

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Metka STANTIČ

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA RAZLIČNO VELIKIH
PLAZMIDOV V BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. Stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Metka STANTIČ

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA RAZLIČNO VELIKIH PLAZMIDOV V
BIOREAKTORJU**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. Stopnja

**OPTIMIZATION OF DIFFERENT SIZED PLASMID DNA PRODUCTION IN A
BIOREACTOR**

M.SC. THESIS
Master study programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Aleša Podgornika, za somentorja prof. dr. Petra Rasporja in za recenzenta prof. Dr. Hrvoje Petkoviča.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednica: Prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: Prof. dr. Aleš Podgornik
Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo, Laboratorij za bioanalitiko, Ajdovščina
- Član: Prof. dr. Peter Raspor
Univerza na Primorskem, Fakulteta za vede o z dravju
- Član: Prof. dr. Hrvoje Petković
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Metka Stantič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
 DK UDK 606:602.4(043.2)=163.6
 KG bakterije/*Escherichia coli*/plazmidi/kultivacija/izolacija/bioreaktorji/bioprocеси
 AV STANTIČ, Metka
 SA PODGORNIK, Aleš (mentor)/RASPOR, Peter (somentor)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
 LI 2014
 IN OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA RAZLIČNO VELIKIH PLAZMIDOV V BIOREAKTORJU
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. Stopnja)
 OP XIII, 94 str., 20 pregl., 30 sl., 4 pril, 72 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI Plazmidi so večinoma krožne dvovijačne molekule DNA, ki se v biotehnologiji uporabljajo kot orodja za proizvodnjo rekombinantnih proteinov, ter kot terapevtska sredstva pri genskem zdravljenju ali v obliki DNA cepiv. Namen naloge je bil optimizirati proces proizvodnje plazmidne DNA v bioreaktorju, ki temelji na gram-negativnih bakterijah vrste *Escherichia coli*, enega najširše uporabljenih gostiteljskih sevov v biotehnologiji. Zaradi vedno večjega napredka genskega zdravljenja in višje učinkovitosti cepiv, ki imajo v svoje ogrodje vključene različne gene za signalne molekule, bodo potrebni vedno večji vektorji, kot se trenutno uporabljajo (pod 15 kb). Povečana uporaba cepiv na osnovi plazmidne DNA zahteva tudi visoko čistost in visoke koncentracije le te. Plazmidno DNA je potrebno izolirati v biološko aktivni superzviti obliki. Za učinkovito proizvodnjo DNA cepiv in terapevtskih plazmidov je tako pomemben visok izkoristek visoko očiščene plazmidne DNA. V magistrskem delu smo želeli ovrednotiti vpliv temperature kultivacije in sestave gojišča na rast petih različnih sevov bakterij *Escherichia coli*, ki imajo vstavljene različno velike plazmide. Pri dveh sevih s plazmidno DNA velikosti 10,7 kbp in 39,4 kbp, kjer smo na stresalniku opazili odziv na okoljske dejavnike, smo nato poskuse ponovili na bioreaktorskem nivoju. Določali smo tudi optimalne pogoje alkalne lize za plazmid velikosti 39,4 kbp, ki je bolj občutljiv na strižne sile.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDK 606:602.4(043.2)=163.6
 CX bacteria/*Escherichia coli*/plasmids/cultivation/isolation/bioreactors/bioprocesses
 AU STANTIČ, Metka
 AA PODGORNIK, Aleš (supervisor)/RASPOR, Peter (co-supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology
 PY 2014
 TI OPTIMISATION OF DIFFERENT SIZED PLASMID DNA PRODUCTION IN A BIOREACTOR
 DT M.SC. thesis (Master study programmes)
 NO XIII, 94 p., 20 tab., 30 fig., 4 ann., 72 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB Plasmids are mainly circular deoxyribonucleic acid molecules. In biotechnology, plasmids are mainly considered as tools for recombinant protein production and a putative therapeutic agent, for example in gene therapy or as DNA vaccines. The purpose of the thesis was to optimize the process of production of plasmid DNA in a bioreactor, which is usually based on the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*, an organism, which is already used on a very large scale in biotechnology. Due to the growing progress of gene therapy and higher effectiveness of vaccines, there is a trend to use plasmid DNA of larger size than currently used: above 15 kb. Due to the increased number of clinical trials in gene therapy, the demand for high-quality plasmid DNA is constantly growing. For the efficient production of DNA vaccines and therapeutic plasmids, only highly purified plasmid DNA in supercoiled form should be produced. In the thesis, we were evaluating the effect of the temperature of the cultivation and composition of the cultivation medium on the growth of five cultures containing different-sized plasmid DNA. For the plasmids of size 10.7 kbp and 39.4 kbp, bioprocess was further repeated at a bioreactor level. Due to the sensitivity of larger plasmids to the shear forces and a chemical environment which occur during the alkaline lysis, we adapted also the downstream process of the 39.4-kbp plasmid DNA.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BAKTERIJE RODU <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.2 Lastnosti seva <i>E. coli</i> K-12	5
2.2. RASTNE KARAKTERISTIKE BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i>	5
2.2.1 Temperatura	6
2.2.2 pH vrednost	7
2.2.3 Sestava gojišča	7
2.2.4 Vpliv koncentracije topnega kisika na rast	9
2.3 PLAZMIDI	11
2.3.1 Topoizoforne plazmidne DNA	15
2.3.2 Replikacija	18
2.3.3 Uporaba plazmidne DNA	20
2.3.3.1 DNA cepiva	21
2.3.3.2 Genska terapija	21
2.3.3.3 Plazmidi kot vektorji za kloniranje	22
2.3.4 pBR322	23
2.3.5 Regulacija biosinteze plazmidov	24
2.4 NAČINI KULTIVACIJE	25
2.4.1 Bioproces z enkratnim polnjenjem	26
2.4.2 Bioproces z enkratnim polnjenjem in dohranjevanjem	28
2.4.3 Gojenje kultur na stresalniku	29
2.5 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA	29

2.5.1 Nečistoče.....	29
2.5.2 Alkalna liza	32
2.6 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI	33
3 MATERIALI IN METODE	35
3.1 MATERIALI	35
3.1.1 Bakterijski sevi in plazmida DNA	35
3.1.2 Rastna gojišča za bakterije vrste <i>E. coli</i>	36
3.1.2.1 Trdno gojišče Luria Bertani - Agar	36
3.1.2.2 Tekoče gojišče Luria Bertani bujon.....	36
3.1.3 Raztopine antibiotikov.....	37
3.1.4 Pufri in raztopine	37
3.1.4.1 Pufer 50 mM TRIS in 10 mM EDTA, pH 8,0	37
3.1.4.2 Raztopina 0,2 M NaOH in 1 % natrijevega dodecil sulfata.....	38
3.1.4.3 Raztopina 3M kalijev acetat, pH 5,5	38
3.1.4.4 Raztopina 4M CaCl ₂	39
3.1.5 Priprava mobilnih faz za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.....	39
3.1.5.1 Mobilna faza A; 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1,5 M NaCl, pH 7,2	39
3.1.5.2 Mobilna faza B; 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,2	39
3.1.6 Laboratorijska oprema in pribor	40
3.1.7 Reagenti	41
3.1.8 Kolone	42
3.2 METODE	42
3.2.1 Priprava delovne banke in shranjevanje bakterij vrste <i>E. coli</i> v zbirko.....	42
3.2.2 Namnožitev biomase za vcepek.....	43
3.2.3 Gojenje bakterijske kulture na stresalniku	43
3.2.4 Gojenje bakterijske kulture v bioreaktorju	43
3.2.5 Merjenje optične gostote vzorcev	43
3.2.6 Določanje koncentracije mokre biomase vzorcev	43
3.2.7 Ločitev celic od gojišča s centrifugiranjem	44
3.2.8 Alkalna liza celic	44
3.2.9 Priprava umeritvene krivulje za HPLC s standardnim plazmidom	44
3.2.10 Analiza plazmidne DNA s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.....	45
3.2.11 Preverjanje čistosti vzorca s plazmidno DNA, z elektroforezo	45
4 REZULTATI	46
4.1 OPTIMIZACIJA RASTNIH PARAMETROV BAKTERIJ VRSTE <i>E. coli</i>.....	46

4.1.1 Preizkusi na stresalniku.....	46
4.1.1.1 Preizkusi kultivacije na stresalniku brez dohranjevanja	46
4.1.1.2 Vpliv dodatka kloramfenikola v gojišče.....	51
4.1.1.3 Preizkusi na stresalniku z dohranjevanjem.....	53
4.2 OPTIMIZACIJA BIOPROCESNIH PARAMETROV	54
4.2.1 Bioproces z enkratnim polnjenjem.....	56
4.2.2 Bioproces z dohranjevanjem substrata.....	63
4.2.3 Bioproces z dodatkom kloramfenikola	66
4.2.4 Izolacija superzvite oblike, s pomočjo HPLC metode.....	67
4.3 OPTIMIZACIJA POTEKA ALKALNE LIZE.....	69
4.3.1 Optimizacija uporabe kemikalij pri postopku alkalne lize	71
4.3.2 Optimizacija časa alkalne lize	71
4.4 OPTIMIZACIJA HPLC METODE.....	72
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	75
5.1 SKLEPI.....	84
6 POVZETEK (SUMMARY).....	85
6.1 POVZETEK	85
6.2 SUMMARY	86
7 VIRI	88
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rast bakterij vrste <i>E. coli</i> , pod različnimi pogoji, vir ogljika je glukoza (Colin in Kristansen, 2006)	10
Preglednica 2: Zahteve za produkte celične in genske terapije (Faucher, 2003)	30
Preglednica 3: Sestava prokariontske celice (Niedhardt in Curtiss, 1996).....	30
Preglednica 4: Seznam uporabljenih plazmidov	36
Preglednica 5: Sestava trdnega gojišča LB-A	36
Preglednica 6: Sestava tekočega gojišča LB-B	37
Preglednica 7: Uporabljeni antibiotiki.....	37
Preglednica 8: Sestavine za pripravo pufra	38
Preglednica 9: Sestavine za pripravo raztopine 0,2 M NaOH in 1% SDS	38
Preglednica 10: Sestavine za pripravo raztopine 3 M kalijevega acetata, pH vrednost 5,5	38
Preglednica 11: Sestavine za pripravo raztopine 4 M CaCl ₂	39
Preglednica 12: Sestavine za pripravo raztopine za mobilno fazo A	39
Preglednica 13: Potrebne kemikalije za pripravo raztopine	39
Preglednica 14: Uporabljena laboratorijska oprema	40
Preglednica 15: Splošni laboratorijski material.....	41
Preglednica 16: Uporabljeni reagenti	41
Preglednica 17: Shematski prikaz pogojev HPLC metode.....	45
Preglednica 18: Primerjava specifičnih hitrosti rasti ter koncentracij plazmidne DNA, z različnimi sevi, pri različnih temperaturah, ob dodajanju različnih hranil.....	53
Preglednica 19: Pregled pogojev rasti pri gojenju kultur v bioreaktorju in prikaz specifičnih hitrosti rasti, ter donosa plazmidne DNA, za vsak bioproces posebej	57
Preglednica 20: Prikaz vpliva količine kemikalij na koncentracijo plazmidne DNA	71

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz različnih oblik plazmidne DNA znotraj celice (Old in Primrose, 1996; Quaak, 2009).	17
Slika 2: Rastne krivulje vseh petih sevov bakterij <i>E. coli</i> , gojenih v dveh ločenih poskusih, pri enaki temperaturi.....	47
Slika 3: Rastne krivulje vseh petih sevov bakterij <i>E. coli</i> , gojenih v ločenih poskusih pri različnih temperaturah.	48
Slika 4: Primerjava povprečij specifičnih hitrosti rasti za vse seve bakterij <i>E. coli</i> , gojene na stresalniku, pri različnih temperaturah.....	49
Slika 5: Primerjava povprečij koncentracij plazmidne DNA (mg/ml), za vse seve bakterij <i>E. coli</i> , gojene na stresalniku, pri različnih temperaturah.....	49
Slika 6: Primerjava koncentracij plazmidne DNA (stolpčni diagram) in specifičnih hitrosti rasti (točkovni diagram), za vse seve bakterij <i>E. coli</i> , pri različnih temperaturah gojenja na stresalniku.....	50
Slika 7: Vpliv dodatka kloramfenikola v gojišče, na vseh pet sevov bakterij <i>E. coli</i> , s petimi različno velikimi plazmidi.....	51
Slika 8: Vpliv temperature gojenja in dodatka kloramfenikola v gojišče, na končno koncentracijo plazmidne DNA, za vse seve bakterij <i>E. coli</i>	52
Slika 9: Vpliv temperature in sestave gojišča, na koncentracije plazmidne DNA, pri treh ločenih kultivacijah bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA YEP13 (10,7kb).....	54
Slika 10: Vpliv temperature na specifično hitrost rasti bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidom YEP13 (10,7 kb).	55
Slika 11: Prikaz odvisnosti časa potrebnega za doseganje maksimalnega titra plazmidne DNA, od temperature gojenja seva bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA YEP13 (10,7 kb). 55	
Slika 12: Potek bioprocesa z enkratnim polnjenjem, z bakterijskim sevom <i>E. coli</i> K12 MC1066 in plazmidno DNA YEP13 (10,7 kb).	56

Slika 13: Prirast biomase, za sev bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA velikosti 10,7 kb, v petih neodvisnih kultivacijah, pri različnih pogojih.	58
Slika 14: Primerjava specifičnih hitrosti rasti in koncentracije plazmidne DNA za bioproces z enkratnim polnjenjem, v bioreaktorju, za sev bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA velikosti 10,7kb.....	59
Slika 15: Krivulje rasti za sev bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb, gojen v bioreaktorju, pri različnih pogojih kultivacije.	59
Slika 16: Primerjava specifičnih hitrosti rasti in koncentracije plazmidne DNA za šaržni bioproces v bioreaktorju, za sev bakterij vrste <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb.	60
Slika 17: Naraščanje koncentracije plazmidne DNA z naraščanjem koncentracije biomase, pri bakterijah vrste <i>E. coli</i> , plazmidna DNA YEP13 (10,7 kbp).	61
Slika 18: Spreminjanje koncentracije plazmidne DNA glede na biomaso, pri bakterijah <i>E. coli</i> , za sev DSM4887_2 (10,7 kb).	61
Slika 19: Spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, v primerjavi s spreminjanjem koncentracije biomase, med bioprosesom z enkratnim polnjenjem, v bioreaktorju, z bakterijami <i>E. coli</i> , sev DSM8878 (7,1 kb).	62
Slika 20: Spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, glede na spreminjanje koncentracije biomase, med bioprosesom z enkratnim polnjenjem, v bioreaktorju, z bakterijami <i>E. coli</i> , sev DSM8878 (7,1 kb).	63
Slika 21: Spremljanje bioprosesa z dohranjevanjem triptona na bioreaktorskem sistemu, pri gojenju z bakterijami <i>E. coli</i> , sev DSM4887 (plazmid YEP13; 10,7 kb).	64
Slika 22: Prirast biomase in spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, pri bioprosesa z dohranjevanjem triptona, pri bakterijah <i>E. coli</i> , sev DSM4887 (plazmid YEP13; 10,7 kb).	65

Slika 23: Vpliv temperature na specifično hitrost rasti in koncentracijo plazmidne DNA, pri treh bioprocseh z enkratnim polnjenjem ter dveh bioprocseh z dohranjevanjem, za sev bakterij <i>E. coli</i> (YEP13; 10,7kb).	65
Slika 24: Primerjava specifičnih hitrosti rasti in koncentracije plazmidne DNA, za dva bioprocasa z enkratnim polnjenjem in bioprocas z dohranjevanjem, za sev bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA velikosti 39,4kb.	66
Slika 25: Prirast biomase in spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, pri bioprocasu z dodatkom kloranfenikola v gojišče, za sev bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb.	67
Slika 26: Dodajanje ribonukleaz k vzorcu lizata seva bakterij <i>E. coli</i> , s plazmidno DNA, velikosti 39,4 kb.	68
Slika 27: Preverjanje delovanja ribonukleaz na 1 % agaroznem gelu.....	69
Slika 28: Shema predhodno razvite metode alkalne lize (Smrekar in sod., 2010).	70
Slika 29: Prikaz vpliva trajanja alkalne lize na koncentracijo pridobljene plazmidne DNA.	72
Slika 30: Prikaz spreminjanja gradienta med optimizacijo HPLC metode.	73

KAZALO PRILOG

- Priloga 1: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije plazmidne DNA (mg/ml) v vzorcih odvzetih med bioprocesi, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti
- Priloga 2: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije celic (mg/ml) pri merjenju optične gostote, tako off-line, kot tudi in-line
- Priloga 3: Primerjava specifičnih hitrosti rasti med gojenjem kultur na stresalniku, z različnimi sevi, pri različnih temperaturah
- Priloga 4: Primerjava povprečij specifičnih hitrosti rasti med gojenjem kultur na stresalniku, z različnimi sevi, pri različnih temperaturah

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% GC	odstotek gvanozina in citozina v DNA
Amp	antibiotik ampicilin
ATP	adenin trifosfat
bp	bazni par
CCC	oblika kovalentno zaprtega kroga (ang. covalently closed circular DNA)
Cm	antibiotik kloramfenikol
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)
g	gravitacijski pospešek
GMP	dobra proizvodna praksa (ang. Good Manufacturing Practice)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
kbp	kilo bazni pari
kDa	kilo dalton
Kn	antibiotik kanamicin
LB	gijišče za kultivacijo bakterij <i>E. coli</i> (ang. Luria-Bertani)
LB-A	Luria-Bertani agar
LB-B	Luria-Bertani bujon
Mbp	mega bazni par
MfA	mobilna faza A
MfB	mobilna faza B
OC	oblika odprtega kroga (ang. open circle DNA)
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. phosphate buffered saline)
SDS	natrijev dodecil sulfat
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina
vrt./min	vrtljaji na minuto

1 UVOD

Plazmidi so stabilne, izvenkromosomske krožne molekule DNA, ki se samostojno podvojujejo, najti pa je moč tudi linearne oblike plazmidov in tudi RNA plazmide. Gre za genetske elemente, ki se nahajajo tako v prokariotskih, kot tudi v evkariotskih celicah, kjer se lahko pojavljajo samostojno, ali pa v večjem številu in lahko nosijo zapis za le nekaj, ali pa za več sto genov (Clark, 2010).

V celici se plazmidi nahajajo v dveh kovalentnih oblikah, ki ju imenujemo kovalentno zaprti krog, ali oblika CCC, ter odprti krog, ali oblika OC. Plazmidi v obliki kovalentno zaprtega kroga so v celici običajno dodatno zviti, plazmidi v obliki odprtega kroga pa so brez dodatnih navojev in jim zato pravimo, da so sproščeni (Old in Primrose, 1994). Pri uporabi plazmidne DNA v terapevtske namene veljajo različni kriteriji kvalitete, ki določajo, da mora končni terapevtski produkt vsebovati več kot 90 % plazmidne DNA prisotne v super zviti obliki, ter manj kot 5 % izoform le te (Faucher, 2003).

Z razvojem tehnologije rekombinantne DNA se je pričel tudi razvoj visoko donosnih procesov za proizvodnjo plazmidne DNA, ki se vedno bolj uveljavlja kot vektor za genske terapije in DNA cepiva (Silva, 2012). V kliničnih preizkusih se še vedno uporabljajo majhni plazmidi, navadno manjši od 10 kb. Na področju DNA cepiv pa so Cohen in sod. (1988) izpostavili potrebo po uporabi plazmidne DNA večjih velikosti, ki povišajo učinkovitost DNA cepiv. Kot navaja Levy (2000), se tudi na področju uporabe plazmidne DNA v genski terapiji, pojavljajo potrebe po čim večjih velikostih vektorjev.

Proizvodni proces je potrebno optimizirati v vseh fazah, pri čemer pa je glavno vodilo maksimalen izkoristek, ob minimalnih stroških. Najpogosteje se išče optimalen profil dohranjevanja s substratom, ter optimalne pogoje, ki se nanašajo na biomaso in substrat (Berovič in Nienow, 2006). Na količino biomase in donos bioprocesa pri proizvodnji plazmidne DNA vplivajo številni parametri, vključno z zmožnostjo plazmida, da se vzdržuje med podvajanjem celic, ter se uspešno podvojuje, kot tudi pogoji kultivacije. Optimizacija bioprocesov za proizvodnjo plazmidne DNA je še vedno ovirana zaradi pomanjkanja informacij o metabolnem odgovoru gostitelja, ter informacij o plazmidni nestabilnosti (Silva, 2012). Da bi dosegli čim višje koncentracije plazmidne DNA smo v našem delu optimizirali različne parametre, ki imajo vpliv na rast celic bakterij vrste *E. coli*.

1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

Cilj diplomskega dela je bil razviti in optimirati bioproces z enkratnim polnjenjem in bioproces z dohranjevanjem substrata, v kombinaciji z obstoječim procesom čiščenja, ki bi dal maksimalni izplen. Optimirali smo rast bakterij vrste *E.coli* in sprotno sledili deležu plazmida v celicah, pod različnimi pogoji gojenja (elektroforeza, kromatografija). Razvite postopke smo prilagodili in optimirali na plazmidih dveh različnih velikosti.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovne hipoteze magistrske naloge, ki smo jih postavili pred začetkom eksperimentalnega dela, so bile:

- Koncentracija DNA narašča s koncentracijo biomase v bioreaktorju.
- S procesom dohranjevanja substrata dosežemo višjo koncentracijo plazmida na liter gojišča, kot pri bioprocesu z enkratnim polnjenjem.
- Tako pri bioprocesu z enkratnim polnjenjem, kot pri procesu z dohranjevanjem substrata, je mogoče pridobiti plazmid v pretežno superzviti obliki.
- Pri čiščenju so izkoristek in čistost plazmida velikosti do 10 kb, večji kot za plazmide velikosti nad 30 kb.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BAKTERIJE RODU *Escherichia coli*

Bakterije rodu *Escherichia coli* so kemoorganotrofne bakterije paličaste oblike, velikosti $1 \times 2 \mu\text{m}$. Spadajo med fakultativne anaerobe, njihov naravni habitat pa je debelo črevo, zaradi česar jih uvrščajo med enteritične bakterije. Predstavljajo dokaj homogeno filogenetsko skupino znotraj gama proteobakterij in so fenotipsko okarakterizirane kot nesporulirajoče celice paličaste oblike, ki se lahko premikajo s pomočjo flagelov. Zaradi dvojne membrane se po Gramu barvajo negativno (Madigan, 2006).

Vrsta vključuje veliko število sevov, ki se razlikujejo v spektru patogenosti. Določeni sevi so pogosti neškodljivi prebivalci črevesja sesalcev, nekateri pa povzročijo infekcije prebavnega in urinarnega trakta, krvi in centralno živčnega sistema. Veliko pozornost so namenili predvsem sevom, ki proizvajajo močan toksin, ki lahko povzroči tudi sepso, v primeru, da ga zaužijemo s kontaminirano vodo ali hrano (Neidhardt, 2001). Metabolno ozadje in genetika tega organizma so dodobra raziskane, zaradi česar je to ena najbolj znanih celičnih oblik življenja in posledično tudi modelni organizem v razvoju številnih panog, kot so to molekularna biologija in fiziologija, ter biokemija (Schaechter, 2009).

Gram negativne bakterije vrste *Escherichia coli* so namreč bile prvi genetsko in molekularno biološko raziskani mikroorganizem, prve so bile spremenjena z uporabo metod genskega inženirstva in podvržene proizvodnji rekombinantnih proteinov. Iz modela za bazične znanstvene raziskave so se razvile v industrijski mikroorganizem, ki trenutno predstavlja najpogostejše uporabljen prokariotski sistem za izražanje heterolognih proteinov. Postale so standardni organizem za proizvodnjo encimov za diagnostične in analize namene. Uporablja se jih tudi za sintezo farmacevtsko pomembnih proteinov, ki ne zahtevajo zapletenih post translacijskih modifikacij in niso sestavljeni iz več različnih podenot (Jevnikar, 2007). Tudi biotehnološka industrija temelji na podlagi raziskav genetike bakterij te vrste, zaradi česar večina biotehnoloških procesov vključuje prav ta mikroorganizem (Neidhardt, 2001). Kot navaja Baneyx (1999), je proizvodnja bioloških zdravil za enkrat omejena predvsem na bakterije vrste *E. coli*, nekatere kvasovke in sesalske celice.

Znotraj rodu *Escherichia* obstaja še veliko drugih vrst, nobena pa ni tako dobro raziskana kot ravno *E. coli*. Rod nosi ime po bakteriologu Theodoru Escherichu, ki je prvi izoliral to

bakterijo, leta 1884. Na podlagi meritve določenih biokemijskih aktivnosti so prišli do zaključkov, da je za bakterije te vrste značilno, da fermentirajo laktozo, imajo lizin dekarboksilazo, proizvajajo indol, ne rastej na citratu, ne proizvajajo H_2S in so Voges-proskauer negativne. Za kromosomsko DNA seva K-12 je značilna 50,8 % vsebnost GC baznih parov (Schaechter, 2009).

Podvojitveni čas bakterij je odvisen od številnih faktorjev, kot so to sestava in koncentracija hranil, inkubacijski pogoji, ter genetika celice. Pri optimalnih pogojih rasti znaša za bakterije vrste *E. coli* le ta 20 minut. Znano je, da je DNA pri *in vivo* pogojih negativno superzavita, v kakih 50 posameznih domen. Taka nepravilna konformacija nukleoida, prispeva k dostopnosti genov za transkripcijo. Po iniciaciji se DNA replikacija odvija pri relativno konstantnih hitrostih (Madigan, 2006). V dokaj hitro rastočih celicah bakterije *E. coli* traja podvojevanje kromosoma pri temperaturi gojenja 37 °C, 40 min. V kulturah, ki rastejo hitreje kot ta, pa je potrebno, da začetek replikacije kromosomov poteka pred zaključkom prejšnjega kroga (Silva, 2009).

V hitro rastočih celicah *E. coli* pa zavzemajo veliko citoplazmatskega prostora ribosomi. Število ribosomov na celico je proporcionalno stopnji rasti in se giblje od približno 2000 na celico, v kulturah, ki rastejo pri 37 °C s hitrostjo rasti $0,2\ h^{-1}$, do več kot 70.000 na celico, pri hitrostih rasti $2,5\ h^{-1}$, kjer predstavljajo 40 % celične mase. Pri bakterijah *E. coli* so geni za štiri rRNA molekule (16S, 23S, 5S in tRNA) razporejeni na sedmih operonih, lociranih na različnih mestih na kromosomu. Večino teh operonov najdemo poleg mest začetka replikacije kromosomov, zaradi česar se zgodaj podvajajo. Taka razporeditev omogoča da se rRNA hitro pomnožuje med hitro rastjo celice (Madigan, 2006).

Pri sevih bakterij *E. coli* najdemo običajne in konjugacijske fimbrije. Prvih je v celici okrog 100 – 1000, konjugacijski fimbriji pa so kodirani s strani plazmidov, kot sta recimo F in R plazmid in so prisotni navadno v eni, do dveh kopijah na celico. Ta struktura omogoča donorski bakteriji in bakteriji prejemnici, da vzpostavita kontakt in posledično prenos DNA med konjugacijo (Schaechter, 2009).

Bakterije *E. coli* imajo en krožni kromosom, na katerem se nahaja okoli 4290 genov. Prvo celotno zaporedje genoma bakterij te vrste, so za sev MG1655 (4,639,221 bp) predstavili leta 1997 Blattner in sodelavci (Rowland, 2003). Nekateri patogeni sevi vsebujejo

približno 1 milijon več baznih parov kot sev K-12, dodatne gene pa je vrsta najverjetneje pridobila med horizontalnim prenosom genov (Schaechter, 2009).

2.1.2 Lastnosti seva *E. coli* K-12

Bakterije *E. coli* vključujejo veliko število sevov, ki se med seboj razlikujejo po sestavi genoma in nivoju patogenosti. Večina izolatov je dobro prilagojenih na kolonizacijo črevesja sesalcev in le redko povzročajo bolezni. Med laboratorijsko kultivacijo humanih sevov pa le ti težijo k izgubi zmožnosti kolonizacije. Eden izmed takih je tudi sev K-12, ki je najširše uporabljen sev v molekularni biologiji (Schaechter, 2009).

Sev K-12 bakterij *E. coli*, so izolirali leta 1922, od leta 1925 pa je del bakterijske zbirke na Stanfordski univerzi (Rowland, 2003). Bakterije rodu *Escherichia coli* K-12 imajo en krožni kromosom, velikosti 4,64 Mbp. Sem nista všteta F-plazmid in bakteriofag lambda, ki sta tudi tipično prisotna v sevu K-12 (Madigan, 2006). Genom kodira skupno verjetnih 4460 proteinov, znotraj 3277 verjetnih transkripcijskih enot in 175 RNA genov. Približno trem četrtinam teh genov so uspeli določiti funkcijo, vendar se podatki nekoliko spreminjajo. Anotacija večine teh genov se vrši na podlagi eksperimentalnih podatkov, kar je največ kar se je delalo za kakršenkoli organizem do sedaj. Za približno 20 % genov predvidevajo, da so bili pridobljeni na podlagi horizontalnega prenosa genov od drugih organizmov (Schaechter, 2009). Sev K-12 spada v razred F^+ , ter nosi tako imenovani F plazmid, ki nosi zapis za gene, ki omogočajo F^+ celicam konjugacijo z F^- celicami (Davis, 2003).

2.2. RASTNE KARAKTERISTIKE BAKTERIJ VRSTE *E. coli*

Pri kontroli mikrobne rasti igrajo ključno vlogo štirje glavni bioprocesni parametri, ki so temperatura, pH vrednost, dostopnost vode ter kisik (Madigan, 2006). Na donos biomase vplivajo številni parametri, kot recimo sestava gojišča, narava virov ogljika in dušika, pH vrednost in temperatura. Donos biomase je višji pri aerobnih kot anaerobnih kultivacijah, na kar vpliva tudi izbira akceptorja elektronov, kot so to kisik, nitrat ali sulfat (Doran, 1995).

Bakterije *E. coli* so kemoheterotrofi in imajo zmožnost rasti na širokem spektru sladkorjev ali amino kislin, prisotnih tako posamično, kot tudi v mešanici. Rastejo pa najhitreje ob prisotnosti glukoze, kot glavnem viru ogljika in energije, ter dosežejo podvojitveni čas 50

min pri optimalnih pogojih aeracije in temperaturi 37 °C. Podvojitveni čas v revnejših gojiščih lahko traja tudi ure. Če pa gojišča obogatimo z amino kislinami, nukleozidi, sladkorji in prekursorji vitaminov, pa dosežajo bakterije te vrste pri isti temperaturi, podvojitveni čas 20 minut (Madigan, 2006).

2.2.1 Temperatura

Temperatura je eden najpomembnejših faktorjev, ki vpliva na rast in preživetje mikroorganizmov. Pri povišanju temperature znotraj določenega območja, pride zaradi hitrejšega dogajanja kemijskih in encimatskih reakcij, do hitrejši rasti mikroorganizma in metabolnih funkcij. Če pa presežemo določeno temperaturo, pa pride lahko do ireverzibilne denaturacije določenih proteinov in tako prenehajo delovati celične funkcije. Za vsak organizem tako poznamo minimalno temperaturo, pod katero se rast ne pojavi več, optimalno temperaturo, pri kateri je rast najhitrejša, ter maksimalno temperaturo, nad katero pa rast ni mogoča več. Te tri pomembne temperaturne točke so značilne za vsak organizem posebej, vendar niso ravno fiksne vrednosti, saj se lahko spreminjajo zaradi drugih dejavnikov okolja, kot na primer zaradi sestave rastnega gojišča. Bakterije *E. coli* uvrščamo glede na temperaturni optimum, ki je pri srednjih temperaturnih vrednostih, med mezofile. Mezofile najdemo pri toplokrvnih živalih, ter v zemeljskem in vodnem okolju v zmernem in tropskem podnebju. Bakterije *E. coli* lahko rastejo v temperaturnem območju med 8 in 48 °C, kar je odvisno od seva in prisotnosti hranil v gojišču. Njihova optimalna temperatura za rast pa je 39 °C (Madigan, 2006). Za uspešno rast je potrebno tako zagotavljanje optimalne temperature gojišča, zaradi česar moramo imeti ustrezno regulacijo (Podgornik in sod., 2013).

V številnih raziskavah so določali vpliv temperature na proizvodnjo plazmidne DNA, ter prišli do ugotovitve, da je to povezano z dostopnostjo hranil. Pod optimalno temperaturo za rast, ima namreč celična membrana nižjo sposobnost aktivno transportirati hranila v celico. Nedwell (1999) je določal vpliv temperature gojenja na afiniteto mikroorganizmov za substrat in ugotovili, da se le ta niha skladno s tem, ko temperatura pade pod optimalno temperaturo za rast. To pripisujejo pojavu, ko pride pod temperaturnim optimumom, do preoblikovanja lipidov v membrani, kar ima za posledico nižjo učinkovitost transportnih proteinov, ujetih v membrano. Najnižja temperatura za rast je tako temperatura, pri kateri organizem ni več sposoben zagotavljati potreb po limitirajočem hranilu za rast, zaradi izgube afinitete za substrat.

Direktne povezave med povišanjem hitrosti rasti ter povečanega števila kopij plazmidov med spreminjanjem temperature kultivacije pa niso opazili. Učinek temperature naj bi zavisel od tipa plazmida. Spreminjanje temperature rasti pa so uspešno uporabili za selektivno amplifikacijo plazmidne replikacije v primerjavi z replikacijo kromosomske DNA, kar je imelo za posledico povišano število kopij plazmidov pri višjih temperaturah (Mahony, 2007).

2.2.2 pH vrednost

Vsak mikroorganizem ima pH območje, znotraj katerega je njegova rast mogoča, običajno pa ima definiran tudi pH optimum. Optimalno območje pH vrednosti za rast predstavlja pH vrednost zunajceličnega okolja. pH vrednost znotraj celice pa se mora gibati relativno blizu nevtralnega, da ne pride do uničenja kislinski ali bazično-labilnih makromolekul znotraj le te. Med šaržno kultivacijo se pH vrednost zunajceličnega okolja spreminja, kot rezultat metabolnih reakcij, kjer se porabljajo ali kopičijo različne kisle ali bazične substance (Madigan, 2006). Zato je kot procesno spremenljivko smiselno spremljati tudi pH vrednost, ki nam daje informacije o metabolizmu (Podgornik in sod., 2013). Da se ohrani pH vrednost relativno konstantno, se v kultivacijsko gojišče dodajajo različni pufri. Bakterije vrste *E. coli* rastejo v pH območju med 6,0 in 8,0, lahko pa pride do rasti tudi v območju odstopanja za 1 pH enoto izven tega ranga (Madigan, 2006).

Kot navajajo Mahoney in sod. (2007), je za rast kulture optimalna začetna pH vrednost gojišča med 7,0 in 7,2. Med bioprosesom prihaja namreč do zakisanja gojišča zaradi metabolne aktivnosti bakterij, kar povzroča padec pH vrednosti gojišča med samim bioprosesom za eno enoto. Dokazali pa so, da je produktivnost celic (titer DNA) pri tej pH vrednosti zelo nizek. Najboljše rezultate so dosegli v primeru, ko je imelo gojišče na začetku pH vrednost med 6,7 in 6,9 ter med 7,3 in 7,5.

2.2.3 Sestava gojišča

Optimalno rastno gojišče mora zagotoviti zadovoljivo in hitro rast mikroorganizma, njegova priprava mora biti enostavna ter ponovljiva, poleg tega pa mora biti še cenovno ugodno (Madigan, 2006). Kot navaja Schaechter (2009), so pri bakterijah *E. coli* citoplazemski membranski sistemi, ki so vključeni v transport raztopin zelo učinkoviti, zato dovoljujejo rast na relativno razredčeni raztopini hranil.

Glede na sestavo ločimo definirana, pol definirana in kompleksna gojišča. Pri definiranih gojiščih so vse sestavine gojišča poznane v podtankost in jih lahko med kultivacijo kontroliramo, zato se teh gojišč poslužujemo, ko želimo doseči visoke koncentracije celic. Hranila v kompleksnem gojišču, kot sta to pepton in kvasni ekstrakt pa varirajo v sestavi in kakovosti, zaradi česar je biosintezni proces ob uporabi teh gojišč manj ponovljiv. V nekaterih primerih pa z uporabo pol definiranih ali kompleksnih gojišč dosežemo višje koncentracije želenega produkta (Kensy in sod., 2009).

