

E.coli SCALE-UP FERMANTASYONU: 500 ML MINIBİO'DAN 3 L LABORATUVAR BİYOREAKTÖRÜNE



Yüksek Kimyager Hakan DİBEK
ANT TEKNİK CİHAZLAR
Applikon Biotechnology
Ürün Sorumlusu

ÖZET

Biyoproses ölçeklendirme (scale-up), yeni veya geliştirilmekte olan bir prosesin laboratuvar ölçeğinden üretim ölçeğine aktarılması anlamına gelmektedir. Maliyeti düşürmek için, küçük ölçekli bir biyoreaktör kullanılarak büyük ölçekli koşulların simüle edilmesi bir biyoprosesi iyileştirmenin ilk adımıdır. Bu çalışmada, Applikon'un 500 mL ve 3 L'lik nominal hacimlerdeki biyoreaktörlerinde tipik bir E. coli fermantasyonu gerçekleştirilmiş ve küçük ölçekten büyük ölçeğe scale-up çalışmaları yapılmıştır. Her iki biyoreaktör için de aynı kültür (cultivation) koşulları kullanılmıştır. Sonuçlar optik yoğunluk (OD600) ölçümleri ve proses kontrolü temel alınarak değerlendirilmiş; parametre kontrolü (pH, T, dO2) ve hücre büyüme profilinin her iki ölçekte de aynı davranış sergilediği gözlemlenmiştir.

GİRİŞ

Antibiyotikler, alkoller, amino asitler, enzimler ve organik asitler gibi birçok biyoteknolojik ürünün ticari olarak üretimi için başlangıç noktası, küçük hacimli laboratuvar biyoreaktörlerinin yüz binlerce litrelik biyoreaktör ölçeklerine uygun olarak optimize edilmesidir. Bu çalışmanın amacı 3 L ve 500 mL biyoreaktör arasındaki ölçeklenebilirliği araştırmak, proses parametrelerini ve kültür (cultivation) sırasında elde edilen büyüme profillerini değerlendirmektir. Tipik bir E. coli fermantasyonu, toplam hacmi 3 L olan 2 L çalışma hacimli ve toplam hacmi 500 mL olan 400 mL çalışma hacimli iki farklı biyoreaktör

kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

MALZEMELER VE YÖNTEMLER

E. coli fermantasyonları 3 L ve 500 mL biyoreaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Her iki biyoreaktör için de aynı konfigürasyon, aynı pre-kültür ve besiyeri ile kullanılmıştır. Ayrıca, pH, çözülmüş oksijen (dO2) ve sıcaklık gibi parametreler de her iki sistem için eşdeğer olarak kontrol edilmiştir. Proses esnasındaki biyokütle büyümesi, 600 nm'deki optik yoğunluk (OD600) farklı zamanlarda ölçülerek takip edilmiştir.

A | 500 mL MiniBio

- E. coli'nin batch fermantasyonu için toplam hacmi 500 mL olan 400 mL çalışma hacimli bir cam otoklavlanabilir biyoreaktör (Applikon Biotechnology) kullanılmıştır. Biyoreaktörün proses kontrolünde, bu amaca yönelik özel bir yazılım olan my-control kullanılmıştır. Biyoreaktör konfigürasyonu Şekil 1A'da gösterilmektedir. Kültür kabı konfigürasyonunda 2 rushton impeller, bir L-tipi sparger, DO2, pH ve sıcaklık sensörleri, numune alma septumu ve pH kontrolü için bir sıvı ekleme portu bulunmaktadır.
- Numuneler, örnekleme septumu boyunca 0.2 mL kültürün steril bir şırınga yardımı ile çekilmesiyle alınmıştır. Optik yoğunluk (OD), spektrofotometre ile 600 nm'de ölçülmüştür.

