

REKOMBINÁNS FEHÉRJÉK GYÁRTÁSA – II/1

A rekombináns fehérjék gyártásának kifejlesztése:

I. A törzs kialakítása

- 1) A molekula megismerése (aminosav sorrend, glikozilálás)
- 2) Megfelelő analitika kidolgozása
- 3) Döntés a gazdaszervezetről és a vektorról
- 4) Kodonoptimalás
- 5) A génszerelvény összeállítása (promóterek, operátorok, célgén, kísérő fehérjék, terminátor)
- 6) Klónozás, expresszió, szelekció
- 7) Sejtbankok létrehozása

II. Technológia kialakítása

- 1) Upstream optimalás (fermentációs körülmények)
- 2) Downstream optimalás (végtermék izolálása)



1. Upstream optimalás

A fermentációs technológia optimalása:

1. A tápoldat összetétele
2. Fermentációs paraméterek (pH, hőmérséklet, stb.)
3. Bioreaktorok, készülékek
4. Fermentációs technikák

Mindez nagyon eltérő a különböző gazdaszervezetek (mikroorganizmusok és állati sejtek) tenyésztésénél, ezért célszerű külön tárgyalni.



1. Mikrobiális fermentációk

1. A tápoldat összetétele
(Indukció)
2. Fermentációs paraméterek (pH, hőmérséklet, stb.)
3. Bioreaktorok, készülékek
4. Fermentációs technikák



1/1 Tápoldatok mikroba fermentációknál

Az ipari tömegtermelésben: gazdasági szempontok: olcsó legyen
→ melléktermékek, hulladékok

C- forrás: keményítő, cukrok (melasz, tejcukor, szulfitszennylég),
néha kőolaj, alkoholok, szerves savak

N-forrás: szerves: műtrágya minőségű sók (ammónium-nitrát,
karbamid, stb.)

szerves: (olajmentesített) szójadara, élesztőkivonat,
húskivonat, kazein...

A gyógyszeriparban ez nem megengedett, a nehezen reprodukálható, szennyezett anyagok helyett tiszta vegyszerekből
összemért tápoldatokat használnak (chemically defined, CD).



Példa: rekombináns *E. coli* tápoldatai

Oltóanyag (inokulum) tápoldat

Glicerín 99,5%
 KH_2PO_4
 K_2HPO_4
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
Kanamicin szulfát
 Tiámin HCl
 Boric acid
 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

Termelő tápoldat

Glicerín 99,5%
 KH_2PO_4
 K_2HPO_4
 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
Kanamicin szulfát
 Tiámin HCl
 Boric acid
 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
PPG2000

Rátáplált (feed) tápoldat

Glicerín 99,5%
 $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
EDTA
Kanamicin szulfát
 Boric acid
 $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
 $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
 $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
 $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
 $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$



Példa: rekombináns *E. coli* tápoldata

A coli esetében a glükóz szénforrás lenne kézenfekvő, de ebből jelentős mennyiségű ecetsavat termel. Ezért alkalmaztak glicerín szénforrást.



Indukció

Az *E. coli*-val történő fehérje termelést rendszerint indukálható promóterrel valósítják meg. Leggyakrabban az IPTG-vel indukálható lac promótert építik be.

Some inducible promoters used for separation of the production of recombinant proteins into a cell growth phase and a production phase.

Host	Promoter	Induction method
<i>E. coli</i>	P_R and P_L	Temp. shift 30 to 40°C
	lac	IPTG addition
	pho	Phosphate starvation
	trp	trp starvation or addition of IAA
	tac	IPTG addition
<i>S. cerevisiae</i>	GAL1	Galactose addition
	PHO5	Phosphate starvation

IPTG: isopropyl β -thio-D galactoside IAA: β -indolyl acrylic acid

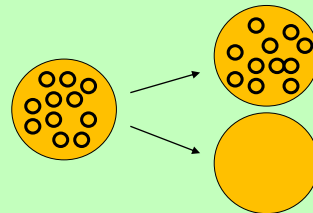


Indukció

Az idegen fehérje termelése megterhelő a gazdaszervezet metabolizmusa számára.

