

| | |
|--|--------|
| SADRŽAJ | strana |
| SPISAK SIMBOLA | ix |
| 1. UVOD U BIOHEMIJSKO INŽENJERSTVO | 1 |
| 1.1. RAZVOJ BIOTEHNOLOGIJE | 2 |
| 1.1.1. Otkriće pencilina i razvoj tehnologije za njegovu proizvodnju | 2 |
| 1.1.2. Razvoj moderne biotehnologije | 4 |
| 1.2. PROIZVODNA REGULATIVA BIOLOŠKIH POSTUPAKA | 6 |
| 1.2.1. Regulativa bioloških procesa sa korišćenjem genetičkih manipulacija | 7 |
| 1.2.2. Moguće opasnosti korišćenja genetičkog inženjerstva i uticaj javnog mjenja | 9 |
| 1.2.2.1. Prenosjenje gena za rezistenciju na antibiotike | 10 |
| 1.2.2.2. Prenos alergija | 10 |
| 1.2.2.3. Prenos polena sa GM biljaka | 10 |
| 1.2.2.4. Socijalna, filozofska i etička pitanja korišćenja genetičkog inženjerstva | 10 |
| 1.2.2.5. Uticaj javnog mjenja na korišćenje genetičkog inženjerstva | 11 |
| 2. BIOLOŠKA OSNOVA BIOHEMIJSKOG INŽENJERSTVA | 13 |
| 2.1. BIOTEHNOLOŠKI PROCESI | 13 |
| 2.2. PREGLED OSNOVNIH TIPOVA I KARAKTERISTIKA ĆELIJA MIKROORGANIZAMA | 15 |
| 2.3. HRANJIVE PODLOGE ZA GAJENJE MIKROORGANIZAMA | 18 |
| 2.3.1. Makronutrijenti | 19 |
| 2.3.2. Mikronutrijenti | 21 |
| 2.3.3. Formulisanje hranjive podloge | 22 |
| 3. OSNOVI PRENOSA INFORMACIJA U ĆELIJAMA | 25 |
| 3.1. DNK KAO OSNOVA PRENOSA INFORMACIJA | 25 |
| 3.2. REPLIKACIJA DNK | 28 |
| 3.3. TRANSKRIPCIJA: PREPISIVANJE PORUKE | 29 |
| 3.3.1. Razlike u transkripciji kod prokariotskih i eukariotskih ćelija | 31 |
| 3.4. TRANSLACIJA GENETSKIH INFORMACIJA: PRENOS PORUKE DO PROIZVODA | 32 |
| 3.5. POSTRANSLACIONE PROMENE PROTEINA | 36 |
| 3.5.1. Prostorno uređivanje proteina | 36 |
| 3.5.2. Dodavanje signalne sekvence | 37 |
| 3.5.3. Glikozilacija | 38 |
| 4. METABOLIZAM I METABOLIČKA REGULACIJA ĆELIJA | 39 |
| 4.1. UVOD | 39 |
| 4.2. BIOENERGETIKA ĆELIJE | 40 |
| 4.3. TRANSPORT ELEKTRONA U ĆELIJI | 42 |
| 4.4. METABOLIZAM GLUKOZE | 43 |
| 4.5. METABOLIČKA REGULACIJA | 48 |
| 4.5.1. Kontrola proteinske-enzimske sinteze | 49 |
| 4.5.1.1. Indukcija | 49 |
| 4.5.1.2. Katabolička regulacija | 53 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.1.3. Povratna ili feedback regulacija | 54 |
| 4.5.1.4. Regulacija u složenim metaboličkim putevima | 56 |
| 5. PROIZVODNI MIKROORGANIZMI | 59 |
| 5.1. UVOD | 59 |
| 5.2. MIKROORGANIZMI OD INDUSTRIJSKOG ZNAČAJA | 59 |
| 5.3. IZVORI MIKROORGANIZAMA | 59 |
| 5.4. IZOLACIJA I SELEKCIJA PROIZVODNOG MIKROORGANIZMA | 62 |
| 5.4.1. Metode direktnog izolovanja | 62 |
| 5.4.2. Metode obogaćenja | 63 |
| 5.4.3. Odabir korisnog mikroorganizma | 63 |