V preprostem gojišču rastejo bakterije *E. coli* zelo hitro, saj dosežejo podvojevalni čas okrog ene ure (Schaechter, 2009). Divji tipi rodu *Escherichia* redko izkazujejo potrebe po rastnih faktorjih in so sposobni rasti na številnih virih energije, kot na primer sladkorjih, amino kislinah, ter organskih kislinah (Madigan, 2006).

Izbira oz. sestava gojišča je odvisna predvsem od potreb določenih bakterij po hranilih, ter omejitev, ki jih lahko predstavlja uporaba le tega. Kot navaja Mulhardt (2007), se v večini protokolov za gojenje bakterij *E. coli* uporablja Luria-broth (LB) gojišče (10 g triptona ali peptona, 5 g kvasnega ekstrakta, 5 do 10 g NaCl in 1 ml 1N NaOH na liter), ki pa ni vedno primereno. Da bi dosegli višji donos biomase, kot recimo pri pripravi plazmidne DNA, se je bolje posluževati uporabe Terrific-broth (TB) gojišča (12 g triptona, 24 g kvasnega ekstrakta in 4 ml glicerina na liter gojišča, h kateremu se doda še 0,1-kratni volumen 1M KHPO₄, do pH vrednosti 7,5), saj dosežemo tako do štirikrat gostejšo rast bakterij. Tako bogato gojišče je primereno tudi za gojenje celih celic, saj ostanejo celice v eksponentni fazi rasti dlje časa kot v LB gojišču, kjer padejo le te v neke vrste hibernacijsko stanje pri OD₅₉₅ vrednosti 0,1.

Bakterije v naravnem okolju velikokrat doleti začasna a pomembna sprememba v količini hranil. Kot rezultat pomanjkanja aminokislin do limitirajoče ravni, kot bi se to zgodilo v primeru ko kulturo prenesemo iz bogatega kompleksnega gojišča v definirano gojišče z enim samim virom ogljika, se sinteza ribosomske RNA in tRNA skoraj v trenutku ustavi. Posledično se biosinteza ribosomov ustavi. To povzroči zmanjšanje sinteze proteinov in DNA, ter aktivacijo sinteze novih aminokislin (Madigan, 2006).

Do večine odstopanj v rasti, opaznih pri bioprocesih v laboratorijskem merilu, pride predvsem zaradi uporabe slabega inokuluma. Kritični faktor pri pridobivanju ustreznega inokuluma pa je izbira kultivacijskega gojišča. Primernost gojišča inokuluma lahko

določimo šele, ko vidimo kako se obnaša organizem v produkcijski fazi. Sam razvoj produkcijskega gojišča pa določajo potrebe organizma po hranilih, ter produktivnost produkcijskega seva. Inokulacijsko gojišče mora tako zagotoviti maksimalno rast organizma in ne tvorbo produkta. Opazili so, da gojenje kulture v istem ali podobnem gojišču kot je ta, v katerem se bo vršil bioproces, zmanjša lag fazo fermentacije. To je posledica aklimatizacije organizma na sestavo fermentacijskega gojišča, ki potrebuje posledično minimalni čas za prilagoditev. Če pa vzamemo gojišče z zelo velikimi razlikami v pH vrednosti, osmotskem pritisku in anionski sestavi, pa se lahko to kaže v zelo nenadnih spremembah v stopnji privzema hranil, kar lahko vpliva na viabilnost. Gojišča za inokulum so na splošno manj hranljiva kot produkcijska gojišča in vsebujejo nižje koncentracije vira ogljika. Volumen inokuluma znaša med 3 in 10 % volumna gojišča, lahko pa je tudi 20 %. Relativno visoke volumne inokuluma se uporablja z namenom minimizacije dolžine lag faze, ter ustvarjanja maksimalnih količin biomase v fermentorju, v najkrajšem možnem času, s čimer zvišamo produktivnost samega procesa. Dodatek prevelikih količin inokuluma, pa je navadno povezan s prevelikim redčenjem produkcijskega gojišča, neželenimi spremembami v pH vrednosti le tega, ter prenosom neželenih odpadkov ali metabolnih produktov. Med samo proizvodnjo inokuluma obstaja nevarnost kontaminacije in degradacije, zaradi česar je potrebna stalna kontrola kakovosti (Srivastava, 2008).

2.2.4 Vpliv koncentracije topnega kisika na rast

Bakterije *E. coli* spadajo med fakultativne aerobe, za katere velja, da lahko pod primernimi kultivacijskimi pogoji rastejo tako v oksičnem, kot tudi v anoksičnem okolju. Za rast ne potrebujejo kisika, vendar je rast boljša, če je le ta prisoten. Zanje so značilni trije tipi metabolizma, in sicer aerobna in anaerobna respiracija, ter fermentacija (Madigan, 2006).

V spodnji tabeli lahko vidimo, da pride pri prenosu fakultativnih organizmov iz aerobnega v anaerobno okolje do nižjih stopenj rasti, zato bomo v našem primeru gojenja uporabili aerobne pogoje, saj je rast hitrejša (Colin in Kristansen, 2006).

Preglednica 1: Rast bakterij *E. coli*, pod različnimi pogoji, vir ogljika je glukoza (Colin in Kristansen, 2006)

Način kultivacije	Molski donos rasti (g SB/ mol substrata)	Koeficient pretvorbe ogljika (g SB / g SC)
Aerobno	95.0	1.32
Anaerobno	25.8	0.36

*SB – suha biomasa, SC – substratni ogljik

Učinkovitost mikrobne rasti pod določenimi pogoji navadno izražamo z donosom celic ki se namnožijo na enoto mase uporabljenega vira ogljika. Molarni donos rasti Y_s je donos celic (suha teža) na mol substrata. Koeficient pretvorbe ogljika pa izraža donos celic na gram substratnega vira ogljika, ter podaja pomembnejšo primerjavo med substrati različnih molekulskih velikosti (Colin in Kristansen, 2006).

Za rast aerobov je potrebno zagotoviti ekstenzivno aeracijo gojišča, saj se kisik, ki ga organizem porabi med rastjo, ne nadomešča dovolj hitro z difuzijo iz zraka. Zato je potrebna dodatna aeracija kulture, kar lahko dosežemo z močnim stresanjem kulture na stresalniku, ali pa z dovajanjem sterilnega zraka v gojišče. Aerobi rastejo velikokrat bolje, če dodatno aeriramo sistem, kot pa če O_2 zagotovimo s preprosto difuzijo (Madigan, 2006).

Da bi zagotovili zadostno koncentracijo kisika, je potrebno gojišče, v katerem gojimo bakterijo, prepihovati z zrakom, hkrati pa tudi premešati, da zagotovimo zadostno raztapljanje kisika v gojišču. Seveda je potrebno koncentracijo topnega kisika v gojišču spremljati, da jo ohranjamo na vrednosti, ki še ni limitna, hkrati pa ne previsoko, saj to pomeni dražje obratovanje bioprocesa (Podgornik in sod., 2013).

Beshay (2008) je zelo lepo prikazal vpliv hitrosti mešanja na koncentracijo raztopljenega kisika v gojišču. Višja hitrost pomešanja, zagotovi višjo vrednost raztopljenega kisika in boljšo disperzijo makromolekul v gojišču. Limitacija s kisikom pa ima za posledico krajšo logaritemsko fazo rasti celic, ter nižjo končno koncentracijo le teh. Ravno tako so dosegli višje koncentracije celic ob višjih hitrostih prezračevanja. Višja hitrost prezračevanja je povezana tudi z višjimi stroški obratovanja bioprocesa, zato so ocenili, da je najbolj ekonomično, da uravnamo pretok zraka na vrednost 3 vvm.

Pri aerobnih procesih, se srečujemo s problemom omejenega prenosa kisika, hitrostjo pomešanja in problemom penjenja. Ti trije problemi se običajno pojavijo sočasno. Optimizacija kultivacijskih in operativnih parametrov mnogokrat omogoča, da se

izognemo nekaterim težavam. Vsekakor pa moramo upoštevati, da mora delovni organizem zadostiti vsem svojim potrebam, da bi bila njegova produktivnost v danih pogojih maksimalna (Raspor in Smole-Možina, 1993).

Potrebe po kisiku pa narekujejo številni faktorji. Nejpomembnejši vpliv pripisujemo vrsti mikroorganizma, fazi bioprocesa, vrsti hranila in tipu bioprocesa. Pri zaprtih bioprocseh sta logaritemska in lag faza povezani z največjo intenzivnostjo porabe kisika, čeprav je maksimalna koncentracija biomase šele v stacionarni fazi bioprocesa. Vnos kisika v brozgo je pogojen z njeno sestavo, temperaturo, načinom in intenzivnostjo mešanja ter tipom bioreaktorja. Ob normalnem prezračevanju se v sistemu vzpostavi uravnovešeno stanje, ki omogoča normalno rast in razvoj mikroorganizma. Proizvodnja biomase je vedno vezana na aerobni bioproces zaradi devetkrat večje produktivnosti kot v anaerobnem bioprocusu (Raspor in Smole-Možina, 1993).

2.3 PLAZMIDI

Genom bakterijske celice poleg kromosomov predstavljajo še številni drugi nekromosomski genetski elementi, kot so to virusi, plazmidi in transpozicijski elementi (Madigan, 2006). Kot navaja Clark (2010), pa plazmidov ne prištevamo h genomu celice, saj le ti niso vedno prisotni pri vseh organizmih iste vrste. Poleg tega, pa lahko določen plazmid najdemo v celicah različnih vrst in se lahko prenaša od ene gostiteljske vrste do druge. Čeprav nosijo genetsko informacijo, ki se lahko izrazi, pa niso stalno prisotni v celici, prav tako niso potrebni za celično rast in delitev v normalnih pogojih.

Plazmidi so genetski elementi, ki se podvajajo ločeno in neodvisno od gostiteljskega kromosoma (Madigan, 2006). Gre za običajno krožne in le redko linearne, izvenkromosomske molekule dvojne vijačnice DNA, ter lahko tudi RNA (Thompson, 1982). Najdemo jih tako v prokariontskih, kot tudi v evkariontskih celicah, kjer se lahko pojavljajo samostojno, ali pa v večjem številu in lahko nosijo zapis za le nekaj, ali pa za več sto genov. Okrog 50 % bakterij v naravi vsebuje vsaj enega ali več plazmidov, najdemo pa jih tudi v višjih organizmih, kot na primer kvasovkah in glivah (Clark, 2010). V naravi najdemo plazmide v velikosti od približno 1 kb do več kot 1 Mb, v splošnem pa velja, da obsegajo manj kot 5 % celotnega genoma bakterije (Madigan, 2006). Plazmidi se med sabo zelo razlikujejo po velikosti. Kot navaja Raspor (1996), so lahko majhni plazmidi veliki le 0,1 %, veliki pa do 10 % velikosti gostiteljskega kromosoma. Povprečno

velikost predstavlja F-plazmid izoliran iz bakterij *E. coli*, ki obsega 1 % velikosti kromosoma le teh. Številni plazmidi, ki jih najdemo v nekaterih celicah v večjem številu, pa so veliko manjši. Tak priemer je plazmid ColE, ki predstavlja 10 % velikosti F-plazmida. V naravi najdemo tudi zelo velike plazmide, ki obsegajo več kot 10 % velikosti kromosoma, z njimi pa je težko operirati (Clark, 2010).

Plazmidi nosijo zapis za gene, katerih proteini dajejo pomembne lastnosti gostiteljski celici, ter ji tako omogočajo selektivno rast pod določenimi pogoji (Madigan, 2006). Plazmidne narave so geni antibiotske rezistence, rezistence na težke kovine, s sposobnostjo rasti na nenavadnih substratih, pa geni za bakteriocine in nekatere toksine (Raspor, 1996). Kot navaja Madigan (2006), kodirajo geni na plazmidih tudi encime, za degradacijo nenavadnih organskih komponent, ter specialne metabolne poti. Tudi virulenčni faktorji številnih bakterij so večinoma kodirani s strani plazmidov. Enteropatogene bakterije *E. coli* so na priemer znane po zmožnosti kolonizacije tankega črevesa in proizvodnji enterotoksina. Kolonizacijo jim omogočajo proteini na celičnem površju, ki jih kodirajo geni, zapisani na plazmidu. Tudi kolicin, ki ga proizvajajo bakterije te vrste, kodira t.i. Col plazmid. Na plazmidu so zapisani geni, ki kodirajo bakteriocine, ter tudi proteine, vključene v proizvodnjo in transport le teh.

Poznamo pa tudi tako imenovane kriptične plazmide, ki ne posredujejo nobenih karakteristik, oz. fenotipskih lastnosti. Nosijo gene katerih lastnosti so še vedno neznane in se uporabljajo za prenos genov v genetskem inženiringu (Clark, 2010).

Za celico lahko predstavljajo plazmidi breme, saj si prisvojijo znatne količine energetskih virov, kljub temu, da ne prinašajo nobenega učinka le tej. To so ugotovi, ko so divjemu tipu bakterij vrste *B. megatherium* odvzeli vseh 7 plazmidov, ki so predstavljali kar 11 % celotnega genoma celice. Pri teh sevih so nato opazili zelo malo fenotipskih razlik, v primerjavi s sevi, ki jim plazmidov niso odstranili. Kljub temu pa so celice, ki ne nosijo plazmida v naravi zelo redke (Filutowicz, 2009).

Plazmidi se od virusov razlikujejo po tem, da ne poškodujejo gostiteljske celice in nimajo ekstracelularnih oblik. Kljub temu, pa se ne prenašajo le med celično delitvijo. Nekatere prokariotske celice namreč lahko prevzamejo prosto DNA iz okolja, zaradi česar lahko v primeru da pride do lize celice ki vsebuje plazmid, pride le ta v kontakt z novim gostiteljem. Glavni mehanizem prenosa plazmidov med celicami je konjugacija,

plazmidom, ki sami vodijo svoj prenos, pa pravimo konjugativni plazmidi. Niso pa vsi plazmidi konjugativni. Konjugacija je replikacijski proces, pri katerem vsaka izmed celic na koncu vsebuje en plazmid. Prenosljivost s pomočjo konjugacije je kontrolirana s setom genov znotraj plazmida, ki jim pravimo tra regija. Ta regija vsebuje gene ki kodirajo proteine, pomembne za prenos in replikacijo DNA molekule, kot tudi gene, ki služijo pri združevanju tvorjenih baznih parov. V primeru, ko se plazmid vključi v kromosom, lahko plazmid, ki vsebuje tra regijo, sprost prenos kromosomske DNA iz ene celice v drugo (Madigan, 2006). Konjugativni plazmide, lahko omogočajo prenos kromosomske DNK med celicami (Raspor, 1996).

Lastnosti določenih plazmidov, da lahko prehajajo iz ene bakterijske celice v drugo pravimo prenosljivost. Številni plazmidi srednjih velikosti, kot na primer F-tip in P-tip plazmidov, imajo to lastnost in jih označujemo kot Tra^+ . Ker je potrebno za prenos plazmida preko 30 genov, imajo to lastnost le srednje veliki in veliki plazmidi. Številni majhni plazmidi, kot je to ColE plazmid, pa se lahko prenašajo s pomočjo samo-prenosnih plazmidov (Tra^+). Take plazmide označujemo kot Mob^+ . Niso pa vsi Tra^- plazmidi Mob^+ . Odkritje, da lahko nekateri Tra^+ plazmidi mobilizirajo tudi kromosomske gene pa je omogočilo razvoj bakterijske genetike in uporabe bakterij vrste *E.coli* v te namene (Clark, 2010).

Nekatere bakterije lahko vsebujejo več različnih tipov plazmidov. Zmožnosti dveh različnih plazmidov, da se lahko replicirata znotraj iste celice, je kontrolirana s strani plazmidnih genov, vključenih v kontrolo DNA replikacije. Plazmidi so razdeljeni v družine, katerih predstavniki posedujejo podobne replikacijske gene. Ko se plazmid prenese v celico, ki že vsebuje en plazmid, se navadno ta drugi plazmid ne obdrži v celici, ampak se izgubi med naslednjo replikacijo celic (Madigan, 2006). Dva različna plazmida, ki spadata v isto družino se namreč ne moreta nahajati v isti celici. Temu pojavu pravimo inkompatibilnost. Plazmide klasificiramo glede na inkompatibilnost, tako da so družine plazmidov tudi inkompatibilnostne skupine, ki jih označujemo z velikimi tiskanimi črkami (F, P, I, X, ...). Plazmidi iz iste inkompatibilnostne skupine imajo zelo podobne DNA sekvence replikacijskih genov, čeprav so preostali geni, ki jih nosijo zelo različni. Možno je, da imamo dva ali več plazmidov v isti celici, v kolikor pripadajo različnim družinam. P-plazmid lahko na primer najdemo v isti celici, kot F-plazmid (Clark, 2010). Plazmidi

znotraj inkompatibilnostne skupine si delijo skupni mehanizem regulacije replikacije, ter so si tako sorodni med sabo (Madigan, 2006).

Nekateri plazmidi, ki jim pravimo episomi pa se lahko vključijo v kromosom (t.i. integrativni plazmidi) in posledično preide kontrola njihove replikacije pod kontrolo replikacije kromosomske DNA. Tak mehanizem najdemo pri virusih, katerih genom se lahko vgradi v gostiteljevega (Madigan, 2006).

Iz različnih naravnih sevov bakterije rodu *Escherichia coli*, so do sedaj izolirali kar 300 različnih plazmidov. Za bakterije te vrste je znano, da nosijo t.i. F-plazmid, krožno DNA molekulo, velikosti 99,159 bp. Na tem so identificirali gene vključene v regulacijo DNA replikacije, ter tra regijo, kjer so geni, ki omogočajo prenašanje plazmida iz ene celice v drugo. F-plazmid poseduje tudi številne transpozone, ki omogočajo, da deluje kot episom (Madigan, 2006).

Spreminja se tudi rang gostiteljev določenih plazmidov. Nekateri plazmidi so omejeni le na nekaj sorodnih bakterij, kot na primer F-plazmid, ki ga najdemo le pri bakterijah *E.coli*, ter nekaterih sorodnih enteritičnih bakterijah, kot sta to rodova *Shigella* in *Salmonella*. Spet drugi pa imajo širok rang gostiteljev. Plazmide iz P družine lahko na primer najdemo v stotih različnih vrstah bakterij (Clark, 2010).

Plazmidi se med seboj razlikujejo po številu kopij, v katerem se pojavljajo znotraj celic. Nekateri so prisotni v celici le v eni do treh kopijah, medtem ko najdemo druge v preko 100 kopijah. Število kopij določenega plazmida je kontrolirano s strani genov na plazmidu in s strani interakcij med gostiteljem in plazmidom (Madigan, 2006). Kot navaja Clark (2010), se v večjem številu pojavljajo predvsem določeni majhni plazmidi, kot na primer ColE. Število kopij pa vpliva na moč karakteristik plazmida, še posebej na antibiotsko rezistenco. Več kot je kopij plazmida v celici, več je kopij genov za antibiotsko rezistenco in posledično je višji nivo rezistence.

Različni plazmidi se pojavljajo znotraj celice lahko le v eni, ali pa v večih kopijah. To uravnavajo različni regulatorni mehanizmi. Pri plazmidih z visokim številom kopij pride do omejitve inicijacije replikacije, ko doseže število le teh določen nivo. Ti plazmidi imajo t.i. sproščeno podvojevanje (Clark, 2010). Kot navaja Quaak (2009), lahko dobimo visoke izkoristke plazmidne DNA, ob kultivaciji plazmidov s sproščenim podvojevanjem, v kombinaciji s spreminjanjem temperature kultivacije, v sredini logaritemske faze rasti.

Delitev plazmidov, ki se pojavljajo v celici v nižjem številu pa je bolj strogo regulirana, zato pride do replikacije teh le enkrat med celičnim ciklom. Do sedaj je raziskano, da pride do regulacije števila kopij s pomočjo antisense RNA, ki kontrolira inicijacijo replikacije plazmidov (Clark, 2010). Visoko število plazmidov v celici pa prinaša tudi določene slabosti. Intenzivna transkripcija lahko namreč moti normalno replikacijo plazmidne DNA. Pri zelo velikem številu kopij plazmidov (nad 2000) lahko pride do propada celice zaradi motenj pomnoževanja celične DNA ali zaradi toksičnosti tarčnega proteina (Schendel in sod., 1989). Poleg tega visoko število kopij plazmidov za celico predstavlja dodatno obremenitev, ki lahko privede do upada rasti celic. Celice s plazmidi rastejo počasneje kot celice brez njih, v primeru velikega števila kopij pa se lahko rast in delitev popolnoma zaustavita (Seo in Bailey, 1985). Poleg tega se plazmidi s sproščenim načinom podvojevanja navadno porazdelijo naključno med hčerinskimi celicami, zato moramo pri proizvodnji le teh paziti, da se sintetizira dovolj veliko število molekul med celičnimi delitvami, da statistično povišamo možnost, da obe hčerinski celici prejmeta kopijo plazmida (Bentley in Quiroga, 1993). Bakterije brez plazmidne DNA nato zaradi višje specifične hitrosti rasti in boljše viabilnosti prerastejo ostale. Do izgube plazmidne DNA pride tudi zato, ker se le ta podvojuje nedvisno od DNA gostiteljske celice in je še dodatno nagnjena k multimerizaciji. Ti faktorji vodijo k neenakomerni porazdelitvi vektorjev v hčerinske celice med delitvijo le teh, ter končno k tvorbi subpopulacij bakterij (Summers in sod., 1993).

Na število plazmidov v celici vpliva tudi njihova segregacijska stabilnost. V primeru, da je v celici število kopij plazmidov visoko, je velika verjetnost, da bo to število visoko tudi v hčerinskih celicah. Če med procesom gojenja naraste število celic brez plazmidov, lahko te prerastejo celice s plazmidi, saj podvojevanje in ekspresija plazmidov porabljata vire in energijo, kar lahko povzroči zmanjšanje rasti celic. Kultura, ki vsebuje veliko število celic brez plazmidov, bo tako imela manjšo produktivnost. Poleg tega je število kopij plazmidov odvisno tudi od različnih dejavnikov v celici in okolju. Pomembna je na primer rast celic, saj je pri počasneje rastočih celicah število plazmidov višje. Velik vpliv ima v povezavi s tem tudi sestava rastnega gojišča (Schmidt in sod., 1996).

2.3.1 Topoizoforme plazmidne DNA

Old in Primrose (1994) ter Quaak (2009) so podali natančnejšo razčlenitev oblik plazmidne DNA, ki so razvidne na sliki 1. Plazmidi se v celici nahajajo v dveh kovalentnih oblikah,

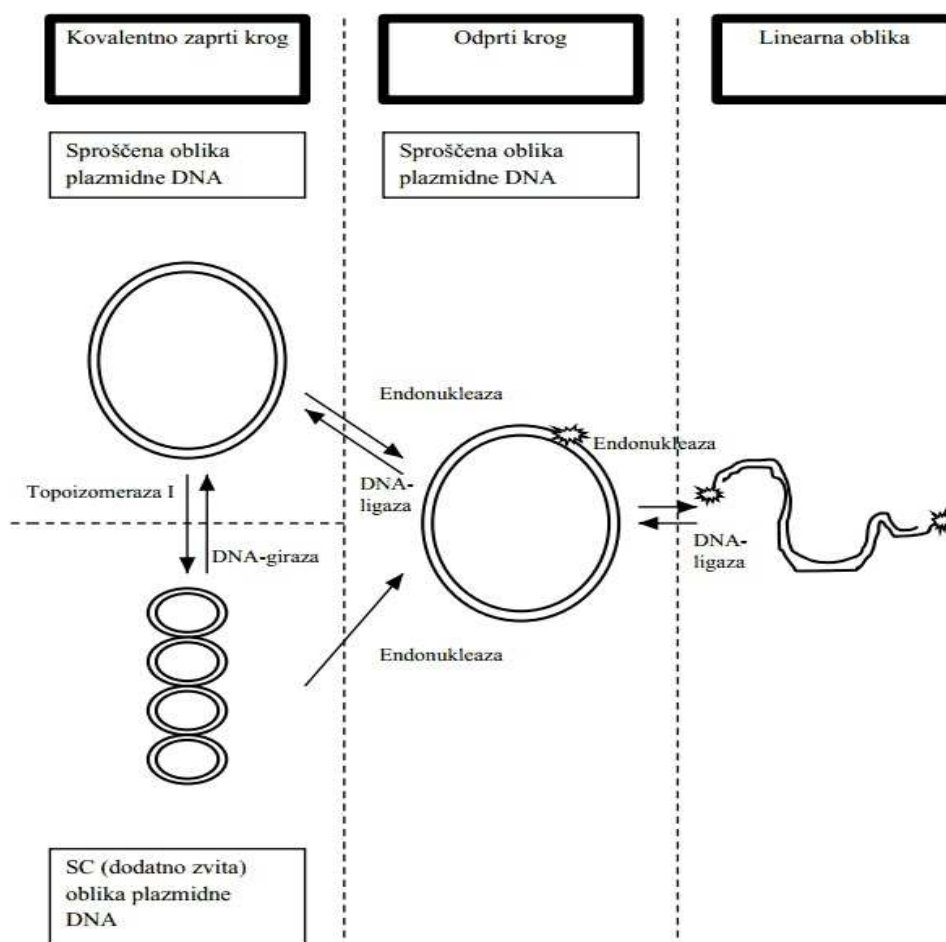
ki ju imenujemo kovalentno zaprti krog, ali oblika CCC, ter odprti krog, ali oblika OC. Pri obliki kovalentno zaprtega kroga je krožna molekula dvoverižne plazmidne DNA nepoškodovana, v celicah pa se običajno nahaja dodatno zvita, čemur pravimo superzvita oblika. Plazmidi v obliki odprtega kroga pa so brez dodatnih navojev in jim zato pravimo, da so sproščeni.

Vsi, tako krožni, kot tudi linearni plazmidi, imajo strukturo dvojno ovitega antiparalelnega DNA heliksa. Ko iz bakterijskih celic izoliramo krožne plazmide, je celoten dvojni heliks pod vplivom strižnih sil, kar lahko vodi do spremembe števila baznih parov na zavoj heliksa. V vseh primerih tvori os dvojnega heliksa nov heliks višjega reda. Tej deformaciji osi heliksa zaprte krožne molekule DNA pravimo superzvijanje. Superzvita DNA je v primerjavi s krožno sproščeno verigo bolj kompaktna (Filutowicz, 2009).

Ker sta linearna oblika plazmidne DNA in oblika odprtega kroga manj učinkoviti, je potrebno plazmidno DNA izolirati v seper zviti obliki. Vse tri oblike plazmidne DNA se proizvajajo med celično rastjo, znotraj celice pa se lahko plazmidna DNA tudi encimsko pretvarja iz ene oblike v drugo. Znano je, da sta oblika odprtega kroga in linearna oblika, posledici poškodb superzvite oblike, med katerokoli fazo pridobivanja plazmidne DNA (Silva, 2009). Kot pa navaja Madigan (2006), je večina plazmidne DNA izolirane iz celic v superzviti obliki, saj je to tudi najbolj kompaktna oblika izmed vseh. Pri uporabi plazmidne DNA v terapevtske namene pa se poslužujemo določenih kriterijev kvalitete, ki določajo, da mora končni terapevtski produkt vsebovati več kot 90 % plazmidne DNA prisotne v superzviti obliki, ter manj kot 5 % izoform le te (Faucher, 2003).

Pri krožnem DNA dupleksu lahko pride do ovijanja le tega, v pozitivno ali negativno smer. Do negativnega ovijanja pride, ko se DNA ovije okrog svoje osi v nasprotni smeri od desno ovitega dvojnega heliksa. DNA najdemo v naravi večinoma v tej superzviti obliki (Madigan, 2006). Tako linearna oblika, kot oblika odprtega kroga sta bili naključno poškodovani na različnih genetskih lokacijah, zaradi česar sta neučinkoviti, v primeru da sta uničeni promotorska regija, ali pa regija, kjer se nahaja določen gen. Seperzvita oblika plazmidne DNA je tako edina nedotaknjena in nepoškodovana, ter posledično tudi najaktivnejša pri transkripciji in vivo (Quaak, 2009). Kot navaja tudi Mulhardt (2007), je superzvita plazmidna DNA bolj primerna za transfekcijo evkariontskih celic, kot pa sproščena oblika le te.

Odkrili so že številne proteine, ki spreminjajo obliko DNA molekule, tako katalitično (npr. topoizomeraze), kot tudi tako, da se vežejo na DNA molekulo in jo stisnejo v superhelično obliko (npr. IHF in HU). Plazmidna DNA je v skoraj vseh primerih negativno ovita (Filutowicz, 2009). Pri bakterijah in večini arhej povzroči nastanek negativnih ovojev DNA molekule encim DNA giraza, topoizomeraza I pa lahko superzvito obliko DNA odvije, pri čemer preide le ta spet v sproščeno stanje. Zaradi aktivnosti topoizomeraz se lahko DNA molekula aktivno zvija in sprošča. Ker je supervitje potrebno za pakiranje DNA v celico, sproščanje pa za replikacijo DNA, sta ta dva komplementarna procesa nujno potrebna za celico. Zvijanje vpliva tudi na ekspresijo genov pri replikaciji, saj se določeni geni aktivneje prepišejo, ko je DNA v superzviti obliki. Na drugi strani pa lahko prekomerno superzvijanje v nekaterih primerih tudi inhibira transkripcijo nekaterih genov (Madigan, 2006).



Slika 1: Prikaz različnih oblik plazmidne DNA znotraj celice (Old in Primrose, 1996; Quaak, 2009).

Ločevanje superzvite oblike od preostalih dveh, predstavlja zaradi podobnosti v velikosti ter identični naravi nukleotidnih sekvenc, najtežji izziv pri čiščenju končnega produkta. Študije stabilnosti in vitro so pokazale, da se superzviti plazmidi zaporedno pretvorijo v sproščene kroge, linearne plazmide ali oligomere. Posledično mora končni produkt pri proizvodnji plazmidne DNA, v skladu z GMP prakso, vsebovati v veliki večini superzvito obliko. Glede na FDA standarde znaša minimalna vsebnost superzvite oblike plazmidne DNA nad 80 %. EMEA pa poleg tega zahteva specifikacije za sprejemljiva razmerja molekularnih oblik plazmida, ki prispevajo k učinkovitosti končnega produkta (Quaak, 2009).

2.3.2 Replikacija

V primeru, ko imamo kot končni produkt bioprocesa plazmidno DNA, je na celičnem nivoju replikacija edini proces, ki je tu potreben. Transkripcija in translacija vstavljenega gena pa sta med proizvodnjo plazmidov v bakterijski gostiteljski celici nezaželeni (Wang, 2001). Protokoli za proizvodnjo rekombinantnih proteinov v bakterijah *E.coli* vodijo do visokih biomas, kar v primeru proizvodnje proteinov pomeni tudi višje titre le teh. Te strategije pa ne moremo uporabiti, če želimo pridobiti visoke količine plazmidne DNA, saj proizvodnja le te v nasprotju s proizvodnjo proteinov zahteva le replikacijo in ne tudi translacije in transkripcije (Mahony, 2007).

Molekulam nukleinskih kislin, ki se lahko same podvajajo, ker vsebujejo mesto ORI, pravimo replikoni. Med replikone spadajo še kromosomi, virusni genom (DNA, RNA) in viroidi. Plazmidi se podvajajo istočasno, kot njihova gostiteljska celica. Ko se celica deli, se delijo tudi plazmidi, praviloma tako, da vsaka hčerinska celica prejme kopijo plazmida. (Clark, 2010).

V replikacijo plazmidov so navadno vključeni encimi gostiteljske celice. Posledično so geni zapisani na plazmidu primarno kontrolirani s strani procesa iniciacije replikacije, ter s porazdelitvijo repliciranih plazmidov med hčerinskimi celicami. Številni plazmidi pri G^- bakterijah se replicirajo na podoben način kot kromosom. To pomeni iniciacijo na mestu ORI, ter dvosmerno replikacijo, da dobimo theta intermediat. Nekateri plazmidi pa imajo neusmerjeno replikacijo. Zaradi majhne velikosti plazmidne DNA molekule, v primerjavi s kromosomsko, se celoten proces replikacije zgodi zelo hitro, najverjetneje v desetini ali manj celotnega časa cikla celične delitve (Madigan, 2006).

Proces DNA replikacije se odvija v skladu s superzvitostjo plazmidne molekule. Inicijacija replikacije plazmidne DNA znotraj celičnega cikla, se navadno ne zgodi istočasno kot inicijacija kromosomske DNA na *oriC* mestu. Ne glede na to, ali se podvojuje plazmid, ali kromosom, pa potrebujejo vse bakterijske DNA polimeraze za sintezo vodilne DNA verige, 3' – OH skupino. V procesu elongacije se pojavi ta skupina iz enega od treh virov: RNA primerja (R-zanka), zareze v eni od dveh verig dvojnega heliksa, ali pa amino kislin proteina, ki je kovalentno vezan na DNA. Med sintezo zaostajajoče verige nastane veliko RNA primerjev, na koncu procesa pa se odstranijo primer za vodilno verigo in multipli RNA primerji za zaostajajočo verigo, tako da se razpoka zapolni. Pri G^+ bakterijah z nizko vsebnostjo GC naj bi pri replikaciji DNA (plazmidi in kromosomi) sodelovali dve različni polimerazi, ena specializirana za sintezo vodilne verige, ena pa za sintezo zaostajajoče verige. Pri G^- bakterijah pa funkcioniira ena sama polimeraza v obeh primerih. Replisom deluje na podlagi enoverižne šablone DNA, ki nastane po vezavi proteinov, ki destabilizirajo DNA heliks (Filutowicz, 2009).

Enota replikacije je replikon, znotraj katerega so mesta ORI, ki so odgovorna za replikacijo. Za podvojevanje večine plazmidov je potreben le en sam replikon in eno samo mesto ORI, moč pa je najti tudi kompleksnejše skupine plazmidov, ki vsebujejo multipla mesta ORI. Študije plazmidnih replikonov nakazujejo, da je mesto ORI, ki se razlikuje od preostale DNA, edino mesto na DNA, kjer se regulira frekvenca replikacije. Terminacija sinteze DNA se pojavi lahko na mestu ORI (pri neusmerjeni replikaciji), ali pa na mestu imenovanem TER (pri dvosmerni replikaciji), kjer se replikacijske vilice razstavijo. Pri linearnih plazmidih pa pride do terminacije replikacije na telomerah. Če v plazmide kloniramo selekcijski marker, omogočimo ori mestom zmožnost nadzorovane replikacije. Rekombinantni plazmidi, ki nastanejo pri tem procesu podeljujejo gostitelju rezistenco na antibiotike, brez da bi predstavljali nevarnost okolju, saj sta njihova konstrukcija in uporaba strogo regulirani in omejeni (Filutowicz, 2009).

Pred tem, ko se sestavi replisom in nastanejo replikacijske vilice, pride na mestu ori do regulacije inicijacije DNA replikacije, z različnimi proteini. Navadno se ena ali več kopij ori-specifičnih proteinov, ki jih kodira plazmid, poveže na to mesto in spremeni njegovo strukturo. Sam proces pa je odvisen od superzvitosti plazmidne DNA (Filutowicz, 2009).

V mikrobni celici, ki se živahno deli, najdemo v vsakem trenutku več delno dokončanih kopij kromosoma. V optimalnih pogojih je celična delitev lahko tako hitra, da bi se

kompletno podvojevanje kromosoma v enem ciklusu ne uspelo zaključiti, zato celica začne znova podvajanje kromosoma, preden se je končala predhodna podvojitev. V statični kulturi vsebuje celica *E. coli* 2 do 4 genoma. Ko se porabijo hranila celica obmiruje z enim samim kromosomskim naborom (Raspor, 2006; Watson in sod., 1987; Terry, 1995).

Pri prokariontih poznamo tri mehanizme genetske izmenjave, ki so transformacija, transdukcija in konjugacija. Slednji prenos vključuje kontakt celica-celica, ter konjugativni plazmid v donorski celici (Madigan, 2006).

Prenos plazmidov na neinficirane seve je zagotovljen s konjugativnim plazmidnim prenosom za katerega so usposobljene nekatere celice, ki imajo F pilus (F^+), ki služi za prepoznavanje občutljive celice, ki pilusa nima (F^-). Celici se pritegneta in ustvarita most za prenos DNK. Ko se plazmidna DNA podvoji, ostane med prenosom ena kopija v celici dajalca, druga pa se prenese v prejemnika. Ko prejemnik sprejme plazmid, pridobi ustrezne piluse in postane dajalec (Raspor, 2006; Watson in sod., 1987; Terry, 1995).

