

פתרון מוצע לבחינה בהנדסה ביוטכנולוגית ושיטות הפרדה

מועד _____ א _____ תשע"ז, יולי 2017
 הנדסה ביוטכנולוגית: ד"ר נסים סמואלוב ומר' עדאל זועבי.
 שיטות הפרדה: ד"ר חנה פייגר. מכללת אורט בראודה

חלק א :

שאלה מספר 1

גזע	$\mu(1/hr)$	$Y_{x/s}(gr\ cell/gr\ arabinose)$	$q_p(gr\ Ethanol/hr*gr\ cell)$
גזע א	0.067	0.14	0.20
גזע ב	0.075	0.12	0.27

1.1

קצב צריכה סגולי של סובסטרט – q_s

$$q_s(a) = \frac{\mu}{Y_{x/s}} = \frac{0.067 hr^{-1}}{0.14 (gr.cell / gr.arabinose)} = 0.478 \frac{gr.arabinose}{gr.cell * hr}$$

$$q_s(b) = \frac{\mu}{Y_{x/s}} = \frac{0.075 hr^{-1}}{0.12 (gr.cell / gr.arabinose)} = 0.625 \frac{gr.arabinose}{gr.cell * hr}$$

1.2

$$Y_{p/x}(a) = \frac{q_p}{\mu} = \frac{0.2 (gr.Ethanol / gr.cell * hr)}{0.067 hr^{-1}} = 2.985 \frac{gr.Ethanol}{gr.cell}$$

$$Y_{p/x}(b) = \frac{q_p}{\mu} = \frac{0.27 (gr.Ethanol / gr.cell * hr)}{0.075 hr^{-1}} = 3.6 \frac{gr.Ethanol}{gr.cell}$$

1.3

נבחר בגזע ב כיוון שקצב ייצור סגולי (q_p) וקצב צריכה סגולי (q_s) וקצב גידול (μ) שלו יותר גבוהים מאשר גזע א.

1.4

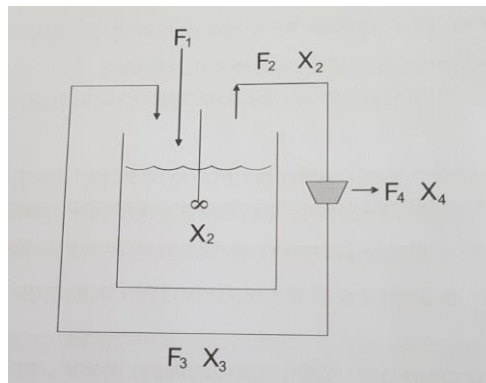
1.4.1

תמצית שמרים מטרתה לספק ויטמינים, חנקן אורגני ויסודות קורט לשמרים. אמוניום סולפט $(NH_4)_2SO_4$ הוא מקור חנקן אנאורגני לשמרים.

1.4.2

מדידת עכירות היא שיטה ישירה ... O.D. עולה כשמספר התאים ליחידת נפח (ריכוז) עולה.

שאלה מספר 2



2.1

$V=50 \text{ lit}$, $X_0=0$, $S_0=4 \text{ grs/lit}$, $S=0.1 \text{ grs/lit}$, $F_1=15 \text{ lit/hr}$, $F_2=20 \text{ lit/hr}$, $(S.S)X_2=3 \text{ grx/lit}$, $X_3=5 \text{ grx/lit}$ (זרם החזר) , $F_3=F_2-F_1=20 \text{ lit/hr}$.

2.1.1

$$(S.S).0 = \frac{dx}{dt} = \frac{F_1}{V} X_0 + \frac{F_3}{V} X_3 + \mu X_2 - \frac{F_2}{V} X_2$$

2.1.2

$$\mu = D(1 + \alpha - \alpha C) = 0.233/h$$

2.2

2.2.1

$$D = \frac{F_1}{V} = 0.3hr^{-1}; X_2 = \frac{D}{\mu} * Y_{X/S} * (S_0 - S).$$

$$Y_{X/S} = \frac{\mu * X_2}{D(S_0 - S)} = \frac{0.233hr^{-1} * 3grx/lit}{0.3hr^{-1} * (4 - 0.1grs/lit)} = 0.598grx/grs$$

2.2.2

כדי להקטין את ריכוז הסובסטרט ביציאה מהפרמנטור בסדר גודל, עלינו להוריד את קצב הגידול של התאים וזה ע"י העלאת פקטור ריכוז (C) בצנטריפוגה. אם יחס $X_3:X_2$ יהיה גבוה פי 2.3, קצב הגידול יקטן בסדר גודל, ולפי המודל של ג'קו ומונו ריכוז הסובסטרט ירד באותו היחס.

