

REAKTORJI ZA BIOLOŠKA ZDRAVILA

NINA ŠKOF

Fakulteta za matematiko in fiziko
Univerza v Ljubljani

Razvoj bioreaktorjev je danes eden pomembnih izzivov pri vzgoji bioloških vzrocev, celic in splošneje v biotehnologiji. V članku so predstavljeni trije glavni tipi bioloških reaktorjev, ki se uporabljajo pri procesu pridelave bioloških zdravil. To so mešalni, kolonski in reaktor z dvigovanjem zraka. Prvi del članka zajema kratek opis izdelave bioloških zdravil, ki mu sledi opis posamezne vrste bioreaktorja. V drugem delu se obravnava vloga hidrodinamike pri bioloških procesih, ki potekajo v notranjosti reaktorja.

REACTORS FOR THE PRODUCTION OF BIOPHARMACEUTICALS

The development of bioreactors is one of the major challenges in raising biological samples, cells and more general in biotechnology today. The article presents three main types of biological reactors used in the production of biopharmaceuticals. These are stirred tank, bubble column and airlift reactors. The first part of the article covers a brief description of the production of biological medicinal products followed by the description of each of the bioreactor types. The second part deals with the role of hydrodynamics in biological processes that take place inside the reactor.

1. Uvod

Biotehnologija je veda, ki združuje koncepte biologije, kemije ter tehnologije in je danes eden najhitreje razvijajočih področij znanosti, pri čemer zavzema probleme od varstva okolja, kmetijstva, industrije (živilske, tekstilne,...) do medicine in farmacije. Zgodovina razvoja sodobne biotehnologije beleži svoje zgodnje začetke v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja. Prvi velik uspeh, s katerim so se okronala biološka zdravila, je prišel z letom 1982, ko so ameriške regulatorne oblasti za zdravljenje sladkorne bolezni odobrile rekombinantni človeški inzulin [1]. V naslednjih tridesetih letih so biološka zdravila doživela skoraj neslutene razsežnosti, med katere med drugim štejemo pomembna odkritja na področju zdravljenja rakavih obolenj [2], [3] in izjemne napredke pri razvoju različnih vrst cepiv [4], [5], [6], ki predstavljajo izjemen napredek farmacevtskih in medicinskih ved ter znanosti.

Biološka zdravila v najožjem pomenu vključujejo izdelke, ki so nastali z uporabo živih organizmov oz. njihovih sistemov kot so mikroorganizmi, rastline ali živali. V večini primerov so po kemijski zgradbi proteini, ki jih sestavljajo relativno velike in kompleksne molekule. Ključni spoznanji, ki sta omogočila razvoj bioloških zdravil, sta bili odkritje sestave DNK leta 1953, čemur je sledilo odkritje tehnologije rekombinantne DNK. Ta metoda omogoča izolacijo dela DNK, ki se ga lahko delno spremeni. Košček tega gena oz. molekule DNK se nato vstavi v drugo celico. Ta tako pridobi nove genske informacije, ki so osnova za izdelavo zelene beljakovine, v našem primeru biološke učinkovine [7].

Pridelava večine bioloških zdravil je ključno pogojena s primerno delujočim bioreaktorjem. Splošna komercialna proizvodnja namreč zahteva gojenje celic v potopljenih kulturah, ki se nahajajo v velikih napravah imenovanih bioreaktorji. Ti so zasnovani tako, da zagotavljajo ustrezno okolje za optimalno rast in presnovno aktivnost mikroorganizma, kar je bistveno za pridelavo končnega produkta [8].

V članku bomo opisali glavne vrste reaktorjev, ki se uporabljajo v procesu pridelave bioloških zdravil, pri čemer se bomo podrobneje posvetili področju hidrodinamike, ki jo določajo parametri kot so mešanje, prenos snovi, hitrost kroženja tekočine in strig hitrostnega polja. Slednji vrednosti bomo dali največji poudarek, saj bistveno vpliva na razvoj celic.

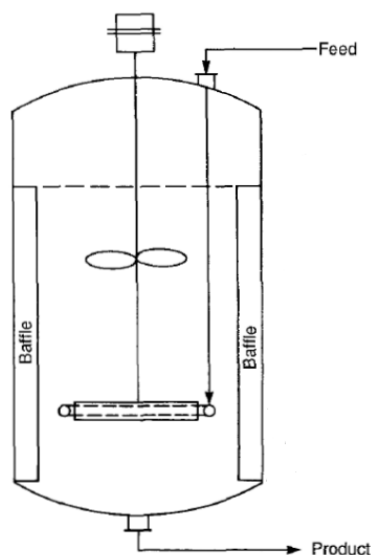
2. Bioreaktorji

Biološke reaktorje lahko opredelimo kot naprave, v katerih potekajo biološki in/ali biokemični procesi, pod strogo nadzorovanimi okoljskimi in delovnimi pogoji [9]. Cilj učinkovitega bioreaktorja je omogočen nadzor nad temperaturo, vzdrževanje optimalnega pH-ja ter tlaka. Organizmi, kot so bakterijske, živalske in rastlinske celice, morajo imeti za svoj razvoj na razpolago dovolj vode, hranilnih snovi, kisika in substrata, ki ga sestavljajo sladkorji, maščobe in protein. Zagotovljeno mora biti tudi ustrezno odstranjevanje odpadnih snovi [8].

Naštetim parametrov lahko zadostimo v vsakem od glavnih bioreaktorskih modelov, ki v splošnem spadajo v kategorije mešalnega, kolonskega bioreaktorja in reaktorja z dvigovanjem zraka.