2.3.3 Uporaba plazmidne DNA

Osnovna orodja genskega inženiringa so omogočila laboratorijsko konstrukcijo številnih novih plazmidov. Vključitev novih genov iz različnih virov v tak plazmid, omogoča prenos genetskega materiala čez številne bariere. Edine zahteve za umetno ustvarjen plazmid so te, da vsebuje gene, ki kontrolirajo njegovo lastno replikacijo, ter, da se stabilno ohranja v izbranem gostitelju. Če je plazmid konjugativen, so pomembne še transferske funkcije (*tra*), ki omogočajo proces konjugacije (Madigan, 2006).

Prenos plazmidne DNA je zelo učinkovit; pod ustreznimi pogoji lahko prav vsaka prejemna celica ki se poveže v par pridobi plazmid. Ko se geni plazmida lahko izrazijo v celici prejemnici, postane le ta donorska celica, ki lahko prenaša plazmid v druge celice prejemnice. Na ta način se lahko plazmidi zelo hitro razširijo med populacijami, podobno kot infekcijski agensi (Madigan, 2006).

Plazmide na področju molekularne biologije uporabljajo kot vektorje za kloniranje, ter kot ekspresijske sisteme za proizvodnjo proteinov. Vedno bolj pa se razvija uporaba le teh na področju genske terapije in DNA cepiv (Wang, 2001; Smrekar, 2009).

2.3.3.1 DNA cepiva

Klasična cepiva temeljijo na inaktiviranih ali oslavljeni patogenih organizmih, ki ne povzročajo okužbe, vendar pa so sposobni aktivirati zaščitni imunski odziv. Kljub določenemu uspehu pa spremljajo pripravo in vnos klasičnih cepiv tudi slabosti, zaradi česar se razvijajo novi pristopi, ki temeljijo na tehnologiji rekombinantne DNA. Ena izmed teh so tudi cepiva na osnovi DNA, ki temeljijo na neposrednem vnosu plazmidne DNA z vstavljenim zaščitnim genom (Jevnikar, 2007).

Genska terapija v obliki plazmidnih DNA cepiv je področje, ki je v zadnjih letih v velikem razvoju, saj je tudi v kliničnih preizkušnjah na ljudeh že večje število tovrstnih cepiv. Obetavna so cepiva za zaščito proti aidsu, cepivo za zdravljenje malarije, ter protitumorna cepiva, ki temeljijo na osnovi plazmidne DNA. Zaradi tovrstnih odkritij se kažejo potrebe po razvoju procesov za proizvodnjo dovolj velikih donosov le te (Quaak, 2009). Za pripravo DNA cepiv so namreč potrebne velike količine plazmidne DNA (miligrami), medtem ko se donosi pri proizvodnji le te gibljejo le okrog nekaj mg/l (Brand, 2012).

2.3.3.2 Genska terapija

Gensko zdravljenje (ali genska terapija) je način zdravljenja bolezni, pri katerem v telesne celice vnašamo gene. Z genskim zdravljenjem zdravimo genske bolezni, torej tiste bolezni, katerih vzrok je okvara gena (Kreft in sod., 2007).

Koncept genske terapije je zasnovan na dejstvu, da s prenosom genskega materiala v določene celice pacienta povišamo gensko ekspresijo, inhibiramo produkcijo tarčnih proteinov ali pa povišamo nivo antigenov v organizmu. V ta namen uporabljamo plazmidno DNA ali mRNA, ki kodirajo želen gen oziroma protein. Tovrstna nevirusna genska terapija pa zahteva velike količine plazmidne DNA, saj sta učinkovitost in trajanje genske ekspresije zelo nizki (Quaak, 2009).

Z vnosom plazmidne DNA, ki kodira določen protein lahko v teoriji dosežemo številne terapevtske cilje; vnos manjkajočega proteina (insulin pri diabetikih), nadomestitev poškodovanih genskih kopij (cistična fibroza) in vnašanje imunogenosti proti rakavim celicam, s povišanjem koncentracije tarčnega proteina (antigena) (Quaak, 2009). Plazmidi za gensko terapijo, ki nosijo humane ali nehumane gene so zelo velike molekule, v primerjavi s proteini (Wang, 2001).

Ko enkrat določimo želeno tarčo, lahko skonstruiramo aktivni pDNA farmacevtski produkt (pDNA API), tako da cDNA želenega proteina vstavimo v plazmidno ogrodje. Cepiva na osnovi plazmidne DNA vsebujejo določene osnovne elemente, kot so to mesto ORI, ki je potrebno za uspešno razmnoževanje znotraj bakterijske celice *E. coli*, gen za rezistenco na določen antibiotik, ki omogoča selekcijo, močan promotor, potreben za ekspresijo v evkariontski celici, poliadenilacijsko terminatorsko sekvenco, ter na koncu še genski insert, ki kodira želen antigen (Quaak, 2009).

Plazmidna ogrodja so skonstruirana tako, da stimulirajo celični in humoralni imunski odgovor. Plazmidi, ki jih uporabljajo za gensko terapijo pri rakavih bolnikih so narejeni na podlagi pUC replikona, saj se pojavlja tak vektor v celici v velikem številu, kar pomeni tudi hitro replikacijo. Razlika med pUC in pVAX plazmidi je ta, da sledeči vsebuje CMV promotor, brez introna A. Za GMP proizvodnjo pa se med fermentacijo ne sme uporabljati antibiotika iz družine ampicilinov, da se izognemo možnim problemom z alergijami na peniciline. Do problema pride lahko tudi zaradi rezistence bakterij na uporabljene antibiotike. V tem primeru v gojišču ne rastejo le bakterije, ki nosijo plazmid, temveč tudi tiste brez njega. Za GMP proizvodnjo se uporablja kanamicin, saj se le redko pojavlja spontana odpornost na ta antibiotik (Quaak, 2009).

2.3.3.3 Plazmidi kot vektorji za kloniranje

Vektor mora biti dovolj majhna in prilagodljiva molekula, njegovo prenašanje med celicami pa mora biti relativno enostavno. Zaželeno je tudi enostavna detekcija prisotnosti le tega, ter direktna selekcija celic, ki nosijo vektor. Poleg tega je pomembna še olajšana insercija genov v vektor, ter detekcija prisotnosti vstavljenega gena vanj. Vsem tem zahtevam se pridružuje še enostavno pridobivanje in čiščenje večih količin vektorske DNA. V praksi se tem zahtevam najbolj približajo plazmidi, ki so tako največkrat uporabljeni vektorji. Izjema so višji organizmi, kjer se velikokrat uporablja kot vektorje viruse, ter v primeru ko hočemo klonirati zelo velike fragmente DNA in se zato poslužujemo celotnih kromosomov kot vektorjev (Clark, 2010).

Plazmid ColE1, ki ga najdemo pri bakterijah *E. coli*, je najširše uporabljen vektor v molekularni biologiji. V celici se nahaja v okrog 40 kopijah, zaradi česar je dokaj lahko pridobiti veliko količino le tega, poleg tega pa se lahko prenaša med celicami v postopku transformacije. Nekoč so kot vektor uporabljali originalno izoliran ColE1 plazmid, sedanji

plazmidi pa vsebujejo nekaj umetnih izboljšav. Odstranjeni so mu gene za proizvodnjo kolicina E1, ter dodali gene za rezistenco na ampicilin (Clark, 2010).

Plazmidi se podvojujejo neodvisno od gostiteljevega kromosoma, saj imajo lastno mesto ORI, ki jim omogoča, da se njihova replikacija v celici nadaljuje neodvisno od direktne kromosomske kontrole. Poleg tega da nosijo gene za lastno replikacijo, so številni tudi naravni vektorji, saj pogosto nosijo gene, ki dajejo gostitelju posebne lastnosti. Kot vektorji za kloniranje pa imajo plazmidi zelo uporabne lastnosti, kot je to majhna velikost, ki nam omogoča enostavno izolacijo ter manipulacijo le teh, v celicah pa so lahko prisotni v velikem številu, kar omogoča amplifikacijo le teh. Nosijo pa tudi zapis za selekcijske markerje, ki nam omogočajo detekcijo in selekcijo klonov, ki nosijo plazmid. Z manipulacijo plazmidnega klonirajočega vektorja lahko tudi preprečimo prenos le tega med organizmi s konjugacijo, da tako zagotovimo biološko obvladljivost genskega materiala (Madigan, 2006).

Replikacija plazmidov je lahko kontrolirana s strani gostiteljskega organizma, pri čemer dosežemo, da je v celici le nekaj kopij plazmidov. Če pa želimo večje število kopij plazmidov, potem mora biti njihovo podvojevanje sproščeno. Doseganje večjega števila kopij je pomembno pri genskem kloniranju, izbiri gostitelja, ki nosi plazmid, če hočemo višje koncentracije le tega, ter nenazadnje pri manipulaciji sinteze celičnih makromolekul s pomočjo plazmidne DNA (Madigan, 2006).

2.3.4 pBR322

F plazmid izoliran iz divjega seva bakterij *E. coli* je veliko prevelik (skoraj 100 kb), da bi ga lahko uporabili kot vektor za kloniranje, poleg tega tudi nima tudi dobrih selekcijskih markerjev. Kljub temu pa so bili prvi vektorji, ki so jih uporabili za kloniranje prav naravni izolati. Kmalu so jih nato zamenjali plazmidi ki so bili rezultat in vitro manipulacije, primer katerega je tudi pBR322, ki se podvojuje znotraj bakterij *E. coli*. Ta plazmid nosi številne karakteristike, zaradi katerih je primeren vektor za kloniranje. Je relativno majhen (samo 4361 bp), v celici pa se ohranja v velikem številu kopij (20-30). Lahko se zelo namnoži (1000-3000 kopij na celico, približno 40 % genoma), s pomočjo inhibicije proteinske sinteze z antibiotikom kloramfenikolom. Enostavno se ga lahko izolira v superzviti obliki, ob uporabi znanih rutinskih tehnik. Vanj se lahko vstavi primerna količina tuje DNA, čeprav vodi vstavljanje velikosti več kot 10 kb v nestabilnost plazmida.

Za ta plazmid je znana celotna sekvenca, kar nam omogoča prepoznavo vseh restrikcijskih mest. Obstajajo samostojna mesta cepitve za različne restrikcijske encime kot npr. PstI, SalI, EcoRI, HindIII in BamHI, ki zelo povečajo uporabnost vektorja. Nosi zapis za odpornost proti ampicilinu in tetraciklinu. V celico se ga zlahka ustavi s transformacijo ali umetno transformacijo (Madigan, 2006).

2.3.5 Regulacija biosinteze plazmidov

Najpogosteje uporabljeni plazmidni vektorji so potomci ColE1-podobnega plazmida, za selektivno amplifikacijo le teh pa mora biti znotraj gostiteljske celice dostopnih veliko dodatnih virov energije. Poleg tega je pomembno tudi, da se druge celične aktivnosti obdržijo na minimalnem nivoju. En primer iz prakse je na primer upočasnitev sinteze celičnih proteinov, kar lahko dosežemo z dodatkom kloramfenikola v gojišče, ali pa z limitacijo aminokislin. Lahko pa to dosežemo tudi z nizko stopnjo celične rasti, kar privede do sprostitev celičnega tekmovanja za vire ogljika in energije znotraj celice, ter priskrbi potrebni čas za replikacijo pDNA, natančneje sinhronizacijo tega procesa s celično delitvijo (Wang, 2001).

Optimizacijske strategije pri proizvodnji plazmidne DNA gredo v smeri iskanja načinov kako prisilit makimalno število bakterij, da bi obdržale plazmidno DNA, toda v ravno pravšnjem nizkem številu, da znižamo porabo energije in hranil za ohranjanje le te v celici. V nasprotnem primeru so ta hranila razpoložljiva za nadaljno sintezo proteinov. Eden možnih načinov je vključevanje genov za odpornost proti antibiotikom. Bakterije, ki nimajo plazmida tako niso zmožne rasti na gojišču, ki mu je bil dodan antibiotik. Slabost pa je, da rezistenca ne vodi nujno do produkcije visokih titrov plazmidne DNA (Lee in sod., 1994). Podobno strategijo sta opisala tudi Fiedler in Skerra (2001), ki sta predlagala uporabo določenih avksotropnih sevov, skupaj z plazmidom, ki kodira esencialni metabolni encim, ki ga sev nima.

Znano je tudi, da lahko višje koncentracije plazmidne DNA proizvedemo z uporabo določenih gostiteljskih sevov *E. coli*, kot na primer DH5 α , DH1, ali C600, ter s spreminjanjem lastnosti mesta ORI (Summers, 1991; Mahony, 2007). Zaključimo lahko, da na proizvodnjo plazmidov v bakterijah *E.coli* vplivajo številni parametri, vključno z gostiteljskim sevom, plazmidno sekvenco, ter pogoji bioprocesa (gojišče, upravljanje bioreaktorja). V našem delu pa smo raziskovali predvsem vpliv slednjih.

2.4 NAČINI KULTIVACIJE

Splošno ločimo med zaprtimi, odprtimi, polodprtimi in polzaprtimi sistemi kultivacije delovnih biokultur. Zaprti bioproces je definiran kot proces, pri katerem med potekom v bioreaktor ne dodajamo substratov za rast. Za polodprti bioproces je značilno dovajanje substrata – ta je pojmovan kot izvor ogljika ali dušika, ki omogoča rast biomase in akumulacijo proizvoda. Odprti bioproces pa definira dovajanje substrata in odvajanje proizvoda med samim procesom (Raspor in Smole-Možina, 1993).

Spreminjanje dimenzij kultivacije pomeni za organizem spremenjeno okolje v katerem le ta raste. Med okoljske parametre sodijo dostopnost hranil, pH vrednost, temperatura, raztopljena koncentracija kisika, strižne sile, koncentracija raztopljenega ogljikovega dioksida, ter penjenje. Na prve štiri parametre vpliva mešanje, zadnji trije pa so odvisni od prezračevanja in prenosa kisika. Pri prenosu procesa na višji nivo pa ni edini problem doseganje pravilne aeracije in pomešanja sistema, ampak tudi problemi vezani na razvoj inokuluma in problemi pri sterilizaciji. Ta dva parametra sta velikokrat razlog za znižanje produktivnosti (Srivastava, 2008). Kot navaja Mulhardt (2007) dobimo višje izkoristke bakterijskih kultur, ko opazimo pri kultivaciji penjenje.

Homogenost in kvaliteta končnega produkta pri plazmidni DNA funkcija interakcij, ki nastopijo med gostiteljem, plazmidom in rastnim okoljem (Quaak, 2009).

Metabolne aktivnosti znotraj celice so regulirane na več nivojih, tako zunaj, kot tudi znotraj celice. Biološka aktivnost celice je zelo občutljiva na dejavnike okolja, ki jim je izpostavljena. Zaradi te več nivojske kompleksne regulacije, je iz inženirskega stališča najpomembnejše razumevanje faktorjev hranil in okolja, ki vplivajo na celični metabolizem. Zelo pomembno je torej, da vzdržujemo okolje v bioreaktorju primerno za rast in produkcijo metabolitov celice. Cilj je vedno konsistentna proizvodnja velikih količin zelenega produkta skozi daljše časovne periode. Da dosežemo ta cilj, se je najboljšše posluževati kultivacije celic v bioreaktorju, kjer lahko učinkovito nadziramo celično aktivnost (Madigan, 2006).

Dogajanje znotraj bioreaktorske posode lahko ocenimo s pomočjo merjenja fizikalnih, kemijskih (izvenceličnih), biokemijskih (znotrajceličnih), ter bioloških parametrov. Pri vseh bioreaktorjih pa se pri kontroli določa tri osnovne okoljske faktorje: pH, temperaturo in koncentracijo raztopljenega kisika v gojišču. Kontrola se izvrši z regulacijo pretoka

kislina/baze, pretoka fluid skozi hladilni plašč ter z mešanjem. Ti trije parametri so zelo pomembni za optimalno celično aktivnost, sami po sebi pa ne zagotavljajo maksimalne produktivnosti (Madigan, 2006).

2.4.1 Bioproces z enkratnim polnjenjem

Bioproces z enkratnim polnjenjem predstavlja zaprt sistem, kjer se rastni pogoji zaradi mikrobne aktivnosti rastočega organizma, konstantno spreminjajo s časom (Madigan, 2006). Zaprti bioprocesi so tisti, pri katerih vnesemo inokulum v sterilizirano ali nesterilizirano gojišče, da bi ga spremenili v uporaben proizvod. Rastna kinetika biokultur je pogojena s substratom, njegovo koncentracijo in razmerji hranilnih komponent v gojišču. Mikroorganizmi se razmnožujejo do trenutka, ko se pogoji za rast izčrpajo in prične koncentracija biomase padati. Učinkovitost biosinteze želenega proizvoda pa je ob organskih in anorganskih induktorjih pogojena tudi z ekološkimi parametri rasti, kot so temperatura, pH-vrednost in ozmotski pritisk (Raspor in Smole-Možina, 1993). Z naraščanjem koncentracije celic pa se spreminja sestava substrata, ter kopičijo produkti, ki so lahko tudi toksični za celice (Levenspiel, 1999). Kljub temu so zaprti bioprocesi tipični za večino današnjih uspešnih biotehnoloških postopkov (Raspor in Smole-Možina, 1993).

Dogajanje v bioprocusu z enkratnim polnjenjem lahko zapišemo z masnimi bilancami. Ker se koncentracija biomase in substrata tekom bioprocesa spreminja za to uporabimo diferencialne masne bilance. Tako lahko bilanco za spreminjanje koncentracije biomase v bioreaktorju opišemo s spodnjo enačbo, kjer je X koncentracija biomase, t je procesni čas, μ pa specifična hitrost rasti (Podgornik in sod., 2013).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \dots (1)$$

V fazi pospešene rasti μ postopoma narašča. Ko doseže velikosti maksimalne specifične hitrosti rasti ($\mu_{\max}$), govorimo o eksponentni fazi, ki jo opisujemo z enačbo

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} X \quad \dots (2)$$

V tej diferencialni enačbi označuje X gostoto celic (g/l), dX/dt je trenutna sprememba prirastka celic v času in predstavlja hitrost rasti (g/lh). Maksimalna specifična hitrost rasti pa je konstantna med eksponentno fazo, ki je za vsak sistem karakteristična. Dokler je $\mu_{\max}$ konstanten, lahko napišemo

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{\max} t \quad \dots (3)$$

Če narišemo graf logaritma koncentracije biomase ($\ln X$) v odvisnosti od časa t , lahko grafično določimo $\mu_{\max}$, ki jo na tem grafu predstavlja tangens naklonskega kota premice (Raspor in Smole-Možina, 1993).

Koncentracija celic narašča eksponentno s časom, in sicer hitreje, čim višja je maksimalna specifična hitrost rasti. Ta je ob optimalnih pogojih kultivacije za vsak organizem specifična veličina, ki je gensko opredeljena. Prav to pogojuje variabilnost med vrstami in močno odvisnost od izvora ogljika in/ali energije. Za izračun kinetičnih parametrov rasti se uporabljajo enačbe, ki najenostavneje opisujejo rast mikroorganizmov, in sicer

$$\ln X = (\mu * t) + \ln X_0 \quad \dots (4)$$

Iz nje lahko izrazimo μ

$$\mu = \frac{\ln X - \ln X_0}{t} \quad \dots (5)$$

Mikrobna rast je definirana kot povišanje števila celic znotraj populacije. Poznavanje specifične hitrosti rasti populacije je uporabno pri optimizaciji kultivacije določene kulture za določen organizem ter za testiranje pozitivnega ali negativnega učinka določenih tretiranj bakterijske kulture (Madigan, 2006).

Ko inokuliramo mikrobno populacijo v sveže gojišče se prične rast po preteku določenega časa. Če prenesemo kulturo, ki je v eksponentni fazi rasti v enako gojišče, z enakimi pogoji rasti, se lag faza ne pojavi, ampak prične kultura takoj z eksponentno rastjo. Če pa inokulum vzamemo iz stare kulture (ki je v stacionarni fazi rasti), in ga prenesemo v isto gojišče, se lag faza navadno pojavi, tudi če so vse celice v inokulumu viabilne. Do tega pride, ker so celice izčrpane različnih esencialnih konstituent in potrebujejo čas za njihovo ponovno (re)sintezo. Zaradi spremembe kompletov encimov, pride do lag faze tudi ko prenesemo populacijo iz bogatega kultivacijskega gojišča, v revnejše (Madigan, 2006). Dolžina lag faze je odvisno od sposobnosti biokulture, da prilagodi svoj encimski sistem novo nastalim razmeram v okolju. V industrijskih bioprocesih se ta faza začne z vnosom inokuluma, ki obsega okrog 1 do 5 % delovnega volumna bioreaktorja. Fazo prilagajanja lahko matematično opišemo s specifično hitrostjo rasti, ki se giblje okrog nič ($\mu = 0 \text{ h}^{-1}$) (Raspor in Smole-Možina, 1993). Kot navaja Madigan (2006), je hitrost eksponentne rasti

kulture odvisna od pogojev v okolju (temperatura in sestava kultivacijskega gojišča), ter genetskih karakteristik posameznega organizma. Pri bioprocesu z enkratnim polnjenjem je eksponentna rast omejena. Po določenem času se pričnejo porabljati hranila, ter kopičiti stranski produkti rasti, ki le to inhibirajo, takrat organizem vstopi v stacionarno fazo rasti. Za to fazo je značilno, da ni prirasta oz. padca v številu celic. Pojavi se t.i. fenomen kriptične rasti, ko nekatere celice v populaciji rastejo, medtem ko druge odmirajo, kar ima za posledico konstantno število celic. Celice ostanejo žive, njihov metabolizem se nadaljuje, ne narašča pa več število celic. V primeru šaržne kultivacije lahko koncentracija hranil vpliva tako na hitrost rasti, kot tudi na izkoristek. Pri zelo nizkih koncentracijah hranila je rast zmanjšana, najverjetneje zato, ker se hranila ne uspejo transportirati v celico dovolj hitro, da bi zagotovila potrebe metabolizma (Madigan, 2006).

Ko pričnejo nakopičeni metaboliti ali pomanjkanje hranil (izvor ogljika, dušika, kisika...) ovirati normalno eksponentno rast, se začne faza pojemajoče rasti. To zakonitost bioprocesov je že leta 1943 ovrednotil Monod z izrazom (Raspor in Smole-Možina, 1993):

$$\mu = \mu_{\max} (S / (K_S + S)) \quad \dots (6)$$

Kot navaja Quaaak (2009), naj bi večino plazmidne DNA proizvedli med fazo reducirajoče rasti. Ko se nivo rasti upočasni, je celična metabolna aktivnost navadno nižja, kar pomeni več dostopnih hranil in energije za plazmidno replikacijo. Nadaljnje pa prisotnost plazmidne DNA zniža nivo rasti in donos biomase, zaradi povišanih potreb po energiji za ekspresijo selekcijskega gena. Pri kultivaciji na stresalniku in bioprocesu z enkratnim polnjenjem imajo mikroorganizmi omejeno dobavo hranil, zaradi česar dobimo na koncu bioprocasa nižjo vsebnost superzvite oblike plazmidne DNA, če le tega vodimo predolgo.

2.4.2 Bioproces z enkratnim polnjenjem in dohranjevanjem

To je način gojenja s spremenljivim volumnom tekočine zato, ker med bioprocesom v bioreaktor s tokom F dodajamo (samo) substrat. Gojenje začnemo šaržno in v primernem trenutku pričnemo z dohranjevanjem, običajno s konstantnim pretokom. Ta način gojenja ima očitne prednosti pred bioprocesom z enkratnim polnjenjem. Omogoča nam kontrolo bioprocasa in s tem metabolizma s primerno izbiro pretoka in koncentracije limitnega substrata v napajalnem toku ter začetnih pogojev. Prav tako je produktivnost takšnega bioprocasa večja, še povečamo pa jo lahko s ponavljanjem tega procesa tako, da po sterilni izpraznitvi ohranimo del gojišča in pričnemo z dohranjevanjem (Pavko, 1996).

Plazmidi se sprostijo, ko se celice prilagodijo na novo okolje, to je po tem, ko se primarni nutrienti porabijo. Pri bioprocesu z dohranjevanjem substrata, pa dosežemo višje nivoje rasti bakterijske kulture, ter konstantno vsebnost super zvite oblike (Quaak, 2009).

Substrat, s katerim dohranjujemo je pogosteje sladkor, kot pa gojišče v katerem gojimo kulturo. Koncentracija le tega mora biti kar se da visoka, da čim manj vplivamo na povišanje volumna med dohranjevanjem. Najpogosteje se uporabljajo med 30 in 50 % sladkorne raztopine. Za ta način gojenja se odločamo iz dveh glavnih razlogov. Limitacija s substratom omogoča kontrolo hitrosti reakcij, s čimer se lahko izognemo inženirskim omejitvam povezanim z ohlajanjem gojišča in prenosom kisika, ter tudi neke vrste kontrolo metabolizma, s čimer se lahko izognemo katabolni represiji in »over-flowu« sladkorjev (Enfors, 2010).

2.4.3 Gojenje kultur na stresalniku

Eksperimenti na laboratorijski ravni se navadno začnejo v erlenmajericah, ki pa imajo to slabost, da kljub stresanju na stresalniku ne izkazujejo dovolj dobrega fermentacijskega potenciala za mikroorganizem in njegov medij, predvsem zaradi slabih karakteristik aeracije, ki so vezane na te posode. Višjo koncentracijo raztopljenega kisika v mediju dosežemo, če uporabimo erlenmajerce z utori, vendar pa le ta ni primerljiva z aeracijskimi pogoji v fermentorju. Za študije na manjšem nivoju so zato primernejši majhni laboratorijski fermentorji, volumna od 1 do 10 ali 12 litrov, saj so tam pogoji aeracije in pomešanja bolj podobni fermentorjem, ki se uporabljajo v proizvodnji (Srivastava, 2008).

Eksperiment lahko poteka v posebnih erlenmajericah s stransko roko, v katerih med poizkusom merimo optično gostoto, ne da bi pri tem uničili vzorec ali kakorkoli vplivali na dogajanje v sistemu. Bioproces spremljamo z merjenjem optične gostote skozi stransko roko v spektrofotometru pri 660 nm. Meritve ponavljamo v 30-minutnih presledkih, dokler kultura ne doseže stacionarnega stanja (Raspor in Smole-Možina, 1993).

2.5 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA

2.5.1 Nečistoče

Kakovost in varnost farmacevtskih produktov na osnovi plazmidne DNA, namenjenih za klinične preizkuse, določajo evropske in ameriške smernice, ki veljajo za aktivne

farmacevtske učinkovine in zdravila, namenjena za injiciranje. Upoštevajo se priporočila, ki jih izdajajo sledeče organizacije; EMEA, FDA, ICH, ter WHO. S tem se sklada tudi postopek dobre proizvodne prakse (cGMP), ki trenutno velja na področju proizvodnje plazmidne DNA (Faucher, 2003).

Preglednica 2: Zahteve za produkte celične in genske terapije (Faucher, 2003)

Zahteva po specifikacijah	Vrednost
Procent določene fizične oblike, sc oblike	$\geq 90 \%$
Ostanki DNA gostiteljske celice	$< 5 \%$ oz $< 0,05 \text{ mg/mg}$ plazmida
Ostanki RNA gostiteljske celice	$\leq 4 \%$ oz $\leq 0,04 \text{ mg/mg}$ plazmida
Ostanki proteinov gostiteljske celice	$< 0,5 \%$
Endotoksini (LPS)	$< 10 \text{ EU/mg}$ plazmidne DNA

*podatki se med posameznimi organizacijami nekoliko razlikujejo.

Takoj za proteini so ribonukleinske kisline, druge najbolj zastopane makromolekule v aktivno rastoči celici. V nasprotju z RNA molekulami predstavljajo tako DNA molekule relativno majhen delež frakcije bakterijske celice. Suha teža aktivno rastoče celice bakterij *E. coli*, znaša povprečno $2,8 \times 10^{-13} \text{ g}$, skupna teža (70 % vode) pa znaša $9,5 \times 10^{-13} \text{ g}$ (Madigan, 2006).

Preglednica 3: Sestava prokariontske celice (Niedhardt in Curtiss, 1996)

Molekule	Suha teža (%)
Vse makromolekule	96
Proteini	55
Polisaharidi	5
Lipidi	9,1
Lipopolisaharidi	3,4
DNA	3,1
RNA	20,5
Vsi monomeri	3
Amino kisline in prekurzorji	0,5
Sladkorji in prekurzorji	2
Nukleotidi in prekurzorji	0,5
Anorganski ioni	1

Kot so ugotovili Silva in sod. (2008), lahko amplifikacija plazmidne DNA vodi do višjih specifičnih donosov le te, kar pomeni tudi nižji procent ključnih kontaminantov prisotnih v lizatu bakterij *E. coli*, kot so to RNA, denaturirana genomska DNA, proteini, in lipopolisaharidi.

Cilj pri čiščenju plazmidne DNA je odstranjevanje celične stene, bakterijskih proteinov, lipidov, lipopolisaharidov in nukleinskih kislin, z izjemo ciljne superzvite oblike plazmidne DNA. Največji izziv pri čiščenju predstavljajo fragmenti genomske DNA, visoko molekularna RNA in različne oblike razgrajene plazmidne DNA, zaradi podobnosti v fizikalnih in kemijskih lastnostih. Postopki čiščenja morajo zagotoviti 99,9 % odstranitev vseh nečistoč (Podgornik in sod., 2013).

Ekstrakcija DNA iz rastlinskih, živalskih in bakterijskih celic zahteva sprostitev vsebine celice v raztopino. Ker so bakterije enocelični organizmi in posledično ne vsebujejo nobenih vezi, maščobe, raznih tkiv in podobnega, je tu ekstrakcija DNA relativno lahka. Pri postopku je najprej potrebno razgraditi bakterijsko celično steno s pomočjo lizocimov, ter nato s pomočjo detergentov raztopiti lipide celične membrane. Da odstranimo kovinske ione, ki povezujejo skupaj komponente zunanje membrane, uporabimo predvsem pri G^- bakterijah kelirajoče agense, kot recimo EDTA. Vsebina celice, vključno z DNA se nato sprosti v raztopino in naprej očisti v sledečih korakih (Clark, 2010).

V splošnem se za čiščenje DNA molekul uporabljata centrifugacija in ekstrakcija z organskimi topili. Pri centrifugaciji takega vzorca se DNA in nekatere druge večje komponente celice, zaradi visokih hitrosti in centrifugacijske sile, posedejo na dno centrifugirke. Fragmenti celične stene, skupaj s še številnimi drugimi topnimi komponentami, pa ostanejo v raztopini in se jih nato zavrže. Še vedno je tu vmes pomešanih veliko proteinov in RNA molekul, ki pa se navadno odstranijo s kemijskimi postopki. En primer le tega je fenolna ekstrakcija, s katero lahko iz vzorca DNA odstranimo preostale proteine. Da se izognemo fenolni ekstrakciji, pa se lahko poslužujemo tudi kromatografskih metod, ki temeljijo na kolonah, na katerih so vezani delci, ki selektivno vežejo DNA molekule, brez preostalih celičnih komponent (Clark, 2010).

2.5.2 Alkalna liza

Za bakterijsko lizo in nadaljnje čiščenje DNA se v osnovi uporabljajo tri metode; alkalna liza, metoda s segrevanjem in uporabo lizocima, ter metoda z uporabo tritona in lizocima. Zadnji dve imata številne kritične korake, kot na primer čas segrevanja, delovanje lizocima in hitrost centrifugiranja. Zaradi teh lastnosti metode niso primerne za številne rodove bakterij, ki so denimo občutljivi na segrevanje (Mulhardt, 2007).

Pri alkalni lizi dosežemo učinkovito odstranjevanje DNA, saj pride v zelo alkalnem okolju do denaturacije le te. Po nevtralizaciji se obe verigi plazmidne DNA hitro ponovno hibridizirata, medtem ko ostane veliko večja kromosomska DNA enoverižna in precipitira (Mulhardt, 2007). Metodo sta opisala Birnboim in Doly (1979) in temelji na selektivni alkalni denaturaciji kromosomske DNA, medtem ko ostane kovalentno zaprta krožna DNA dvojno ovita. V ozkem območju pH vrednosti (med 12,0 in 12,5), pride do denaturacije linearne oblike DNA, pri čemer ostane super zvita oblika plazmidne DNA nepoškodovana. Metoda je dovolj preprosta, da dovoljuje analizo večih majhnih vzorcev naenkrat, ter hkrati zagotavlja dovolj čisto obliko plazmidne DNA, da jo lahko razgradimo z restrikcijskimi encimi, ali uporabimo za transformacijo celic.

Najprej je potrebno celice zaradi celične stene tretirati z lizocimom, ter jih nato popolnoma lizirali z uporabo natrijevega dodecil sulfata (SDS) in NaOH. Z izbiro ustreznega razmerja med količino NaOH in količino celične suspenzije, se doseže primerno pH vrednost za alkalno lizo, kjer pride do selektivne denaturacije kromosomske DNA. Nato sledi nevtralizacija lizata z natrijevim acetatom, ko pride do renaturacije kromosomske DNA in tvorbe skupkov. Hkrati povzroči visoka koncentracija natrijevega acetata precipitacijo kompleksov protein-SDS in RNA molekul visoke molekulske teže. Na ta način pride do precipitacije treh glavnih makromolekul, ki so glavni kontaminanti v tem procesu in se jih nato naprej dokončno odstrani s centrifugacijo. Plazmidno DNA (ter ostala RNA z nizko molekulsko maso) nato iz supernatanta izolirajo s pomočjo etanolne precipitacije (Birnboim in Doly, 1979).

V zaključnih procesih pa se lahko v koraku predčiščenja poslužujemo tudi precipitacije s soljo. Kot navajajo Zhong in sod. (2011), je glavni namen precipitacije s kalcijevim kloridom odstranjevanje RNA molekul visoke molekulske teže, saj le te motijo nadaljnje čiščenje plazmidne DNA, z anionsko-izmenjevalno kromatografijo. Da dobimo dovolj

visoke količine superzvite oblike plazmidne DNA in da odstranimo več kot 89 % RNA, je dovolj že, če uporabimo 0,13 M raztopino kalcijevega klorida (Bo in sod., 2007).

2.6 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI

Kromatografska analiza je postopek, kjer najprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrezno detekcijo, s ciljem kvalitativne ali kvantitativne določitve (Žorž, 1991). Posamezne komponente se med seboj ločujejo na podlagi različnih afinitet do stacionarne in mobilne faze (Anderluh in sod., 2009).

Ionsko izmenjevalna kromatografija deluje na principu izmenjave med nabitimi molekulami v vzorcu z ioni v mobilni fazi, ki tekmujejo za vezavo na ustrezno (praviloma nasprotno) nabite funkcionalne skupine stacionarne faze ionskega izmenjevalca. Ta vezava je reverzibilna. Elucijo dosežemo s spremembo pH ali ionske jakosti pufru. Posledica je postopna desorpcija posameznih molekul, kar je odvisno od njihovih elektrokemijskih lastnosti (Anderluh in sod., 2009).

V praksi skušamo doseči čim boljšo separacijo v čim krajšem času, z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema. Meja optimalnosti je po navadi določena z zmogljivostjo opreme in pritiska na koloni (Žorž, 1991). Z razvojem mehansko izredno odpornih nosilcev in črpalk, ki lahko ustvarijo velike delovne pritiske, se je uveljavil nov tip kromatografije, imenovan tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, ali s kratico HPLC. Sistem deluje pri tlaku do 10 MPa, visoka stopnja pretoka pa sili mobilne faze skozi kolono, da dobimo hitro ločitev v širokem območju, zaradi manjše velikosti delcev. HPLC se odlikuje z izredno veliko ločljivostjo in občutljivostjo (Anderluh in sod., 2009).

S to tehniko lahko ločujemo snovi na osnovi adsorpcije, porazdelitve, ionske izmenjave, velikosti molekul in biološke afinitete, na nosilcih in v kolonah, ki zdrže velike delovne pritiske. Uporabljamo jo tako za preparativno delo kot tudi za kvalitativne in kvantitativne analize separacije. Uporabljajo se stacionarne faze fine in enakomerne granulacije, ki dajejo dobre ločitve in prenesejo visoke tlake, ki so potrebni za doseganje zadovoljivih pretočnih lastnosti mobilne faze (Lunder, 2007).