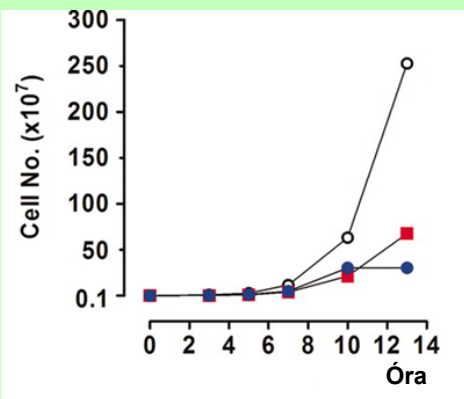
Célszerű a szaporodás alatt szüneteltetni a rekombináns fehérje termelését, majd bekapcsolni azt. Így kisebb a megterhelés és a gén esetleges „elvesztése” kisebb kárt okoz. Előfordulhat:

- Strukturális változás (a plazmid elpusztul, vagy nem termel fehérjét)
- Szegregáció (plazmidmentes leánysejtek jelennek meg az osztódás során)



Plazmid instabilitás

Ezek a plazmidmentes sejtek néhány generáció alatt túlnövik (outnumber) a plazmid-tartalmú sejteket, mert gyorsabban nőnek. Ha később indítjuk meg a termelést, akkor ez nem fordulhat elő.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

9

Rekombináns és plazmid-mentes sejtek ATP igénye

Gazda : E.coli; szénforrás: glükóz; 100 plazmid/sejt;

A plazmid móltömege 2.9 MDa;

A rekombináns fehérje 50% -a az összes fehérjének.

	Plazmid-mentes sejtek 10 e(-16) mol/cell	Rekombináns sejtek 10 e(-16) mol/cell
ATP felhasználás:		
poliszacharidok	5.75	5.73
sejt saját fehérje	57.39	57.22
termék fehérje	0.00	57.22
RNS	12.24	12.20
kromoszóma DNS	2.96	2.95
plazmid DNS	0.00	0.27
bioszintézisére		
transzportra	11.88	20.82
összesen:	97.17	163.38



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

10

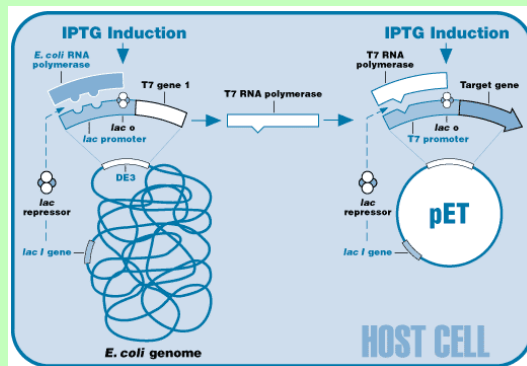
Kettős indukció: T7 polimeráz

Ez a módosított *E. coli* törzs olyan T7 RNS polimeráz gént tartalmaz a kromozómáján, amely IPTG-vel indukálható.

A célgén elé egy (szintén IPTG-indukálható) T7 promotert kell beépíteni.

Amíg nincs IPTG a rendszerben, addig a T7 RNS polimeráz sem képződik.

Kettős biztonság, ráadásul a T7 polimeráz gyorsabb.



1/2 Fermentációs paraméterek: hőmérséklet

Az *E. coli*-nál a növekedési optimum 37 °C, de a fehérje termelésnél gyakran alacsonyabban tartják.

Példa: A GCSF fehérjét a *coli* zárványtestek formájában termeli. 37 °C-on ezek olyan kompakta, hogy a szokásos módszerekkel nem lehet feloldani. 32 fokon puha, laza szerkezetűek, oldhatóak, viszont nem lehet lecentrifugálni. Emiatt olyan csökkenő hőfokprofil optimáltak, amely a szaporodásban 37 °C, azután fokozatosan csökken.

Élesztőknél a szokásos hőfok 28-30 fok, de minden technológiánál célszerű újra optimalni.



Fermentációs paraméterek: pH

Az optimum a baktériumoknál, így az *E. coli*-nál közel semleges, 6,5-7,5 között van. Az anyagcsere savakat termel, emiatt lúg adagolással tartják a kívánt értéket.