| 5.5. POBOLJŠANJE PROIZVODNIH OSOBINA MIKROORGANIZAMA | 64 |
| 5.5.1. Mutacije | 65 |
| 5.5.1.1. Mutageneza | 67 |
| 5.5.1.2. Selekcija mutanata | 67 |
| 5.6. ČUVANJE PROIZVODNIH MIKROORGANIZAMA | 70 |
| 6. OSNOVNE TEHNIKE GENETSKOG INŽENJERSTVA | 71 |
| 6.1. UVOD | 71 |
| 6.2. IZOLACIJA I PREČIŠĆAVANJE NUKLEINSKIH KISELINA | 71 |
| 6.3. TEHNIKA KOMPLEMENTARNE DNK | 72 |
| 6.4. RESTRIKCIONI ENZIMI – ENDONUKLEAZE | 72 |
| 6.5. DNK LIGAZE | 73 |
| 6.6. VEKTORI | 73 |
| 6.7. PLAZMIDI | 75 |
| 6.8. PRENOS GENA | 75 |
| 6.9. GENETIČKI MARKERI | 77 |
| 6.10. TEHNIKA REPLICIRANIH PLOČA | 79 |
| 6.11. TEHNIKA PCR | 80 |
| 6.12. DNK PROBE | 81 |
| 6.13. TEHNIKA "PALJBE" | 82 |
| 6.14. TEHNIKA BESMISLENIH GENA: ISKLJUČIVANJE GENA | 83 |
| 6.15. SINTEZA GENA | 83 |
| 6.16. GEL-ELEKTROFOREZA | 84 |
| 7. RAST ĆELIJA | 85 |
| 7.1. UVOD | 85 |
| 7.2. RAST ĆELIJA U ŠARŽNOM SISTEMU | 86 |
| 7.2.1. Metode određivanja koncentracije ćelija | 86 |
| 7.2.1.1. Određivanja broja ćelija | 86 |
| 7.2.1.2. Određivanja vijabilnosti ćelija | 87 |
| 7.2.1.3. Određivanja ćelijske mase | 89 |
| 7.3. KINETIKA ĆELIJSKOG RASTA U ŠARŽNOM SISTEMU | 91 |
| 7.3.1. Koeficijenti prinosa biomase | 95 |
| 7.3.2. Koeficijent održavanja | 97 |
| 7.3.3. Mikrobnii proizvodi i njihova klasifikacija | 98 |
| 7.4. UTICAJ USLOVA OKOLINE NA KINETIKU RASTA | 99 |
| 7.4.1. Temperatura | 99 |
| 7.4.2. Uticaj pH vrednosti | 100 |
| 7.4.3. Uticaj koncentracije sastojaka hranjive podloge | 101 |

| | |
|---|------------|
| 7.4.4. Uticaj koncentracije rastvorenog kiseonika | 101 |
| 7.4.5. Redoks potencijal | 103 |
| 7.4.6. Rastvoreni ugljen-dioksid | 103 |
| 7.4.7. Jonska jačina | 103 |
| 7.5. TOPLOTA OSLOBOĐENA U MIKROBIOLOŠKOM RASTU | 104 |
| 8. STEHIOMETRIJA ĆELIJSKOG RASTA I SINTEZE PROIZVODA | 107 |
| 8.1. UVOD | 107 |
| 8.2. STEHIOMETRIJSKI PRORAČUNI | 107 |
| 8.2.1. Bilansiranje elemenata | 107 |
| 8.2.2. Određivanje stepena redukcije | 109 |
| 8.2.3. Određivanje koeficijenata prinosa | 111 |
| 8.2.3.1. Teorijsko predviđanje koeficijenata prinosa | 112 |
| 9. KINETIKA MIKROBNIH PROCESA | 113 |
| 9.1. UVOD | 113 |
| 9.2. KONCIPIRANJE MATEMATIČKOG MODELA BIOLOŠKOG PROCESA | 113 |
| 9.3. KINETIČKI MODELI ĆELIJSKOG RASTA | 114 |
| 9.3.1. Struktura i složenost modela | 115 |
| 9.3.2. Korišćenje nestrukturiranih nesegregiranih modela za definisanje specifične brzine rasta | 116 |
| 9.3.2.1. Model fiksne zapremine | 116 |
| 9.3.2.2. Rast limitiran supstratom (Monodov kinetički model) | 117 |
