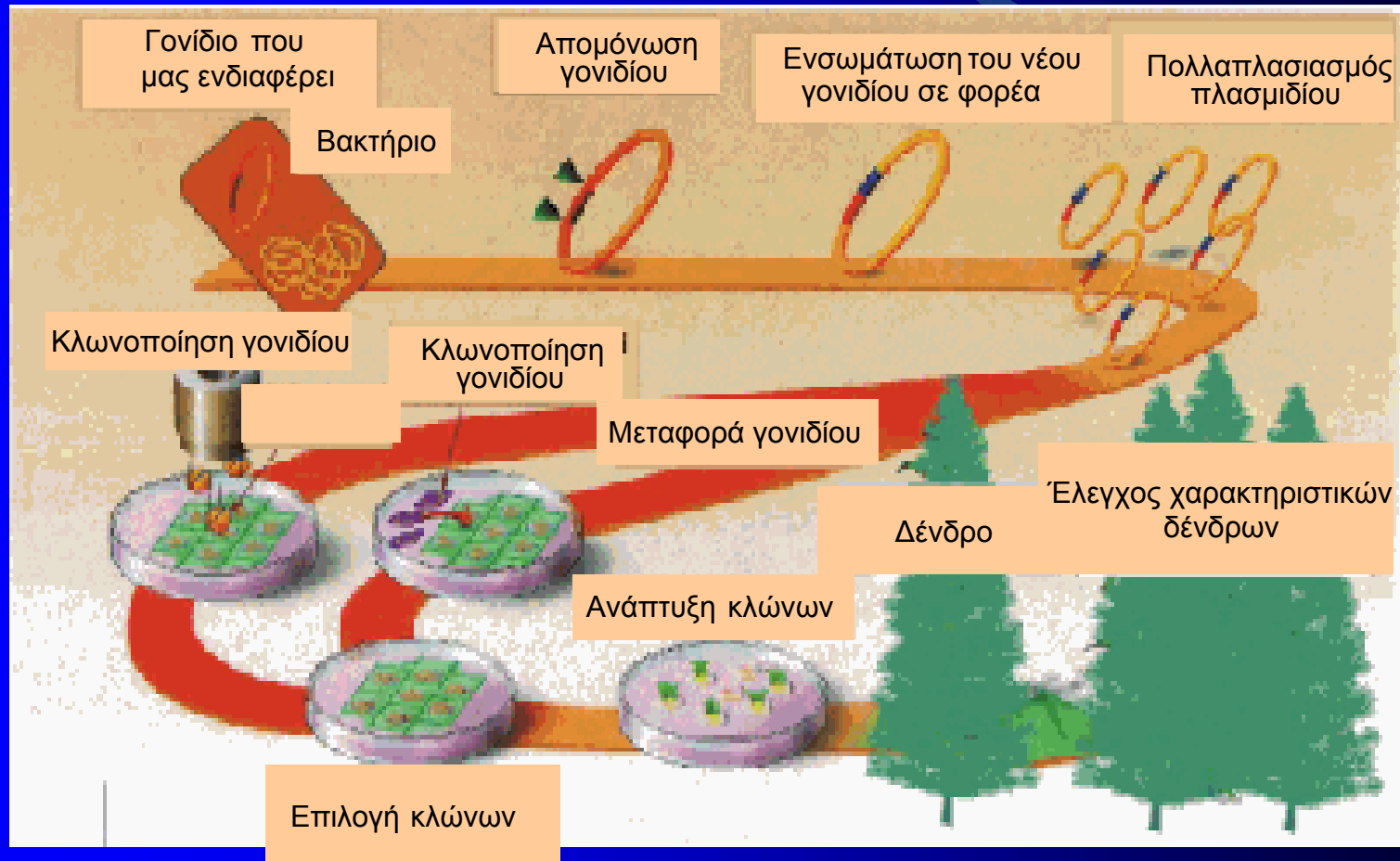
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ
ΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΗΣ
ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ

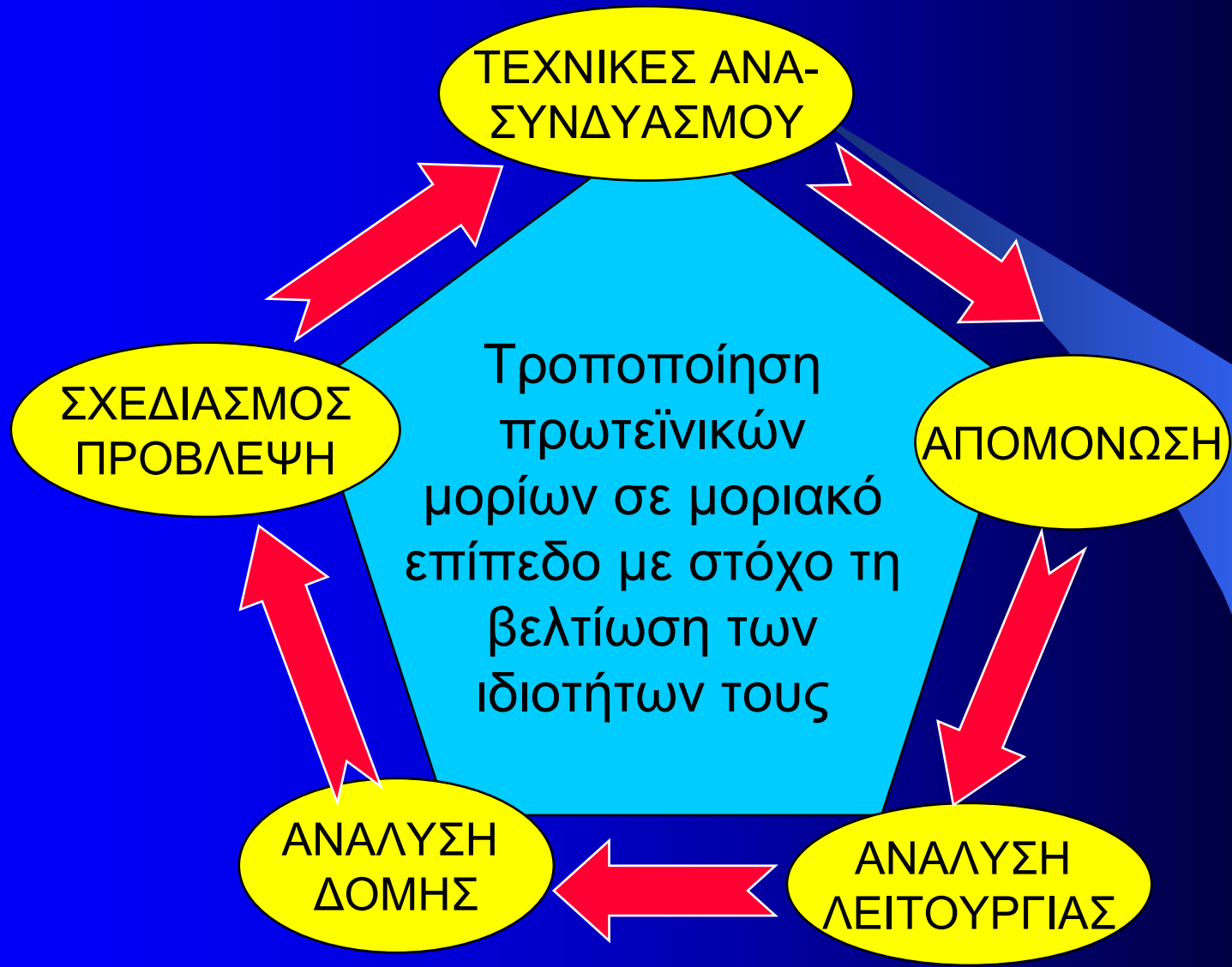
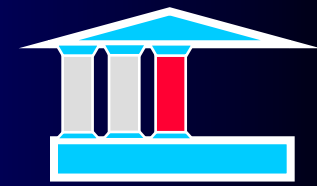
ΛΕΥΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

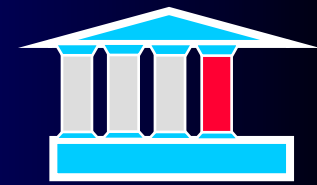


Γενετική Μηχανική

Σύνολο εργαλείων χειρισμού του γενετικού υλικού έξω από το κύτταρο με στόχο τη δημιουργία τεχνητών γονιδίων ή νέων συνδυασμών γονιδίων







Οργάνωση των πληροφοριών βιολογικού περιεχομένου (συνήθως σε μοριακό επίπεδο) και αξιοποίησή τους

Genomics

- Προσδιορισμός αλληλουχίας γονιδίων
- Ανάλυση πληροφοριών γονιδιώματος
- Φυλογενετική σύγκριση

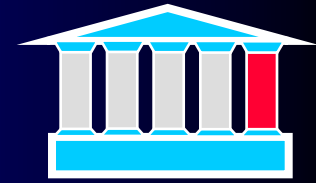
Proteomics

- Σύγκριση αλληλουχίας αμινοξέων
- Μοντελοποίηση μακρομοριακών δομών/συμπλόκων
- Σχεδιασμός φαρμάκων

Metabolomics

- Ανάλυση μεταβολικών οδών





Μεταβολική Μηχανική

Η κατευθυνόμενη βελτίωση των κυτταρικών λειτουργιών και η παραγωγή προϊόντων μέσω της τροποποίησης εξειδικευμένων βιοχημικών αντιδράσεων ή της εισαγωγής νέων, με τη χρήση της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. G. Stephanopoulos MIT (1991)

Εστίαση σε ολοκληρωμένους μεταβολικούς δρόμους

ΑΝΑΛΥΣΗ

Δημιουργία χάρτη μεταβολικών ροών



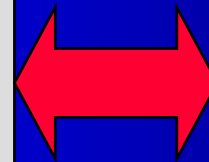
Ανάλυση μεταβολικού ελέγχου



Εντοπισμός στόχων



Εκτίμηση επίδρασης



ΣΥΝΘΕΣΗ

Εισαγωγή γενετικών αλλαγών

- έκφραση νέων γονιδίων
- ενίσχυση ενδογενών ενζύμων
- διαγραφή γονιδίων



Ρύθμιση ενζυμικής δραστηριότητας



Έλεγχος μεταβολικών δρόμων