Az élesztők fermentációs optima rendszerint savasabb tartományban van, de pH=5 alatti érték nem jellemző.

Az optimalásnál célszerű megvizsgálni a változó pH profil lehetőségét is.



Fermentációs paraméterek: oxigén

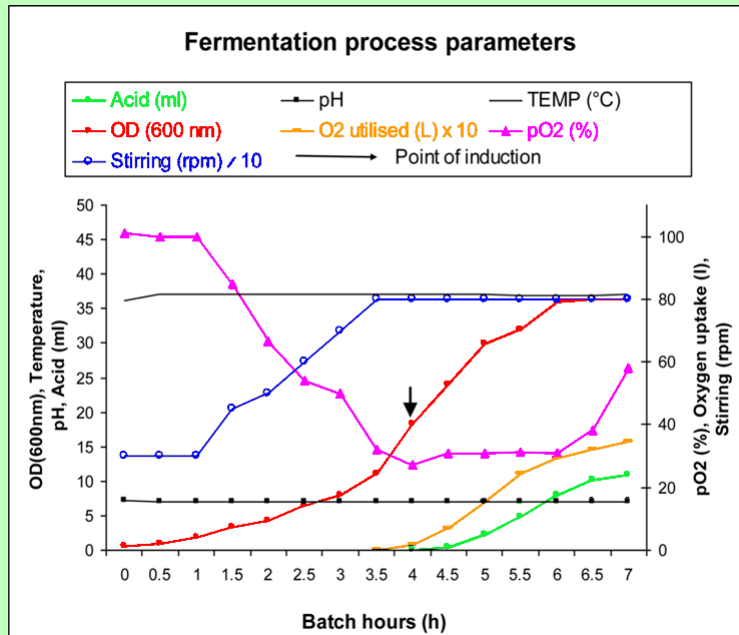
Mind a *coli*, mind az élesztő fakultatív anaerob mikroorganizmus, de a rekombináns fehérje termelésnél teljesen aerob anyagcserére törekednek. Ehhez intenzív levegőztetésre és keverésre van szükség.

Az oldott oxigénszintet elektróddal folyamatosan mérik, és szabályozzák, nem engedik egy megállapított érték alá csökkenni.

Ezzel összeállt egy kép a bakteriális fermentációról:



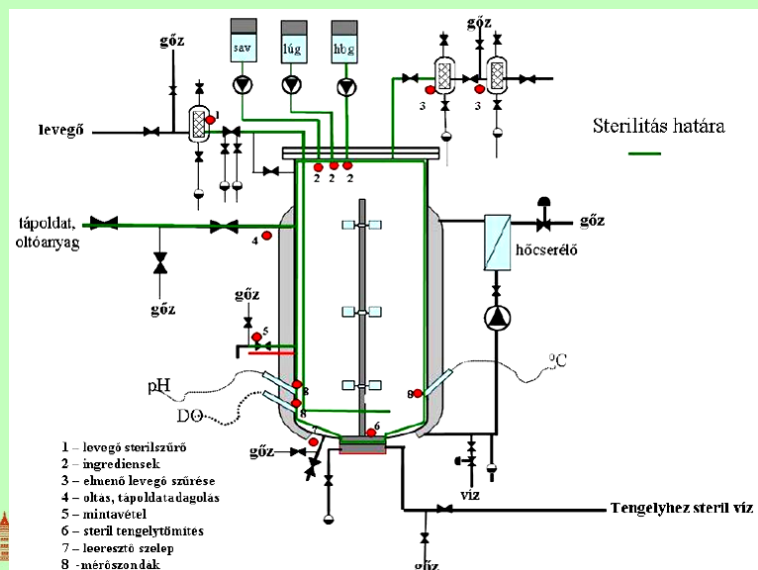
E. coli fermentáció lefolyása egy IPTG-indukálható rekombináns fehérje termelő technológiában



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

1/3 Ipari fermentor jellemző szerelvényei



16

1/4 Fermentációs technikák

Az indukció beépítése a technológiába kétszakaszos fermentációt (sejtszaporítás + termékképzés) tételez fel, ezzel kizárja a félfolytonos és folytonos fermentációs technika alkalmazását.