| 9.3.2.3. Modeli sa inhibicijom rasta | 120 |
| 9.3.2.4. Model rasta filamentoznih mikroorganizama | 122 |
| 9.3.3. Složeni modeli mikrobnog rasta | 122 |
| 9.3.3.2. Hemijski strukturirani modeli | 123 |
| 9.3.3.3. Kibernetiski modeli | 124 |
| 10. KINETIKA I IZVOĐENJE BIOTEHNOLOŠKIH PROCESA U BIOREAKTORIMA | 125 |
| 10.1. KINETIKA MIKROBNIH PROCESA U IDEALNIM BIOREAKTORIMA | 125 |
| 10.1.1. Idealni šaržni bioreaktor | 126 |
| 10.1.1.1. Bilansiranje mase u i šaržnom bioreaktoru | 126 |
| 10.1.2. Protočni bioreaktor | 128 |
| 10.1.2.1. Bilansiranje mase u idealnom protočnom bioreaktoru | 130 |
| 10.1.2.2. Produktivnost protočnog bioreaktora sa idealnim mešanjem | 134 |
| 10.2. IZVOĐENJE BIOLOŠKIH REAKCIJA U BIOREAKTORIMA | 135 |
| 10.2.1 Izbor načina gajenja mikroorganizama | 135 |
| 10.3. MODIFIKACIJE ŠARŽNIH I PROTOČNIH REAKTORA | 137 |
| 10.3.1. Protočni reaktor sa recirkulacijom | 137 |
| 10.3.2. Višestepeni protočni reaktor | 139 |
| 10.3.3. Dolivni postupak | 141 |
| 10.3.4. Postupak sa perfuzijom | 143 |
| 10.4. SISTEMI SA IMOBILISANIM ĆELIJAMA | 144 |
| 10.4.1. Aktivna imobilizacija ćelija | 144 |

| | |
|--|-----|
| 10.4.2. Pasivna imobilizacija: Biološki filmovi | 150 |
| 10.4.3. Difuziona ograničenja u sistemima sa imobilisanim ćelijama | 152 |
| 10.4.4. Bioreaktori sa imobilisanim ćelijama | 153 |
| 10.4.5. Fermentacija čvrstih supstrata | 155 |
| 11. BIOTEHNOLOŠKI PROCESI SA ANIMALNIM ĆELIJAMA | 159 |
| 11.1. STRUKTURA I BIOHEMIJSKE KARAKTERISTIKE ANIMALNIH ĆELIJA | 159 |
| 11.2. ANIMALNA ĆELIJSKA KULTURA | 162 |
| 11.2.1. Prednosti i mane korišćenja animalne kulture | 162 |
| 11.2.2. Razvoj animalne ćelijske kulture | 163 |
| 11.2.3. Izvori i izolacija ćelijskih kultura | 165 |
| 11.2.3.1. Direktno izolovanje iz tkiva | 165 |
| 11.2. 4. Tipovi animalnih ćelija | 167 |
| 11.2. 5. Normalne i transformisane ćelije | 168 |
| 11.2.6. Diferenciranje ćelija | 169 |
| 11.2.7. Ćelijske kolekcije - banke animalnih ćelija | 171 |
| 11.2.8. Čuvanje ćelija | 172 |
| 11.3. KULTIVACIJA ANIMALNIH ĆELIJA | 172 |
| 11.3.1. Faze rasta u animalnoj kulturi ćelija | 173 |
| 11.3.2. Održavanje sterilnosti prilikom gajenja ćelijske kulture | 175 |
| 11.3.3. Oprema potrebna za kultivaciju animalnih ćelija | 176 |
| 11.3.4. Uslovi gajenja | 180 |
| 11.3.5. Hranjiva podloga | 180 |
| 11.3.5.1. Dodaci hranjivoj podlozi | 182 |
| 11.3.6. Praćenje i kontrola ćelijskog rasta | 183 |
| 11.3.7. Indirektne metode određivanja koncentracije ćelija | 184 |