B | 3 L Biyoreaktör

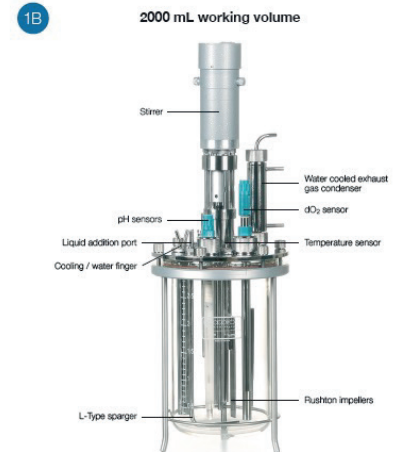
- E. coli'nin batch fermantasyonu için toplam hacmi 3 L olan 2 L çalışma hacimli bir cam otoklavlanabilir biyoreaktör (Applikon Biotechnology) kullanılmıştır. Biyoreaktörün proses kontrolünde, bu amaca yönelik özel bir yazılım olan Ez-control kullanılmıştır. Biyoreaktör konfigürasyonu Şekil 1B'de gösterilmektedir. Kullanılan insert'ler, 500 mL biyoreaktördeki ile aynıdır. Biyoreaktör, dO2, sıcaklık ve pH sensörleri ile kurulmuş ve bu parametreler, Ez-control yazılımı ile kontrol edilmiştir. Havalandırma açık borulu L tipi sparger ile gerçekleştirilmiştir. Kültür kabı konfigürasyonunda 2 rushton impeller, numune alma septumu ve pH kontrolü için ilave port bulunmaktadır.
- Numuneler, örnekleme septumu boyunca 1.0 mL kültürün steril bir

şırınga yardımı ile çekilmesiyle alınmıştır. Optik yoğunluk (OD), spektrofotometre ile 600 nm'de ölçülmüştür.

oksijeni kontrol etmek için gaz girişleri ısıtma / soğutma peltieri ve sensörleri ile mini-Bio'nun konfigürasyonu.

C | Aktüatörler ve ayar noktaları

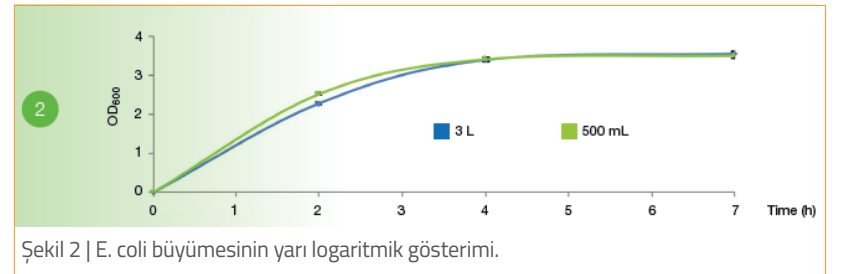
- dO2, her iki biyoreaktör için bir hava valfi kullanılarak, % 30 hava doygunluğundan başlayarak yukarı doğru kontrol edilmiştir.
- pH, amonyak sıvı çözeltisi (% 25 V / V) kullanılarak pH 7.0'ye ayarlanmıştır.
- Sıcaklık 37°C olarak ayarlanmıştır. Biyoreaktör sıcaklık kontrolü, 500 mL için ısıtma / soğutma peltieri ile 3 L için ise bir ısıtma battaniyesi ve soğuk bir parmak ile sağlanmıştır.
- Karıştırıcı hızı, 500 mL için 2000 rpm, 3 L için ise 1000 rpm'e ayarlanmıştır. Belirlenen koşullar için her iki biyoreaktörde ölçülen KLa yaklaşık olarak 217 saat-1 olmuştur.
- Her iki kontrolörden (3 L biyoreaktör için Ez-control, 500 mL biyoreaktör için my-control) kaydedilen parametrelerin proses değerleri, Applikon Biotechnology'nin SCADA yazılımı ile toplanmıştır.



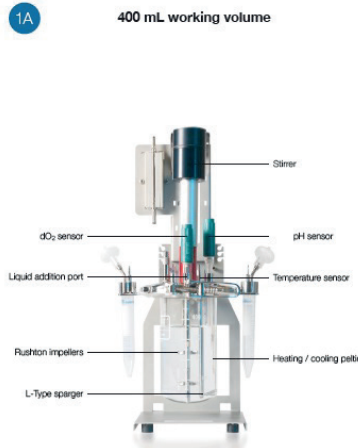
B | pH, sıcaklık ve çözülmüş oksijen ölçüm sensörleri ile STR tip (karıştırımlı) biyoreaktör 3 L.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3 L'lik ve 500 mL'lik biyoreaktörler arasındaki ölçeklenebilirliği araştırmak için 7 saat süreyle paralel E. coli fermantasyonları gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2 | E. coli büyümesinin yarı logaritmik gösterimi.



Şekil 1 | A | Sıcaklık, pH ve çözülmüş

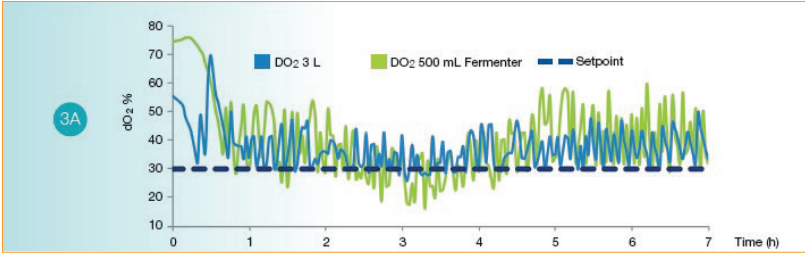
Farklı zaman noktalarında ölçülen optik yoğunluk (OD) sonuçları Şekil 2'de gösterilmektedir.