2.1 Mešalni bioreaktorji

Najpogostejša vrsta aerobnega bioreaktorja v današnji uporabi, je mešalni. Gradnja takih jeklenih rezervoarjev je standard predvsem za uporabo v industriji pri obravnavi večjih količin. Mešalni bioreaktorji imajo posebno notranjo konfiguracijo, ki zagotavlja točno določene vzorce toka. Kot je prikazano na sliki 1, v tank dovedemo sterilni medij in celice, z zgornjega dela, medtem ko je dovod zraka tipično na dnu. Za optimalno mešanje, reaktor nima le mešalnega sistema, ampak tudi pregrade, ki preprečujejo nastanek "whirlpool" efekta, ki bi lahko oviral pravilno mešanje. V zgodnjih fazah procesa topla voda kroži skozi pregrade in tako segreje sistem; kasneje lahko znotraj njih kroži hladna voda, in s tem preprečuje pregrevanje. Število pregrad se običajno giblje od štiri do osem. Ko bioreakcija napreduje, mehurčki, ki so nastali zaradi dovoda zraka, na svoji poti navzgor zaradi mešala razpadejo. Na tak način je mikroorganizmom, ki jih gojimo v reaktorjih, doveden kisik. Trenutno je v uporabi, veliko različnih vrst mešal, pri čemer je najbolj pogosta štirikraka disk turbina. Novejši modeli premorejo tudi do 18 diskov, oz. imajo diski konkavno obliko, ki pripomore k izboljšanju hidrodinamike [8].



Slika 1. Na sliki je prikazan mešalni bioreaktor. Vanj dovedemo sterilni medij s celicami, mešalo, ki ga poganja motor, nato skupaj s pregradami, ki jih vidimo ob stenah reaktorja, poskrbi za čim boljše pogoje, ki celicam omogočajo optimalen razvoj [10].

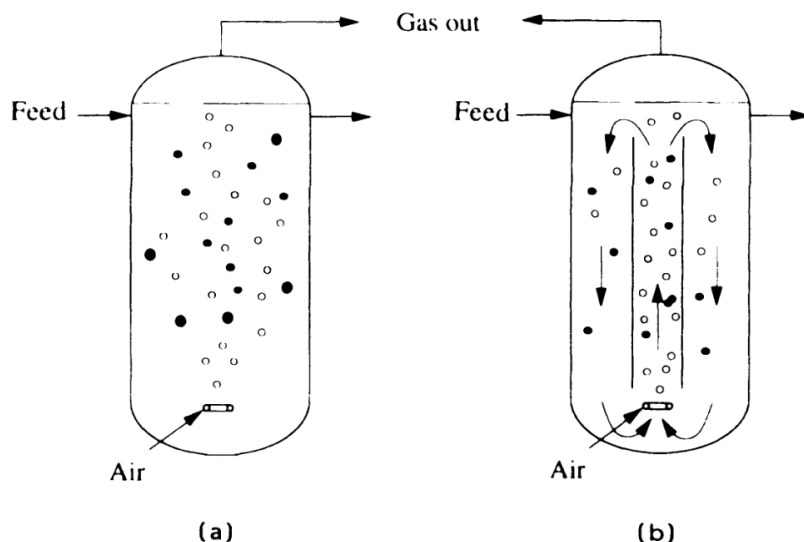
2.2 Kolonski bioreaktor in reaktor z dvigovanjem zraka

Danes uporabljamo več vrst pnevmatskih bioreaktorjev, ki delujejo na principu dvigovanja zraka. To pomeni, da je mešanje in oskrba medija s plinom dosežena s pomočjo zračnih mehurčkov. Glavna predstavnika sta kolonski bioreaktor in reaktor z dvigovanjem zraka [11], ki sta prikazana na sliki 2. Glavna razlika med njima je v načinu pretoka tekočine, ki je odvisen od geometrije sistema.

Kolonski bioreaktor je preprosta posoda, v katero dovajamo plin, navadno na dnu, nato pa dvigovanje mehurčkov poskrbi za naključno mešanje. V reaktorjih z dvigovanjem zraka, je glavni tok tekočine določen z obliko reaktorja, ki ima ločen kanal za dovajanje plina in ločen kanal za odvajanje plina s pretokom navzdol. Oba kanala sta povezana na spodnjem in zgornjem delu in tako oblikujeta zaprto zanko. Plin se po navadi injicira v bližini dna zanke. Delež plina, ki se ne izloči in ostane ujet s padajočo tekočino, ima pomemben vpliv na dinamiko pretoka tekočin v reaktorju in s tem na splošno delovanje reaktorja. Kroženje tekočine in plina narekuje tlačna razlika, ki se ustvari na dnu reaktorja in jo zapišemo kot:

$$\Delta P_b = \rho_L g (\phi_r - \phi_d), \quad (1)$$

kjer ρ_L predstavlja gostoto tekočine, g gravitacijsko konstanto. Simbola ϕ_r in ϕ_d v enačbi opisujeta masna deleža plina v dvižnem kanalu in kanalu za odvajanje plina [12].



Slika 2. (a) Kolonski bioreaktor in (b) bioreaktor z dvigovanjem zraka [13].

Pnevmatski sistemi zagotavljajo nekatere prednosti glede na običajne bioreaktorje, kot so npr. standardni mešalni reaktorji. Imajo zasnovano brez gibljivih delov in nižjo vrednost striga hitrostnega polja, ki omogoča večjo fleksibilnost, kar pomeni, da je sistem mogoče uporabiti za gojenje tako rastlinskih kot živalskih celic, ki so strižno bolj občutljive. V mešalnih reaktorjih so namreč dosežene večje strižne hitrosti, zato so bolj primerni za gojenje strižno odpornejših celic, kot so npr. bakterijske [8].