Ennek megfelelően szakaszos (batch), illetve rátáplálásos (fed batch) fermentációval termelnek. A rátáplálás (feed) összetétele más, mint a szaporító tápoldaté.

A rátáplálással a fermentációs idő meghosszabbítható, nagyobb mennyiségű és koncentrációjú termék keletkezik.



2. Állati sejtek tenyésztése

1. A tápoldat összetétele
2. Fermentációs paraméterek (pH, hőmérséklet, stb.)
3. Bioreaktorok, készülékek (felületi és szubmerz)
Egyszer használatos eszközök
4. Fermentációs technikák



2/1 Az állati sejtenyésztés tápoldatai

Tápoldatok: reprodukálni kell a természetes környezetet: vér, sejtközi folyadék (sokkomponensű, drága)

Szénforrás: glükóz (mint a vércukor), + glutaminsav

15 - 20 féle aminosav, vitaminok, koenzimek, lipidek, ionok (pontos összetétel, pH, ozmózis nyomás)

A sejtek érzékenyek a szerves ionok pontos koncentrációjára, pl az üveg edényekből kioldódó anyagokra, ezért vagy műanyag edényeket, vagy víztöltéssel többször autoklávozott üveget használnak tenyésztésükhöz.

A víznek is különlegesen tisztának kell lennie (ionmentes, szervesanyag-mentes, endotoxin-mentes, pirogén-mentes) és ezt is műanyag edényben tárolják.



Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium					
Component	D5546 [1x] g/L	D5648 g/L		D5546 [1x] g/L	D5648 g/L
INORGANIC SALTS					
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379	0.10379
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS		
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Niacinamide	0.004	0.004
AMINO ACIDS					
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—	0.004
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004	—
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER		
L-Leucine	0.105	0.105	D-Glucose	1.0	4.5
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	0.0159	0.0159
L-Phenylalanine	0.066	0.066	Pyruvic Acid • Na	0.11	—
L-Serine	0.042	0.042	ADD		
L-Threonine	0.095	0.095	Glucose	—	—
L-Tryptophan	0.016	0.016	L-Glutamine	0.584	—
			Sodium Bicarbonate	—	3.7

Az állati sejtenyésztés tápoldatai

SZÉRUM: a sejtvonalak nagy része igényli a vérfehérjék jelenlétét is → ezt újszülött állatok (borjú) vérszérumával biztosítják (5-15%). Ez szörnyű drága (és nehezen reprodukálható), ezért törekednek a minimalizálására, helyettesítésére vagy teljes elhagyására.

A szérumentes, kémiai komponensekből összemért tápoldatok olcsóbbak, állandó az összetételük, és reprodukálhatóbbak az eredmények, kisebb a fertőzés kockázata, könnyebb a fehérje termékek izolálása.

Pl. próbálkoznak a szérum részbeni vagy teljes pótlására hidrofíll polimerekkel pl. dextránnal.

Léteznek olyan sejtvonalak, amelyek a szérumból egyedül az inzulin jelenlétét igénylik (de ez lehet rekombináns inzulin is).



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

A szérum aktív komponensei

Important Components of Serum and Their Probable Role in Cell Culture

Component	Probable function
Proteins	
Albumin	Osmoticum and buffer Lipid, hormone, mineral carrier
Fetuin	Cell attachment
Fibronectin	Cell attachment
α_2 -Macroglobulin	Trypsin inhibitor
Transferrin	Binds iron
Polypeptides	
Endothelial growth factor (ECGF)	Mitogen ^a
Epidermal growth factor (EGF)	Mitogen
Fibroblast growth factor (FGF)	Mitogen
Insulin-like growth factors (IGF1 and IGF2)	Mitogen
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Mitogen and major growth factor
Hormones	
Hydrocortisone	Promotes attachment and proliferation
Insulin	Promotes uptake of glucose and amino acids
Growth hormones	Mitogen—present in fetal sera
Metabolites and nutrients	
Amino acids	Cell proliferation
Glucose	Cell proliferation
Keto-acids (e.g., pyruvate)	Cell proliferation
Lipids (e.g., cholesterol)	Membrane synthesis
Minerals	
Iron, copper, zinc, and selenium	Enzymes and other constituents
Inhibitors	
γ -globulin	
Bacterial toxins from prior contaminants	
Chalones (tissue-specific inhibitors)	