Položaj posameznega vrha opredeljujejo retencijski in zadrževalni časi, ki nam povedo koliko časa se je neka snov v koloni zadrževala in kakšne so razmere, pri katerih se snov

spere iz kolone. Za neko snov lahko predvidimo, da je čista takrat, kadar je njen vrh simetričen in dobro ločen od drugih vrhov. Vsaka druga oblika vrha zahteva ustrezno spremembo metode (kolone, mobilne faze, temperature, količine nanosa, itd.) (Anderluh in sod., 2009).

HPLC se v glavnem uporablja kot adsorpcijska ali ionsko-izmenjevalna kromatografija za ločevanje majhnih molekul, kot so to peptidi, aminokisline, ogljikovi hidrati, tRNA ter druge organske molekule. Prednost analitskih in ločitvenih tehnik HPLC pred klasično kromatografijo je v kratkih časih ločitve, veliki ponovljivosti in visoki občutljivosti detekcije (Anderluh in sod., 2009). Zaradi teh lastnosti in široke uporabnosti je HPLC tehnika trenutno najširše uporabljena izmed vseh separacijskih tehnik (Skoog in sod., 2002).

3 MATERIALI IN METODE

Laboratorijsko delo v okviru magistrskega dela je obsegalo tri sklope.

a) Mikrobiološki

Kulture, ki so bile prej zamrznjene v vialah smo nacepili na predhodno razlito trdno gojišče. Liofilizirane kulture smo po odprtju kapsule prenesli v tekoče gojišče LB bujon. Vse vzorce smo nato tudi shranili v mikrobiološko zbirko na Biotehniški fakulteti.

b) Bioprosesni

Seve transformirane s plazmidno DNA različnih velikosti smo gojili na stresalniku, ter v bioreaktorskem sistemu. Med tem smo spremljali dinamiko rasti s sprotnim merjenjem optične gostote. Pri gojenju na bioreaktorskem sistemu smo spremljali dinamiko rasti z merjenjem optične gostote in-line, kot tudi off-line. Poleg tega smo dobili še podatek o spreminjanju pH vrednosti med bioprosesom, ter koncentraciji kisika.

c) Molekularno-biološki

Iz vzorcev odvzetih v različnih časovnih razmakih med spremljanjem bioprosesov, smo izolirali plazmidno DNA po postopku alkalne lize (poglavje 3.2.8).

d) Analitski

Za analizo koncentracije plazmidne DNA v vzorcih odvzetih znotraj različnih časov med bioprosesi, smo se posluževali HPLC metode (poglavje 3.2.10).

3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili spodaj naštet in opisane materiale.

3.1.1 Bakterijski sevi in plazmida DNA

Pri delu smo uporabili pet različnih sevov bakterij vrste *E. coli*, ki so predstavljeni v tabeli.

Preglednica 4: Seznam uporabljenih plazmidov

Ime plazmida	Kataloška številka	Velikost (kb)	Marker	Gostiteljski sevi
pAK1003	DSM 8878	7,1	Ap ^r , Km ^r	<i>E. coli</i> K12 J53
Yep13	DSM 4887	10,7	Ap ^r , Tc ^r	<i>E.coli</i> K12 MC1066
pSRW25	DSM 7023	12,6	Km ^r , Tc ^r	<i>E. coli</i> K12 J53
R6K	DSM 4245	39,4	Ap ^r , Sm ^r	<i>E. coli</i> K12 J53
R702	DSM 4247	69,7	Km ^r , Sm ^r , Sp ^r , Su ^r , Tc ^r , Hg ^r	<i>E. coli</i> K12 J53-2

* Podatke smo pridobili od proizvajalca plazmidov; nemške zbirke mikroorganizmov in celičnih kultur.

3.1.2 Rastna gojišča za bakterije vrste *E. coli*

Za revitalizacijo in spremljanje rasti bakterij *E. coli*, smo pri eksperimentalnem delu uporabili sledeča gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca.

3.1.2.1 Trdno gojišče Luria Bertani - Agar

Trdno gojišče Luria Bertani - Agar (LB-A) (Bertani, 1951) smo pripravili tako, da smo 10 g NaCl, 10 g triptona, 5 g kvasnega ekstrakta, ter 20 g agarja (2 % w/v vsebnost agarja) raztopili v 1 l deionizirane vode. Sledila je sterilizacija pri 121 °C, tlaku 1,1 bar, 20 minut. Po sterilizaciji smo počakali, da se je gojišče ohladilo na okoli 50 °C in nato sterilno dodali ustrezno količino antibiotikov, ter gojišče razlili v petrijeve plošče. Gojišče smo nato do uporabe hranili pri temperaturi 4 °C.

Preglednica 5: Sestava trdnega gojišča LB-A

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
NaCl	10	Merck, Nemčija
Trypton	10	Merck, Nemčija
Kvasni ekstrakt	5	Biolife, Italija
Agar	20	Biolife, Italija
dH ₂ O	do 1 l	

3.1.2.2 Tekoče gojišče Luria Bertani bujon

Bakterijsko kulturo smo gojili v tekočem gojišču Luria Bertani bujon (LB-B) (Bertani, 1951), ki smo ga pripravili tako, da smo 10 g NaCl, 10 g triptona in 5 g kvasnega ekstrakta

raztopili v 1 l deionizirane vode in sterilizirali. Tako pripravljeno gojišče smo hranili pri temperaturi 4 °C. Pred uporabo smo nato v gojišče dodali določene količine ustreznih antibiotikov.

Preglednica 6: Sestava tekočega gojišča LB-B

Sestavina	Koncentracija v gojišču (g/l)	Proizvajalec
NaCl	10	Merck, Nemčija
Tripton	10	Merck, Nemčija
Kvasni ekstrakt	5	Biolife, Italija
dH ₂ O	do 1 l	

3.1.3 Raztopine antibiotikov

V preglednici so navedeni antibiotiki, ki smo jih dodali gojiščem, za selekcijo zelenih sevov bakterij *E. coli*. Antibiotike smo izbirali na podlagi plazmidov, ki smo jih hoteli izolirati iz bakterij.

Preglednica 7: Uporabljeni antibiotiki

Antibiotik	Koncentracija v gojišču (µg/ml)	Proizvajalec
Ampicilin	50	Sigma, Nemčija
Kanamycin	50	Sigma, Nemčija

Po sledečem protokolu smo pripravili založno raztopino antibiotikov. Zatehtali smo 500 mg ampicilina, ter ga raztopili v 10 ml dH₂O. Enako smo zatehtali 500 mg kanamicina, ter ga raztopili v 10 ml dH₂O. Raztopino smo prefiltrirali čez filtre z velikostjo por 0,2 µm.

3.1.4 Pufri in raztopine

Pufre smo potrebovali za izolacijo plazmidne DNA, v postopku alkalne lize.

3.1.4.1 Pufer 50 mM TRIS in 10 mM EDTA, pH 8,0

Preglednica 8: Sestavine za pripravo pufra

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
Tris baza	6,07	Sigma, Nemčija
EDTA	2,92	Sigma – Aldrich, Nemčija
dH ₂ O	do 1 l	

Naštete sestavine smo zatehtali v 1000 ml čašo, dodali vodo do oznake 900 ml, ter mešali na magnetnem mešalu, da so se sestavine vidno raztopile. Nato smo z uporabo pH metra določili pH vrednost, ter le to uravnali na pH 8,0, z uporabo 5 M NaOH. Na koncu smo dolili še vodo do oznake 1000 ml.

3.1.4.2 Raztopina 0,2 M NaOH in 1 % natrijevega dodecil sulfata

Preglednica 9: Sestavine za pripravo raztopine 0,2 M NaOH in 1% natrijevega dodecil sulfata

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
NaOH	8	Merck, Nemčija
SDS	10	Sigma, Nemčija
dH ₂ O	do 1 l	

Naštete sestavine smo zatehtali v 1000 ml čašo, ter dodali vodo in mešali na magnetnem mešalu, da so se sestavine vidno raztopile.

3.1.4.3 Raztopina 3M kalijev acetat, pH 5,5

Preglednica 10: Sestavine za pripravo raztopine 3 M kalijevega acetata, pH vrednost 5,5

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
Kalijev acetat	294,45	Sigma, Nemčija
dH ₂ O	do 1 l	

V 1000 ml čašo smo zatehtali ustrezno količino kalijevega acetata, dodali vodo do oznake 900 ml, ter mešali na magnetnem mešalu, da se je sol vidno raztopila. Nato smo z uporabo pH metra določili pH vrednost, ter le to uravnali na pH 5,5, z uporabo 0,5 M HCl. Na koncu smo dolili še vodo do oznake 1000 ml.

3.1.4.4 Raztopina 4M CaCl₂

Preglednica 11: Sestavine za pripravo raztopine 4 M CaCl₂

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
CaCl ₂	443,96	Sigma, Nemčija
dH ₂ O	do 1 l	

V 1000 ml čašo smo zatehtali ustrezno količino kalcijevega klorida, ter dodali vodo in mešali na magnetnem mešalu, da se je sol vidno raztopila.

3.1.5 Priprava mobilnih faz za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

3.1.5.1 Mobilna faza A; 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1,5 M NaCl, pH 7,2

Preglednica 12: Sestavine za pripravo raztopine za mobilno fazo A

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
Tris baza	6,07	Sigma, Nemčija
EDTA	2,92	Sigma, Nemčija
NaCl	87,66	Merck, Nemčija
dH ₂ O	do 1 l	

Naštete sestavine smo zatehtali v 1000 ml čašo, dodali vodo do oznake 900 ml, ter mešali na magnetnem mešalu, da so se sestavine vidno raztopile. Nato smo z uporabo pH metra določili pH vrednost, ter le to uravnali na pH 7,2, z uporabo 5 M NaOH. Na koncu smo dolili še vodo do oznake 1000 ml. Tako pripravljeno raztopino smo filtrirali skozi filtre, z velikostjo por 0,2 µm.

3.1.5.2 Mobilna faza B; 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,2

Preglednica 13: Potrebne kemikalije za pripravo raztopine

Sestavina	Koncentracija (g/l)	Proizvajalec
Tris baza	6,07	Sigma, Nemčija
EDTA	2,92	Sigma, Nemčija
dH ₂ O	do 1 l	

*Raztopino pripravimo po istem postopku, kot mobilno fazo A, le da tu ne dodamo soli.

3.1.6 Laboratorijska oprema in pribor

Preglednici 14 in 15 prikazujeta uporabljeno laboratorijsko opremo ter materiale.

Preglednica 14: Uporabljena laboratorijska oprema

Naziv	Proizvajalec
Avtoklav	Sutjeska, Jugoslavija
Avtoklav 5075 ELVC	Tuttnauer, ZDA
Avtomatske pipete 200 µl, 1000 µl in 10 ml	Gilson, Francija
Bioreaktorski sistem Techfors-S	Infors HT, Švica
Brezprašna komora	Iskra, Slovenija
Centrifuga	Sigma, ZDA
Digestorij	Iskra, Slovenija
Fotometer MA 9510	Iskra, Slovenija
Hladilnik	Gorenje, Slovenija
Horizontalna agarozna elektroforeza	Pharmacia, Biotech
Komora za fotografiranje gelov Gel Doc 1000 UV Gel Documentation system	Bio-Rad, ZDA
Ledomat	
Magnetno mešalo Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Slovenija
Magnetno mešalo	ICA, ZDA
pH meter	Mettler toledo, ZDA
Programski paket Bionumerics za obdelavo gelov	Applied Maths
Programski paket IRIS Bioprocess Control Software	Infors HT, Švica
Sistem za kromatografijo visoke ločljivosti	Knauer, Nemčija
Stresalnik Multitron	Infors HT, Švica
Stresalnik Vibromix 403	Tehtnica, Slovenija
Tehtnica, analytic	Sartorius, Nemčija
Tehtnica, exelence	Sartorius, Nemčija
Termostat s cirkulacijo hladilne tekočine, 2219, Multitemp II,	LKB - Pharmacia
Vakuumska črpalka	Sartorius, Nemčija
Vrtinčnik	IKA, ZDA
Zamrzovalnik (-20 °C)	LTH, Slovenija

Preglednica 15: Splošni laboratorijski material

Naziv	Proizvajalec
Filtri Chromafil; 0,45 µm pore	GVS, ZDA
Erlenmajerice s stransko roko, 150 ml	Scott Duran, Nemčija
Injekcijske brizgalke	BD plastipak
Merilni valji	-
Mikrocentrifugirke, 2 ml	Eppendorf, Nemčija
Mikrotitrne ploščice P96	TPP, Švica
Nastavki za pipete 200 µl, 1000 µl in 10ml	Eppendorf, Nemčija; Gilson, Francija
Parafilm »M« PM 992	American National Can, ZDA
Plastične filtrirne naprave	TTP, Švica
Plastilne mikrocentrifugirke 15 ml in 50 ml	TTP, Švica
Steklene filtrirne naprave	Sartorius, Nemčija
Sterilne petrijeve plošče	Labortechnika Golias, Slovenija
Sterilne plastične cepilne zanke	Labortechnika Golias, Slovenija
Viale	Supelco, Sigma-Aldrich, Nemčija
Laboratorijske steklenice 100 ml, 250 ml, 500 ml in 1000 ml	Simax, Češka in Duran, Nemčija
Steklene palčke	-

3.1.7 Reagenti

V spodnji preglednici so predstavljeni vsi reagenti, ki smo jih uporabili pri delu.

Preglednica 16: Uporabljeni reagenti

Ime reagenta	Proizvajalec
Agar	Biolife, Italija
CaCl ₂	Sigma - Aldrich, Nemčija
Etanol (70%, 96%)	Merck, Nemčija
Glukoza	Merck, Nemčija
Kalijev acetat	Sigma – Aldrich, Nemčija
Kvasni ekstrakt	Biolife, Italija

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 16. Uporabljeni reagenti«

Ime reagenta	Proizvajalec
NaCl	Merck, Nemčija
NaOH	Merck, Nemčija
Trypton	Merck, Nemčija
Trizma baza	Sigma – Aldrich, Nemčija
SDS	Sigma – Aldrich, Nemčija

3.1.8 Kolone

Pri analitski HPLC metodi smo uporabili CIM DEAE disk monolitne kolone (Bia Separations).

3.2 METODE

3.2.1 Priprava delovne banke in shranjevanje bakterij vrste *E. coli* v zbirko

Iz nemške zbirke mikroorganizmov in celičnih kultur (DSMZ) smo prejeli pet različnih sevov bakterij *E. coli*, s petimi različno velikimi plazmidnimi DNA molekulami, ter z njimi postopali naprej po navodilih proizvajalca. Tri seve, ki smo jih prejeli v vialah, smo s cepilno zanko prenesli na trdna LB-A gojišča z ustreznimi antibiotiki, ter jih čez noč gojili v inkubatorju, pri 37 °C. Naslednji dan smo izbrali kolonijo, ter jo precepili v tekoče LB-B gojišče z dodanim ustreznim antibiotikom (končna koncentracija v gojišču 50 µg/ml), ter gojili kulturo na stresalniku, pri 37 °C in 220 vrt./min. Ko smo dosegli OD₆₅₀ več kot 0,7, smo kulture shranili v zbirko na faksu, ter za namene našega eksperimentalnega dela. V označeno vialo smo k 1200 µl kulture dodali 300 µl glicerola, ter zamrznili alikvote 1 ml na -80 °C.

Dva seva, ki smo jih prejeli v liofilizirani obliki pa je bilo potrebno najprej rehidrirati. Liofilizirani kulturi smo po odprtju kapsule prenesli v tekoče gojišče LB bujon, ki smo mu dodali ustrezen antibiotik. Kulturi sta rastli na stresalniku pri 220 vrt./min in temperaturi 37 °C. Tudi ti dve kulturi smo naslednji dan shranili v zbirko, ter za namene našega nadaljnjega dela, na temperaturo -80 °C.

3.2.2 Namnožitev biomase za vcepek

Vcepek za gojenje bakterijske kulture v bioreaktorju smo po navodilih proizvajalca, pripravili v 1000 ml erlenmajericah z utori, s 500 ml tekočega gojišča LB-B, ki smo mu dodali 500 µl ustreznega antibiotika. V gojišče smo iz zamrznjene kulture iz zbirke, s pipeto prenesli 100 µl kulture bakterij vrste *E. coli*, z ustreznim plazmidom. Kulturo smo od 17 do 24 ur inkubirali na stresalniku, pri temperaturi 37 °C in 220 vrt./min.

3.2.3 Gojenje bakterijske kulture na stresalniku

Ploščo stresalnika smo prilagodili tako, da smo lahko v 150 ml erlenmajericah s stransko roko istočasno gojili vseh pet sevov. Pogoji gojenja so bili za vsak poizkus različni in so navedeni posebej v poglavju rezultati.

3.2.4 Gojenje bakterijske kulture v bioreaktorju

Po recepturi (Bertani, 1951) smo pripravili 20 l osnovnega LB-B gojišča, za kultivacijo bakterij *E. coli*, ter izvedli sterilizacijo po standardnem postopku, v bioreaktorski posodi (121 °C, 30 minut). V primeru bioprosesov z dohranjevanjem, smo pripravili še 5 l raztopine ustreznih hranil, ki smo jih sterilizirali posebej v avtoklavu. Naslednji dan, ko je bilo gojišče ohlajeno, je sledila inokulacija steriliziranega gojišča, kjer smo s pomočjo gorilnika zagotovili aseptične pogoje. Med bioprosesom smo v posebne plastične epruvete, vsako uro vzorčili 40 ml vzorca. Po določitvi optične gostote, smo vzorec shranili v hladilnik, za kasnejše analize. Dogajanje v bioreaktorju smo spremljali s pomočjo »in line« merjenja optične gostote in pH-vrednosti brozge, ter koncentracije raztopljenega kisika.

3.2.5 Merjenje optične gostote vzorcev

Po vsakem vzorčenju smo spremljali spreminjanje koncentracije biomase, s pomočjo merjenja optične gostote, pri valovni dolžini 650 nm. Spektrofotometer smo pred merjenjem ničlili z uporabo čistega gojišča.

3.2.6 Določanje koncentracije mokre biomase vzorcev

40 ml bioprosesne brozge smo centrifugirali v stehanih in označenih centrifugirkah, 10 min pri 12000 vrt./min. Supernatant smo zavrgli, biomaso pa dobro sprali z destilirano

vodo in odstranili preostanke gojišča. Sediment smo nato stehali, ter od dobljene mase odšteli maso prazne centrifugirke. Razlika na koncu je predstavljala maso mokre biomase.

3.2.7 Ločitev celic od gojišča s centrifugiranjem

40 ml gojišča z bakterijsko kulturo smo natočili v centrifugirke in centrifugirali 10 minut na 12000 vrt./min, pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo zavrgli, bakterijsko biomaso pa stehali in izvedli alkalno lizo.

3.2.8 Alkalna liza celic

Alkalno lizo smo izvedli po prilagojenih metodah, ki so jih vpeljali Birnboim in Doly (1979), ter Smrekar in sod. (2010). Centrifugirko, oziroma čašo, v kateri se je nahajala predhodno scentrifugirana biomasa, smo postavili na led. Nato smo dolili v čašo na vsak gram biomase 10 ml raztopine Tris pufer (50 mM) in EDTA (10 mM), pH = 8,0, ki je bil predhodno ohlajen na 4 °C. Čašo smo postavili na magnetno mešalo in mešali dokler nismo dobili homogene suspenzije. Medtem smo pripravili svežo raztopino 0,2 M NaOH in 1 % natrijevega dodecil sulfata (SDS). Čašo smo iz magnetnega mešala prestavili spet na led, kjer smo ob mešanju s stekleno palčko dodali 10 ml/g biomase, sveže pripravljene raztopine NaOH (0,2 M) in SDS (1 %), ter pustili stati natančno 5 minut.

Ob mešanju s stekleno palčko smo nato dodali še 10 ml/g biomase 3 M raztopine kalijevega acetata, s pH vrednostjo 5,5, ki je bil predhodno v zmrzovalniku. Nato smo 3 minute mešali in dodali raztopino CaCl₂, do koncentracije 0,5 M (dodaj 1/7 volumna lizata). Čašo smo nato dali v hladilnik za 15 minut. Nato smo vsebino čaše prelili v centrifugirke in centrifugirali pol ure na 12000 vrt./min. Plazmid se je nahajal v supernatantu, ki smo ga odlili in ga prefiltrirali skozi 0,45 µm filter.

3.2.9 Priprava umeritvene krivulje za HPLC s standardnim plazmidom

Iz podjetja Bia Separations smo dobili standard (1,5 ml raztopine s plazmidom R6K, koncentracije 0,21 mg/ml). Plazmid smo najprej redčili v razmerju 1:5, nato pa naprej za faktor 2. Vzorce smo injicirali na HPLC sistem, ter iz kromatografov določili površine vrhov. Iz teh smo dobili umeritveno krivuljo. Enačbo premice pa uporabljali naprej za določevanje koncentracije plazmidne DNA v vseh nadaljnjih vzorcih.

3.2.10 Analiza plazmidne DNA s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

Za postavitev HPLC analitske metode za spremljanje koncentracije plazmidne DNA, smo prilagodili metodo, ki jo je vzpostavila skupina Smrekar in sod. (2010).

Preglednica 17: Shematski prikaz pogojev HPLC metode

	Čas	Pretok (ml/min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)	Valovna dolžina
1	00:00		100	0	
2	00:10		100	0	
3	00:30		100	0	
4	01:20		40	60	
5	02:50	4	20	80	260 nm
6	03:05		0	100	
7	03:25		0	100	
8	03:40		100	0	
9	04:45		100	0	
10	04:50	0	100	0	

*Pritisk na črpalkah je bil 11 bar. Zanka je 1 ml, zato injiciramo 1,5 ml vzorca.

3.2.11 Preverjanje čistosti vzorca s plazmidno DNA, z elektroforezo

Postopek smo izvedli po navodilih proizvajalca (Qiagen). 50 µl lizata smo najprej inkubirali za 30 minut pri temperaturi 37 °C, da smo omogočili encimsko aktivnost ribonukleaz. Med tem smo pripravili 1 % agarozni gel, tako, da smo v 60 ml TAE pufra raztopili 0,6 g agaroze. Ohlajenemu gelu smo nato dodali še barvilo SYBR green. Na tako pripravljen gel smo nanašali 20 µl vzorca, ki je predstavljal 18 µl različnih lizatov in 2 µl nanašalnega barvila. Pogoji pri elektroforezi so bili; 120 V, 400 mA, 45 min. Gel smo nato barvali s pomočjo etidijevega bromida.

4 REZULTATI

Poglavje povzema rezultate laboratorijskega dela, ki so podani v obliki preglednic in grafov, nekateri podrobnejši podatki ter umeritvene krivulje pa so posebej v poglavju Priloge. Predstavljeni so rezultati gojenja bakterij *E. coli* na stresalniku, ter v bioreaktorju. V obeh primerih smo se posluževali tako odprtega, kot tudi zaprtega načina kultivacije bakterijskih kultur, ki so nosile različno velike plazmide DNA molekule. Na stresalniku smo istočasno gojili vseh pet različnih sevov, z različno veliko plazmidno DNA. Na podlagi rezultatov pridobljenih na stresalniku, smo potem v bioreaktorju optimizirali pogoje rasti dveh različnih sevov, z velikostjo plazmidne DNA 10,7, ter 39,4 kb. Rasti bakterij med bioprocesom smo sledili preko merjenja optične gostote (OD_{650}), tako z »on-line«, kot tudi s periodičnimi »off-line« meritvami. Koncentracijo plazmidne DNA smo določali z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).

4.1 OPTIMIZACIJA RASTNIH PARAMETROV BAKTERIJ VRSTE *E. coli*

Plazmidno DNA uvrščamo med primarne produkte celice, zaradi česar je pomembno, da znamo uspešno gojiti gostiteljsko celico, če hočemo čim višje koncentracije produkta, v najkrajšem času in ob najnižjih stroških. Zato smo se pri načrtovanju poskusov najprej spoznali z dinamiko rasti in rastnimi zahtevami našega organizma, ter šele nato optimizirali bioprocesne parametre, ter postopek alkalne lize.

4.1.1 Preizkusi na stresalniku

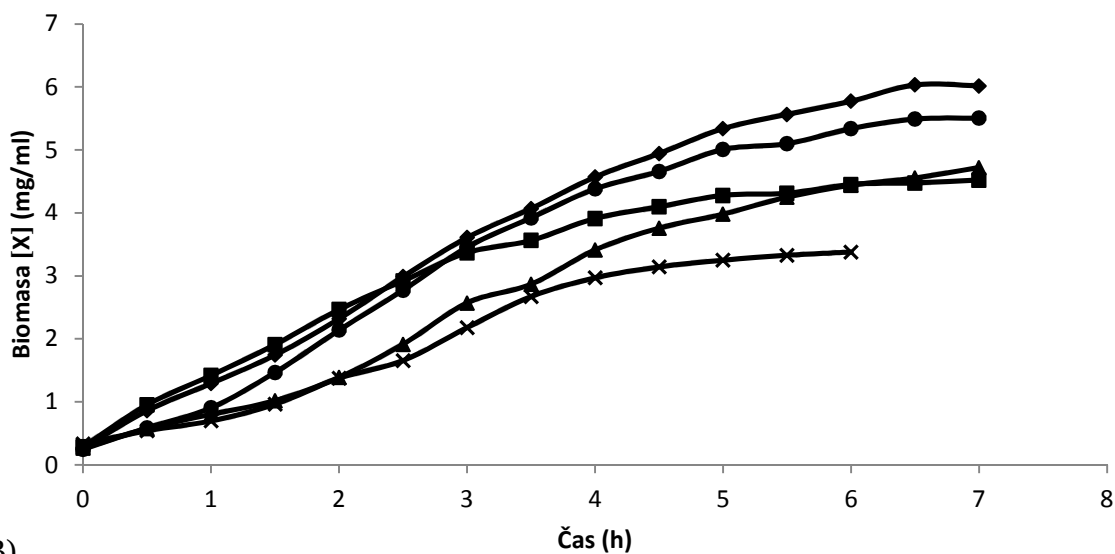
Na stresalniku smo spremljali rast vseh petih sevov bakterij *E. coli*, ki so nosili različno velike plazmide. Na podlagi teh rezultatov, smo se nato odločili za dva različna seva, za katera smo optimizirali pogoje gojenja naprej v bioreaktorju.

4.1.1.1 Preizkusi kultivacije na stresalniku brez dohranjevanja

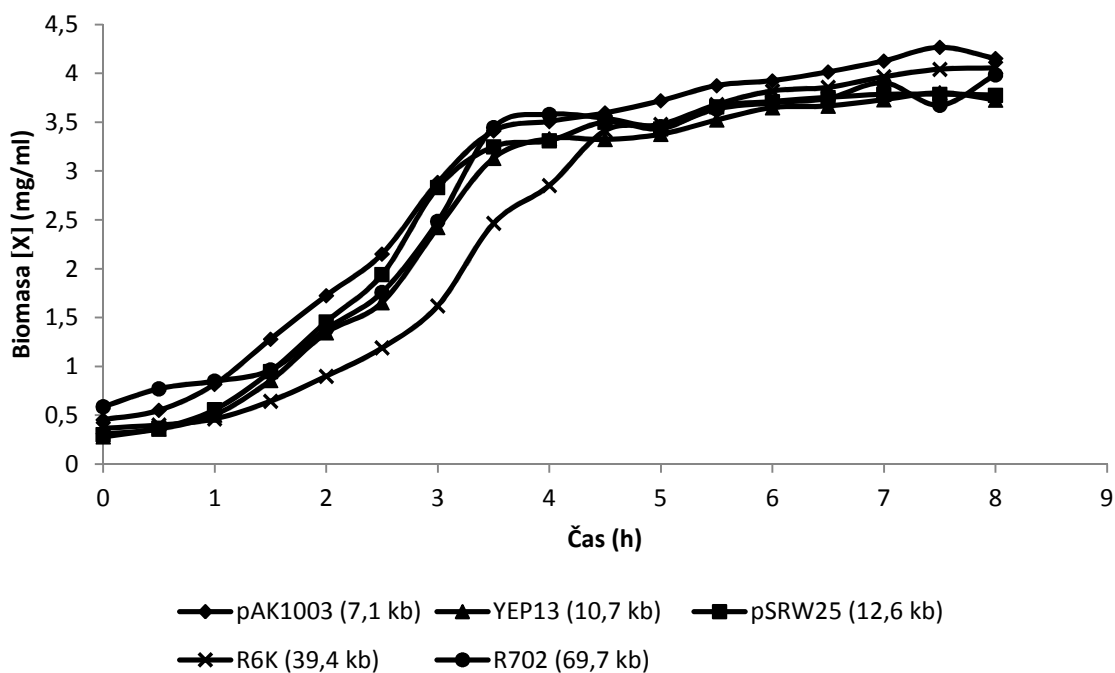
Bakterijske kulture smo gojili v 200 ml erlenmajericah s stransko roko, s 100 ml gojišča LB-B. Z uporabo tovrstnih erlenmajeric smo lahko spremljali dinamiko rasti, s periodičnim merjenjem optične gostote na spektrofotometru. Poleg tega so imele te erlenmajerice utore, zaradi katerih pride do višjega deleža koncentracije raztopljenega kisika med kultivacijo, kot v navadnih. Da bi lahko določili vpliv temperature na rast bakterij, smo se posluževali treh različnih temperatur gojenja, tj. 28 °C, 37 °C, ter 40 °C. Hitrost stresa je bila pri

vseh primerih konstantna in sicer 220 vrt./min. Za vcepek smo uporabili kulture naravnost iz delovne banke, ali pa prekonočne kulture, katere rast smo predhodno spremljali na stresalniku.

A)



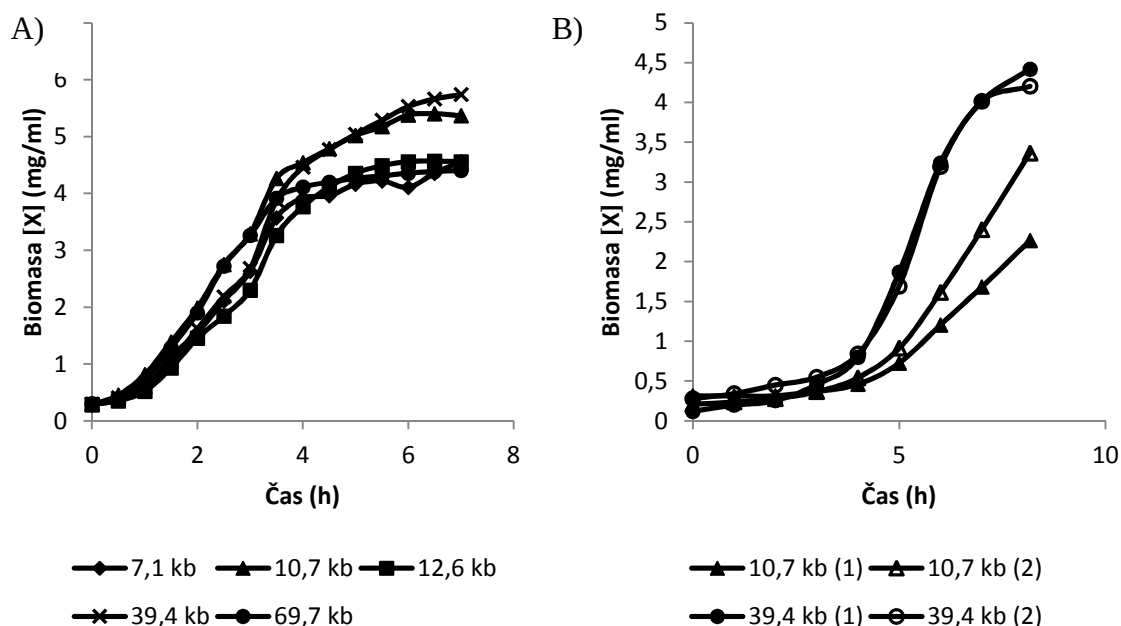
B)



Slika 2: Rastne krivulje vseh petih sevov bakterij *E. coli*, gojenih v dveh ločenih poskusih, pri enaki temperaturi.

Stresalnik; gojišče LB-B, 37 °C, 220 vrt./min. A) prva kultivacija, B) druga kultivacija

Na sliki 2, ki nakazuje rast bakterij na stresalniku pri 37 °C, je lepo razviden pomen fiziološkega stanja vcepka med prenašanjem v naslednjo kultivacijsko fazo. V prvem primeru smo kot vcepek v 100 ml LB-B gojišča odpipetirali 100 µl kulture, direktno iz delovne banke. Ker so bile v dobrem fiziološkem stanju, je bila lag faza pri tej kultivaciji krajša, kot v drugem primeru. Drugo kultivacijo pri 37 °C smo namreč izvedli takoj naslednji dan, tako da smo kot vcepek uporabili kar kulturo celic prekonočne kultivacije.



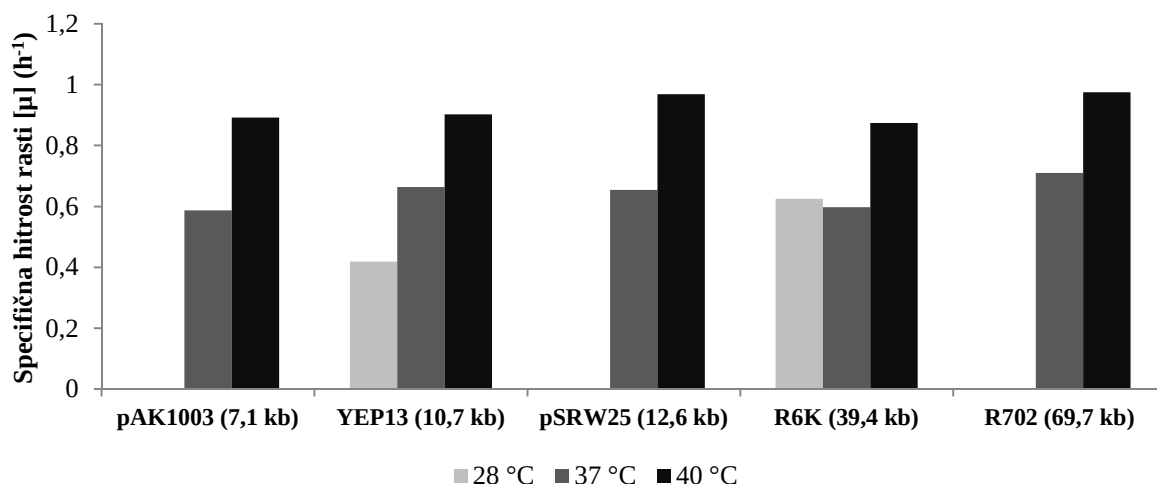
Slika 3: Rastne krivulje vseh petih sevov bakterij *E. coli*, gojenih v ločenih poskusih pri različnih temperaturah.

Stresalnik; gojišče LB-B, 220 vrt./min. Vseh pet sevov smo gojili pri temperaturi 40 °C (A), dva seva s plazmidno DNA velikosti 10,7 kb (YEP13), ter 39,4 kb (R6K), pa pri temperaturi 28 °C (B).

Na slikah 2 in 3 vidimo različne krivulje rasti med gojenjem pri različnih temperaturah na stresalniku. Pri temperaturi 28 °C je kultura prešla v stacionarno fazo rasti po 8 urah gojenja, pri 37 °C po približno 5 urah, najhitreje pa se ta preobrat zgodi pri gojenju na 40 °C, ko se zaključí eksponentna faza rasti že po treh do štirih urah. Pri dveh sevih gojenih na 28 °C, lahko vidimo ponovljivost naših meritev med kultivacijo, saj dobimo za dva različna seva po dve značilni krivulji (slika 3, B).