3. Vloga hidrodinamike v bioloških reaktorjih

Poznavanje hidrodinamike je bistvenega pomena, saj ta narekuje potek bioloških procesov. Splošna hidrodinamika v reaktorju je kompleksna, zato se bomo v članku osredotočili le na osnovne teoretične probleme.

V večini bioreaktorjev, predvsem zaradi mešanja, prevladuje turbulenten tok. Glavni parameter, ki določa ali je tok turbulenten ali laminaren, je viskoznost tekočine. Vendar je ta, kot lastnost, ki

lahko že sama po sebi opiše najbolj verjetno obnašanja toka tekočine, omejena na čiste, enofazne tekočine z nizko molekulkno maso. Večina fermentacij pri gojenju celic za biološka zdravila sestoji vsaj iz dvo ali trofaznih sistemov, pogosto s strukturo, ki je posledica prisotnosti rastočega organizma, kar povzroči, da moramo upoštevati hidrodinamiko večfaznih kompleksnih tekočin.

Turbulenca je v fiziki pojav, ki opisuje nekatere kompleksne in nepredvidljive fluktuacije v gibanju tekočin. Zaznamo jo kot hitro spreminjanje hitrosti in tlaka tekočine v prostoru in času. Gibanje tekočine je torej prikladno opisati, kot njen odklon od časovnega povprečja z enačbo:

$$u_i = u + u', \quad (2)$$

v kateri u' predstavlja trenuten odklon hitrosti, u pa povprečno hitrost v x smeri, določeno kot:

$$u = \frac{1}{t} \int_0^t u_i dt, \quad (3)$$

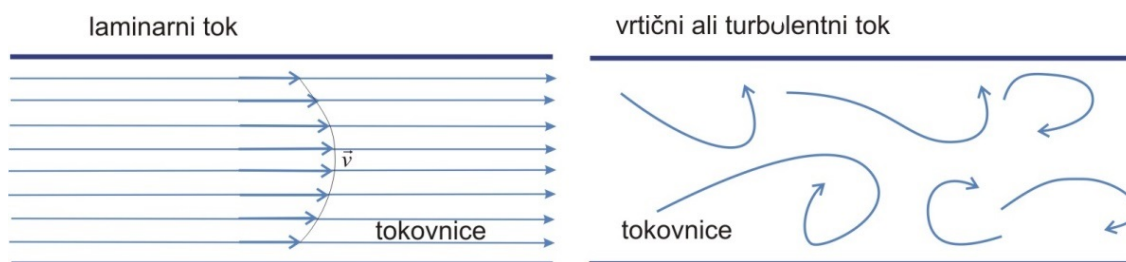
pri čemer je čas t velik. Ekvivalentni enačbi veljata tudi za hitrost, v , v y smeri in hitrost, w , v z smeri. Pravimo, da je turbulenca homogena, ko so časovno povprečene fluktuacije enake v vseh točkah sistema in izotropna, ko so odkloni v vseh smereh enaki. Z drugimi besedami to pomeni, da je hitrostno polje statistično invariantno na rotacije in translacije. Za specifično intenziteto turbulence, I , lahko sedaj zapišemo enačbo:

$$I = \frac{\sqrt{1/3(\bar{u}'^2 + \bar{v}'^2 + \bar{w}'^2)}}{u}. \quad (4)$$

Vidimo, da večje kot so fluktuacije hitrosti, večja je intenziteta turbulence. Za primer izotropne turbulence se zgornji izraz poenostavi v:

$$I = \frac{\sqrt{\bar{u}'^2}}{u} = \frac{u_{rms}}{u}, \quad (5)$$

kjer indeks rms označuje koren povprečja kvadrata (ang. root mean square) [14].



Slika 3. Laminarni tok, ki je prikazan na levi sliki je tok tekočine, pri katerem so tokovnice gladke in urejene; pomembno vlogo ima viskoznost tekočine. Turbulentni tok (desno) je nestacionarni tok tekočine, pri katerem se tokovnice s časom spreminjajo, iz njih pa se lahko ustvarjajo vrtinci, kot je vidno na sliki [15].

Vredno je omeniti še, da imamo pri bioloških procesih večinoma opravka z nenevtonskimi tekočinami. Tudi, če na začetku uporabimo tekočino, ki je newtonska, ta tekom razvojne faze celic običajno postane nenevtonska. Pravimo, da je tekočina newtonska ali idealna, če zanjo velja Newtonov zakon. Ta pravi, da je odpor tekočine proti toku pri enostavnem strigu linearno sorazmeren hitrosti strižnega toka oziroma hitrosti strižne deformacije. Proporcionalnostni faktor je viskoznost. Nenevtonske tekočine temu zakonu ne sledijo, saj odziv na strižno silo ni linearen [11].