BN

2/2 Az állati sejtenyésztés körülményei

A sejtek nagyon érzékenyek pl. a nyírásra:

- nagyon kíméletes keverés,
- sok sejtvonal érzékeny a buborékokra

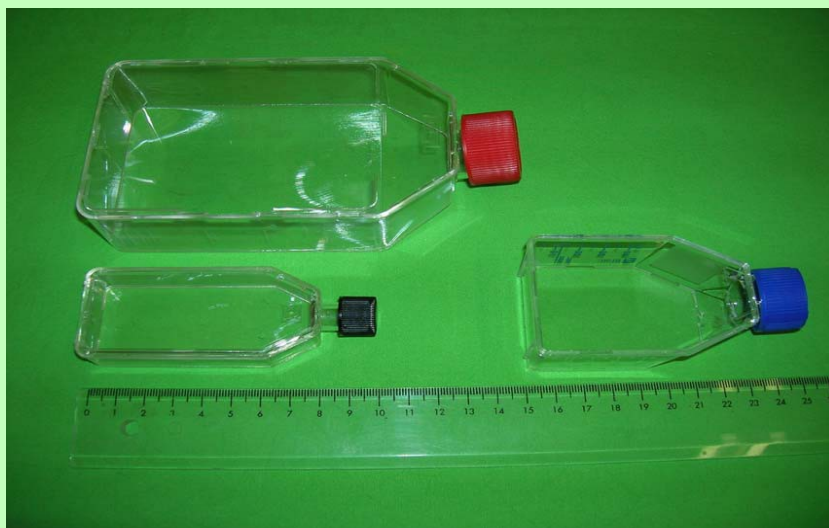
Az oxigénigény nagyon kicsi, rendszerint elég a fejtérfogatot átöblíteni levegővel. Sok sejtvonal kedveli a CO₂ jelenlétét (2-5%)

A pH=7,4, az ozmolaritás 300-400 milliozmól, azonos a vérrel.

Hőmérséklet: emlős sejteknél 37°C, madársejteknél 41°C



2/3 Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

25

Laboratóriumi tenyésztő edények (felületi)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

26

A felület növelése

Multitray



roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

Forgó palackok/roller bottles



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

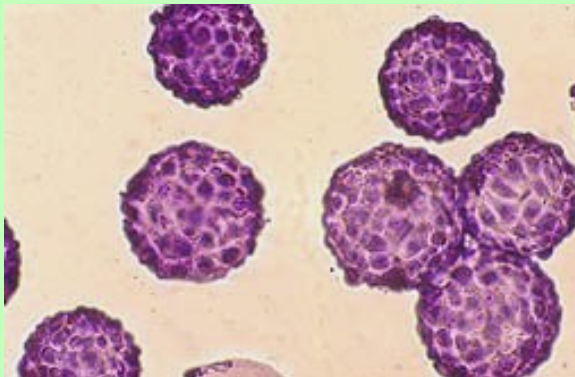
28

Mikrokarrises tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis



kialakult monolayer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú keverés

Mikrokarrises és szuszpenziós tenyésztés



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

30

Minibioreaktorok mikroba és emlős sejtekhez



12 ml („tic-tac doboz”)



200 ml

Egyedi hőmérséklet-, pH-, DO-, pCO₂-, keverés-szabályozással, automatikus mintavételezéssel.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

Bioreaktorok emlős sejtekhez



Térfogat: 6x2 liter, közös szabályozó egység



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32

Kevert reaktorok

Általánosan szuszpenziós tenyésztéshez, de mikrokarrierrel felületi tenyésztésekhez is használható.