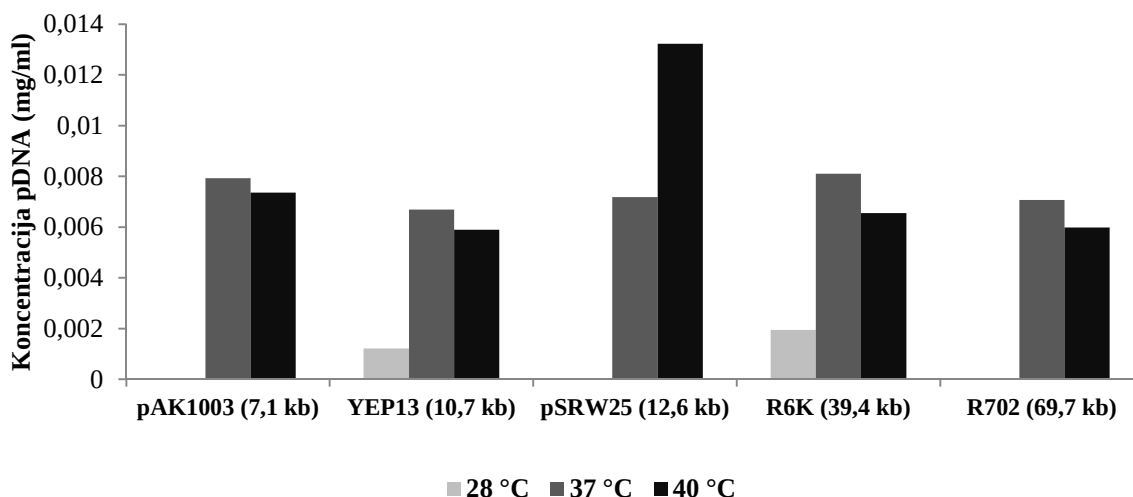
Začetna koncentracija celic je bila za posamezen preizkus pri vseh sevih enaka. Kot je razvidno na slikah 2 in 3, smo dosegli najvišje končne koncentracije biomase s sevom, ki nosi plazmidno DNA velikosti 10,7 kb. Zaradi tega smo ta sev izbrali za nadaljnje poskuse na biorektorskem nivoju. Visoke končne koncentracije biomase je pri vseh temperaturah

gojenja izkazoval tudi sev, ki nosi plazmidno DNA velikosti 39,4 kb. Kot je lepo razvidno po naklonu eksponentne faze, je za ta sev značilna tudi visoka specifična hitrost rasti, iz česar smo nato lahko ugotovili, kako to vpliva na koncentracijo plazmidne DNA.



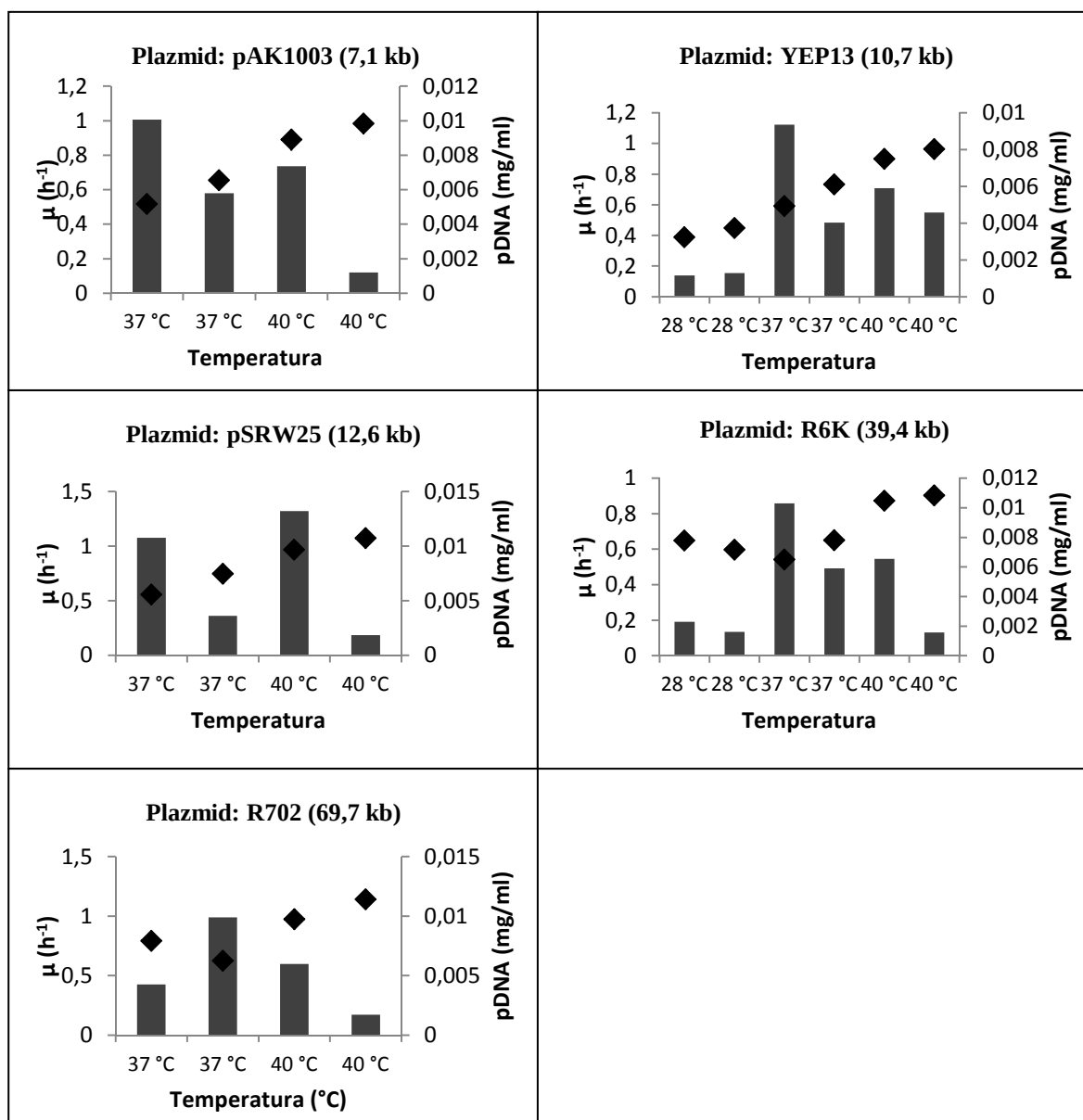
Slika 4: Primerjava povprečij specifičnih hitrosti rasti za vse seve bakterij *E. coli*, gojene na stresalniku, pri različnih temperaturah.

Glede na dobljene rezultate pa ne moremo zaključiti, da ima velikost plazmida vpliv na specifično hitrost rasti celic. Pričakovali smo, da bo sev, ki nosi največjo plazmidno DNA (69,7 kb) rasel najpočasneje. Kot je razvidno iz slike 4, pa je tako pri 37 °C, kot tudi pri 40 °C, najpočasneje rasel sev, ki nosi najmanjšo plazmidno DNA (7,1 kb).



Slika 5: Primerjava povprečij koncentracij plazmidne DNA (mg/ml), za vse seve bakterij *E. coli*, gojene na stresalniku, pri različnih temperaturah.

Pri gojenju kultur na stresalniku smo izolirali plazmidno DNA po koncu vsakega bioprocesa, ker nismo imeli dovolj velikih količin vzorca, da bi lahko spremljali koncentracijo le te periodično, med samim bioprosesom. Poleg tega bi lahko prišlo do kontaminacije vzorca med prenašanjem kulture iz erlenmajeric. Spreminjanje koncentracije plazmidne DNA smo tako spremljali kasneje, na biorektorskem nivoju, ko smo lahko aseptično odvzeli dovolj velike in reprezentativne količine vzorca. Na slikah 4 in 5 lahko vidimo, da dobimo pri višjih temperaturah gojenja sevov na stresalniku, tudi višje koncentracije biomase, ter plazmidne DNA.

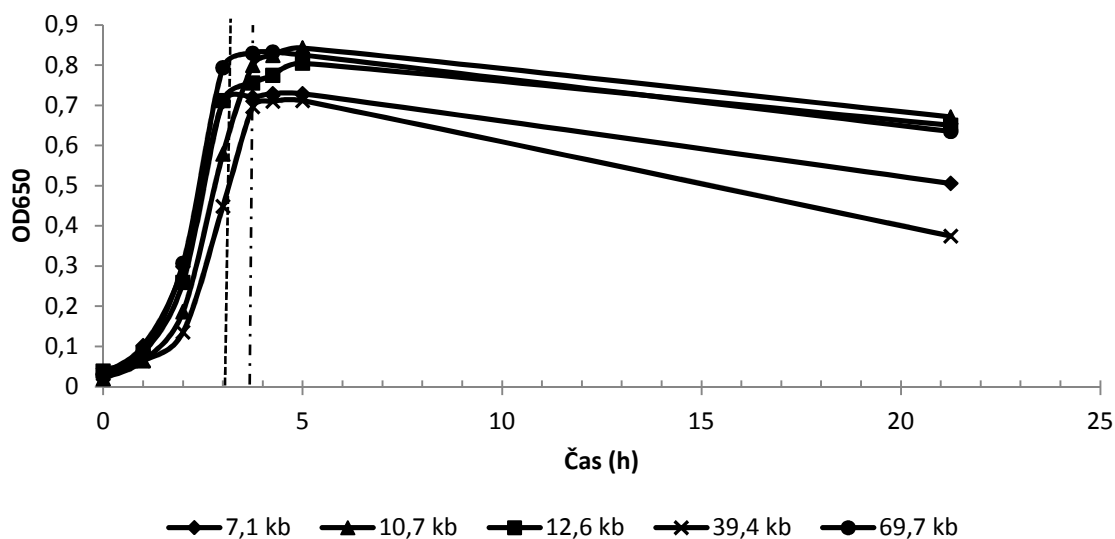


Slika 6: Primerjava koncentracij plazmidne DNA (stolpčni diagram) in specifičnih hitrosti rasti (točkovni diagram), za vse seve bakterij *E. coli*, pri različnih temperaturah gojenja na stresalniku.

Pri preizkusih na stresalniku smo pokazali, da se z višanjem temperature, pri kateri gojimo sev, povečuje tudi specifična hitrost rasti. Za vse seve smo dokazali, da dosežemo najvišje specifične hitrosti rasti pri temperaturi 40 °C. Nekoliko počasnejšo rast izkazujejo sevi ob gojenju pri temperaturi 37 °C, najpočasneje pa pričakovano rastejo pri temperaturi 28 °C. Do odstopanja je prišlo pri sevu, ki nosi plazmidno DNA velikosti 39,4 kb. Ob gojenju pri temperaturi 28 °C smo dosegli zelo velike specifične hitrosti rasti, kljub temu pa je sama koncentracija plazmidne DNA še vedno nižja, kot pri gojenju na višjih temperaturah.

4.1.1.2 Vpliv dodatka kloramfenikola v gojišče

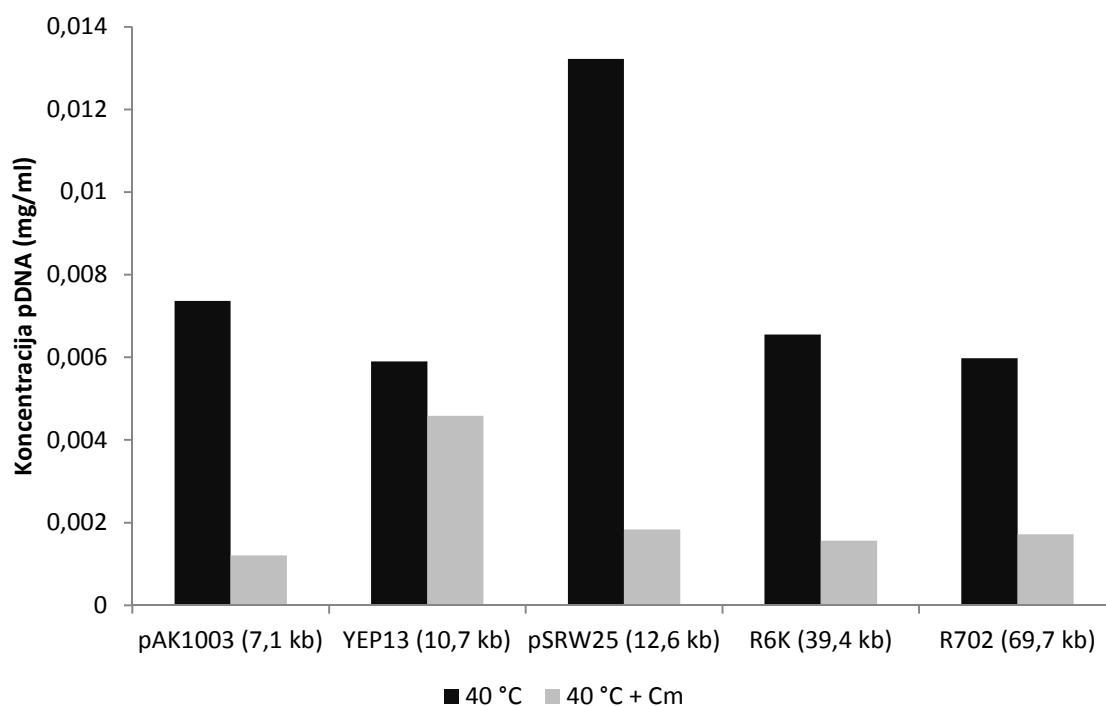
Na stresalniku smo naredili tudi preizkus vpliva dodatka kloramfenikola v gojišče, saj naj bi ta po navedbah nekaterih člankov vplival na višjo koncentracijo plazmidne DNA. V pet erlenmajeric s stransko roko smo v 100 ml predhodno pripravljenega in steriliziranega gojišča z ustreznim antibiotikom, inokulirali 100 µl kultur posameznih sevov, z različno veliko plazmidno DNA. Kulture smo gojili na stresalniku pri temperaturi 40 °C in 220 vrt./min. Sproti smo periodično spremljali rast, z merjenjem optične gostote pri 650 nm. Ko smo dosegli vrednost med 0,6 in 0,7, smo aseptično dodali v vsako erlenmajerico 500 µl predhodno pripravljene raztopine kloramfenikola, s koncentracijo 34 µg/ml.



Slika 7: Vpliv dodatka kloramfenikola v gojišče, na vseh pet sevov bakterij *E. coli*, s petimi različno velikimi plazmidi.

Stresalnik: gojišče LB-B, 40 °C, 220 vrt./min. K sevom s plazmidno DNA velikosti 12,6 kb, 69,7 kb in 7,1 kb smo dodali kloramfenikol po treh urah od pričetka kultivacije (označeno na grafu s prvo pravokotno črto). K sevom z 39,4 kb in 10,7 kb veliko plazmidno DNA, pa po treh urah in 45 minutah od pričetka kultivacije (označeno na grafu z drugo pravokotno črto).

Kot je razvidno na sliki 7, so pričele celice po dodatku kloramfenikola zelo hitro prehajati v stacionarno fazo rasti. Ker smo pustili kulturo rasti preko noči, so v tem času celice zaradi delovanja kloramfenikola že odmrle. Posledično je bila nizka tudi končna koncentracija plazmidne DNA. Če bi hoteli izolirati večje koncentracije le te, bi bilo potrebno bioproces zaustaviti kmalu po dodatku kloramfenikola, predno pričnejo celice prehajati v fazo odmiranja. Kljub temu, da smo seve gojili pri temperaturi 40 °C, smo zaradi neustreznega časa zaustavitve kultivacije, dobili nižje koncentracije plazmidne DNA, kot v drugem primeru gojenja pri isti temperaturi (slika 8). Kljub odmiranju celic, pa je bila koncentracija plazmidne DNA na koncu večja, kot v primeru gojenja kulture na stresalniku pri temperaturi 28 °C. Ta preizkus se odločimo zato ponoviti na bioreaktorskem sistemu, kjer lahko spremljamo kaj se dogaja s koncentracijo plazmidne DNA med samim bioprocesom.



Slika 8: Vpliv temperature gojenja in dodatka kloramfenikola v gojišče, na končno koncentracijo plazmidne DNA, za vse seve bakterij *E. coli*.

Stresalnik; gojišče LB-B, 40 °C, 220 vrt./min. V drugem primeru smo h kulturam dodali kloramfenikol (Cm).

4.1.1.3 Preizkusi na stresalniku z dohranjevanjem

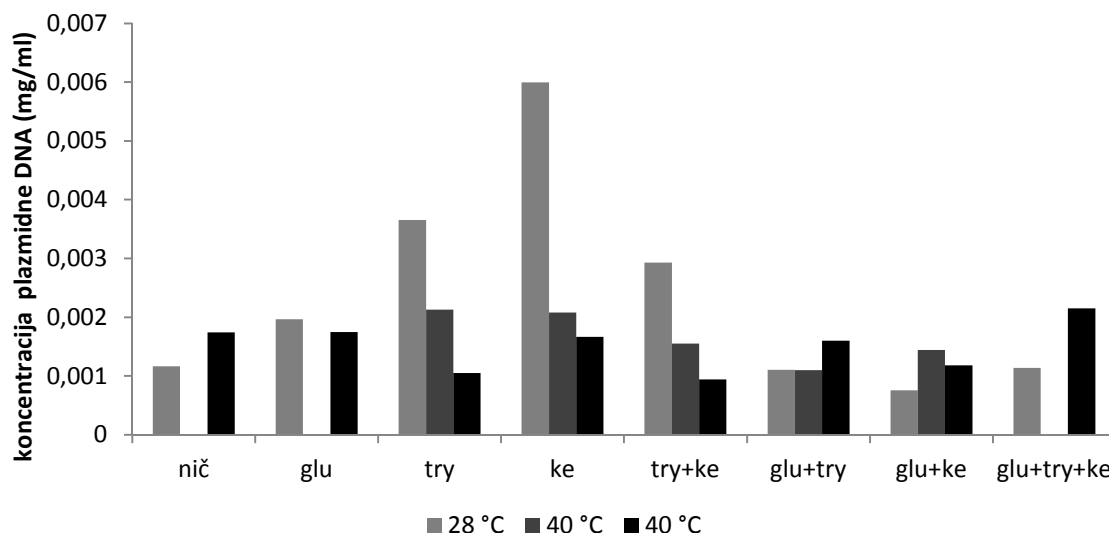
V LB-B gojišče smo že na začetku kultivacije dodali različna hranila, da bi določili povezavo vpliva le teh na rast sevov, ter možen vpliv na končno koncentracijo plazmidne DNA. Med samo kultivacijo pa hranil nismo dodajali več, zaradi nevarnosti kontaminacije, ter prevelikega redčenja gojišča zaradi majhnih volumnov vzorcev.

Preglednica 18: Primerjava specifičnih hitrosti rasti ter koncentracij plazmidne DNA, z različnimi sevi, pri različnih temperaturah, ob dodajanju različnih hranil

Dohranjevanje	4887; 28 °C		4887; 40 °C		4887; 40 °C		4245; 40 °C	
	μ (h ⁻¹)	pDNA (µg/ml)	μ (h ⁻¹)	pDNA (µg/ml)	μ (h ⁻¹)	pDNA (µg/ml)	μ (h ⁻¹)	pDNA (µg/ml)
Nič	0,5374	1,1656			0,0247	1,7465	0,8406	1,0370
Glukoza	0,4925	1,9650			0,0203	1,7496	0,8474	0,8019
Trypton	0,4999	3,6556	0,6742	2,1310	0,0199	1,0511	0,8801	0,8468
Kvasni ekstr.	0,4764	5,9971	0,6544	2,0797	0,0429	1,6660	0,9674	1,3050
Try + Ke	0,4585	2,9342	0,7124	1,5539	0,0248	0,9426	0,7347	0,6506
Glu + Try	0,5178	1,1086	0,6258	1,0985	0,0221	1,6030	0,8113	0,7973
Glu + Ke	0,4269	0,7601	0,7553	1,4446	0,0255	1,1831	0,9358	0,4869
Glu + Try+ Ke	0,6531	1,1411			0,0236	2,1544	0,7673	0,8660

*Ke – kvasni ekstrakt; Glu – glikoza; Try – tripton. Stresalnik: 220 vrt./min

Glede na dobljene rezultate, vpliva na končno koncentracijo plazmida velikosti 10,7 kb, dodatek triptofana, ter kvasnega ekstrakta v gojišče. To je posebej lepo opaziti pri kultivaciji kultur pri temperaturi 28 °C. Dodatek glukoze v gojišče nima nobenega vpliva na količino plazmida, saj je ta enaka kot v primeru, ko v gojišče nismo dodajali nobenih hranil. Pri poskusu na biorektorskem sistemu, se tako odločimo voditi bioproces pri 28 °C, ter dohranjevati s triptonom. Pri gojenju kulture na 40 °C, pa smo dobili ravno obratne rezultate, saj je v veliki večini višja končna koncentracija plazmida dosežena v primeru, ko smo kulturo dohranjevali z glukozo. Posledično smo se odločili za izpeljavo tovrstnega bioprocesa tudi na biorektorskem nivoju.



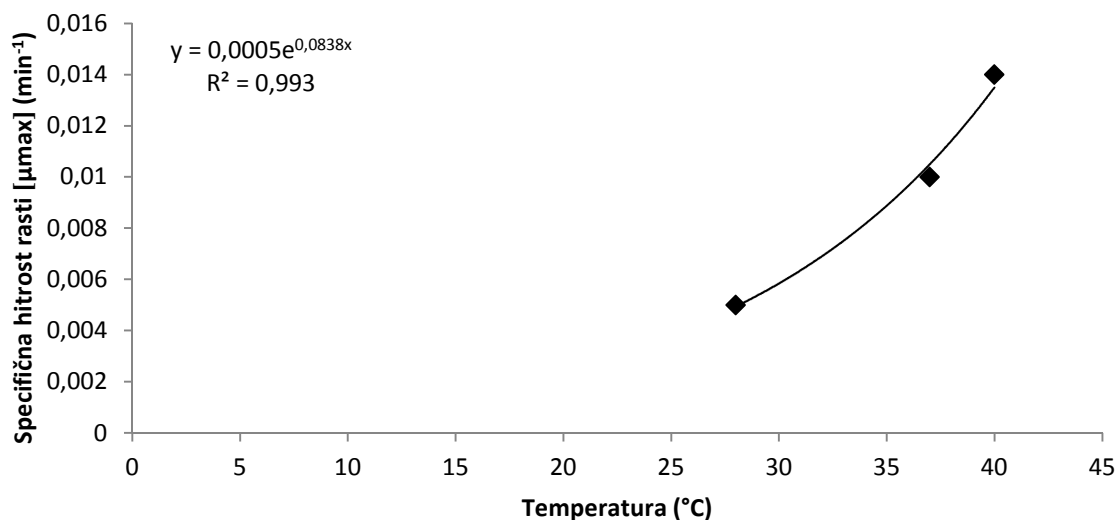
Slika 9: Vpliv temperature in sestave gojišča, na koncentracije plazmidne DNA, pri treh ločenih kultivacijah bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA YEP13 (10,7kb).

Stresalnik: prva kultivacija pri 28 °C, druga pri 40 °C in tretja pri 40 °C. Hitrost stresa je bila povsod 220 vrt./min. Dohranjevali smo z različnimi kombinacijami hranil. »glu« - glukoza, »try« - tripton, »ke« - kvasni ekstrakt.

Pri kultivaciji na stresalniku nismo ugotovili, da bi prišlo pri procesih z dohranjevanjem do višjih koncentracij biomase, ter plazmidne DNA, v primerjavi s poskusi, ko nismo v gojišče dodajali nobenih drugih hranil. Pri istih pogojih gojenja na stresalniku, smo v primeru dodatka hranil v gojišča, dosegli nekoliko hitrejšo rast. Koncentracija plazmidne DNA pa v tem primeru ni dosegla višjih vrednosti. Pri gojenju brez dodajanja različnih hranil dosežemo koncentracije plazmidne DNA v mejah med 0,001 in 0,006 mg/ml, pri istih pogojih gojenja ob dodajanju različnih hranil pa med 0,001 in 0,004 mg/ml.

4.2 OPTIMIZACIJA BIOPROCESNIH PARAMETROV

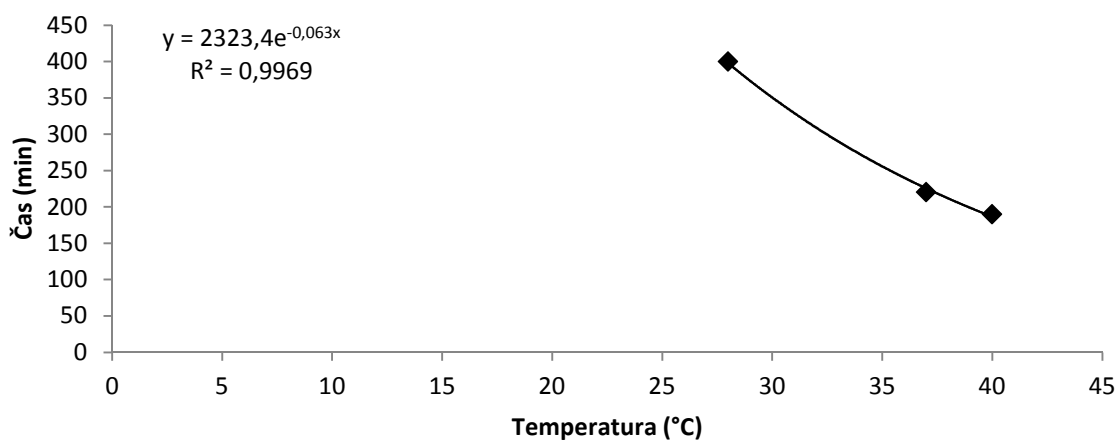
Ko smo izvedli prve poskuse na stresalniku, ter dva poskusa v bioreaktorju, smo lahko naredili simulacijo vpliva temperature na rast sevov, ter posledično na titer plazmidne DNA. S pomočjo tega, smo dobili podatek, kdaj je potrebno zaključiti bioprocese na bioreaktorskem nivoju, da smo dobili čim višje izkoristke plazmidne DNA. Iz rastnih krivulj, ki nakazujejo rast seva pri različnih temperaturah, smo izračunali maksimalno specifične hitrosti rasti, ter za simulacijo vzeli povprečno vrednost le teh, ki je znašala 0,01 min⁻¹.



Slika 10: Vpliv temperature na specifično hitrost rasti bakterij *E. coli*, s plazmidom YEP13 (10,7 kb).

S pomočjo zgornje enačbe krivulje odvisnosti maksimalne specifične hitrosti rasti od temperature, smo tako lahko naredili simulacijo vpliva temperature. Upoštevali smo tudi različne začetne koncentracije celic v vcepku.

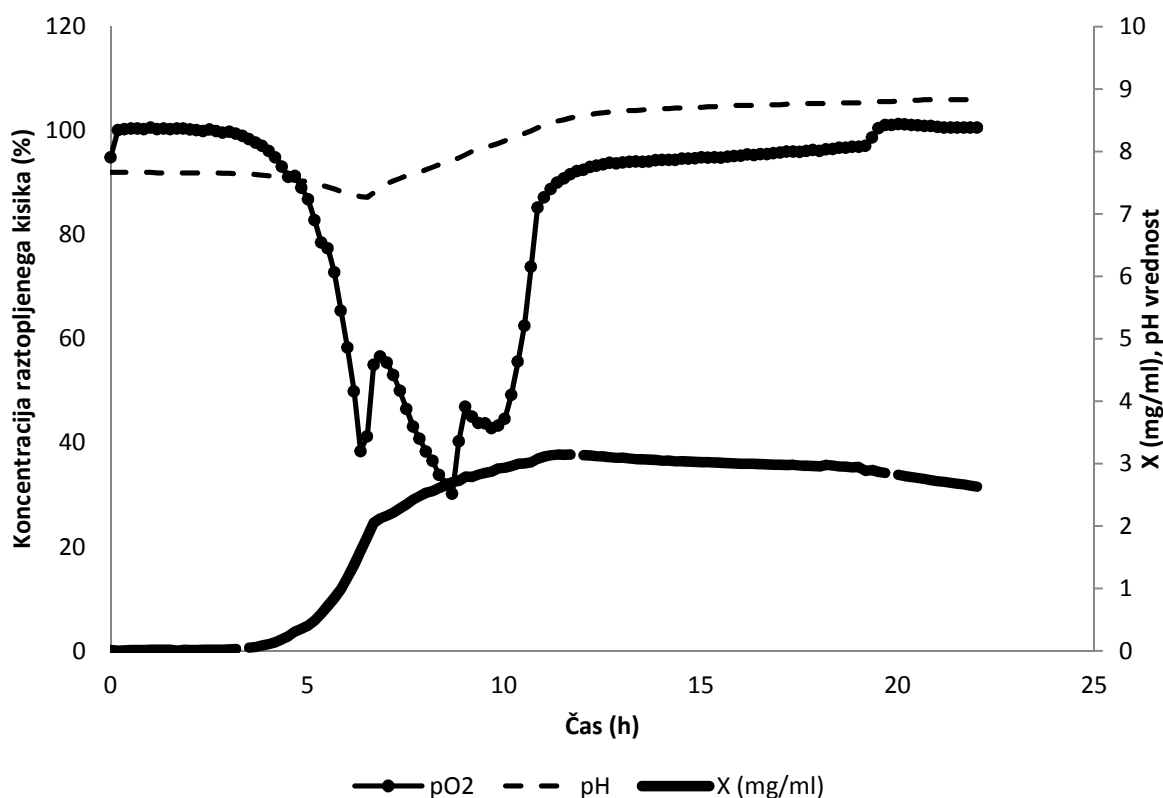
S pomočjo simulacije smo lahko ocenili tudi čas kultivacije, potreben za doseganje maksimalne koncentracije plazmidne DNA. Iz enačbe krivulje lahko naprej izračunamo v kolikšnem času bomo dosegli najvišje koncentracije plazmidne DNA, če gojimo sev pri različni temperaturi. Kot lahko vidim na sliki 11, je pri višjih temperaturah gojenja potrebno manj časa, da dosežemo enako koncentracijo plazmidne DNA. Z višanjem temperature obratovanja bioprocesa pa se višajo tudi stroški, zaradi česar je potrebno narediti določen kompromis.



Slika 11: Prikaz odvisnosti časa potrebnega za doseganje maksimalnega titra plazmidne DNA, od temperature gojenja seva bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA YEP13 (10,7 kb).

4.2.1 Bioproces z enkratnim polnjenjem

Preizkuse smo izvajali na 30 l bioreaktorju PID Techfors – S Bacterial, z delovnim volumnom 20 l. Bioreaktor je povezan s spektrofotometrom, preko katerega poteka »on line« merjenje optične gostote.



Slika 12: Potek bioprocesa z enkratnim polnjenjem, z bakterijskim sevom *E. coli* K12 MC1066 in plazmidno DNA YEP13 (10,7 kb).

Bioreaktor: gojišče LB-B, 37 °C, 300-350 vrt./min.

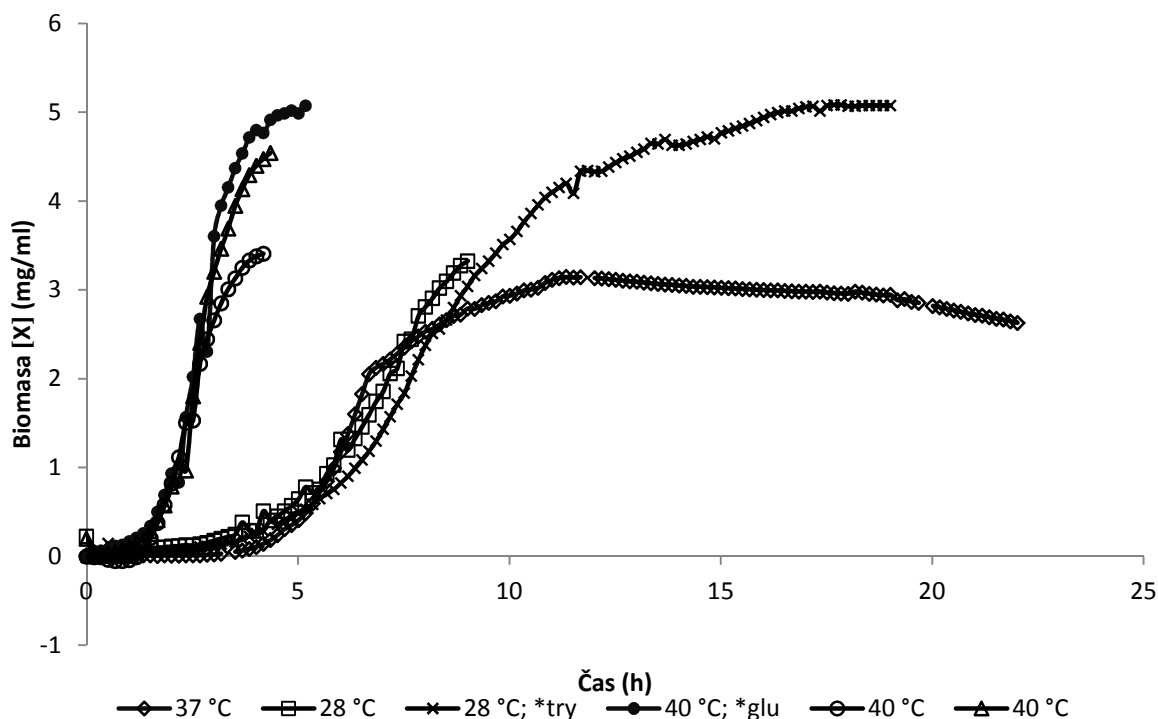
Na sliki 12 so prikazane tri spremenljivke, ki smo jih spremljali med obratovanjem bioprocesa z enkratnim polnjenjem, v bioreaktorskem sistemu. Po približno šestih urah rasti kulture pade delež koncentracije raztopljenega kisika pod 40 %, zato smo povišali mešanje iz 300 vrt./min, na 350 vrt./min. V naslednjih petih urah, ko prične kultura prehajati iz eksponentne faze rasti v stacionarno, pa lahko vidimo na istem grafu, ki prikazuje delež koncentracije raztopljenega kisika, značilen prevoj, ki se pojavlja tudi naprej pri vseh nadaljnjih kultivacijah na bioreaktorskem sistemu. Prevoj se lepo sklada z dvigom pH vrednosti, ki ga nakazuje zgornji graf, ter koncem eksponentne faze rasti organizma. Zaradi tega lahko sklepamo, da pride na tisti točki mogoče zaradi

primanjekovanja hranil v gojišču, do upočasnjene rasti mikroorganizmov, kar se izraža tudi v manjši porabi kisika. Ko pa prične kultura izrabljati druge vire ogljika, ki so na voljo v gojišču, pa prične spet nekoliko hitreje rasti, kar vidimo spet na padcu naklona grafa, ki prikazuje delež koncentracije raztopljenega kisika. Tak trend je mogoče opaziti pri vseh nadaljnjih kultivacijah, zato lahko izključimo, da bi bil to šum elektrode, ampak gre dejansko za fiziološki odgovor organizma na spremembe v okolju.

Preglednica 19: Pregled pogojev rasti pri gojenju kultur v bioreaktorju in prikaz specifičnih hitrosti rasti, ter donosa plazmidne DNA, za vsak bioproces posebej

Velikost plazmida (kb)	Temp. (°C)	Obrati (Rpm)	OD ₆₅₀ inokuluma	μ (h ⁻¹)	pDNA (mg) na koncu eksponentne faze rasti	pDNA (mg) na koncu bioprocesa
10,7	37	300	1,0086	1,5862	-	12
7,1	37	*400	0,9097	0,9346	14	6
10,7	28	350	1,1146	0,5828	18	20
10,7 *try	28	350	1,1518	0,6915	21	20
10,7 *glu	40	350	1,0688	1,6692	24	123
10,7	40	400	0,9018	2,1717	27	7
10,7	40	400	0,713	2,1049	5	14
39,4	37	400	0,929	1,1082	31	121
39,4	40	400	1,2088	1,1229	25	28
39,4	40	400	1,1356	1,1998	25	28
39,4 *ke	40	400	1,0025	1,2452	21	19
39,4 *Cm	40	400	1,105	1,1002	43	41

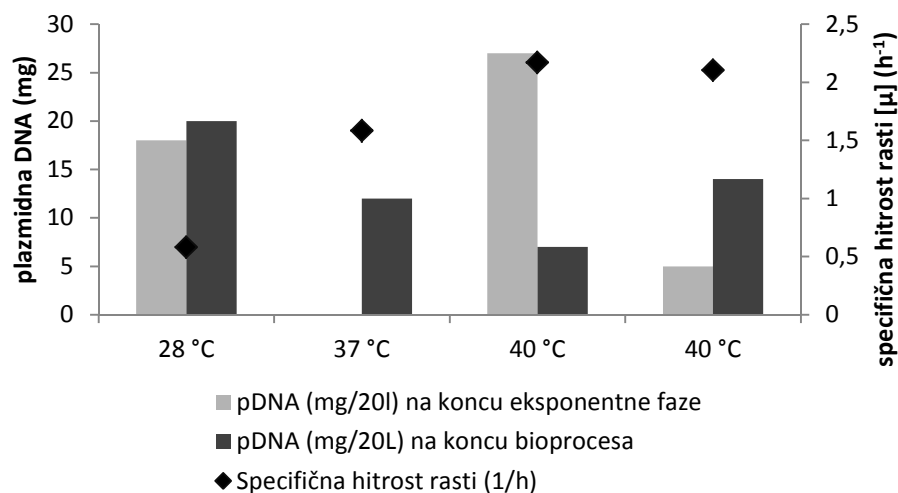
*glu-glukoza, ke-kvasni ekstrakt, try-tripton. Prezračevanje je konstantno; 20 l/min pri vseh bioprocesih.