| 11.3.7.1. Određivanje koncentracije glukoze | 184 |
| 11.3.8. Merenje vijabilnosti ćelija i citotoksičnosti na bazi smanjene sposobnosti rasta | 184 |
| 11.3.9. Identifikacija ćelijske linije | 186 |
| 11.3.10. Analiza ćelijskog ciklusa | 188 |
| 11.4. HIBRIDOMA ĆELIJE – IZVORI MONOKLONSKIH ANTITELA | 189 |
| 11.4.1. Monoklonska antitela i njihova proizvodnja | 189 |
| 11.4.1.1. Imunizacija | 191 |
| 11.4.1.2. Hibridizacija ćelija - postupak fuzije | 192 |
| 11.4.1.3. Selekcija ćelija | 193 |
| 11.4.2. Testovi za određivanje koncentracije monoklonskih antitela | 195 |
| 11.4.2.1. ELISA test | 196 |
| 11.4.2.2. RIA- radioimunotest | 199 |
| 11.4.2.3. Afinitivno vezivanje | 199 |
| 11.4.2.4. Imuno gel-elektroforeza | 199 |
| 11.4.3. Humana monoklonska antitela | 199 |
| 11.5. GAJENJE KULTURA ANIMALNIH ĆELIJA U VEĆIM RAZMERAMA | 200 |
| 11.5.1. Tipovi rektora za gajenje animalnih ćelija | 200 |
| 11.5.1.1. Bioreaktor sa mešanjem | 201 |
| 11.5.1.2. Air-lift bioreaktor | 203 |
| 11.5.1.3. Bioreaktor sa fluidizovanim slojem i kolona sa pakovanjem | 204 |
| 11.5.1.4. Bioreaktor sa keramičkim punjenjem | 204 |

| | |
|--|------------|
| 11.5.1.5. Bioreaktor sa šupljim vlaknima | 205 |
| 11.6. PROIZVODI NA BAZI ANIMALNE KULTURE | 205 |
| 11.6.1. Produktivnost sistema animalne ćelijske kulture | 206 |
| 11.6.2. Komercijalni proizvodi animalne ćelijske kulture | 207 |
| 11.6.2.1. Monoklonska antitela | 207 |
| 11.6.2.2. Virusne vakcine | 207 |
| 11.6.2.3. Glikoproteini iz ćelija sisara | 210 |
| 11.6.2.3.1 Interferoni | 210 |
| 11.6.2.3.2. Plazminogen aktivator | 212 |
| 11.6.2.3.3. Aktivatori zgrušavanja krvi | 213 |
| 11.6.2.3.4. Eritropoetin | 214 |
| 11.6.3. Rizici u proizvodnji proizvoda ćelijskih kultura | 214 |
| 11.6.3.1. Bezbednost ćelijske linije | 214 |
| 11.6.4. Ćelije kao proizvodi | 214 |
| 11.6.4.1. Inženjerstvo koža i tkiva | 215 |
| 12.6.4.2. Kulture organa | 215 |
| 12.6.4.3. Toksikološki testovi | 216 |
| 11.6.4.4. Genska terapija | 216 |
| | |
| 12. BIOTEHNOLOŠKI PROCESI SA BILJNIM ĆELIJAMA | 217 |
| 12.1. OSOBINE BILJNIH ĆELIJA I NJIHOVO GAJENJE <i>IN VITRO</i> | 218 |
| 12.1.1. Mikropropagacija biljaka | 219 |
| 12.2. PROIZVODNJA SEKUNDARNIH METABOLITA NA BAZI KULTURA BILJNIH ĆELIJA | 221 |
| 12.2.1. Parametri gajenja biljnih ćelija u cilju proizvodnje metabolita | 221 |
| 12.2.1.1. Osobine biljnih ćelija u kulturi | 223 |
| 12.2.2. Mehanizmi povećanja sinteze sekundarnih metabolita | 223 |