Max. 10.000 liter (pl: interferon, tPA)

Energiabevitel kisebb, kevesebb O_2 kell, így kevésbé károsodik a sejt, néha elegendő a felületi levegőztetés, a cél csak a homogenizálás és szuszpenzióban tartani a sejteket/mikrokarriereket

Diffúziós levegőztetés: szilikon csövek falán át, nincs károsodás

Keverő: propeller, hajócsavar, lekerékített formák, 25-250rpm

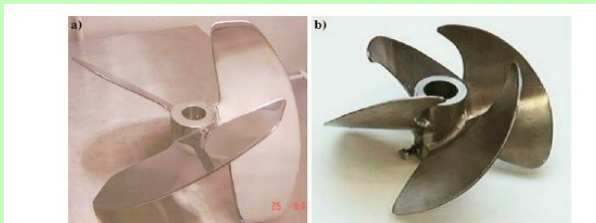


Fig. 13 (a) An ABEC 'elephant ear' impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Léptéknövelés 1000 literre



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Léptéknövelés 10 000 literre



Egyszer használatos bioreaktorok

Single-Use Bioreactors

Advantages:

- No CIP/SIP required
- Quick turnaround time
- Lower fixed costs
- Increased flexibility
- Reduced cleaning validation
- Faster procurement & implementation



Courtesy of Wave Biotech, LLC

HyClone S.U.B.



Courtesy of HyClone

Disadvantages:

- Scaling issues
- Heavy reliance on suppliers for consumables
- **Most systems still require the use of traditional (non-disposable) probes**

Xcellerex XDR




Courtesy of Xcellerex, Inc.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Egyszer használatos bioreaktorok

 sartorius stedim
biotech

CultiBag STR 200L Bag Holder: Easy and Efficient



Holder Design:

- Disconnectable from control tower to allow connection spare bagholder skid
- ⇒ no time loss due to bag preparation, harvesting, further process steps
- ⇒ very low operational downtime of equipment
- Opening for harvesting port at lowest point
- Double door for easy installation bag



Egyszer használatos bioreaktorok

Rozsdamentes
acél héj
(állandó)
(1000 literig)



Egyszer-
használatos
bioreaktor zsák

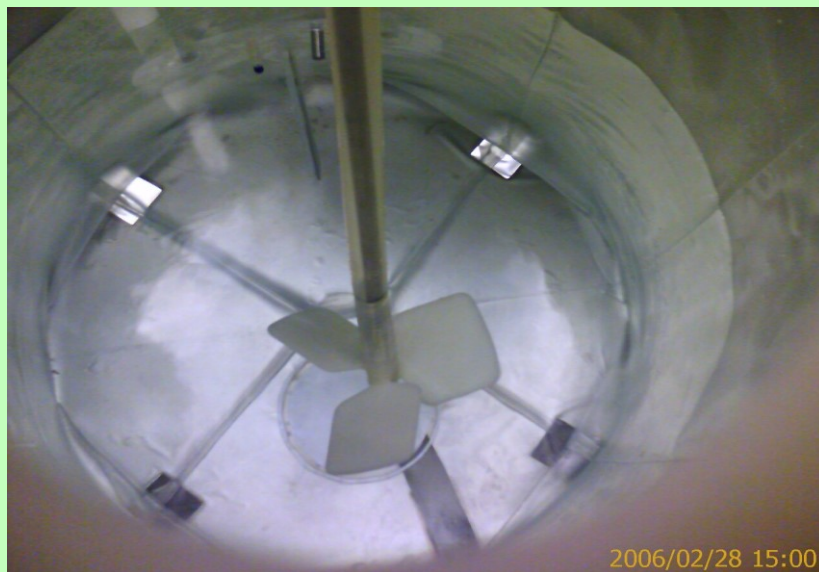


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

A keverőszár behelyezése

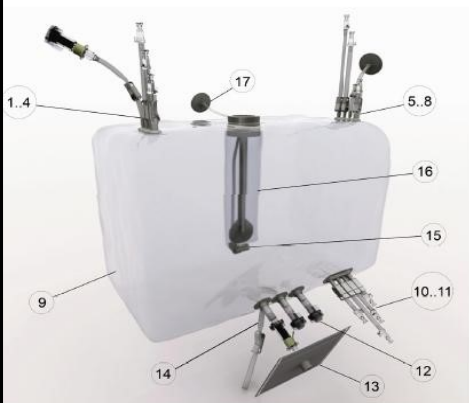


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Egyszer használatos bioreaktorok