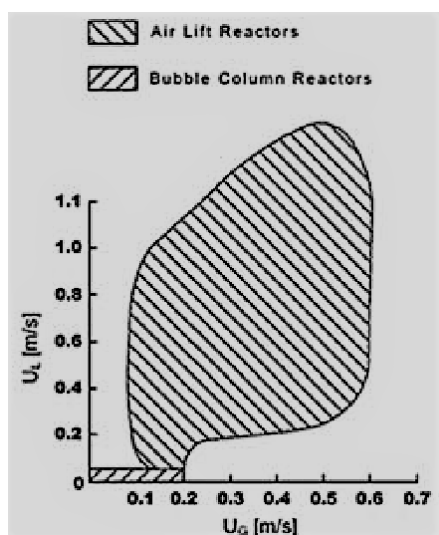
V nadaljevanju bomo spoznali tri temeljne parametre, ki jih moramo pri obravnavi pojma hidrodinamike v bioreaktorjih podrobneje spoznati. Najpomembnejša med njimi je velikost striga hitrostnega polja, saj ta posredno vpliva na celotno dinamiko tekočin.

3.1 Strig hitrostnega polja

Gradient povprečne prostorske hitrosti tekočine ali prevladujoči strig hitrostnega polja (ang. shear rate), je pomembna spremenljivka v bioreaktorjih. Poznavanje vrednosti striga je bistvenega pomena iz vsaj dveh razlogov:

1. Velikost striga hitrostnega polja vpliva na povprečno navidezno viskoznost nenevtonskih tekočin in s tem na absorpcijo energije, karakteristiko mešanja in prenos snovi.
2. Mikroorganizmi, celice in druge suspendirane trdne snovi so občutljivi na poškodbe, povezane s prevladujočo vrednostjo striga in pripadajočo strižno silo [16].

Ko gre za mikroorganizme, lahko kolonske bioreaktorje in bioreaktorje z dvigovanjem zraka pogosto enačimo, predvsem zato, ker so vrednosti striga hitrostnega polja v teh reaktorjih podobne. Vseeno pa moramo imeti v mislih dejstvo, da lahko reaktorji z dvigovanjem zraka dosežejo mnogo večje hitrosti plina in tekočine (slika 4), kar vodi do večje strižne hitrosti in turbulence, zlasti na dnu reaktorja. Turbulenco na kritičnih področjih se da omejiti s pravilno zasnovo teh in tako izboljšati delovanje bioreaktorja pri strižno občutljivih mikroorganizmih [17].



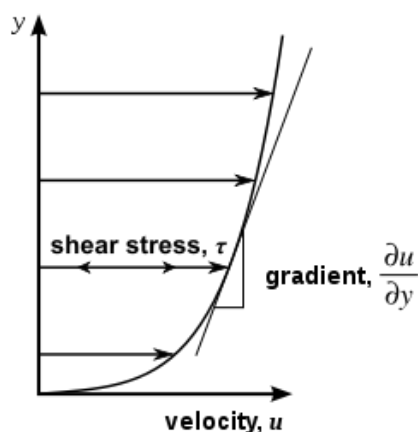
Slika 4. Primerjava med površinsko hitrostjo plina in tekočine v kolonskem bioreaktorju in reaktorju z dvigovanjem zraka. Na grafu poševne črte v desno ponazarjajo hitrostne vrednosti kolonskega bioreaktorja, poševne črte v levo se nanašajo na dosežene hitrosti v reaktorjih z dvigovanjem zraka [17].

3.1.1 V mešalnem bioreaktorju

Najprej si pogledjmo mešalne reaktorje, v katerih so prisotne višje vrednosti striga hitrostnega polja. Specifična stopnja disipacije energije v mešalnem reaktorju je odvisna od velikosti striga hitrostnega polja γ in strižne sile τ . Definirajmo jo kot:

$$\frac{P}{V} = \tau\gamma, \quad (6)$$

kjer P predstavlja vloženo moč in V volumen tekočine v reaktorju. Za tekočine v laminarnem strižnem toku je odpornost proti deformaciji odvisna od dinamične viskoznosti, kot je prikazano na spodnji sliki 5.



Slika 5. Laminaren strižni tok in strižna vrednost [18]

Za gradient linearne hitrosti, ki nastane zaradi gibanja ene vzporedne plasti nad drugo, je relacija med strigom in strižno napetostjo podana kot:

$$\tau = \mu \frac{du}{dy} = \mu \gamma, \quad (7)$$

kjer je za newtonske tekočine viskoznost μ konstantna in neodvisna od vrednosti striga hitrostnega polja. Za lažjo predstavo lahko tu omenimo, da je viskoznost vode enaka $1mPas(1cps)$, tako da bio-reaktorski medij, ki vsebuje enostavne celice v suspenziji, v glavnem ostane newtonski z viskoznostjo le malenkost večjo kot je viskoznost vode, razen ko gre za visoke koncentracije [14]. Z upoštevanjem enačbe za viskoznost:

$$\mu = \frac{\tau}{\gamma}, \quad (8)$$

ki torej velja za Newtonske tekočine, iz enačbe (6) dobimo:

$$\frac{P}{V} = \tau \gamma = \tau \gamma \frac{\gamma}{\gamma} = \mu \gamma^2 \quad (9)$$

in posledično enačbo za strig hitrostnega polja:

$$\gamma = \left(\frac{P}{\mu V} \right)^{1/2}. \quad (10)$$

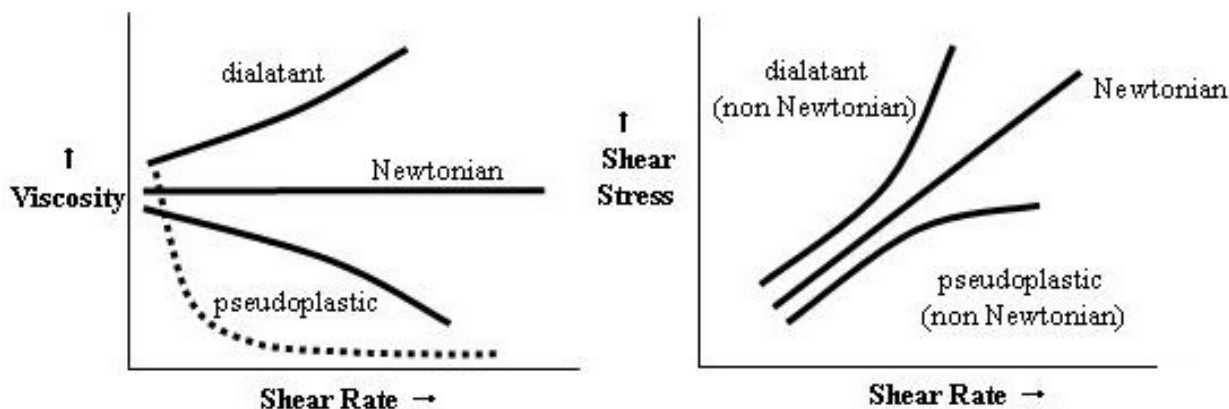
Napisana enačba velja tako za laminaren, kot tudi za turbulenten in prehodni tok (ang. transitional flow) [16].

Za večino bioloških tekočin je viskoznost funkcija strižne hitrosti. To je običajno v primerih, ko tekočina vsebuje velike kompleksne molekule kot so npr. polimeri. Obstajajo trije podrazredi časovno neodvisnih nenewtonovih tekočin. Ti vključujejo pseudoplastike (ang. pseudoplastics), dilatante (ang. dilatants) in viskozoplastike (ang. viscoplastics). Navidezna viskoznost (μ_a) za pseudoplastične in viskozoplastične tekočine z naraščajočo vrednostjo striga pada, medtem ko se pri dilatantih povečuje, kot je razvidno s slike 6 [19].

Za nenewtonske tekočine, za katere velja Ostwald de Waelejev potenčni zakon [21] je strižna sila določena kot:

$$\tau = K \gamma^n, \quad (11)$$

kjer K predstavlja indeks konsistence (ang. consistency index) in n indeks, ki opisuje vedenje toka tekočine. Za pseudoplastične tekočine velja, da je $n < 1$, za dilatante je $n > 1$.



Slika 6. Primerjava newtonskih in nenewtonskih tekočin. Lev graf prikazuje odvisnost (navidezne) viskoznosti od strižne vrednosti, desni prikazuje odvisnost strižne sile od strižne vrednosti [20].

S pomočjo navidezne viskoznosti, ki je podana kot:

$$\mu_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = K\dot{\gamma}^{n-1}, \quad (12)$$

lahko sedaj enačbo, ki ustreza enačbi (9) za nenewtonski medij, zapišemo kot:

$$\frac{P}{V} = \mu_a \dot{\gamma}^2 \quad (13)$$

in ven izrazimo enačbo za stig hitrostnega polja:

$$\dot{\gamma} = \left(\frac{P}{KV} \right)^{1/(n+1)}, \quad (14)$$

ki velja za laminaren in turbulenten tok v primeru nenewtonske tekočine.

Preden se lotimo nadaljne podrobnejše izpeljave vpeljimo še pojem agitacije (ang. agitation), ki se nanaša na vzbujeno gibanje snovi v neki predpisani smeri, ponavadi krožni. V reaktorjih spodbuja prenos toplote in razporeditev celic v tekočini ter sodeluje pri razpršitvi plina skozi tekočino. V primeru mešalnega reaktorja je gibanje medija vzbujeno s strani vrtenja mešala in nato pripelje do mešanja [22].

Sedaj bomo pokazali, da je povprečna velikost striga hitrostnega polja, za newtonske in nenewtonske tekočine, funkcija rotacijske hitrosti mešala N . V ta namen vpeljemo dve števili, ki določata režim toka. To sta Newtonovo (N_p) in Reynoldsovo (Re) število. Definirani sta kot:

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 d_i^5} \quad \text{in} \quad Re = \frac{\rho N d_i^2}{\mu}, \quad (15)$$

kjer ρ predstavlja gostoto tekočine, N rotacijsko hitrost mešala in d_i njegov premer. Newtonovo število efektivno določa razmerje med upornostnimi in vztrajnostnimi silami, Reynoldsovo število pa opisuje razmeje med vztrajnostnimi in viskozni silami v tekočini ter določa ali je tok laminaren ali turbulenten. Laminarni tok nastopi pri nizkih vrednostih Reynoldsovega števila, kjer so dominantne viskozne sile, turbulentni pa se pojavi pri visokih vrednostih, ko prevladujejo vztrajnostne sile.

Za agitacijo v laminarnem toku ($Re \leq 10$) sta N_p in Re povezan preko zveze:

$$N_p = \frac{C}{Re}, \quad (16)$$

kjer je C konstantna vrednost, odvisna od geometrije reaktorja in mešala. V tej točki moramo upoštevati, da se mešalo v bioreaktorju zaradi motorja, ki ga poganja, vrti. Vhodna moč je zato odvisna tudi od navora M na mešalo in jo lahko zapišemo kot:

$$P = 2\pi MN. \quad (17)$$

Sedaj lahko za newtonske tekočine z upoštevanjem zveze (16), v katero vstavimo definiciji za Re in N_p dobimo enačbo, ki definira navor na vrteče se mešalo v primeru laminarnega toka:

$$M = \frac{C\mu d_i^3}{2\pi} N. \quad (18)$$

Mešalni bioreaktorji so navadno valjastih oblik, saj je cilindrična geometrija, zaradi mešanja, najprimernejša za biološke procese, ki potekajo v notranjosti fermentorja. Za mešalni bioreaktor take standardne geometrije [21] velja, da je višina tekočine H v reaktorju enaka njegovemu premeru d_T in trikrat večja od premera mešala. Z upoštevanjem zapsanega specifično vhodno moč izrazimo kot:

$$\frac{P}{V} = \frac{2\pi NM}{\pi/4(3d_i)^3} = \frac{8}{3^3 d_i^3} NM = \frac{4\mu C}{\pi 3^3} N^2, \quad (19)$$

pri čemer smo zadnji enačaj pridelali s pomočjo zapisa za navor (18). Iz napisanega se lepo vidi, da je za laminaren tok specifična vhodna moč sorazmerna s kvadratom rotacijske hitrosti mešala N^2 . Sedaj lahko s pomočjo (9) in (19) končno zapišemo splošen izraz za strig hitrostnega polja za primer laminarnega toka:

$$\gamma = \left(\frac{4C}{\pi 3^3} \right)^{1/2} N = qN, \quad (20)$$

kjer q predstavlja konstanten člen. Ta enačba velja tako za newtonske kot tudi za nenewtonske tekočine.

Za turbulenten tok, ki v bioreaktorjih prevladuje in nastopi, ko je $Re > 10^4$, je Newtonovo število konstanta. Z izbiro ustreznih enačb, na podoben način kot pri laminarnem toku, za mešalni reaktor standardne geometrije pridelamo enačbo, ki ponazarja vhodno moč na volumsko enoto:

$$\frac{P}{V} = \frac{4N_p \rho d_i^2}{\pi 3^3} N^3, \quad (21)$$

iz katere razberemo, da je vhodna moč v tem primeru funkcija kuba rotacijske hitrosti mešala N^3 . Če enačbo (21) izenačimo z (9) dobimo izraz za strig hitrostnega polja kot:

$$\gamma = \left(\frac{4N_p \rho d_i^2}{\pi 3^3 \mu} \right)^{1/2} N^{3/2} = wN^{3/2}, \quad (22)$$

kjer je w konstanta za newtonske tekočine, saj sta Newtonovo število in viskoznost konstanti. Za tekočine, ki niso newtonske, moramo viskoznost v enačbi (22) nadomestiti z enačbo (11), da dobimo izraz za povprečno vrednost striga hitrostnega polja:

$$\gamma = \left(\frac{4N_p \rho d_i^2}{\pi 3^3 K} \right)^{1/(n+1)} N^{3/(1+n)} = mN^{3/(1+n)}, \quad (23)$$

kjer je m konstanta.

Še več, enačba (23) je tako splošna, da lahko velja tudi za newtonske tekočine, če upoštevamo da je $n = 1$ in $K = \mu$ [16].

3.1.2 Razširitev na kolonski bioreaktor in reaktor z dvigovanjem zraka

V kolonskih reaktorjih je vhodna moč na volumsko enoto tekočine povezana s površinsko hitrostjo plina, ki jo označimo z U_g , saj imamo v tem primeru pnevmatsko mešanje in agitacijo in ne mehanske, kot pri mešalnih bioreaktorjih. Zapišemo jo kot:

$$\frac{P}{V} = g\rho U_g, \quad (24)$$

kjer g predstavlja gravitacijski pospešek. Ob upoštevanju enačbe (14) dobimo željeno zvezo, ki opisuje strig hitrostnega polja:

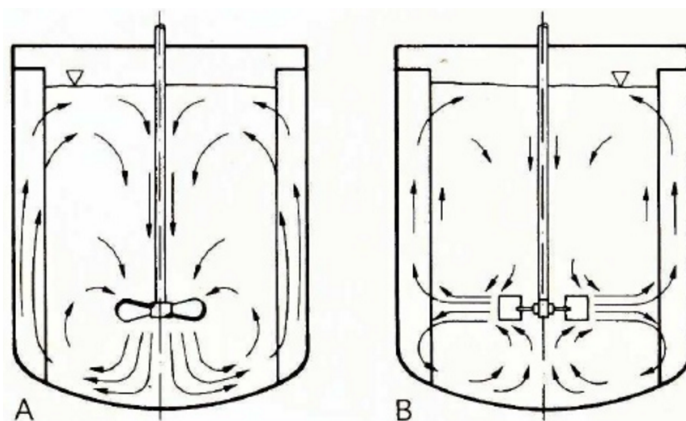
$$\gamma = \left(\frac{g\rho U_g}{K} \right)^{1/(n+1)}. \quad (25)$$

Pri reaktorjih z dvigovanjem zraka moramo enačbo (24) pomnožiti s faktorjem $\frac{A_R}{A_R + A_D}$, kjer A_R in A_D predstavljata prečni presek kanala za dovajanje (ang.riser) in odvajanje (ang.downcomer) plina. Strig hitrostnega polja nato izrazimo na enak način, kot smo to naredili pri kolonskem.

3.2 Mešanje

Mešanje je hidrodinamska operacija, ki ima velik vpliv na potek bioloških procesov v samem reaktorju. Igra ključno vlogo pri doseganju enotne sestave in temperature medija ter bistveno pospeši prenos hranil, toplote in metabolnih produktov.

V mešalnem reaktorju agitacijo dosežemo z mehanskim mešanjem. Mešala zagotavljajo odlično mešanje in dobre vrednosti koeficientov, ki opisujejo prenos toplote in snovi v bioreaktorju. Prav tako je od vrste in posledično oblike mešala odvisen vzorec toka v reaktorju, kot je to prikazano na spodnji sliki.