2.3

* קצב ייצור נפחי גבוה יותר כי בתהליך רציף אין שלבי הכנה ועיקור בין המנות.
* במצב עמיד כל הריכוזים קבועים וכמובן שקצב תפוקת התאים/התוצר $F(X/P)$ קבועים.

שאלה מספר 3

$$V=14000 \text{ lit}, N_0=3 \cdot 10^2 \text{ spore/ml}, T_{\text{עיקור}}=121^\circ\text{C}, t_{\text{עיקור}}=10\text{min}, k=3.1\text{min}^{-1}$$

3.1

$$\ln(N_f) = \ln(N_0) - K \cdot t = \ln(300) - 3.1 \cdot 10 \rightarrow N_f = 1 \cdot 10^{-11} \text{ cell/ml}$$

3.2

$$\ln(N_0/N_f) = \ln(300/1 \cdot 10^{-11}) = 31$$

3.3

$$\ln(1 \cdot 10^{-11}/1.5) = \ln(300) - 3.1 \cdot t \rightarrow t = 10.14\text{min}$$

3.4

3.4.1

ניתן לסנן אנטיביוטיקה ע"י סינון בפילטר שמסנן חיידקים גדולים מ-0.2 מיקרון.

3.4.2 - שתי סיבות:

* כדי שחומר הגלם וכל הסובסטרטים ישמשו לגידול המיקרואורגניזמים היצרני שלנו וליצור המוצר הרצוי.

** למניעת זיהומים ורעילות לאדם ולסביבה מחומרים שמיוצרים על ידי מיקרואורגניזמים מזהמים.

שאלה מספר 4

4.1

4.1.1

$$\mu = \frac{\ln(15/0.05)}{12\text{hr}} = 0.475\text{hr}^{-1}$$

4.1.2

$$OUR_{\max} = \frac{\mu \cdot X_F}{Y_{X/O}} = \frac{0.475\text{hr}^{-1} \cdot 15\text{grx/lit}}{1.6 \frac{\text{grx}}{\text{grO}_2} \cdot \frac{32\text{grO}_2}{1000\text{mmolO}_2}} = 139.16 \frac{\text{mmolO}_2}{\text{lit} \cdot \text{hr}}$$

4.2

$$OUR_{\max} = 139.16 \frac{\text{mmolO}_2}{\text{lit} \cdot \text{hr}} = OTR = K_L a \cdot (C_L^* - C_L) =$$

$$= K_L a \cdot (0.8 \cdot C_L^*) = K_L a \cdot (0.8 \cdot 0.21 \frac{\text{mmolO}_2}{\text{lit}}) \Rightarrow K_L a = 828.33\text{hr}^{-1}$$

4.3

המערכת כן מסוגלת לסלק את החום הנוצר

$$Q_{F_{\max}} = OUR_{\max} \cdot V \cdot \frac{0.12\text{Kcal}}{1\text{mmolO}_2} = 139.16 \frac{\text{mmolO}_2}{\text{lit} \cdot \text{hr}} \cdot 8000\text{lit} \cdot \frac{0.12\text{Kcal}}{1\text{mmolO}_2} = 133593.6 \frac{\text{Kcal}}{\text{hr}}$$

$$133593.6 \frac{\text{Kcal}}{\text{hr}} < 150,000 \frac{\text{Kcal}}{\text{hr}}$$

4.4

קבוע מעבר החמצן כן ישתנה (יעלה), כיוון שהוא תלוי בפרמטרים פיזיקליים כמו RPM, טמפ', סוג הבוחש וכו'.

חלק ב :

שאלה מספר 5

5.1

$$\text{מנתית : } prod = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{5 \text{ grp} / \text{lit}}{(16 + 6) \text{ hr}} = 0.227 \text{ grp} / \text{lit} * \text{hr}$$

$$\text{רציף : } prod = D * P = 0.6 \text{ grp} / \text{lit} * 0.04 \text{ hr}^{-1} = 0.024 \text{ grp} / \text{lit} * \text{hr}$$

• על סמך הפרודוקטיביות הייתי ממליץ על מנתית.

5.2

תוצר שניוני נוצר שלא במקביל לקצב הגידול אלא כאשר קצב הגידול מתקרב לאפס (פאזה סטציונרית), וגם במשך הפאזה הסטציונרית. תוצר שניוני איננו חיוני לגידול.

שאלה מספר 6

6.1

$$\mu = D$$

$$S (x) = \frac{D * K_s}{\mu_{\max} - D} = \frac{0.4 * 0.08}{1.2 - 0.4} = 0.04 \frac{\text{grs}}{\text{lit}}$$

$$S (z) = \frac{D * K_s}{\mu_{\max} - D} = \frac{0.4 * 0.04}{1.0 - 0.4} = 0.0267 \frac{\text{grs}}{\text{lit}}$$

6.2

שני הגזעים יגדלו יחד כיוון שעבור שניהם ($\mu_{\max} > D$) ולא תהיה שטיפה של אף אחד מהם.