Slika 13: Prirast biomase, za sev bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA velikosti 10,7 kb, v petih neodvisnih kultivacijah, pri različnih pogojih.

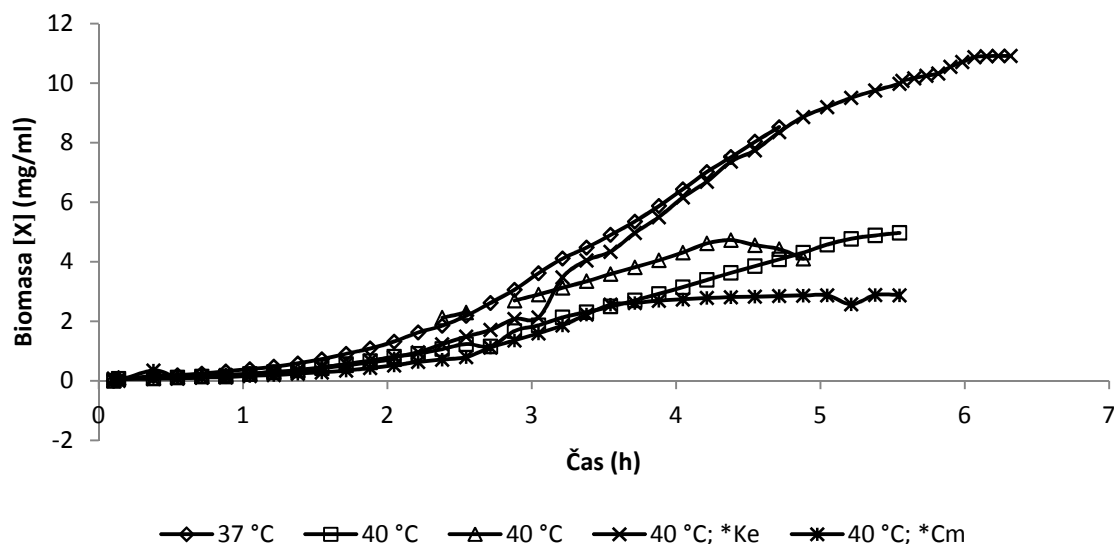
Bioreaktor: gojišče LB-B, 300 vrt./min. *try – napajanje z raztopino triptona, *glu – napajanje z raztopino glukoze.

Na koncu obratovanja bioprocesov z enkratnim polnjenjem, smo za sev, ki nosi plazmidno DNA velikosti 10,7 kb pridobili najvišje koncentracije le te, pri temperaturi gojenja 28 °C. To je posledica dejstva, da smo v drugih primerih, ko smo sev gojili na 37 °C in 40 °C, pustili bioproces teči predolgo in je v tem času organizem dosegel že fazo odmiranja, ki pomeni tudi nižjo koncentracijo plazmidne DNA. Če primerjamo koncentracije plazmidne DNA izolirane ob koncu eksponentne faze rasti, pa lahko ugotovimo, da dosežemo najvišjo koncentracijo le te v primeru kultivacije pri 40 °C. V primeru kultivacije pri 37 °C, je koncentracija plazmidne DNA za 5 % nižja. Kar 53 % nižjo koncentracijo plazmidne DNA pa dobimo na kuncu eksponentne faze rasti, ob kultivaciji pri temperaturi 28 °C.



Slika 14: Primerjava specifičnih hitrosti rasti in koncentracije plazmidne DNA za bioprocen z enkratnim polnjenjem, v bioreaktorju, za sev bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA velikosti 10,7kb.

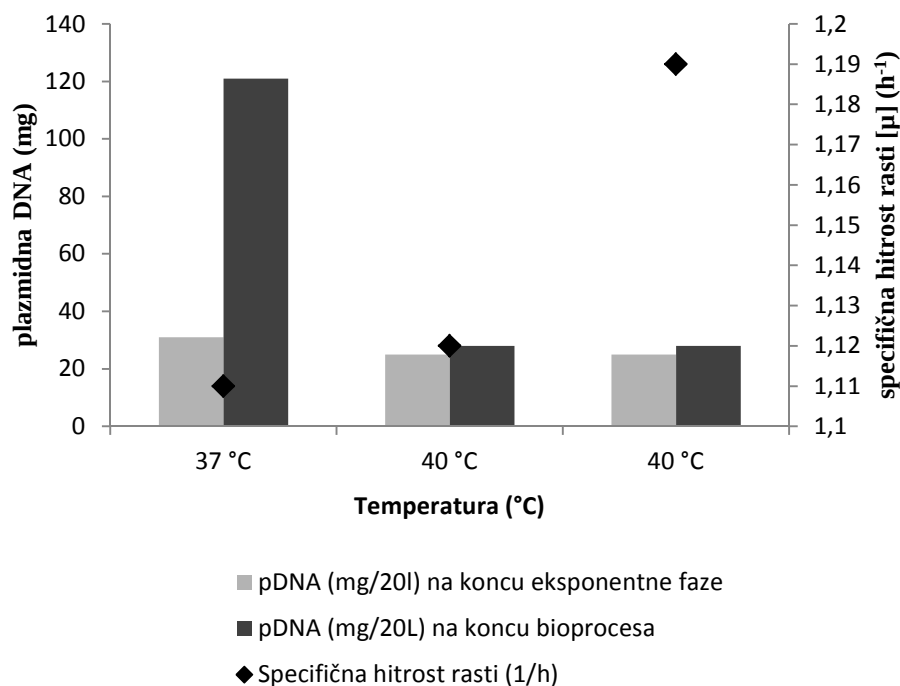
Pri kultivaciji na 37 °C, ko je končna koncentracija celic najmanjša, smo dosegli dokaj visoko koncentracijo plazmidne DNA, v primerjavi s kultivacijo na 40 °C, ko imamo visoke končne gostote celic in najnižjo koncentracijo plazmidne DNA. Najvišje koncentracije le te smo presenetljivo zasledili na koncu bioprocesa z enkratnim polnjenjem, ki smo ga vodili pri temperaturi 28 °C. Tu smo dosegli višjo koncentracijo celic kot pri kultivaciji na 37 °C, ampak nižjo kot pri kultivaciji na 40 °C.



Slika 15: Krivulje rasti za sev bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb, gojen v bioreaktorju, pri različnih pogojih kultivacije.

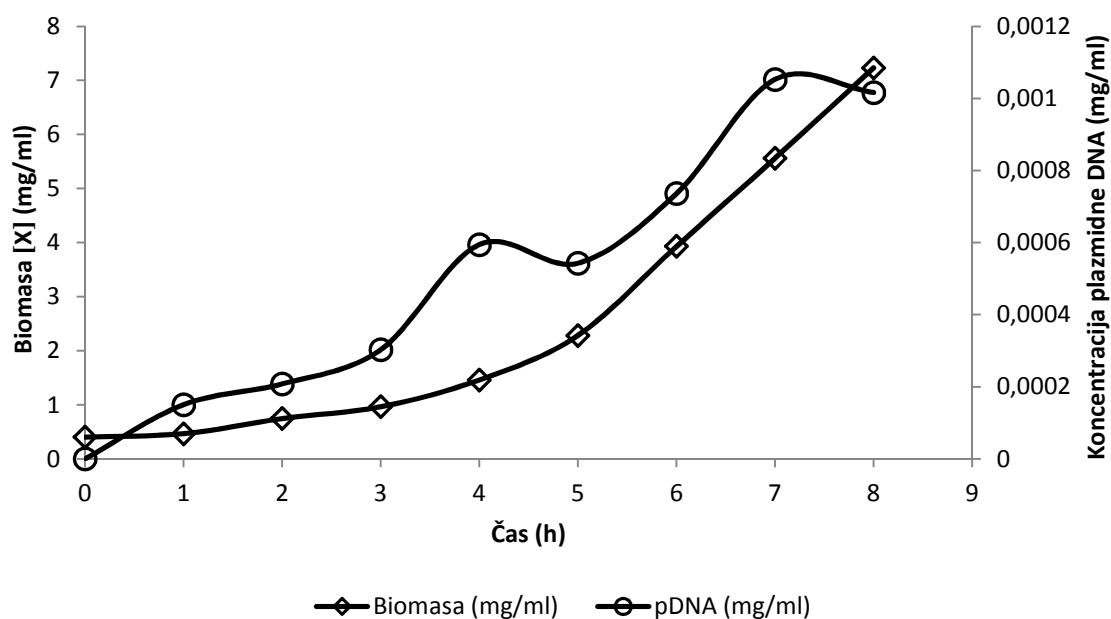
Bioreaktor: gojišče LB-B, 300 vrt./min. *Ke – dohranjevanje z raztopino kvasnega ekstrakta, *Cm – dodatek kloramfenikola v gojišče.

Na sliki 15, ki prikazuje rast kulture s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb, lahko vidimo počasnejšo rast pri temperaturi kultivacije 37 °C. Po preteklih štirih urah kultivacije je kultura pri v primeru gojenja na 40 °C že dosegla stacionarno fazo rasti, medtem ko je pri gojenju na 37 °C ta šele v eksponentni fazi. Kot pa lahko vidimo na sliki 16, smo v primeru kultivacije na 37 °C dosegli večjo končno koncentracijo plazmidne DNA.



Slika 16: Primerjava specifičnih hitrosti rasti in koncentracije plazmidne DNA za šaržni bioproces v bioreaktorju, za sev bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb.

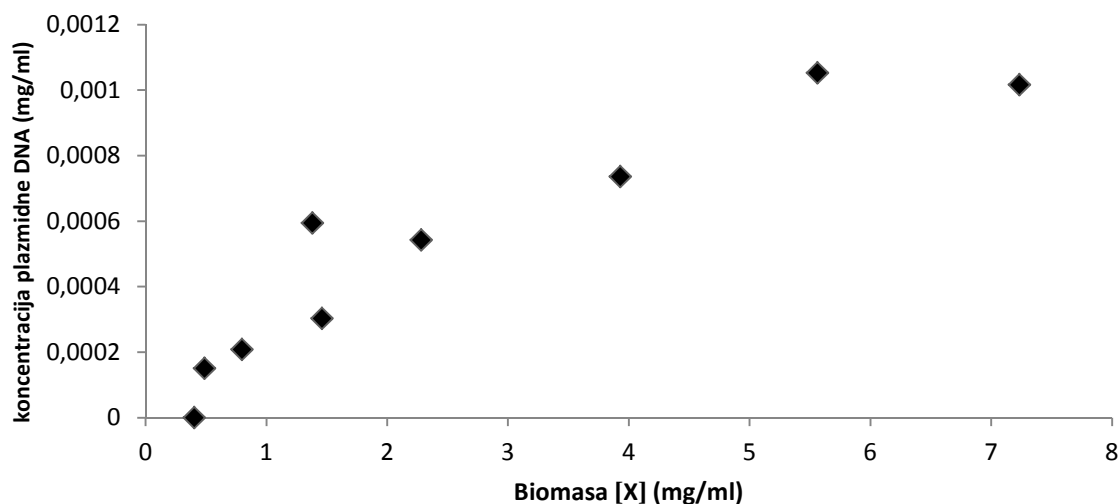
Pri gojenju bakterijskih sevov v bioreaktorju smo dosegali skoraj enkrat višje končne koncentracije biomase, kot pri gojenju na stresalniku. Ravno tako je bila pri temperaturi gojenja 40 °C dosežena višja specifična hitrost rasti v bioreaktorju, kot pa na stresalniku.



Slika 17: Naraščanje koncentracije plazmidne DNA z naraščanjem koncentracije biomase, pri bakterijah *E. coli*, plazmidna DNA YEP13 (10,7 kbp).

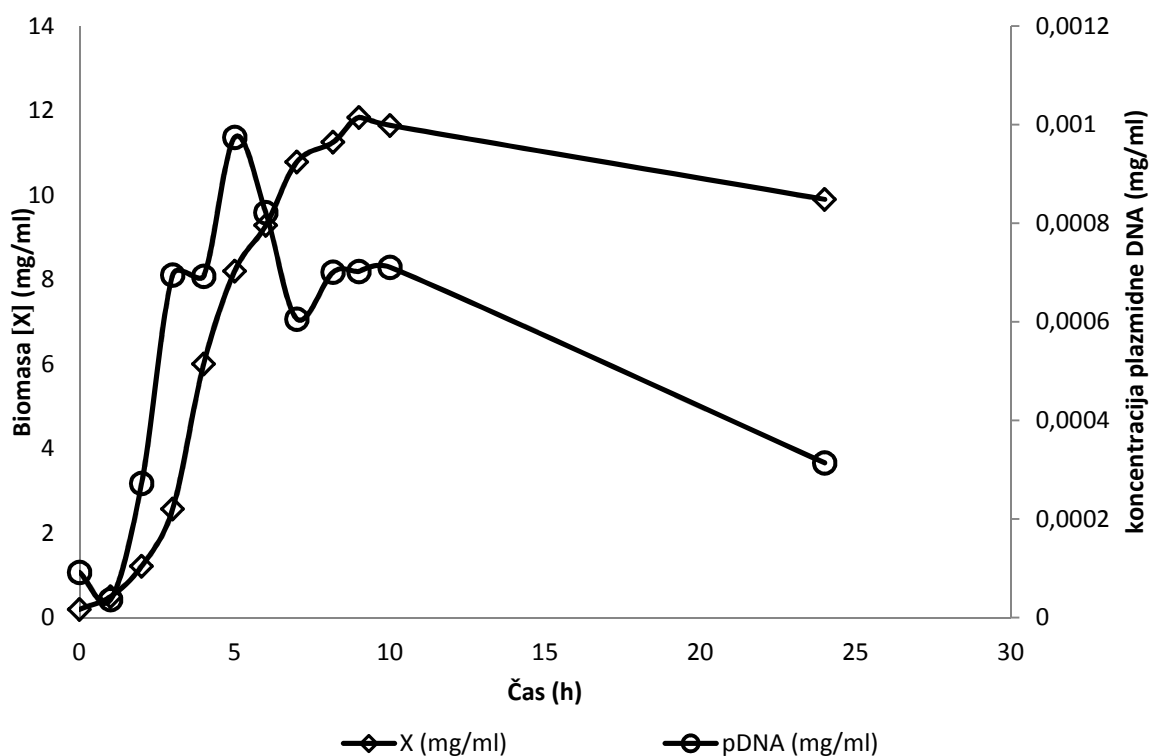
Bioreaktorju: gojišče LB, 28 °C in hitrosti mešanja 350 vrt./min.

S pomočjo rastne krivulje smo tako lahko določili optimalen trenutek za zaustavitev bioprocesa, ter pričetek alkalne lize, da smo dobili najvišjo koncentracijo plazmidne DNA.



Slika 18: Spreminjanje koncentracije plazmidne DNA glede na biomaso, pri bakterijah *E. coli*, za sev DSM4887_2 (10,7 kb).

Bioreaktor: gojišče LB-B, 28 °C in hitrost mešanja 350 vrt./min.

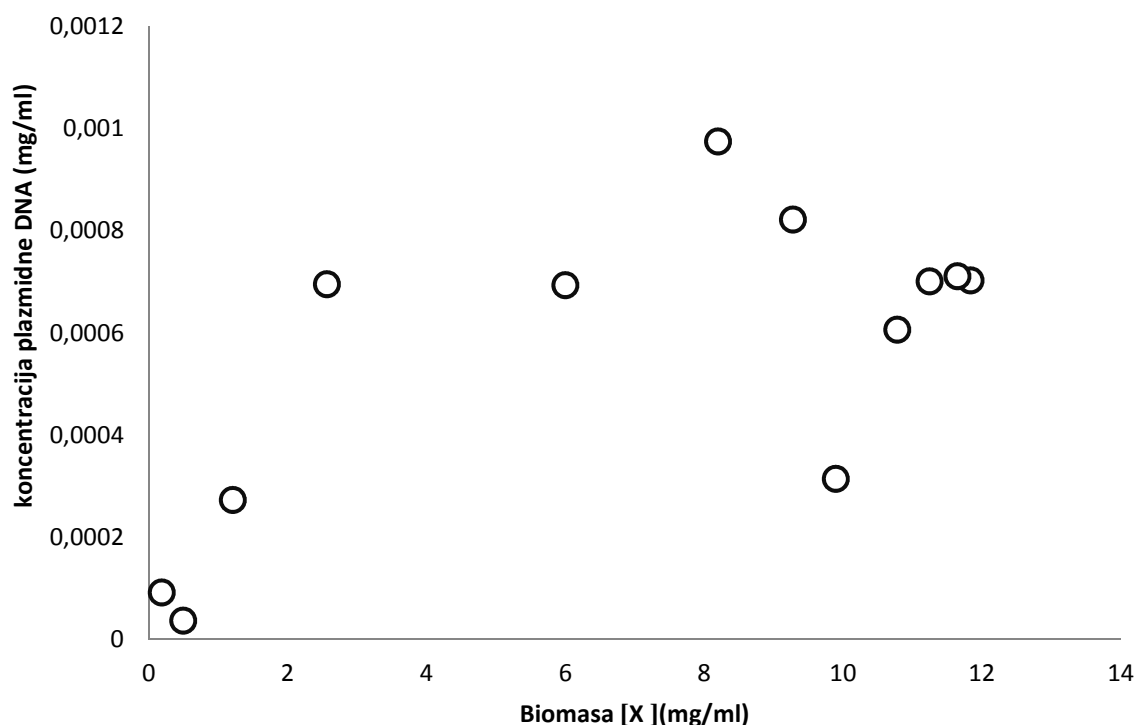


Slika 19: Spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, v primerjavi s spreminjanjem koncentracije biomase, med bioprosesom z enkratnim polnjenjem, v bioreaktorju, z bakterijami *E. coli*, sev DSM8878 (7,1 kb).

Bioreaktor: 37 °C, hitrost mešanja 300 – 400 vrt./min.

Na sliki 19, ki prikazuje spreminjanje koncentracije plazmidne DNA med rastjo seva v bioreaktorskem sistemu, lahko vidimo, da le ta narašča vse do konca eksponentne faze rasti. Med prehodom kulture v stacionarno fazo rasti, pa prične koncentracija plazmidne DNA padati oz. so vrednosti zelo nestabilne, na koncu obratovanja bioprosesa, pa zelo nizke. Za doseganje visokih koncentracij plazmidne DNA, je torej pomembno, da bioproses prekinemo, ko je organizem na koncu eksponentne faze rasti. Če bi bioproses zaključili po petih urah, bi pridobili 19 mg plazmidne DNA na celoten volumen bioreaktorske brozge. Po štiriindvajsetih urah obratovanja, pa smo iz 20 l brozge uspeli izolirati 6,3 mg plazmidne DNA.

Za isti bioproses je spodaj predstavljen graf spreminjanja plazmidne DNA glede na biomaso.



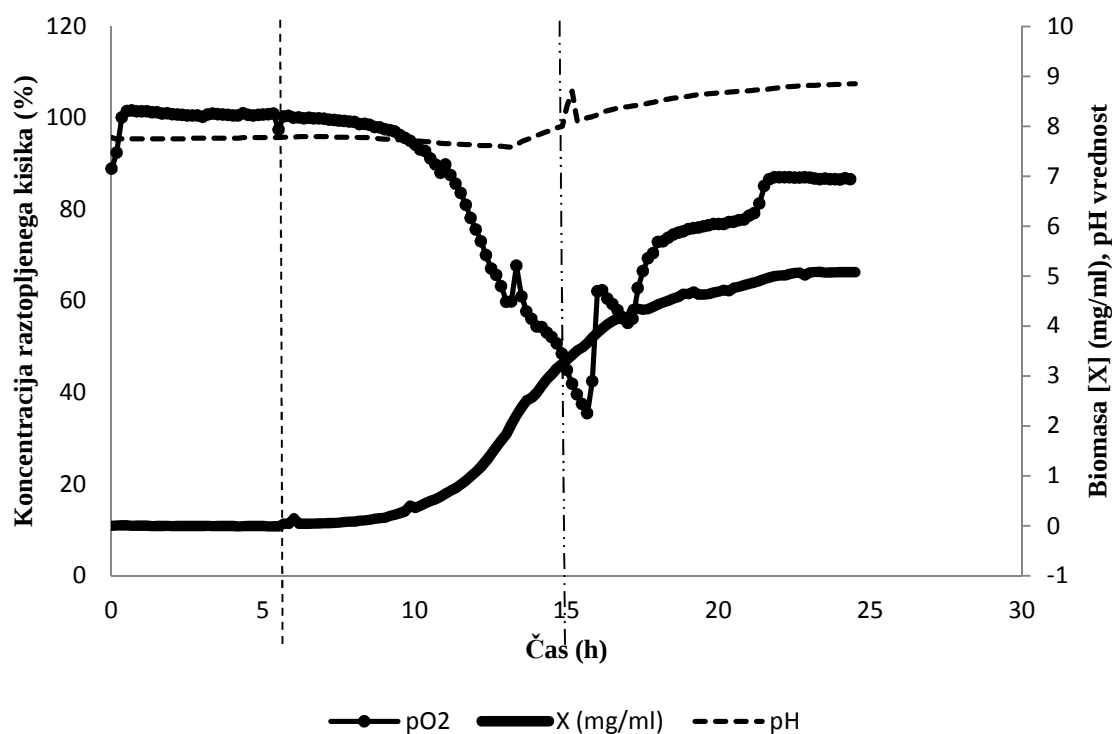
Slika 20: Spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, glede na spreminjanje koncentracije biomase, med bioprocesom z enkratnim polnjenjem, v bioreaktorju, z bakterijami *E. coli*, sev DSM8878 (7,1 kb).

Pogoji obratovanja: Temperatura 37 °C, hitrost mešanja 300 – 400 vrt./min.

Kot je razvidno iz slike 20, smo za najmanjši plazmid pokazali, da se vzporedno z večanjem koncentracije biomase viša tudi koncentracija plazmidne DNA. Ta trend je opaziti vse do konca eksponentne faze rasti. Ko preide enkrat kultura v stacionarno fazo, pa prične koncentracija plazmidne DNA padati. Potrebno je torej določiti primeren trenutek za zaustavitev bioprocesa, da ne pričnemo izgubljati plazmidne DNA. V grobem lahko zaključimo da se nam najbolj izplača bioproces voditi pri 40 °C, saj dosežejo organizmi pri tej temperaturi najvišje specifične hitrosti rasti, ter posledično tudi visoke koncentracije plazmidne DNA v kratkem času. Samo trajanje bioprocesa je v tem primeru najkrajše.

4.2.2 Bioproces z dohranjevanjem substrata

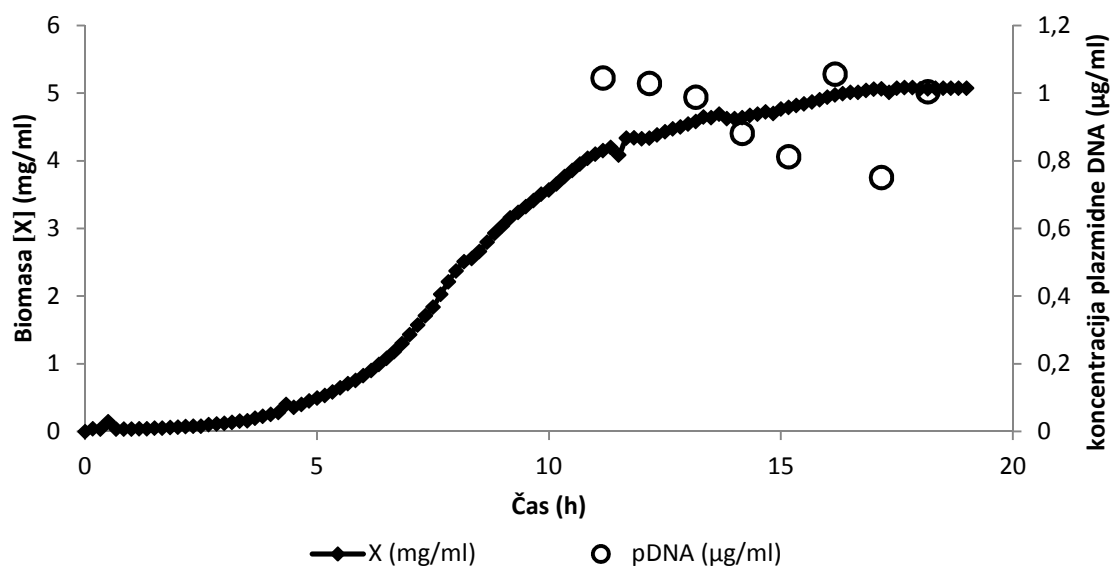
Glede na rezultate dobljene pri kultivaciji kultur na stresalniku smo se odločili, da ponovimo na bioreaktorskem sistemi izvesti tri ločene bioprocese z dohranjevanjem triptona, glukoze ter kvasnega ekstrakta.



Slika 21: Spremljanje bioprocesa z dohranjevanjem triptona na biorektorskem sistemu, pri gojenju z bakterijami *E. coli*, sev DSM4887 (plazmid YEP13; 10,7 kb).

Pogoji kultivacije; Temperatura 28 °C, hitrost mešanja; najprej 100 vrt./min, nato po 5:45 h zvišamo na 350 vrt./min. Navpična črta pri 5:45 h nakazuje čas inokulacije. Navpična črta pri 15:01 h nakazuje čas pričetka napajanja triptona.

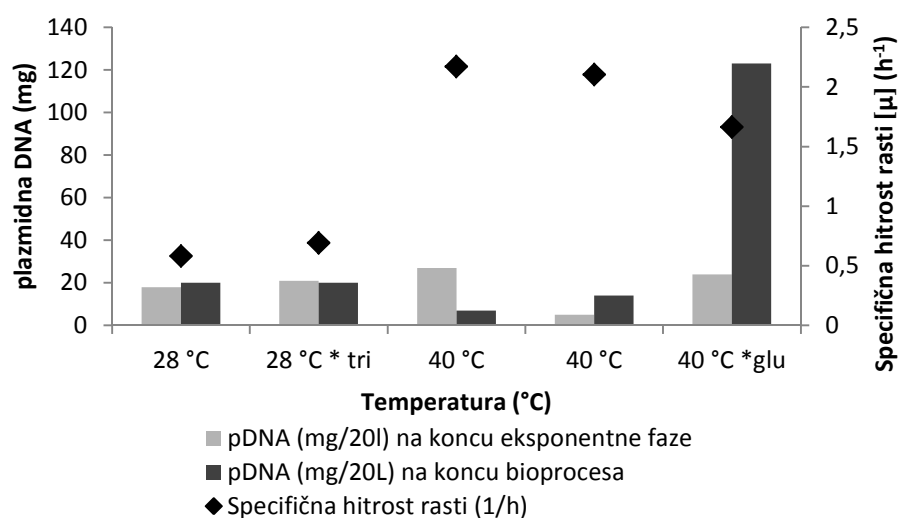
Na sliki 21 lahko vidimo spreminjanje koncentracije kisika, ter pH vrednosti brozge, glede na spreminjanje koncentracije biomase med bioprocesom. Graf, ki nakazuje spreminjanje koncentracije kisika, prične po inokulaciji lepo padati, graf, ki nakazuje pH vrednost pa naraščati, po tem, ko smo pričeli z dohranjevanjem triptona. Bioproces z enkratnim polnjenjem, ki smo ga vodili pod istimi pogoji, smo zaključili po devetih urah rasti, ker smo ocenili, da smo takrat dosegli konec eksponentne faze rasti, ter s tem tudi najvišjo koncentracijo plazmidne DNA. Ker smo pri procesu z dohranjevanjem substrata hoteli podaljšati eksponentno fazo rasti kultur, ter s tem zvišati koncentracijo biomase, ter posledično plazmidne DNA, smo se odločili, da pričnemo z dohranjevanjem po devetih urah od začetka inokulacije. V primerjavi z bioprocesom z enkratnim polnjenjem, ki smo ga vodili za isti sev pod istimi pogoji, smo tu dosegli nekoliko višjo končno koncentracijo biomase, ter specifično hitrost rasti. Za bioproces z enkratnim polnjenjem je ta znašala $0,58 \text{ h}^{-1}$, pri bioprocesu z dohranjevanjem substrata pa $0,69 \text{ h}^{-1}$.



Slika 22: Prirast biomase in spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, pri bioprocesa z dohranjevanjem triptona, pri bakterijah *E. coli*, sev DSM4887 (plazmid YEP13; 10,7 kb).

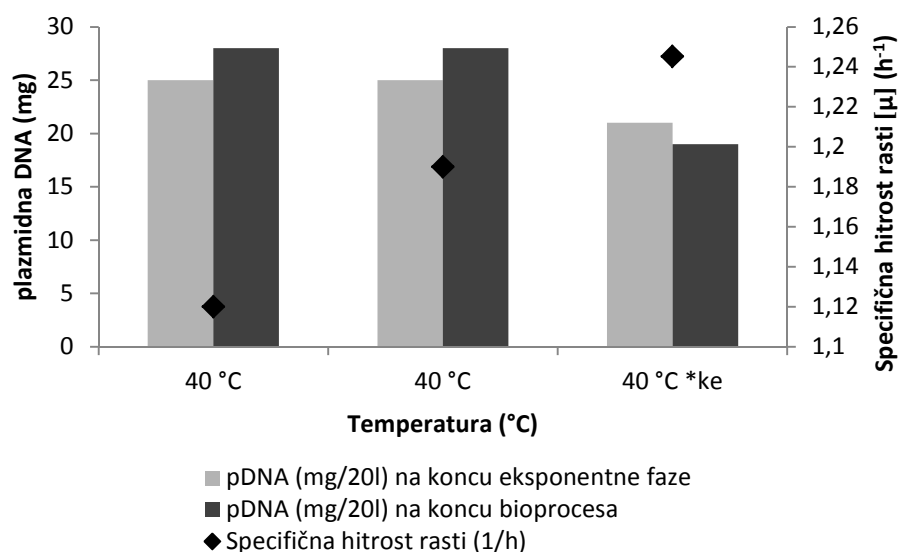
Bioreaktor; gojišče LB-B, Temperatura 28 °C, hitrost mešanja 350 vrt./min.

Na sliki 22 lahko vidimo spreminjanje koncentracije plazmidne DNA po tem, ko smo pričeli z dohranjevanjem s triptonom. Kulturo nam je uspelo obdržati nekoliko dlje v eksponentni fazi rasti, specifična hitrost rasti pa je vedno manjša. Posledično je pričela padati tudi koncentracija plazmidne DNA.



Slika 23: Vpliv temperature na specifično hitrost rasti in koncentracijo plazmidne DNA, pri treh bioprocesih z enkratnim polnjenjem ter dveh bioprocesih z dohranjevanjem, za sev bakterij *E. coli* (YEP13; 10,7kb).

Bioreaktor; gojišče LB-B, hitrost mešanja 350 vrt./min. *tri – dohranjevanje z raztopino triptona, *glu – dohranjevanje z raztopino glukoze.



Slika 24: Primerjava specifičnih hitrosti rasti in koncentracije plazmidne DNA, za dva bioprocesa z enkratnim polnjenjem in bioproc z dohranjevanjem, za sev bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA velikosti 39,4kb.

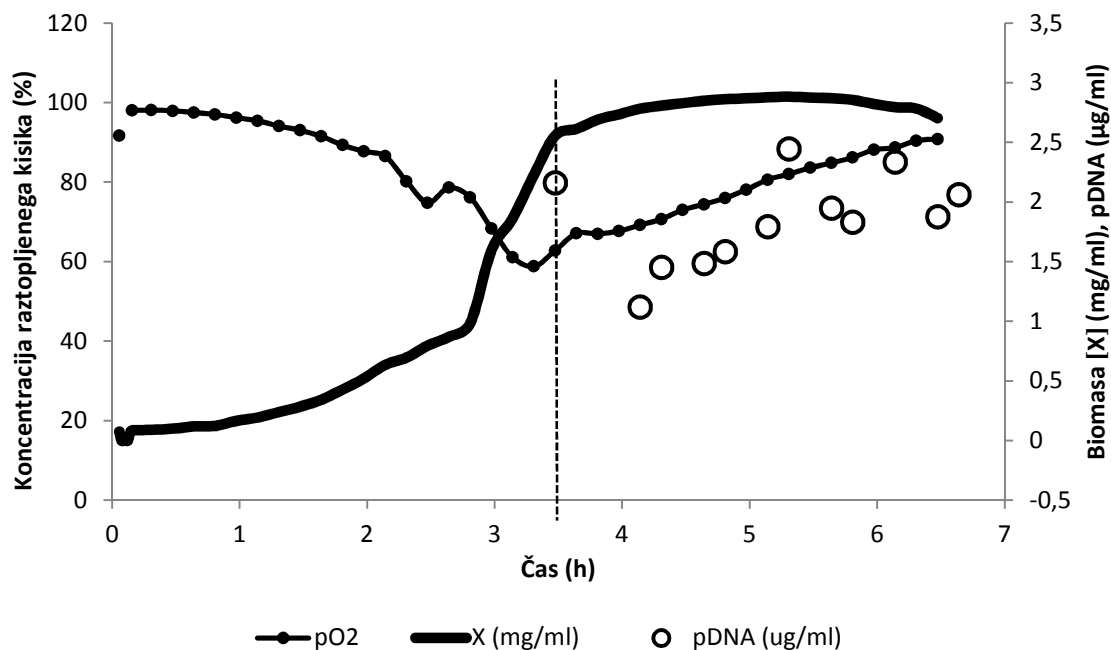
Bioreaktor: gojišče LB-B, 40 °C; *ke – dohranjevanje z raztopino kvasnega ekstrakta.

Pri gojenju seva s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb, smo dobili največje količine le te, v primeru kultivacije na 37 °C. Pri kultivaciji kultur na 40 °C, smo dosegli najvišjo koncentracijo plazmidne DNA že po treh urah. Koncentracija se ob podaljševanju časa kultivacije ni bistveno zviševala, tako da je iz ekonomskega vidika najbolj smotrno zaključiti bioprocés že po treh urah, saj s tem prihranimo veliko stroškov. Kar dvakrat višje koncentracije plazmidne DNA pa smo pri isti temperaturi, dobili v primeru kultivacije seva ob dodatku kloramfenikola. Kot je razvidno iz slike 19, je prišlo do višjih koncentracij plazmidne DNA šele po petih urah kultivacije, ko je kultura pričela že nekoliko odmirati.

4.2.3 Bioprocés z dodatkom kloramfenikola

Pri preizkusu na stresalniku ob dodajanju kloramfenikola v gojišče, smo zabeležili višjo koncentracijo plazmidne DNA, kot v nekaterih preizkusih brez kloramfenikola, zato smo to ponovili še na biorektorskem nivoju. Po približno treh in pol urah rasti kulture pri 40 °C, smo aseptično dodali 100 ml predhodno filtrirane raztopine kloramfenikola, s koncentracijo 34 mg/ml. Po dodatku kloramfenikola je kultura kmalu prešla v stacionarno fazo rasti, ter nato pe eni uri že v fazo odmiranja. To lepo prikazuje tudi graf koncentracije

raztopljenega kisika na sliki 25, ki prične po dodatku kloramfenikola strmo naraščati. Koncentracija plazmidne DNA je kljub odmiranju celic vedno bolj naraščala, ter bila najvišja, ko je celica prehajala v fazo odmiranja. Tudi v primerjavi z ostalimi poskusi gojenja tega seva pod istimi pogoji, smo dobili v primeru dodajanja kloramfenikola h kulturi, za skoraj tretino višje koncentracije plazmidne DNA.