Slika 7. Mešala so razdeljena v dva razreda glede na to kakšen vzorec toka povzročajo. To sta aksialni tok, ki je prikazan na sliki A, in radialni tok, ki je ponazorjen na sliki B. Prvi vzorec dobimo, če kot mešalo uporabimo npr. propeler, drugega, če uporabimo npr. turbino [14].

V kolonskih bioreaktorjih in reaktorjih z dvigovanjem zraka sta mešanje in agitacija pnevmatska, zato jih pogosto uporabljamo pri bioprocesih kjer je pomemben stik med tekočino in plinom. Vloga slednjega je zagotoviti kontakt s tekočino pri procesih prenosa snovi, kot sta absorpcija in desorpcija ter z ekspanzijo plina zagotoviti energijo, potrebno pri mešanju tekočin.

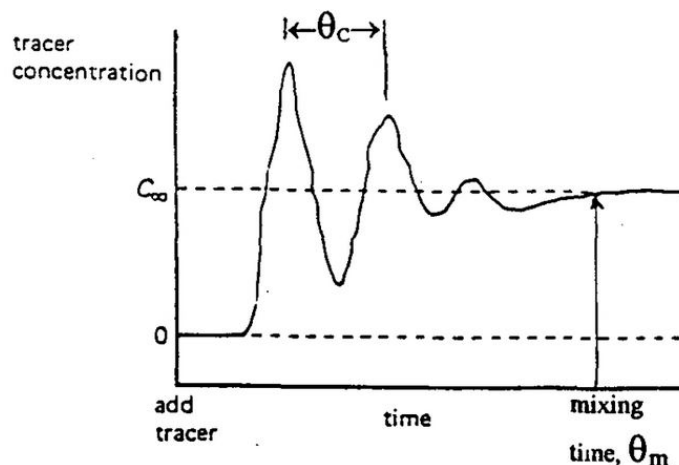
Mešanje je ključnega pomena pri prehodu iz laboratorijskih analiz na industrijsko raven, saj so te v industrijskem merilu velikokrat ogrožene. Ker se okoljski pogoji v reaktorju spreminjajo, je čas mešanja v bioprocesu pomemben za predvidenje optimalnih obratovalnih pogojev, kot so pH,

temperatura in koncentracija substrata. Čas pomešanja je običajno definiran kot čas, potreben za doseg določene ravni homogenosti (I) (običajno 95% homogenost). Raven I izrazimo kot:

$$I = \frac{C - C_\infty}{C_\infty}, \quad (26)$$

kjer C in C_∞ pomenita začetno in srednjo koncentracijo markerja, tj. referenčne tekočine, s katero si pomagamo pri določevanju časa pomešanja [23].

Homogeni pogoji so v bioreaktorjih zaželeni, saj omogočajo boljšo porazdelitev hranil in boljši prenos snovi po tekočini kar posledično izboljša pogoje za gojenje celičnih kultur.



Slika 8. Slika prikazuje meritev časa pomešanja, za primer, ko v mešalni bioreaktor kot marker injiciramo NaCl [14].

3.3 Prenos snovi med plinom in tekočino

Operacije, ki generirajo prenose snovi v bioloških sistemih so odvisne od nešteto vmesnih in vzporednih hidrodinamičnih procesov. Reaktorji, v katerih poteka prenos med plinom in tekočino izpolnjujejo dve zahtevi: disperzijo in absorpcijo. Disperzija zahteva, da se celotni volumen reaktorja uporabi za vmešavanje plina v tekočino. Ta korak je običajno enostavno doseči in ne predstavlja kritične omejitve sistema. Po drugi strani nam nizka topnost večine plinov omeji absorpcijo plina do te mere, da postane prenos snovi med plinom in tekočino pomemben za celotno reakcijo [24]. Ta omejitev je še posebno pomembna v sistemih, ki uporabljajo slabo topne pline, kot je npr. ogljikov monoksid, ki ga najdemo v sinteznih plinih, od katerih imajo nekateri zelo pomembno vlogo v industriji [19]. Najlažji način za povečanje produktivnosti v takem primeru je povečanje prenosa snovi med plinom in tekočino.

Pri prenosu snovi med plinom in tekočino moramo omeniti še dva pomembna parametra. To sta koeficient prenosa tekočinske faze, ki ga označimo s k_L in koeficient prenosa plinske faze, ki mu pripišemo oznako k_g . Ker je upornost snovnega prenosa plinske faze običajno precej manjša od tekoče ($k_L \gg k_g$), prenos snovi med plinom in tekočino nadzorujemo kar s k_L [12]. Ta vrednost je modulirana s specifično mejno površino, a , med fazama. Gonilna sila za prenos snovi je gradient koncentracije plina med plinsko fazo, C^* , in raztopljenim plinom, C . Hitrost prenosa snovi je določena z enačbo:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C). \quad (27)$$

Pri določanju masnega prenosa se običajno meri plinsko tekočinski koeficient prenosa snovi, $k_L a$, saj je k_L ali a izredno težko izračunati ali meriti neodvisno enega od drugega. Razlike, ki se pojavljajo pri merjenju koeficientov prenosa snovi so pogosto neposredna posledica sprememb

v površine med fazama [25]. To zopet napeljuje na dejstvo, da je homogen (mehurčkast) tok pri bioloških procesih bolj zaželen, kot heterogeni.