Bu çalışmanın sonuçları, 3 L ve 500 mL'lik biyoreaktörlerdeki büyüme koşullarının birbirine yakın ve kendi aralarında tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

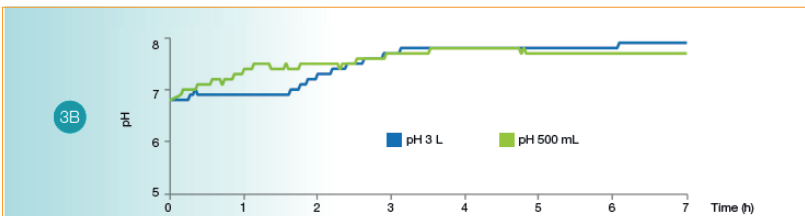
Her iki ölçek için de aynı KLa değerinin elde edilebilmesi ve iki kültür kabının benzer geometride olması, söz konusu konfigürasyonların yukarı ve aşağı ölçeklendirme (scale-up/down) için uygun olduğunu göstermiştir.

KONTROL EDİLEN PARAMETRELER

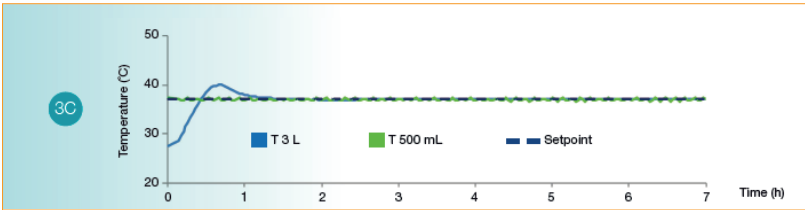
Şekil 3A, 3B ve 3C'de ez-control (3 L biyoreaktör) ve my-control (500 mL biyoreaktör) ile kontrol edilen parametreler arasındaki karşılaştırma gösterilmektedir.



Şekil 3A | ez-control ve hava valfinin aktüatör olarak kullanıldığı 3 L'lik ve 500 mL'lik biyoreaktörlerdeki çözünmüş oksijen - DO2.



Şekil 3B | ez-control ve bir alkali peristaltik pompanın aktüatör olarak kullanıldığı 3 L'lik ve 500 mL'lik biyoreaktörlerdeki pH.



Şekil 3C | ez-control ve soğuk parmak ve ısıtıcı battaniyenin kullanıldığı 3 L'lik ve 500 mL'lik biyoreaktörlerdeki sıcaklık - T.

SONUÇLAR

- 3 L ve 500 mL'lik biyoreaktörlerde, aynı koşullar kullanılarak paralel E. coli fermentasyonları gerçekleştirilmiştir. Biyokütle sonuçları, her iki biyoreaktörün benzer bir büyüme oranına izin verdiğini göstermiştir. 3 L ve 500 mL'lik biyoreaktörler için sırasıyla 7.12 ve 6.81'lik bir OD600 elde edilmiş ve iki biyoreaktörün, % 4.4'lük bir farkla, birbirine oldukça yakın biyokütle sonuçları gösterdiği gözlemlenmiştir.
- İki biyoreaktörde, 3L için ez-control, 500 mL için my-control, olmak üzere, iki farklı Applikon kontrolör kullanılmıştır. İki konfigürasyon arasındaki tek fark sıcaklık kontrolüdür. Sonuçlar, farklı ölçekteki iki biyoreaktörde DO2, pH ve sıcaklık parametrelerinin mükemmel bir şekilde kontrol edildiğini ve E. coli'nin aynı seviyede büyüdüğünü göstermiştir.
- Yapılan çalışmayla Applikon'un 3 L ve 500 mL biyoreaktörleri arasındaki ölçeklenebilirlik kanıtlanmış ve her iki biyoreaktörün de küçük ölçekli prosesler için güvenilir seçenekler olduğu gösterilmiştir.

REFERANS

Carolina Santos Fernandes, MSc, Cristina Bernal Martinez, PhD, Paul ter Huurne, BSc, Timo Walvoort, MSc, "E.coli scale-up fermentation from mini to laboratory bioreactor" poster

IPMS