| 12.3. BIOREAKTORI ZA GAJENJE KULTURA BILJNIH ĆELIJA | 224 |
| 12.3.1. Bioreaktori za kulture u suspenziji | 224 |
| 12.3.2. Bioreaktori sa imobilisanim ćelijama | 226 |
| 12.3.3. Bioreaktori sa organizovanim tkivom | 227 |
| 12.4. EKONOMIČNOST KULTURE BILJNOG TKIVA | 229 |
| 12.5. KORIŠĆENJE GENTIČKOG INŽENJERSTVA U GAJENJU BILJAKA | 230 |
| 12.5.1. Tehnike za dobijanje transgenih biljaka | 232 |
| 12.5.1.1. Transformacija pomoću <i>Agrobacterium-a</i> | 232 |
| 12.5.1.2. Bombardovanje česticama (shot-gun) | 234 |
| 12.5.2. Ostvarivanje rezistencije na herbicide | 235 |
| 12.5.3. Ostvarivanje rezistencije na štetočine i bolesti | 236 |
| 12.5.3.1. Ostvarivanje rezistencije na insekte | 236 |
| 12.5.3.2. Ostvarivanje rezistencije na viruse | 236 |
| 12.5.4. Ostvarivanje boljeg kvaliteta biljaka | 237 |
| 12.5.4.1. Ostvarivanje veće trajnosti proizvoda | 237 |
| 12.5.4.2. Ostvarivanje boljih nutritivnih i tehnoloških osobina | 238 |
| 12.5.4.3. Genetčke manipulacije u cilju modifikacije metabolizma | 238 |
| 12.5.4.4. Genetčke manipulacije u cilju proizvodnje proteina (biljnih vakcina) | 238 |

| | |
|---|-----|
| 13. BIOTEHNOLOŠKI PROCESI SA GENETSKI MODIFIKOVANIM ĆELIJAMA | 239 |
| 13.1. UVOD | 239 |
| 13.2. UTICAJ PROIZVODA NA PROCESNU STRATEGIJU | 240 |
| 13.3. IZBOR SISTEMA VEKTOR-DOMAĆIN | 241 |
| 13.3.1. Pregled sistema domaćina | 241 |
| 13.3.2. <i>Escherichia coli</i> | 242 |
| 13.3.3. Gram-pozitivne bakterije | 244 |
| 13.3.4. Niže eukariotske ćelije | 245 |
| 13.3.5. Ćelije sisara | 247 |
| 13.3.6. Sistem ćelije insekata - baculovirus | 248 |
| 13.3.7. Korišćenje transgenih životinja | 249 |
| 13.3.8. Korišćenje transgenih biljaka i kulture biljnog tkiva | 250 |
| 13.3.9. Poređenje različitih sistema i strategija | 250 |
| 13.4. OGRANIČENJA PROCESA: GENETIČKA NESTABILNOST | 252 |
| 13.4.1 Segregacioni gubitak | 253 |
| 13.4.2. Strukturna nestabilnost plazmida | 254 |
| 13.4.3. Mutacije ćelija domaćina | 254 |
| 13.4.4. Nestabilnost uslovljena većom brzinom rasta | 254 |
| 13.5. PROJEKTOVANJE I KONSTRUKCIJA PLAZMIDA | 255 |
| 13.6. PREDVIĐANJE INTERAKCIJA ĆELIJA DOMAĆINA I VEKTORA I GENETIČKE NESTABILNOSTI | 259 |
| 14. BIOTEHNOLOŠKI PROCESI SA MEŠANIM KULTURAMA | 265 |
| 14.1. UVOD | 265 |
| 14.2. OSNOVNE VRSTE INTERAKCIJA U MEŠANIM KULTURAMA | 265 |
| 14.3. MODELI INTERAKCIJA U MEŠANIM KULTURAMA | 265 |
| 14.4. MEŠANE KULTURE U PRIRODI | 269 |
| 14.5. INDUSTRIJSKO KORIŠĆENJE MEŠANIH KULTURA | 269 |
| SPISAK SKRAĆENICA | 273 |
| LITERATURA | 277 |