Vse merilne napake katerekoli spremenljivke lahko vodijo do lažnih sklepov ali nepravilne uporabe modelov snovnega prenosa. Ta problem je prisoten predvsem v mešalnih bioreaktorjih, ki lahko dosežejo visoke strižne hitrosti in ravni turbulence in ne toliko pri kolonskih bioreaktorjih ali reaktorjih, ki delujejo na princip dvigovanja zraka.

4. Zaključek

Svetovni trg bioloških zdravil za ljudi danes šteje več kot 180 bioloških zdravil. Uporabljamo jih npr. za zdravljenje revmatičnih bolezni, rakavih obolenj, sladkorne bolezni, slabokrvnosti, motenj v rasti, obolenj oči in pljuč, pomembno vlogo pa imajo tudi v kardiologiji in pri presaditvi organov [26]. Ker se jih v kliničnih raziskavah proučujejo še veliko več, lahko z gotovostjo trdimo, da se bo v prihodnosti njihov delež na farmacevtskem tržišču znatno povečal. Vzrok tega so znatne izboljšave na področju biotehnologije, med katere spada tudi vedno boljši razvoj bioreaktorjev. Velik izziv v tem razvoju predstavlja zapletena reologija in pojavljanje večfaznega toka v reaktorjih.

V članku smo med drugim spoznali, da je vrednost velikosti striga hitrostnega polja tista, ki predstavlja eno izmed glavnih komponent, ko je govora o dinamiki tekočin. Čeprav lahko njena pretirana vrednost povzroči izgubo sposobnosti preživetja celic ali motnje v njihovem razvoju, je po drugi strani določena stopnja striga nujno potrebna, da je dosežen zadosten prenos snovi in energije za učinkovito delovanje bioreaktorja.

5. Zahvala

Za nasvete in popravke se zahvaljujem mentorju doc. dr. Mihi Ravniku.

LITERATURA

- [1] C. Shimasaki, *Biotechnology Entrepreneurship: Starting, Managing, and Leading Biotech Companies* (Academic Press, Oklahoma, 2014).
- [2] L. A. Pray, (2008) Gleevec: the Breakthrough in Cancer Treatment. *Nature Education* 1(1):37.
- [3] N. Ferrara, K. J. Hillan, H. P. Gerber in W. Novotny, *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 391 (2004).
- [4] R. Rappuoli, S. Black, P. H. Lambert, *Lancet* **378**, 360 (2011).
- [5] Vaccine Development and Licensing Events (2017). [online] Dostopno na: <https://www.historyofvaccines.org/content/articles/vaccine-development-licensing-events>(Datum dostopa: 10.5.2017).
- [6] L. R. Burns, *The Business of Healthcare Innovation, 2nd Edition* (Cambridge University Press, Cambridge, 2012).
- [7] B. Štrukelj in J. Kos, *Biološka zdravila: od gena do učinkovine* (Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007).
- [8] J. A. Williams, *Keys to Bioreactor Selection* (AIChE, New York, 2002).
- [9] I. Martin, D. Wendt in M. Heberer, *Trends Biotechnol.*, **22**, 80 (2004).
- [10] Well-stirred batch reactors. [online] Dostopno na: http://www.metal.ntua.gr/~pkousi/e-learning/bioreactors/page_04.htm(Datum dostopa: 28.4.2017).
- [11] S. S. de Jesus, J. M. Neto in R. M. Filho, *Biochem. Eng. J.* **118**, 70 (2017).
- [12] J.C. Merchuk in M. Gluz, *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Bioreactors, Air-lift reactors* (Wiley, 2002).
- [13] Air Lift or Bubble Column Reactors. [online] Dostopno na: http://www.metal.ntua.gr/~pkousi/e-learning/bioreactors/page_11.htm(Datum dostopa: 28.4.2017).
- [14] A. W. Nienow, *Appl. Mech. Rev.* **51**, 1 (2009).
- [15] Laminarni in turbulentni tok. [online] Dostopno na: https://si.openprof.com/ge/images/267/laminarni_turbolentni_tok.jpg(Datum dostopa: 30.4.2017).
- [16] J. A. Sanchez, E. M. Rodriquez Porcel, J. L. Casas Lopez, J. M. Fernandez Sevilla in Y. Chisti, *Chem. Eng. J.* **124**,1 (2006).
- [17] E. Kadic in T. J. Heindel, *Hydrodynamic considerations in bioreactor selection and design* (Iowa State University, Department of Mechanical Engineering, Canada, 2010).
- [18] Viscosity. [online] Dostopno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Viscosity>(Datum dostopa: 20.4.2017).
- [19] M. Moo-Young, *Design of Biochemical Reactors, Mass Transfer Criteria for Simple and Complex Systems* (Springer, 1981).
- [20] Theory of Viscosity in Injection Molding. [online] Dostopno na: <http://www.injectionmoldingonline.com/ProcessingTheory/ViscosityCurve.aspx>(Datum dostopa: 20.4.2017)
- [21] J. M. Coulson in J. F. Richardson, *Chemical engineering / Vol. 1, Fluid flow, heat transfer and mass transfer* (Pergamon, Oxford, 1987).
- [22] C. Fenge, C. Klein, C. Heuer et al., *Cytotechnology* **11**, 233 (1993).
- [23] F. Y. Gumery, *Mixing characteristics of draft tube airlift bioreactor using the electrical resistance tomography* (Ryerson University, Toronto, 2010).
- [24] J. Y. Oldshue, *Fluid mixing technology* (McGraw-Hill, New York, 1993).
- [25] O. Stenberg in B. Andersson, *Chem. Eng. Sci.* **43**, 725 (1988).
- [26] M. Dragoš, T. Germovnik in M. Abazović *Biološka zdravila* (Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2013).