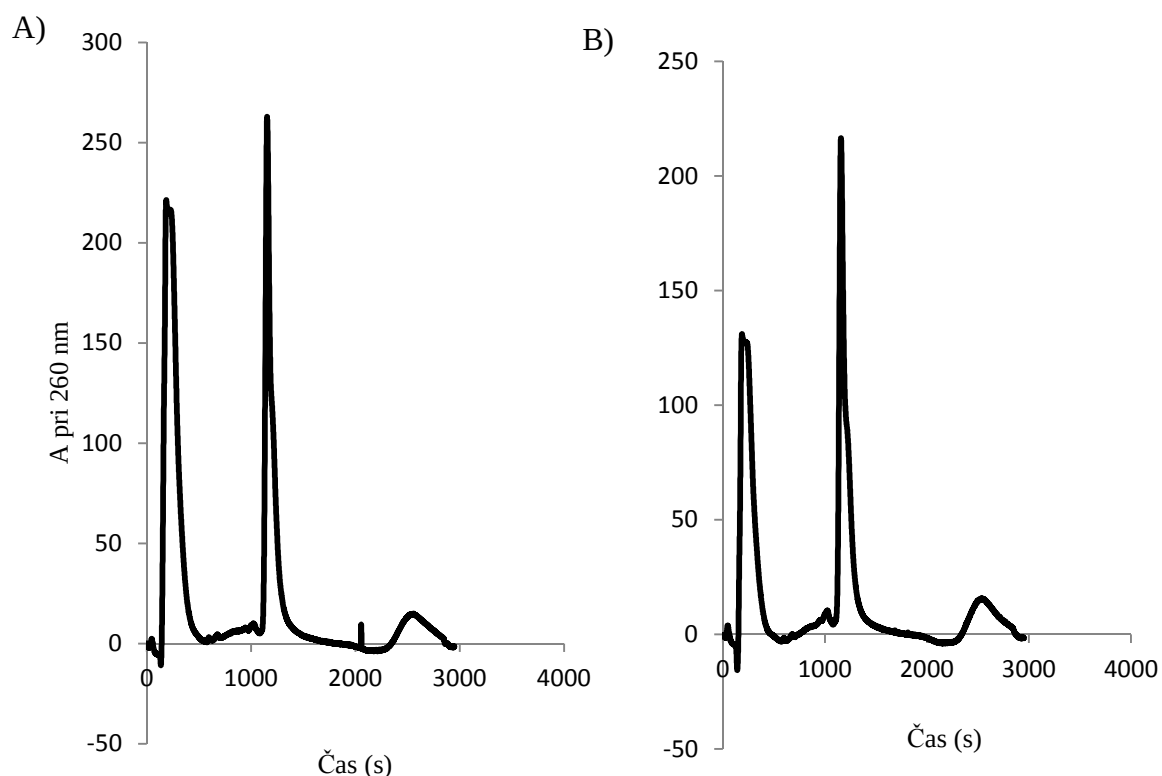


Slika 25: Prirast biomase in spreminjanje koncentracije plazmidne DNA, pri bioproces z dodatkom kloramfenikola v gojišče, za sev bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb.

Bioreaktor: gojišče LB-B, 40 °C; 400 vrt./min. Pravokotna prekinjena črta označuje čas, ko smo dodali kloramfenikol v gojišče.

4.2.4 Izolacija superzvite oblike, s pomočjo HPLC metode

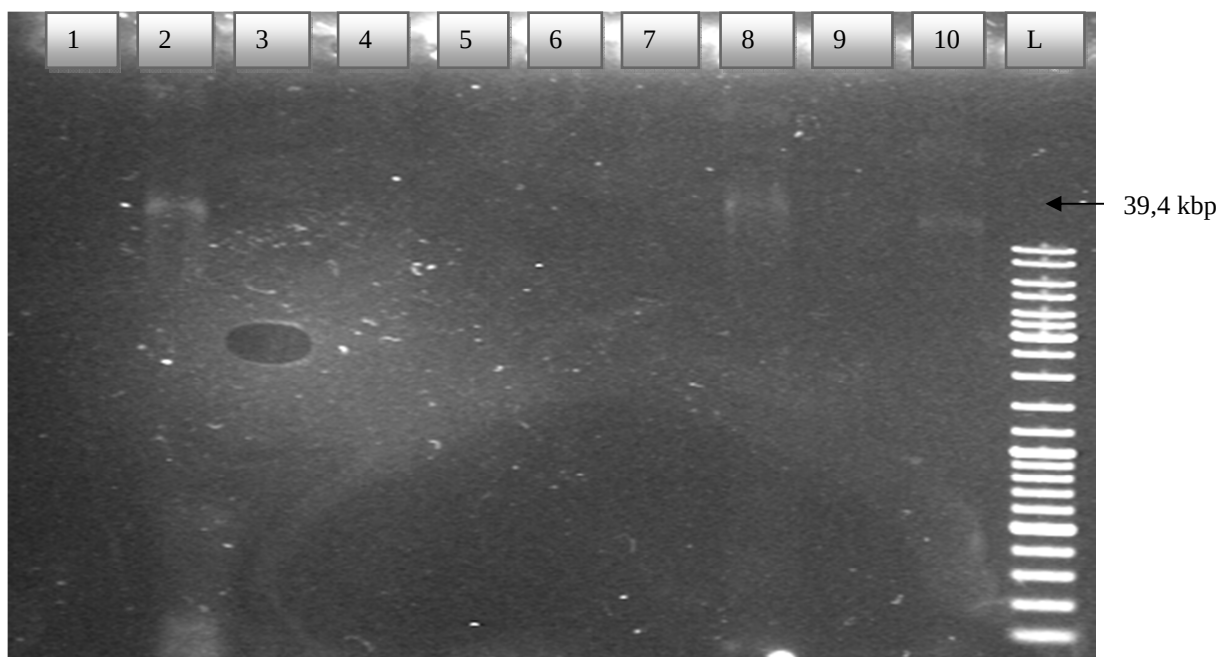
Ob uporabi gradientne HPLC metode za določanje koncentracije plazmidne DNA, je včasih prišlo do večih vrhov, za katere nismo zagotovo vedeli kaj nakazujejo. Da bi dokazali, da vrhovi med retencijskim časom 2 in 3 minut nakazujejo superzvito obliko plazmidne DNA, smo vzorec iz alkalne lize testirali še na 1 % agaroznem gelu.



Slika 26: Dodajanje ribonukleaz k vzorcu lizata seva bakterij *E. coli*, s plazmidno DNA, velikosti 39,4 kb.

A: vzorec z dodano ribonukleazo, B: vzorec brez dodane ribonukleaze.

Po dodatku ribonukleaz k vzorcu lahko na sliki 27 vidimo, da so lise še vedno lepo vidne, tako da lahko potrdimo, da pride pri alkalni lizi in precipitaciji s kalcijevim kloridom do obarjanja RNA molekul in izoliramo v veliki meri plazmidno DNA. Glede na prepotovano razdaljo v gelu lahko določimo tudi, ali pride med izolacijo do poškodb in dobimo na koncu linearno obliko plazmidne DNA, ali pa je ta večinoma v superzviti obliki.

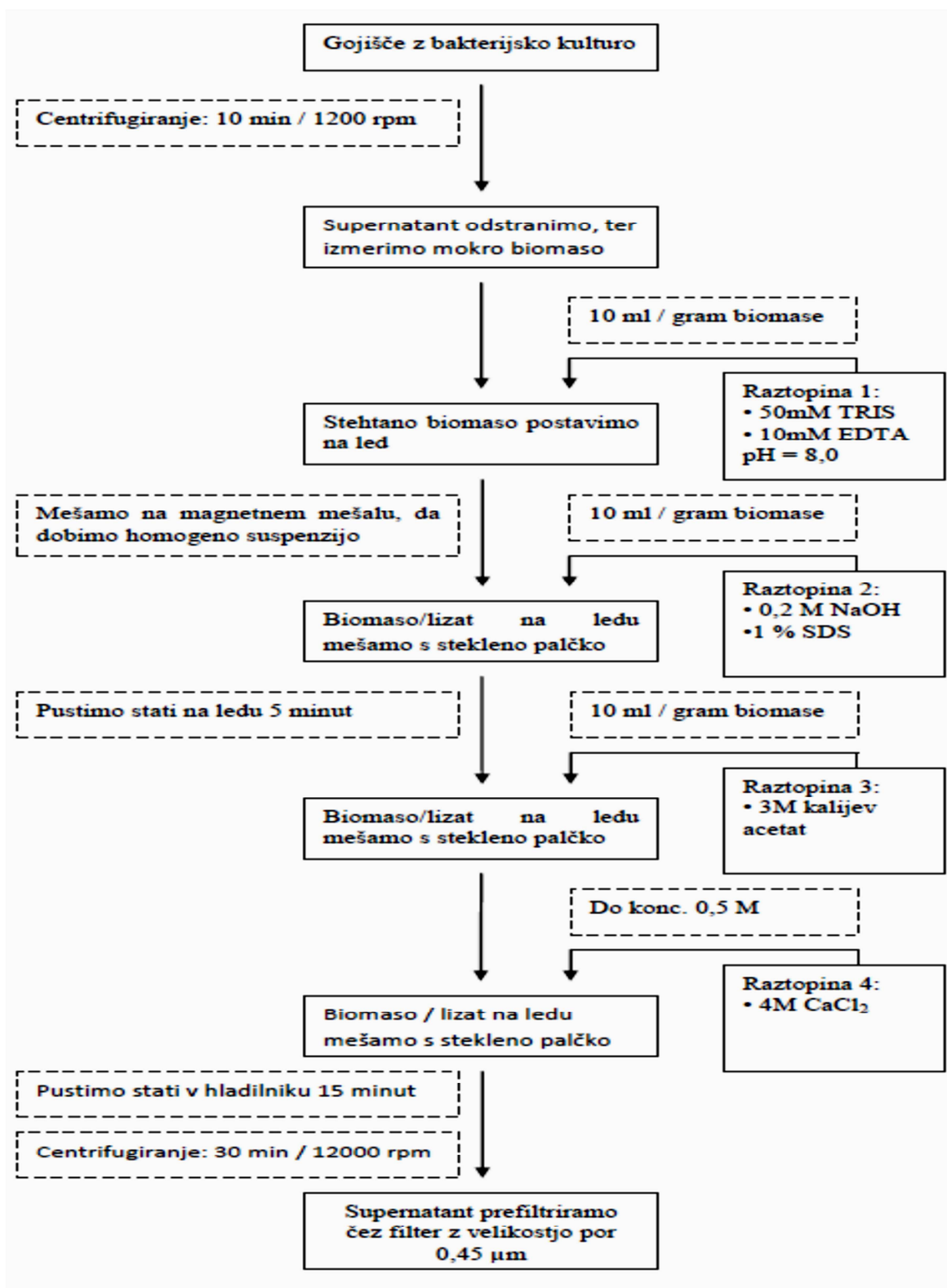


Slika 27: Preverjanje delovanja ribonukleaz na 1 % agaroznem gelu.

L - elektroforezni standard velikosti (1 kb); **S** številkami od 1 do 10 pa so označeni vzorci, ki smo jih nanašali na gel; **1** – plazmid R6K; **2** – eluat (1,5 M sol); **3** – vzorec brez plazmidne DNA; **4** – eluat (0,6 M sol); **5** – DSMZ4245_4 (13:00); **6** – DSMZ4245_4 (12:00); **7** – vzorec brez plazmidne DNA z dodano RNA-zo; **8** – eluat (1,5 M sol) z dodano RNA-zo; **9** – vzorec brez plazmidne DNA z dodano RNA-zo; **10** – eluat (1,5 M sol), z dodano RNA-zo.

4.3 OPTIMIZACIJA POTEKA ALKALNE LIZE

Med postopkom alkalne lize smo optimizirali uporabo kemikalij in čas, ko je bil lizat izpostavljen alkalnim pogojem. Preizkus smo naredili s sevom, ki nosi plazmidno DNA velikosti 39,4 kb. Na spodnji sliki lahko vidimo shemo prirejene metode za izolacijo plazmidne DNA s pomočjo alkalne lize in precipitacije s kalcijevim kloridom, ki so jo uspešno preizkusili že Smrekar in sod. (2010).



Slika 28: Shema predhodno razvite metode alkalne lize (Smrekar in sod., 2010).

4.3.1 Optimizacija uporabe kemikalij pri postopku alkalne lize

Pri postopku alkalne lize smo dodajali različne koncentracije kemikalij k vzorcu, da bi ocenili kako vpliva količina le teh na pridobljeno plazmidno DNA. Po tem, ko smo stehali mokro biomaso vzorca, smo k lizatu dodali različne volumne kemikalij, da smo dosegli želene končne koncentracije le teh v vzorcu.

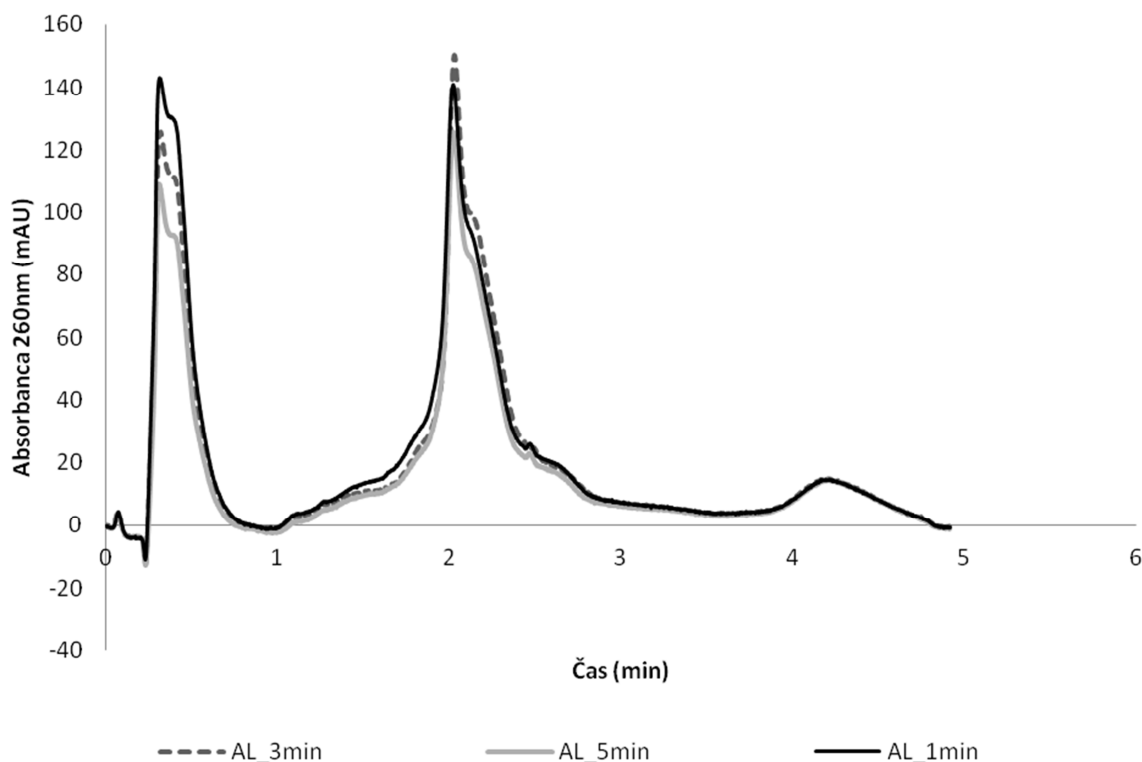
Preglednica 20: Prikaz vpliva količine kemikalij, na koncentracijo plazmidne DNA

Koncentracija kemikalij (ml / g biomase)	Mokra biomasa	Količina kemikalij (ml)	Koncentracija plazmidne DNA (µg/ml)
3	0,2782	0,8346	0,3
5	0,3132	1,566	0,7
7	0,2632	1,8361	0,6
8	0,3674	2,9392	0,9
9	0,3506	3,1554	1,3
11	0,3489	3,8379	0,8

Po predhodno razviti metodi alkalne lize dodamo k lizatu tolikšen volumen kemikalij, da znaša končna koncentracija le teh 10 ml/g biomase. Pri našem preizkusu smo izolirali največ plazmidne DNA v primeru, ko je bila končna koncentracija kemikalij 9 ml/g biomase. Ko smo dodajali k lizatu raztopine v koncentraciji med 3 in 7 ml/g biomase, smo dobili nekoliko nižje koncentracije plazmidne DNA. Glede na rezultate lahko torej sklepamo, da je potrebno ob izolaciji plazmidne DNA dodati kemikalije do končne koncentracije najmanj 8 ml/g biomase. Ni pa potrebno dodajati več kot 10 ml/g biomase, ker smo pri koncentraciji 11 ml/g biomase dosegli nižje vrednosti plazmidne DNA, kot pri 9 ml/g biomase.

4.3.2 Optimizacija časa alkalne lize

Spremljali smo vpliv časa izpostavljenosti lizata alkalnim pogojem, torej časa ko deluje na lizat detergent SDS v alkalni raztopini NaOH.



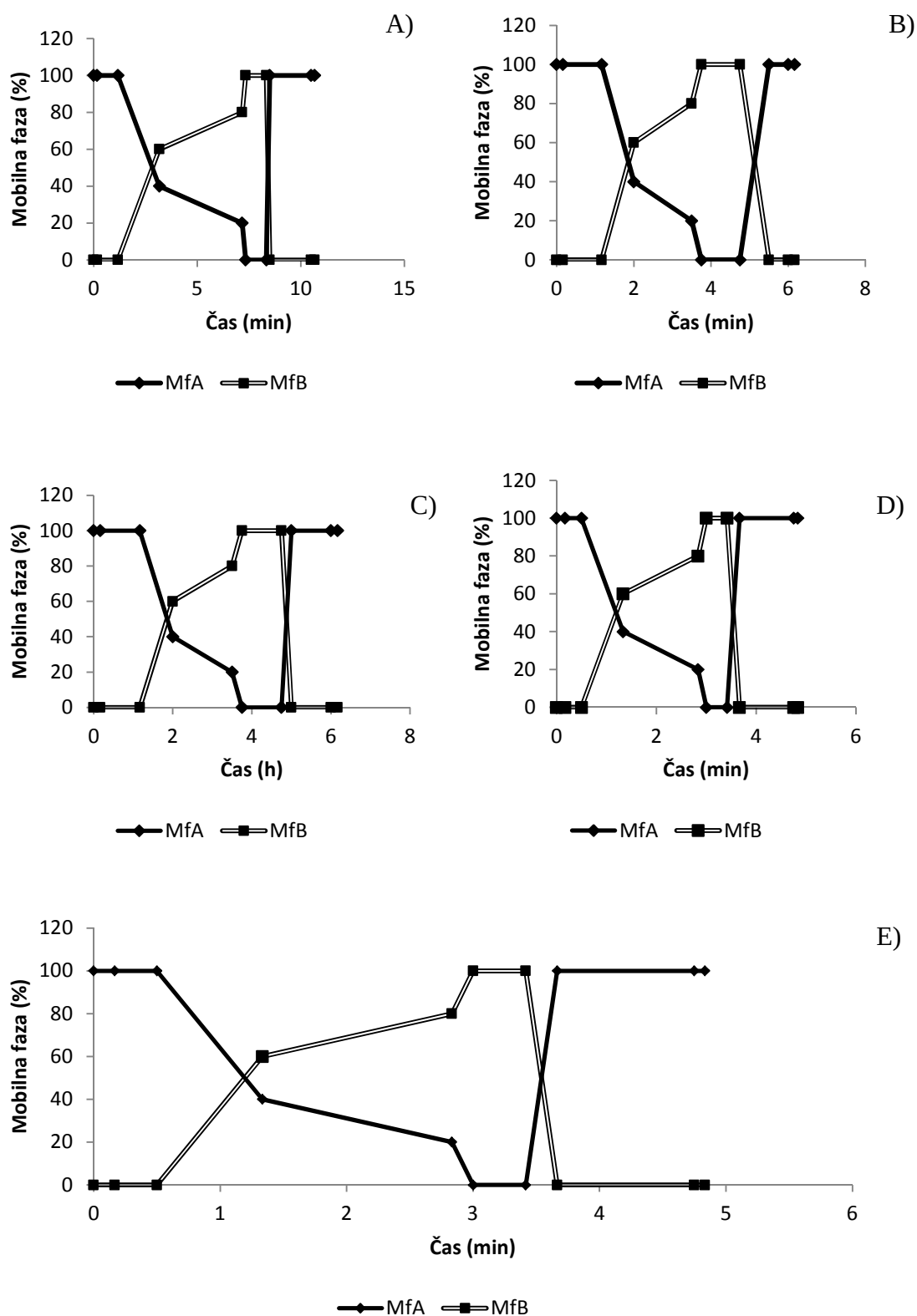
Slika 29: Prikaz vpliva trajanja alkalne lize na koncentracijo pridobljene plazmidne DNA.

*Lizat smo izpostavljali alkalnim pogojem za 5, 3 in 1 minuto.

Pri izpostavitvi vzorca alkalnim pogojem za 3 minute, smo dobili največ plazmidne DNA, najmanj pa v primeru 1 minutne alkalne lize. Poznala se je tudi razlika pri izolaciji, če smo vzorec mešali na vrtinčniku, ali pa s stekleno palčko. Ker so predvsem veliki plazmidi občutljivi na strižne sile, smo tu dobili večje izkoristke pri mešanju s stekleno palčko.

4.4 OPTIMIZACIJA HPLC METODE

Na spodnji sliki so prikazane vse štiri metode, ki smo jih preizkušali, predno smo razvili zadnjo metodo, katero smo naprej uporabljali za določanje količine plazmidne DNA. Zadnjo metodo označuje peti graf.



Slika 30: Prikaz spreminjanja gradienta med med optimizacijo HPLC metode.

MfA: mobilna faza A, MfB: mobilna faza B. Od A do E so prikazane vse metode, do razvoje končne (E).

Pred razvojem končne HPLC metode, s katero smo določali koncentracijo plazmidne DNA v vzorcih, smo preizkusili štiri različne metode, z različnim gradientom mobilnih faz. Čas trajanja metode smo iz prvotnih 10 minut skrajšali na nekaj več kot 4 minute. Vrh, ki nakazuje plazmidno DNA ima pri našem končnem gradientu retencijski čas med 2 in 3 minutama.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Med optimizacijo rasti bakterij *E.coli*, smo sprotno sledili deležu plazmida v celicah pod različnimi pogoji gojenja. Rast bakterij s plazmidno DNA dveh velikosti, ki sta dajale najvišje donose pri preizkusih na stresalniku, smo nato optimirali tudi na bioreaktorskem nivoju. Kot so dokazali že Reinikainen in sod. (1988), lahko vplivamo na število kopij rekombinantnega plazmida znotraj celice, s kontrolo temperature in pH vrednosti fermentacije. Maksimalno število kopij plazmidne DNA med fazo rast celi pa zahtevajo drugačne pogoje fermentacije, kot ti, ki so potrebni za optimalno bakterijsko rast in delitev celic.

Na stresalniku smo primerjali rast petih različnih sevov bakterij *E. coli*, pri treh različnih temperaturah gojenja, in sicer 28 °C, 37 °C ter 40 °C. Skupina Silva in sod. (2009) je namreč pokazala, da dosežejo bakterije te vrste, pri višjih temperaturah kultivacije nižje specifične hitrosti rasti, ter višje koncentracije plazmidne DNA. Pri višjih temperaturah naj bi namreč prišlo do višjega števila kopij le te v celici. Če primerjamo med seboj rezultate gojenja sevov pri istih temperaturah (slika 6), smo tudi mi pri vseh sevih dokazali, da dobimo v primeru, ko imamo nižje specifične hitrosti rasti, večje koncentracije plazmidne DNA na koncu bioprocesa. Do odstopanj je prišlo le pri kultivaciji na 28 °C.

Poleg tega lahko iz podatkov preizkusov na stresalniku, ocenimo tudi vpliv temperature na proizvodnjo plazmidne DNA. Skoraj vsi sevi (z izjemo seva z velikostjo plazmidne DNA 12,6 kb) so dosegli največje koncentracije plazmidne DNA pri temperaturi gojenja 37 °C (slika 5), pričakovano najnižje koncentracije le te pa pri kultivaciji na 28 °C. Skupina Silva in sod. (2009) so prišli do podobnih zaključkov. Pri kultivaciji na 30 °C so prišli do višjih specifičnih hitrosti rasti, ter končnih koncentracij biomase, a nižjih izkoristkov plazmidne DNA, kot pri gojenju na 37 °C in 40 °C. Pri njihovih preizkusih pa dobijo najvišje izkoristke le te pri 40 °C in ne pri 37 °C, kot smo dobili mi. Kot ugotavljajo naprej Silva in sod. (2011) v drugi raziskavi, pride do povišane koncentracije plazmidne DNA pri temperaturah gojenja 37 °C in 40 °C, zaradi lastnosti mesta ORI. Nekateri sevi imajo namreč to mesto spremenjeno tako, da omogoča višje število kopij plazmidne DNA pri temperaturah med 37 °C in 42 °C, ne pa v območju 30 – 32 °C. Pri višjih temperaturah kultivacije so dobili tudi večje koncentracije superzvite oblike le te, v primerjavi s kultivacijami pri temperaturnem območju med 30 in 32 °C.

Pri preizkusih na stresalniku smo tako pokazali, da se z višanjem temperature, pri kateri gojimo sev, povečuje tudi specifična hitrost rasti. Za vse seve smo dokazali, da dosežemo najvišje specifične hitrosti rasti pri temperaturi 40 °C, nekoliko nižje pri 37 °C, najpočasneje pa sevi pričakovano rastejo pri temperaturi 28 °C. Če tako primerjamo kultivaciji pri 37 °C in 40 °C, pa vidim nasproten trend, saj dobimo pri 40 °C nižje koncentracije plazmidne DNA, pri višjih specifičnih hitrostih rasti. Višja kot je bila le ta, višja je bila tudi koncentracija celic, ter koncentracija plazmidne DNA na koncu kultivacije, s čimer smo potrditi našo hipotezo, o naraščanju koncentracije plazmidne DNA, z naraščanjem biomase (slika 6). Rezultati pa se ne skladajo s preizkusi drugih raziskovalnih skupin, zato bi bile tu potrebne dodatne študije. Kot namreč navajajo Mahony in sod. (2007), vsebujejo bakterije pri višjih koncentracijah biomase manj plazmidne DNA na enoto biomase. Pri njihovih preizkusih je prišlo ob razmnoževanju celic, do izgubljanja plazmidne DNA. Kot predpostavljajo Mahony in sod (2007), ter Rozakov in sod. (2006), naj bi imele celice z nižjo specifično hitrostjo rasti dovolj časa za replikacijo plazmidne DNA pred naslednjo delitvijo celic, kar vodi v višje koncentracije le te.

Pri preizkusih na stresalniku smo uspeli dokazati, da dobimo na koncu bioprocesa pri višjih temperaturah gojenja višjo koncentracijo plazmidne DNA. Delno smo uspeli dokazati tudi, da z višanjem specifične hitrosti rasti narašča tudi koncentracija plazmidne DNA. Pri kultivaciji na 28 °C dobimo namreč v primerjavi s kultivacijami pri 37 °C in 40 °C več kot pol manjše koncentracije plazmidne DNA. V primeru gojenja na 40 °C pa smo dosegli višje specifične hitrosti rasti kot v primeru gojenja na 37 °C, ampak presenetljivo nekoliko nižje koncentracije plazmidne DNA (slika 6). Upoštevati pa moramo dejstvo, da smo bioproces pri 40 °C zaključili po 7 urah kultivacije, preden so kulture prešle v stacionarno fazo rasti. Pri kultivacijah na 37 °C in 28 °C pa smo le te podaljšali čez noč in bioproces zaključili, ko so bile kulture v stacionarnem stanju, ker smo preverjali dinamiko rasti. Natančnejše podatke o spreminjanju koncentracije plazmidne DNA med bioprocesom bomo zato podali pri preizkusih v bioreaktorju, ker smo takrat vsako uro stopenjsko jemali vzorce.

Glede na dobljene rezultate pa ne moremo zaključiti, da ima velikost plazmida vpliv na specifično hitrost rasti celic. Predvidevali smo, da bo sev, ki nosi največjo plazmidno DNA (69,7 kb) rastel najpočasneje, saj potrebujejo celice v tem primeru več časa za

podvojevanje plazmidne DNA. Kot je razvidno (slika 2 in slika 3), pa je tako pri 37 °C, kot tudi pri 40 °C, najpočasneje rasel sev, ki nosi najmanjšo plazmidno DNA (7,1 kb). Do podobnih zaključkov so prišli tudi Cai in sod. (2010), ki so za majhne plazmide (velikosti 3-10 kb) pokazali, da sta donos in čistost plazmidne DNA neodvisna od velikosti plazmida in morebitnega gena, ki je v tega vstavljen. Glede na dobljene rezultate lahko tudi mi potrdimo, da velikost plazmida ne vpliva na specifično hitrost rasti celic.

Poleg pogojev bioprocesa, ki smo jih spremljali med našim raziskovalnim delom, pa na proizvodnjo plazmidne DNA vplivajo tudi številni molekularno biološki parametri, ki jih naše raziskave niso zajele. Primerjava naših podatkov z literaturnimi je tako mogoča le v primeru, ko so vsi poizkusi narejeni z istim sevom in isto plazmidno DNA. Kot ugotavljajo številne študije (Summers, 1991; Mahony, 2007), vpliva namreč lahko na višje koncentracije plazmidne DNA že uporaba določenih gostiteljskih sevov, kot naprimer DH5 α , DH1, ali C600, ter spreminjanje lastnosti mesta ORI.

Da bi potrdili našo hipotezo o naraščanju koncentracije plazmidne DNA z naraščanjem koncentracije biomase, smo se glede na rezultate gojenja kultur na stresalniku (razvidni v poglavju 4.1.1.1), odločili za nadaljnjo kultivacijo plazmidov velikosti 10,7 kb in 39,4 kb, naprej v bioreaktorju. Seva ki sta nosila plazmidno DNA te velikosti, sta namreč izkazovala visoke končne koncentracije celic, ter visoke končne koncentracije plazmidne DNA. Po preteklih petih urah gojenja so pričeli vsi sevi dosegati končno gostoto okrog 6 mg/ml, sev s plazmidno DNA velikosti 39,4 kb pa je dosegel na koncu kultivacije najvišje gostote (med 6 in 8 mg/ml). Kot je lepo razvidno po naklonu eksponentne faze, je za ta sev značilna tudi visoka specifična hitrost rasti, iz česar smo nato lahko ugotovili, kako to vpliva na koncentracijo plazmidne DNA.

Na sliki 12 lahko vidimo značilne krivulje za parametre, ki smo jih spremljali med bioprosesom. V zaprtem bioprosesu se mikroorganizmi razmnožujejo do trenutka, ko se pogoji za rast izčrpajo in prične koncentracija biomase padati (Raspor in Smole-Možina, 1993). Ko se začetna hranila porabijo (Mahony in sod. navajajo, da je to po 8 h, v našem primeru gojenja pri 37 °C pa že po 5 h), prične zaradi zmanjšane metabolne aktivnosti, naraščati tudi koncentracija raztopljenega kisika v gojišču, kar je lepo razvidno na grafu, ki nakazuje trend spreminjanja le tega. Skladno s porabo kisika na tem grafu, prične padati tudi krivulja, ki nakazuje pH vrednost (slika 12). Zaradi metabolne aktivnosti bakterijskih

celic pride namreč do zakisanja gojišča, kar je normalen fiziološki pojav, ki se sklada s povišano rastjo kulture.

S spremljanjem raztopljene koncentracije kisika, ter pH vrednosti brozge med bioprosesom, tako lahko sklepamo kaj se med bioprosesom dogaja z organizmom. Pri prvem bioprosesu, kjer smo plazmid gojili največ časa, je zelo lepo razviden trend povečane uporabe kisika po pretečenih šestih urah gojenja. Pojav se lepo sklada s spremembo naklona grafa, ki nakazuje rast biomase, kjer prične kultura rasti počasneje. Najverjetneje pride na tej točki do limitacije s katerim od hranil in prične kultura z uvajanjem druge vrste metabolne poti. Rast se namreč upočasni, potrebe po kisiku pa nenadoma narastejo. Skladno s tem se poviša tudi pH vrednost gojišča (slika 12). Ko pade koncentracija kisika na kritično točko je potrebno zvišati hitrost mešanja, da zagotovimo več raztopljenega kisika v gojišču. To pa lahko naredimo do določene meje, saj se prične ob tem kultura peniti.

Po nekaj urah izvajanja bioprosesa pride do zmanjšane porabe kisika, deloma tudi zaradi izčrpanja vira ogljika. Kot navajajo Sezanov in sod. (2007), se rast ustavi zaradi pomanjkanja uporabnih virov ogljika, ki ga predstavljajo v gojišču Luria-Bertani aminokisline in ne sladkorji. Tudi v primeru uporabe aminokislin kot edinega vira dušika, lahko namreč pride do pojava, ki mu pravimo diavksična rast. D'Ari in sodelavci (2007) so pri raziskovanju rasti bakterij *E. coli* prišli do zaključkov, da pride v zgodnji eksponentni fazi, ko doseže OD 600 vrednost okrog 0,3 do nenadne spremembe v fiziologiji celice in velikost celic se manjša. Podobno sta tudi Wang in Koch (1978) opisala, da izkazujejo bakterije te vrste zelo zgodaj v »eksponentni« fazi rasti na LB gojišču rastne karakteristike, podobne spremembam rasti v diavksični fazi. D'Ari in sod (2007) so nato sklepali, da na ta pojav vpliva dostopnost amino kislin, ki se zlahka uporabijo kot viri ogljika. Ob preučevanju prostih aminokislin v gojišču so prišli do zaključka, da celice bakterij *E. coli* na LB gojišču porabijo kot vir ogljika za rast najprej lažje razgradljive aminokisline, ko teh zmanjka pa preidejo na težje razgradljive. S pojavom diavksične rasti na različni mešanici amino-kislin sta se ukvarjala tudi Kinjo in Nikaido (1961) in ugotovila, da celice kot vir ogljika najprej porabijo aspartat in arginin, serin in cistein, medtem ko se preostale aminokisline (na primer levcin in valin) ne porabijo vse dokler celica ne preide v naslednjo fazo rasti. Kot vemo, pride pri gojenju bakterij *E. coli* v minimalnem gojišču z glukozo do pretvorbe glukoze v acetat in ostale organske kisline. Kasneje v eksponentni fazi rasti pa

celice rastejo primarno zaradi oksidacije teh organskih kislin. Sprememba v viru ogljika, je tako verjetno neizogibna komplikacija pri šaržni kultivaciji.

Kot smo dokazali že pri preizkusih na stresalniku in kot to potrjujejo tudi skupina Brand in sod. (2012), je za učinkovito proizvodnjo plazmidne DNA potrebna visoka končna koncentracija celic. V nasprotju pa skupina Mahony in sod. (2007) ugotavlja, da v primeru proizvodnje plazmidne DNA na celičnem nivoju potrebujemo le proces DNA replikacije in ne tudi transkripcije in translacije, kot pri proizvodnji proteinskih produktov. Posledično ne moremo zagotoviti visokih titrov produkta le s proizvodnjo visokih količin biomase. V poglavju 4.2.1 so predstavljeni rezultati bioprocsov z enkratnim polnjenjem v bioreaktorju (preglednica 18), kjer lahko vidimo vpliv koncentracije celic na koncentracijo plazmidne DNA. Pri preizkusih s plazmidno DNA velikosti 10,7 kb, smo delno potrdili ugotovitev skupine Mahony in sod. (2007), saj smo v primeru, ko smo pri 40 °C dosegli najvišje koncentracije biomase, istočasno izolirali najmanjšo koncentracijo plazmidne DNA. Največ plazmidne DNA smo presenetljivo izolirali na koncu bioprocesa pri 28 °C, ko imamo za skoraj tretjino nižjo koncentracijo celic.

Tudi v primeru kultivacij v bioreaktorju pa smo, tako za plazmidno DNA velikosti 10,7 kbp, kot tudi za 39,4 kb, potrdili korelacijo med padanjem koncentracije plazmidne DNA, z naraščanjem specifične hitrosti rasti. Skupina Mahony in sod. (2007) to povezujejo z dejstvom, da imajo bakterije z nižjo specifično hitrostjo rasti dovolj časa za podvojevanje plazmidov pred vsako delitvijo celic. Helmstetter in Cooper (1968), pa sta prišla do ugotovitve, da se prične replikacija DNA v katerikoli fazi rasti celice in je odvisna od specifične hitrosti rasti celice. Čas v katerem se odvije celoten cikel replikacije pa je konstanten in ni odvisen od tega, v kateri stopnji rasti je mikroorganizem. Predvidevajo le, da se pri hitro rastočih bakterijah *E. coli* prične nov krog replikacije pred tem, ko se prejšnji uspe zaključiti.

S stopenjskim vzorčenjem smo lahko določili stabilnost koncentracije plazmidne DNA med stacionarno fazo rasti mikroorganizma. Med enournim intervalnim vzorčenjem smo prišli do ugotovitev, da je največja koncentracija plazmidne DNA ob koncu eksponentne faze rasti, oz. na prehodu v stacionarno fazo. Med samo stacionarno fazo se količina nekoliko ohranja in prične nato na sredini stacionarne faze nekoliko padati. Kot navaja Quaak (2009), naj bi večino plazmidne DNA celice proizvedle med fazo reducirajoče rasti. Ko se nivo rasti upočasni, je namreč celična metabolna aktivnost navadno nižja, kar

pomeni več dostopnih hranil in energije za plazmidno replikacijo. Pri kultivaciji na stresalniku in bioprocesu z enkratnim polnjenjem imajo mikroorganizmi omejeno dobavo hranil, zaradi česar dobimo na koncu bioprocesa nižjo vsebnost superzvite oblike plazmidne DNA, če le tega vodimo predolgo.