6.3

כמו הנ"ל וגם לעבוד ב-D נמוך מנקודת חוסר היציבות, שבה קצב יצור נפחי DX הוא מקסימלי.

שאלה מספר 7

7.1

תנועה, ניטרול טוקסינים, ויסות לחצים.

7.2

$$X = Y_{x/s} * (S_0 - S) = 0.45 * (10 - 0.1) = 4.455 \text{ grx} / \text{lit}$$

7.3

$$m * X = 4.455 \text{ grx} / \text{lit} * 0.13 \frac{\text{grs}}{\text{grx} * \text{hr}} = 0.579 \frac{\text{grs}}{\text{lit} * \text{hr}}$$

חלק ג :

שאלה מספר 8

8.1

$$\omega = 2\pi N = 2\pi \cdot 80 \text{ (1/s)} = 502 \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

מהירות התנועה הרדיאלית בצנטריפוגה:

$$\begin{aligned} V_{\omega} &= (d^2/18\mu) \cdot (\rho_s - \rho_l) \cdot \omega^2 r = \\ &= ((3 \cdot 10^{-4} \text{ cm})^2 / 18 \cdot 0.01 \text{ gr/cm}^2 \cdot \text{s}) \cdot (1.1 \text{ gr/cm}^3 - 1 \text{ gr/cm}^3) \cdot (502 \text{ (s}^{-1}\text{)})^2 \cdot 10 \text{ cm} \\ &= 0.126 \text{ (cm/s)} \end{aligned}$$

8.2

התאים הורחפו בתמיסת בופר בנוכחות 20mM NaCl ולא במים על מנת לא לגרום לשבירת התאים כתוצאה הפרשי ריכוז בתוך ומחוץ לתא.

8.3

ניתן להשתמש בשיטות כימיות, אנזימטיות ומכניות שאינן גורמות לחימום כגון טחינת כדורים או הימגון.

8.4

שיטה נוספת להפרדה בין מוצקים לנוזלים היא סינון, בה חומרים מופרדים לפי גודל. עקרון ההפרדה בצנטריפוגציה הוא לפי צפיפות החומרים.

שאלה מספר 9

9.1

יש לבחור במחליף אניונים כי חלבון המטרה הינו אניון (טעון שלילית) בpH=8, מכיוון ש-pH זה הינו גובה מערך 5.9 = pI של החלבון.

9.2

ניתן להקטין את נפח הגרדיאנט (לדוגמה ל-10 נפחי העמודה) או להגביל את ריכוזי המלח לטווח ריכוזים רחב יותר (לדוגמה בין 0 ל-1M NaCl). שני הדברים הנ"ל יגרמו ליציאה מרוכזת יותר של החלבון מהעמודה.

9.3

$$U_{\text{specific before purification}} = 22 \text{ (U/ml)} / 60 \text{ (mg/ml)} = 0.37 \text{ (U/mg)}$$

$$U_{\text{specific after purification}} = 72 \text{ (U/ml)} / 25 \text{ (mg/ml)} = 2.88 \text{ (U/mg)}$$

פקטור הטיהור

$$\beta = U_{\text{specific after purification}} / U_{\text{specific before purification}} = 2.88 \text{ (U/mg)} / 0.37 \text{ (U/mg)} = 7.8$$

9.4

ניצולת ההתהליך:

$$\% = [[25 \text{ (mg/ml)} \cdot 18 \text{ ml}] / [60 \text{ (mg/ml)} \cdot 70 \text{ ml}]] \cdot 100\% = 11\%$$

שאלה מספר 10

10.1

היתרון בהעברת התערובת בעמודת מחליף קטיונים היא הפרדה של חלבון המטרה מחלבונים בעלי משקל מולקולרי שונה. עיקרון ההפרדה על מחליף יונים הינו לפי מטען חשמלי של חלקיקים המופרדים. לעומת זאת, עקרון ההפרדה בג'ל פילטרציה הוא לפי משקל מולקולרי, לכן בשיטה זו חלבונים בעלי משקל מולקולרי דומה אינם מופרדים היטב.

10.2

גודל החלבון הינו בין 20-30 kDa כי פס החלבון נמצא בין שני פסים נמוכים של סמן גודל.

10.3

עמודת ג'ל פילטרציה מתאימה להפרדת חלבון המטרה כי טווח הפרדה שלה מתאים לגודל החלבון.

10.4

10.4.1

חומר מילוי של עמודה בג'ל פילטרציה צריך להיות אינרטי ולהכיל חללים בעלי גודל זהה ומתאים להפרדת חומר המטרה.

10.4.2

יש להקטין את מידת הצילוב של הג'ל על מנת להגדיל את החללים בג'ל שיוכלו לעכב את התנועה של מולקולת חלבון בגודל 50kDa לעומת 100kDa.