Na sliki 22, ki prikazuje spreminjanje koncentracije biomase in plazmidne DNA med gojenjem seva pri 28 °C, pa lahko vidimo, da doseže sev v našem primeru najvišjo koncentracijo plazmidne DNA po sedmih urah gojenja, ko je kultura na koncu eksponentne faze rasti. Rezultat se sklada s simulacijo, kjer smo predpostavili, da dosežemo pri tej temperaturi gojenja najvišjo koncentracijo plazmidne DNA po približno šestih urah gojenja. Na sliki 19 lahko nato naprej vidimo obnašanje seva s plazmidno DNA velikosti 7,1 kb, ki doseže najvišjo koncentracijo le te po približno šestih urah gojenja. To pa se ne sklada z našo simulacijo, kjer smo predpostavili, da se pri 37 °C dosežejo najvišje koncentracije plazmidne DNA že po približno treh urah kultivacije. Za natančnejšo potrditev bi bili potrebni dodatni preizkusi, saj smo simulacijo delali le s pomočjo seva, ki je nosil plazmidno DNA velikosti 10,7 kb, zato je tu mogoče prišlo do takega odstopanja.

Pri šaržnem načinu obratovanja bioprocesa smo tako dokazali, da dosežemo najvišje koncentracije plazmidne DNA, ko je kultura v pozni eksponentni fazi rasti. Ker lahko s pomočjo dohranjevanja kulture z različnimi hranili vplivamo na podaljšanje eksponentne faze rasti, lahko predpostavljamo, da s tem načinom kultivacije pridobimo višje koncentracije plazmidne DNA. Vprašanje je, s katerim hranilom dohranjevati, da bi dosegli višje koncentracije le te.

Pri rezultatih gojenja na stresalniku, pri temperaturah kultivacije 28 °C in 37 °C (poglavje 4.1.1.2) smo prišli do zaključka, da vpliva na končno koncentracijo plazmidne DNA velikosti 10,7 kb, dodatek triptofana, ter kvasnega ekstrakta v gojišče. Dodatek glukoze pa nima nobenega vpliva, saj je končna koncentracija enaka kot v primeru, ko v gojišče nismo dodajali nobenih hranil. Pri preizkusu na biorektorskem sistemu, smo tako izvedli šaržni sistem z dohranjevanjem triptona, pri temperaturi 28 °C. V primeru kultivacije na stresalniku pri 40 °C, pa smo dobili ravno obratne rezultate, saj je v veliki večini višja končna koncentracija plazmida dosežena v primeru, ko smo kulturo dohranjevali z glukozo. Tudi skupina Silva in sod. (2009), je dosegla najboljše rezultate ob uporabi nižjih koncentracij triptona. Uporaba triptona kot vira aminokislin, namreč poviša število molekul plazmidne DNA znotraj celice, s čimer dosežemo tudi višji specifični donos le te.

Pri poskusih na bioreaktorju smo uspeli potrditi hipotezo, da dosežemo pri bioprocusu z dohranjevanjem substrata nekoliko višjo koncentracijo plazmida na liter gojišča kot pri bioprocusu z enkratnim polnjenjem. Glede na to, da so bile razlike zelo majhne, bi bilo smiselno narediti dodatne preizkuse. Dodatne raziskave so potrebne predvsem pri odkrivanju primernega trenutka za zaustavitev bioprocusa, ko dosežemo najvišje koncentracije plazmidne DNA, da ne izgublamo le te z morebitnim nadaljnjim podaljševanjem bioprocusa.

Cai in sod. (2010) ugotavljajo še, da dobimo pri bioprocusu z enkratnim polnjenjem, glede na kratek čas le tega, višje koncentracije superzvite oblike plazmidne DNA v primerjavi s kontinuirnim obratovanjem in dohranjevanjem. Izolacijo plazmidne DNA smo izvajali po prilagojenem postopku, ki so ga uporabili skupina Smrekar in sod. (2009) in zagotavlja izolacijo plazmidne DNA pretežno v superzviti obliki. Iz dobljenih rezultatov pa ne moremo sklepati, da dobimo pri šaržni kultivaciji višje koncentracije le te v primerjavi z bioprocusi z dohranjevanjem substrata. Da bi to potrdili bi bili smiselni nadaljnji poiskusi z uporabo analitskih kolon, ki omogočajo učinkovito ločevanje različnih oblik plazmidne DNA.

V literaturi smo naleteli na še en zanimiv pristop k zviševanju koncentracije plazmidne DNA znotraj celice, ter ga preizkusili tako na stresalniku, kot tudi na biorektorskem nivoju. Kot navaja Clewell (1972), lahko z dodatkom kloramfenikola k celicam, ki so v eksponentni fazi rasti, dosežemo visoke titre plazmidne DNA na koncu bioprocusa. Dodatek kloramfenikola namreč povzroči inhibicijo sinteze proteinov, ki so pomembni za iniciacijo replikacije kromosomske DNA, medtem, ko se plazmidna DNA sintetizira naprej. Pri njegovem poizkusu se je po dveh do štirih urah od dodatka kloramfenikola v gojišče, plazmidna DNA replicirala približno osem krat bolj intenzivno, kot pod normalnimi pogoji. Replikacija se je nadaljevala še 10 do 15 ur po dodatku kloramfenikola, med tem časom pa je število plazmidov na celico zrastle za okrog 125-krat. V našem primeru kultivacije na stresalniku so pričele celice po dodatku kloramfenikola zelo hitro prehajati v stacionarno fazo rasti. Na koncu bioprocusa smo pri vseh sevih zabeležili nižje koncentracije plazmidne DNA, kot v primeru kultivacije pri istih pogojih, a brez dodatka antibiotika. Ker pa smo kulture na stresalniku pustili rasti preko noči in vzorčili kulturo za izolacijo plazmidne DNA ko so celice že odmrle (slika 7),

pa smo se odločili poskus ponoviti še v bioreaktorju, saj tam lahko spremljamo nihanje koncentracije plazmidne DNA skladno z dodatkom kloramfenikola.

V literaturi navajajo, da pride ob dodatku kloramfenikola do prenehanja rasti populacije bakterij *E. coli*, po določenem prilagoditvenem obdobju pa prične koncentracija plazmidne DNA eksponentno naraščati. Število kopij plazmidne DNA se poveša v primerjavi z genomsko DNA za skoraj pet krat (Silva in sod., 2009; Reinkeinen, 1988). Tudi v našem primeru kultivacije kulture s plazmidno DNA velikosti 39,4 kp v bioreaktorju (slika 25), lahko vidimo da pride po tem, ko smo dodali kloramfenikol v gojišče do odmiranja celic. Koncentracija plazmidne DNA pa prične naraščati in je najvišja po dveh urah od dodatka kloramfenikola v gojišče. Po treh urah smo se odločili proces prekiniti, saj koncentracija plazmidne DNA ni naraščala več. Glede na rezultate preizkusa na stresalniku bi s podaljševanjem kultivacije kultura prešla v fazo odmiranja, s čimer bi pričela padati tudi koncentracija plazmidne DNA. Če primerjamo rezultate kultivacije v bioreaktorju za isti sev, pri isti temperaturi (preglednica 18), vidimo, da smo z dodatkom kloramfenikola izolirali za skoraj tretjino več plazmidne DNA.

V prihodnje bo ključna tudi količina uporabe kemikalij, ki so potrebne za izolacijo plazmidne DNA. Številne študije, ki se ukvarjajo s tem vprašanjem, so predpostavile, da dosežemo isto čistost končnega produkta ob uporabi nižje količine reagentov, kot so navedeni v metodi izolacije plazmidne DNA z alkalno lizo, ki sta jo razvila Birnboim in Doly (1979). Posledično smo se lotili postopka alkalne lize s šestimi različnimi koncentracijami reagentov, ter prišli do zaključka, da je za uspešno izolacijo dovolj že, če uporabimo kemikalije do končne koncentracije najmanj 8 ml/g biomase (in ne 10 ml/g, kot predpostavlja metoda). S tem pristopom nekoliko zmanjšamo uporabo kemikalij in izoliramo plazmidno DNA enake kakovosti. Tudi skupina Bo in sod. (2007), so prišli do podobnih zaključkov, da donos pDNA ne narašča več, tudi če dodamo višje razmerje kemikalije:biomasa, od 11:1. Poleg tega so ugotovili še, da lahko znižamo tudi koncentracijo uporabljenega CaCl_2 na 0,13 M, ter pri tem dobimo sprejemljiv delež plazmidne DNA (>90 %) in odstranimo >89 % RNA molekul. Količino reagentov potrebnih za alkalno lizo in precipitacijo lahko tako zmanjšamo, brez da bi vplivali na donos super zvite oblike plazmidne DNA, s tem pa izboljšamo ekonomijo procesa, ter znižamo okoljski vtis le tega.

Poleg uporabe kemikalij pa smo optimizirali tudi čas, ko je bil lizat izpostavljen alkalnim pogojem. Največ plazmidne DNA smo izolirali v primeru, ko smo vzorec izpostavili alkalnim pogojem za tri minute (slika 29). Podoben poizkus so za plazmidno DNA enake velikosti izvedli tudi skupina Lendero – Krajnc in sod. (2009), ter prišli do zaključka, da dobimo največ plazmidne DNA, če izpostavimo lizat alkalnim pogojem za krajši čas (1 in 3 minute), kot ga navaja metoda (5 minut). V njihovem primeru so uporabljali tri različne koncentracije NaOH (0,05, 0,075 in 0,1 M), ter dosegli najvišje koncentracije plazmidne DNA pri najvišji koncentraciji NaOH, to je 0,1 M. Kot navajajo Levi in sod. (2000), so večji plazmidi občutljivi tudi na strižne sile, ki so jim izpostavljeni med procesom izolacije. V našem primeru smo tako zasledili večje izkoristke plazmidne DNA, v primeru ko smo lizat med izolacijo mešali s stekleno palčko, namesto na vrtinčniku kot to predpostavlja metoda.

Učinkovitost izolacije plazmidne DNA s pomočjo prilagojene metode alkalne lize, smo na koncu preverili s pomočjo anionsko-izmenjevalne kromatografije, ob uporabi CIM monolitnih diskov. Glede na podatke v literaturi (Smrekar in sod. 2010), smo ustrezno prilagodili tudi HPLC metodo (slika 30). Pri našem delu smo uporabljali HPLC metodo z namenom analize velikega števila vzorcev izoliranih med bioprocesom, tako da smo metodo ustrezno skrajšali iz prvotnih desetih, na končne štiri minute. Med dvema in tremi minutami smo dobili značilen vrh, ki nakazuje koncentracijo plazmidne DNA. Ker smo predvidevali, da bi vrh lahko nakazoval tudi RNA, smo vsebnost le te v eluatu preverili še s pomočjo gelske elektroforeze. Z gelsko elektroforezo lahko ločimo in čistimo fragmente DNA ali RNA, ter proteine. Agarozna gelska elektroforeza se navadno uporablja za ločevanje DNA molekul različnih velikosti, kot recimo genomske in plazmidne DNA (Clark, 2010). Glede na položaj lis (slika 27) lahko sklepamo, da smo s pomočjo precipitacije s kalcijevim kloridom uspešno odstranili RNA in izolirali plazmidno DNA v super zviti obliki. Če bi prišlo do razgradnje plazmidne DNA, bi to na gelu opazili kot lise manjših velikosti kot je bil velik naš plazmid (39,4 kb). Prav tako bi na gelu opazili tudi prisotnost RNA molekul v dveh očiščenih vzorcih, ki smo jim pred nanosom na gel dodali encim ribonukleazo. Pri teh dveh vzorcih smo tako dokazali da nakazuje značilna lisa ki se pojavi na gelu, plazmidno DNA velikosti 39,4 kb in, da ne gre za RNA molekule.

5.1 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo naslednje:

- Uspeli smo potrditi hipotezo, da z naraščanjem koncentracije biomase narašča tudi koncentracija plazmidne DNA.
- Potrdili smo hipotezo, da je specifična hitrost rasti bakterij *E. coli*, tako v bioprocesu z enkratnim polnjenjem, kot v bioprocesu z dohranjevanjem odvisna od temperature kultivacije. V bioreaktorju smo z optimalnimi pogoji dosegli visoke končne koncentracije kulture, ter visok donos plazmidne DNA.
- Pokazali smo, da dobimo pri procesu z dohranjevanjem višje končne koncentracije plazmidne DNA.
- Potrdili smo hipotezo, da dodatek kloramfenikola v gojišče vpliva na povišanje koncentracije plazmidne DNA, vendar le, če pravočasno zaključimo bioproces.
- S pomočjo kromatografije in gelske elektroforeze smo potrdili, da izoliramo s prilagojeno metodo alkalne lize in precipitacije s kalcijevim kloridom plazmidno DNA pretežno v superzviti obliki.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Na področju medicine in molekularne biologije se vedno bolj uveljavljajo terapevtske učinkovine, ki temeljijo na plazmidnih DNA molekulah. Uporabljajo se kot orodja za proizvodnjo rekombinantnih proteinov ter kot terapevtska sredstva na področju genske terapije in DNA cepiv. Pri kliničnih preizkusih na področju genskega zdravljenja se kažejo potrebe po vedno večjih količinah visoko kakovostne plazmidne DNA, ki se uporablja kot vektorska molekula. Če je proizvodnja plazmidne DNA velikosti do 15 kbp že dobro preučena, pa je malo podatkov o pripravi večjih plazmidov čeprav potreba po njih narašča. Zato smo odločili optimirati na biorektorskem nivoju bioprocasa s plazmidno DNA velikosti 39,4 kbp, kar pa zahteva tudi določene prilagoditve pogojev bioprocesa in postopkov čiščenja. Visoke končne koncentracije celic so predpogoj za učinkovito proizvodnjo visoko kakovostnih plazmidnih DNA molekul, zato smo najprej optimizirali procesne parametre, ki vplivajo na gojenje celic. Kot gostiteljski organizem smo uporabili bakterije vrste *Escherichia coli*, potomke seva *E. coli* K-12, ki je bil odobren s strani FDA in se tako uporablja v postopkih proizvodnje plazmidne DNA pod GMP pogoji. Kulture s petimi različnimi velikostmi plazmidne DNA smo najprej gojili na stresalniku v erlenmajericah s stransko roko, s pomočjo katerih smo lahko spremljali optično gostoto celic. Uspeli smo pokazati, da koncentracija plazmidne DNA narašča skladno z naraščanjem koncentracije biomase. Najvišje koncentracije plazmidne DNA smo dosegli v primeru kultivacije na 40 °C. Za plazmida velikosti 10,7 kbp in 39,4 kbp smo nato ponovili poskuse tudi na biorektorskem sistemu, kjer smo lahko določili tudi spreminjanje koncentracije plazmidne DNA med različnimi fazami rasti mikroorganizma. Največje koncentracije le te smo zabeležili med prehodom iz eksponentne v stacionarno fazo rasti. Pri poskusih na stresalniku smo zabeležili visoke koncentracije plazmidne DNA v primeru ko smo v gojišče dodali tripton in kvasni ekstrakt. Na biorektorskem nivoju smo zato ločeno izvedli bioprocasa z dohranjevanje teh substratov, ter dosegli višje končne koncentracije plazmidne DNA v primerjavi s šaržnimi bioprocasi. Prav tako smo s poskusom na biorektorskem sistemu potrdili navedbe iz literature, o povišanju končne koncentracije plazmidne DNA ob dodatku kloramfenikola v gojišče. Poleg optimizacije bioprocasnih parametrov smo prilagodili tudi zaključni proces čiščenja plazmidne DNA, ki je občutljiva na strižne sile, ki se pojavijo med postopkom alkalne lize. Pokazali smo, da

moramo čas izpostavitve lizata alkalnim pogojem skrajšati iz petih na tri minute. RNA molekule, ki so eden glavnih kontaminantov v lizatu, smo odstranili z uporabo izboljšanega protokola alkalne lize, ki vključuje precipitacijo s pomočjo kalcijevega klorida ter tako dosegli čisto plazmidno DNA v superzviti obliki.

6.2 SUMMARY

Plasmid DNA based therapeutics have become an important topic in the field of medicine and molecular biology. They are mainly considered as a tool for recombinant protein production, and a potential therapeutic agent, for example in gene therapy or as DNA vaccine. Due to increased number of clinical trials in gene therapy demand for high-quality plasmid DNA used as a vector is constantly growing. Besides, there is a trend to use plasmid DNA of larger size above 15kbp. While production of smaller plasmid DNA is already well established, there is little literature data available for larger plasmids. This was motivation to optimize production of 39.4 kbp large plasmid DNA on bioreactor scale together with appropriate downstream processing. Since high cell density of bacteria is a prerequisite for efficient production of high-quality plasmid DNA first step was optimization of bacterium *E. coli* process parameters. As host organism *E. Coli* K-12 were used as they have been approved by the FDA in different processes and can thus be applied for plasmid DNA production under GMP conditions. Initially we were cultivating five cultures containing different sized plasmid DNA on an orbital shaker in Erlenmeyer flasks with a sidearm, that enabled measurement of optical cell density. We have shown that the concentration of plasmid DNA is increasing in accordance with the biomass concentration. Maximum concentration of plasmid DNA was achieved when cultivation was carried at 40 °C. For the plasmids of 10,7 kbp and 39,4 kbp size bioprocess was further transferred on a bioreactor level, where determination of plasmid DNA concentration during the various growth phases of microorganism was possible. The highest concentration of plasmid DNA was observed during phase of limitation present when the culture is transforming from exponential to the stationary growth phase. During experiments on the shaker the highest final plasmid DNA concentration was determined when tryptone and yeast extract were added to the culture medium. The same fed batch experiments procedure was therefore tested also a bioreactor level and also in bioreactor higher final concentration of the plasmid DNA in comparison with batch cultivation was achieved. With the experiment in bioreactor we also confirmed literature data that addition of chloramphenicol increase

plasmid DNA concentrations. Beside the optimization of bioprocess parameters, we also adapted downstream process of plasmid DNA, due to its sensitivity to shear forces and chemical environment that occur during the alkaline lysis. We have shown that the critical time of expose of lysate to alkaline conditions needs to be shortened from five to three minutes. With usage of improved alkaline lysis protocol incorporating CaCl_2 precipitation step, we removed majority of RNA molecules that are main contaminant and achieve pure super-coiled plasmid DNA.

7 VIRI

- Anderluh G., Maček P., Sepčič K., Turk T. 2009. Eksperimentalne metode v biokemiji. Ljubljana, Študentska založba: 137 str.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curren Opinion in Biotechnology, 10, 5: 411-421
- Bentley W.E., Quiroga O. E. 1993. Investigation of subpopulation heterogeneity and plasmid stability in recombinant *Escherichia coli* via a simple segregated model. Biotechnology and Bioengineering, 42, 2: 222-234
- Berovič M., Nienow A. W. 2005. Biochemical engineering principles: doctoral/post-doctoral level course. Ljubljana, University of Ljubljana, Faculty of Chemistry and Chemical Technology Press: 409 str.
- Berovič M., Enfors S.O. 2010. Comprehensive bioprocess engineering. Ljubljana, Univerza v Ljubljani: 444 str.
- Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 62, 3: 293-300
- Beshay U. 2008. Oxygen transfer conditions in the production of rainbow trout growth hormone (rtGH) by *Escherichia coli*. Indian Journal of Biotechnology, 7, 2: 225-229
- Birnboim H. C., Doly J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research, 7, 6: 1513-1523
- Bo H., Li H., Shao H., Huang S. 2007. Optimization of alkaline lysis protocol and salt precipitation steps in the production of plasmid DNA. Minerva Biotechnologica, 19, 4: 133-138
- Brand E., Ralla K., Neubauer P. 2012. Strategies for plasmid DNA production in *Escherichia coli* V: Biopharmaceutical production technology. 1nd ed. Subramanian G. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 3-41

- Cai Y., Rodriguez S., Rameswaran R., Draghia-Akli R., Juba R. J., Hebel H. 2010. Production of pharmaceutical-grade plasmids at high concentration and high supercoiled percentage. *Vaccine*, 28, 8: 2046-2052
- Clark D.P. 2010. *Molecular biology*. Burlington, Academic Press, Elsevier: 452 str.
- Clewell D. B. 1972. Nature of Col E₁ plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *Journal of Bacteriology*, 110, 2: 667-676
- Cohen A.D, Boyer J.D, Weiner A.D.B. 1998. Modulating the immune response to genetic immunization. *The FASEB Journal*, 12, 15: 1611-1626
- Colin R. in Kristansen B. 2006. *Basic biotechnology. Growth and metabolism*. 3rd ed. London, Cambridge University Press: 666 str.
- Cooper S., Helmstetter C.E. 1968. Chromosome replication and the division of *Escherichia coli* B/r. *Journal of Molecular Biology*, 31, 3: 519-540
- Doran P. M. 1995. *Bioprocess engineering principles*. London, Elsevier Science & Technology Books: 525 str.
- Faucher D. 2003. Quality control of NV1FGF plasmid DNA for PAD gene therapy. V: Council of Europe, Standardisation and quality control cell and gene therapy products. *Proceedings of the International Symposium*. Strasbourg, Council of Europe: 13 str.
- Filomena S., Queiroz A., Domingues F. C. 2012. Evaluating metabolic stress and plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 30, 3: 691-708
- Filutowicz M. 2009. Plasmids, Bacterial. V: *The desk encyclopedia of microbiology*. 2nd ed. Schaechter M. (ed.). London, Academic Press, Elsevier: 915-936
- Helmstetter C. E., Cooper S. 1968. DNA synthesis during the division of rapidly growing *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 31, 3: 519-540
- Jevnikar Z. 2007. Ekspresijski sistemi. V: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 68-111

- Karp P.D., Keseler I. M. 2007. Multidimensional annotation of the *E.coli* K-12 genome. *Nucleic Acids Research*, 35, 22: 7577-7590
- Kennedy R.D., Baldwin C., Keshavarz-Moore E. 2000. Effects of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. *Journal of Biotechnology*, 76, 2: 175-183
- Kensy F., Zang E., Faulhammer C., Rung-Kai T., Büchs J. 2009. Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. *Microbial Cell Factories*, 31, 8: 1-17
- Kinjo K., Nikaido H. 1961. Successive assimilation of amino acids. *Nippon Saikingaku Zasshi*, 16, 10: 926-931
- Kreft S., Doljak B., Obermajer N. 2007. Osnove genskega zdravljenja. V: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Štrukelj B., Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 592-625
- Lendero-Krajnc N., Smrekar F., Černe J., Raspor P., Modic M., Krgovič D., Štrancar A., Podgornik A. 2009. Purification of large plasmids with methacrylate monolithic columns. *Journal of Separation Science*, 32, 15-16: 2682-2690
- Lendero-Krajnc N., Smrekar F., Štrancar A., Podgornik A. 2011. Adsorption behavior of large plasmids on the anion-exchange methacrylate monolithic columns. *Journal of Chromatography A*, 1218, 17: 2413-2424
- Levenspiel O. 1999. *Chemical reaction engineering*. 3rd ed. New York, John Wiley & Sons: 668 str.
- Levy M.S., Ronan D.O., Ayazi-Shamlou P., Dunnill P. 2000. Biochemical engineering approaches to the challenges of producing pure plasmid DNA. *Trends in Biotechnology*, 18, 7: 296-305
- Levi P. 1989. An interview with *Escherichia coli* (one of five intimate interviews). New York, Schoecken Books: 46 str.

- Lunder M. 2007. Izolacija bioloških učinkovin. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B. in Kos J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 114–134
- Madigan M. T. in sod. 2006 . Brock Biology of Microorganisms. 11th ed. New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Mahony K. O., Freitag R., Hilbrig F., Muller P., Schumacher I. 2007. Strategies for high titre plasmid DNA production in *Escherichia coli* DH5 α . Process Biochemistry, 42, 7: 1039–1049
- Mulhardt C. 2007. Molecular biology and genomics: The experimenter series. London, Academic Press, Elsevier: 257 str.
- Neidhardt F.C., Curtiss R. 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, ASM Press: 863 str.
- Neidhardt F.C., Ingraham J.L., Schaechter M. 1990. Physiology of the bacterial cell. A molecular approach. Biochemical Education, 20, 2: 124-125
- Nedwell D.B. 1999. Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. FEMS Microbiology Ecology, 30, 2: 101–111
- Paredes-Lopez O., Camargo-Rubino E., Ornelas-Vale A. 1976. Influence of specific growth rate on biomass yield, productivity, and composition of *Candida utilis* in batch and continuous culture. Applied and Environmental Microbiology, 31, 4: 487–491
- Podgornik A., Lendero Krajnc N. 2012. Application of monoliths for bioparticle isolation. Journal of Separation Science, 35, 22: 3059–3072
- Podgornik A., Paš M., Raspor P. 2013. Biotehnološki tehnikum: učbenik za vaje. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 68 str.
- Raspor P., Smole-Možina S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Bioinženirske tehnike dela. Ljubljana, BIA: 148 str.

- Ratledge C., Kristiansen B. 2006. Basic Biotechnology. 3rd ed. London, Cambridge University Press: 666 str.
- Reinikainen P., Korpela K., Nissinen V., Olkku J., Soderlund H., Markkanen P. 1988. *Escherichia coli* plasmid production in fermenter. Biotechnology and Bioengineering, 33, 4: 386–393
- Rowland H. Davis. 2003. The microbial models of molecular biology: from genes to genomes. London, Oxford University Press: 337 str.
- Rozkov A., Avignone-Rossa C. A., Ertl P.F., Jones P., Kennedy O., Smith J. J., Dale J. W., Bushell M. E. 2006. Fed batch culture with declining specific growth rate for high-yielding production of a plasmid containing a gene therapy sequence in *Escherichia coli* DH1. Enzyme and Microbial Technology, 39, 1: 47-50
- Schaechter M. 2009. *Escherichia coli* V: The desk encyclopedia of microbiology. 2nd ed. Moselio Schaechter. (ed.). London, Academic Press, Elsevier: 420-427
- Schendel F.J, Baude E.J., Flickinger M.C. 1989. Determination of protein expression and plasmid copy number from cloned genes in *Escherichia coli* by flow injection analysis using an enzyme indicator vector. Biotechnology and Bioengineering, 34, 8: 1023–1036
- Schmidt T., Friehs K., Flaschel E. 1996. Rapid determination of plasmid copy number. Journal of Biotechnology, 29, 1-3: 219–219
- Seo J.H., Bailey J.E. 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and cloned gene product formation in *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, 27, 12: 1668-1674
- Sezonov G., Joseleau-Petit D., Dari R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. Journal of Bacteriology, 189, 23: 8746–1749
- Silva F., Lourenco O., Maia C., Queiroz A., Domingues C. 2011. Impact of plasmid induction strategy on overall plasmid DNA yield and *E. coli* physiology using flow cytometry and real – time PCR. Process Biochemistry, 46, 1: 174–181

- Silva F., Passarinha L., Sousa F., Queiroz J. A., Domingues F. C. 2009. Influence of growth conditions on plasmid DNA production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19, 11: 1408–1414
- Silva F., Queiroz J. A., Domingues C. 2012. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 30, 3: 691-708
- Skoog D.A., West D.M. in Holler F.J. 2002. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 7th ed. New York, Harcourt College Publishers: 870 str.
- Smrekar F., Podgornik A., Ciringier M., Kontrec S., Raspor P., Štrancar A., Peterka M. 2010. Preparation of pharmaceutical-grade plasmid DNA using methacrylate monolithic columns. *Vaccine*, 28, 8: 2039–2045
- Srivastava M. L. 2008. *Fermentation technology*. London, Alpha Science International: 391 str.
- Summers D., Beton C. H. W., Withers H. L. 1993. Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Molecular Biology*, 8, 6: 1031-1038
- Thompson R. 1982. Plasmid and phage M13 cloning vectors. V: *Genetic Engineering*. Vol. 3. Williamson R. (ed.). London, Academic Press: 2-41
- Urthaler J., Buchinger W., Necina R. 2005. Improved downstream process for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 3: 703–711
- Urthaler J., Buchinger W., Necina R. 2005. Industrial scale cGMP purification of pharmaceutical grade plasmid-DNA. *Chemical Engineering Technology*, 28, 11: 1408-1420
- Wahren B., Liu M. 2005. DNA Vaccines – an overview V: *DNA-Pharmaceuticals: Formulation and Delivery in Gene Therapy, DNA Vaccination and Immunotherapy*. Schleef M. (ed.). Weinheim, Wiley VCH Verlag GmbH & Co: 1-5
- Wang C. H., Koch A. L. 1978. Constancy of growth on simple and complex media. *Journal of Bacteriology*, 136, 3: 969–975

- Werner R. G., Urthaler J., Kollmann F., Necina R., Konopitzky K. 2002. pDNA-from process science to commercial manufacture. *Pharmaceutical Technology Europe*, 18, 9: 34-40
- Williams J. A., Carnes A. E., Hodgson C. P. 2009. Plasmid DNA vaccine vector design: Impact on efficacy, safety and upstream production. *Biotechnology Advances*, 27, 4: 353–370
- Zhong L., Srirangan K., Scharer J., Moo-Young M., Fenner D., Crossley L., Honeyman C.H., Suen S-Y., Chou P. 2011. Developing an RNase-free bioprocess to produce pharmaceutical-grade plasmid DNA using selective precipitation and membrane chromatography. *Separation and Purification Technology*, 83, 2: 121–129
- Zimmer C. 2008. *Microcosm: E. coli and the new science of life*. New York, Pantheon Books: 243 str.
- Žnidaršič P.P., Pavko A. 2005. *Praktikum iz biokemijskega inženirstva*. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 89 str.
- Quaak S. 2009. *Pharmaceutical development of the plasmid DNA vaccine pDERMATT*. Amsterdam, Gildeprint Drukkerijen Enschede: 187 str.
- Quaak S. G. L., Berg J. H., Toebes M., Schumacher T. N. M., Haanen J. B. A. G., Beijnen J. H., Nuijen B. 2008. GMP production of pDERMATT for vaccination against melanoma in a phase I clinical trial. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 2: 429-438

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Alešu Podgorniku za strokovno pomoč in nasvete.

Somentroju prof. dr. Petru Rasporju in recenzentu prof. dr. Hrvoju Petkoviću se zahvaljujem za konstruktivno kritiko dela.

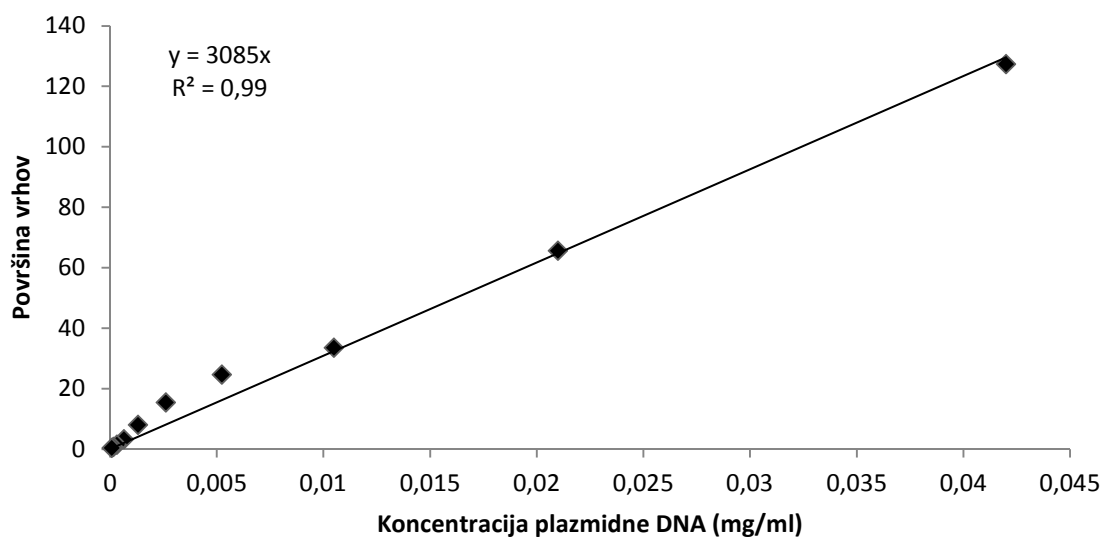
Zahvaljujem se Mateju Šerganu za tehnično pomoč pri pripravi bioreaktorjev, ter doc dr. Neži Čadež, za pomoč na področju mikrobiološkega dela naloge. Hvala mag. Simoni Juvan za hiter pregled oblikovne ustreznosti naloge.

Hvala najbližjim za podporo.

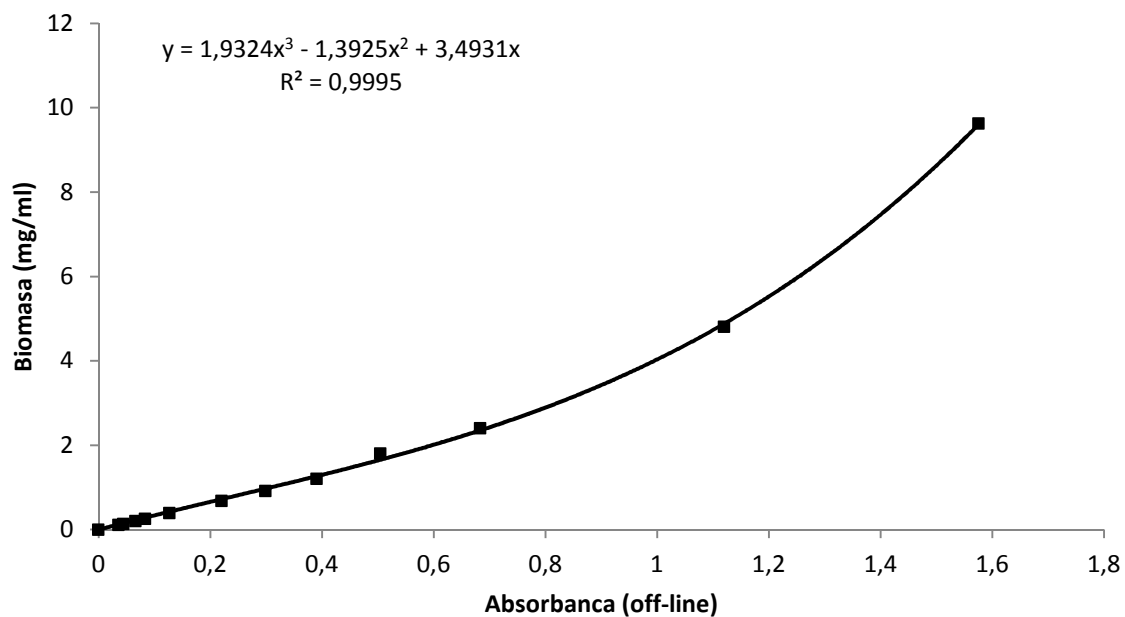
Pipo, hvala ti, ker si!

PRILOGE

Priloga 1: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije plazmidne DNA (mg/ml) v vzorcih odvzetih med bioprocеси, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti



Priloga 2: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije celic (mg/ml) pri merjenju optične gostote tako off-line, kot tudi in-line.



Priloga 3: Primerjava specifičnih hitrosti rasti med gojenjem kultur na stresalniku, z različnimi sevi, pri različnih temperaturah

Temperatura	4887 (10,7kbp)	7023 (12,6kbp)	4247 (69,7kbp)	8878 (7,1kbp)	4245 (39,4kbp)
28 °C	0,3889				0,6505
	0,4490				0,5986
37 °C	0,5934	0,5585	0,7935	0,5185	0,543
37 °C	0,7345	0,7496	0,6266	0,6559	0,6518
40 °C	0,9019	0,9687	0,9745	0,8922	0,8743
40 °C *cf	0,9656	1,0763	1,1439	0,9845	0,9049

Priloga 4: Primerjava povprečij specifičnih hitrosti rasti med gojenjem kultur na stresalniku, z različnimi sevi, pri različnih temperaturah

Temperatura	Specifična hitrost rasti (h⁻¹)				
	4887 (10,7kbp)	7023 (12,6kbp)	4247 (69,7kbp)	8878 (7,1kbp)	4245 (39,4kbp)
28 °C	0,4190				0,6246
37 °C	0,6640	0,6541	0,7101	0,5872	0,5974
40 °C	0,9019	0,9687	0,9745	0,8922	0,8743