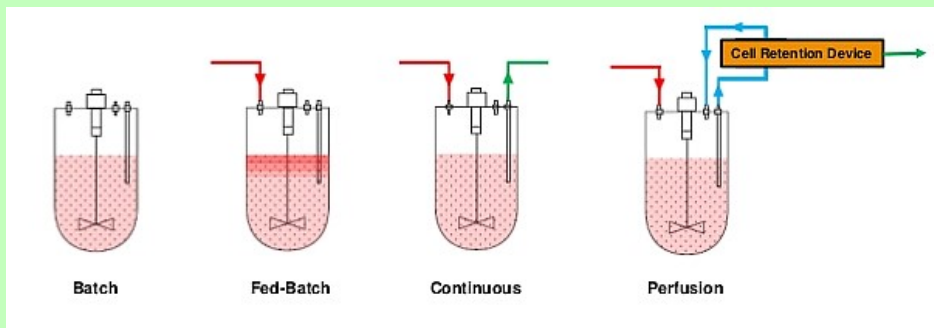
Line	Description
1..4	Multi port fitment - Can be used for: Supplement addition, Gas exhaust/Foam trap assembly inlet, pH regulation inlet, Cell culture Media or Cell addition, ...
5..8	Multi port fitment - Can be used for: Component addition inlet, Cell culture Media or Cell addition, Gas inlet, ...
9	Disposable bioreactor bag (ADCF barrier film)
10	Sampling exit
11	Perfusion connection/Extra sampling connection
12	Connection for pH,T or DO probe with sterile Kleopak connector
13	Sensing probe assembly to be connected to (12) by Kleopak counterpart
14	Easy drain connector
15	Micro or macro-sparging unit
16	Paddle mixing stick surrounded by sleeve
17	Gas inlet through sparging unit



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2/4 Tenyésztési módszerek összehasonlítása

A szuszpenziós vagy mikrokarrieres állati sejt tenyészeteket többféle technikával is lehet szaporítani:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

42

Tenyésztési módszerek összehasonlítása

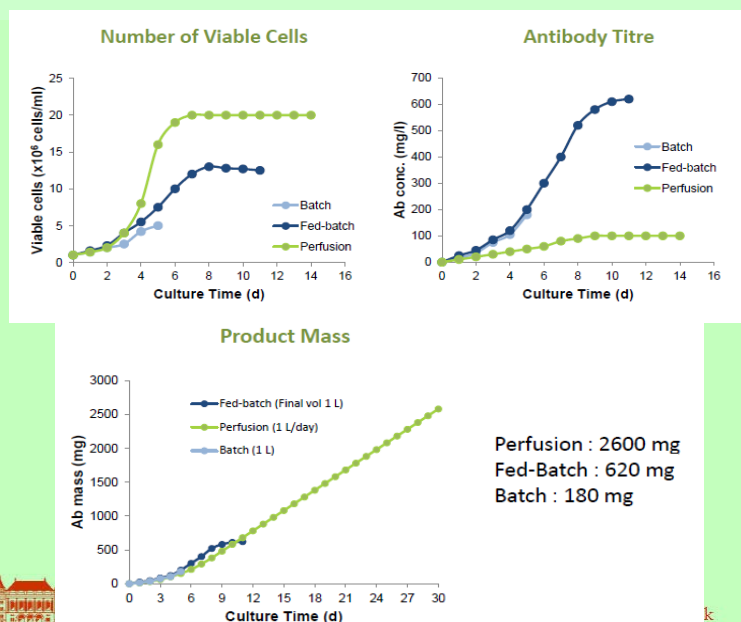
Szakaszos (batch): kis produktivitás, a sejtkoncentráció $1-2 \times 10^6$ sejt/ml, tenyésztés 3-5 nap

Rátáplálásos (fed-batch): +glükóz +aminosavak, 1-3 hét, nagyobb a produktivitás, mint szakaszosan, de toxikus metabolitok felhalmozódása hat a termelésre és a termékminőségre.

Folytonos (perfúziós): sejtkoncentráció $3-5 \times 10^7$ sejt/ml, 6-8 hét, termék is koncentráltabb, a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a. Jó a szubsztrát ellátottság, és jó a toxikus metabolitok eltávolítása.



Tenyésztési módszerek összehasonlítása



Titernövelés: csökkenő költségek

Titre Improvements

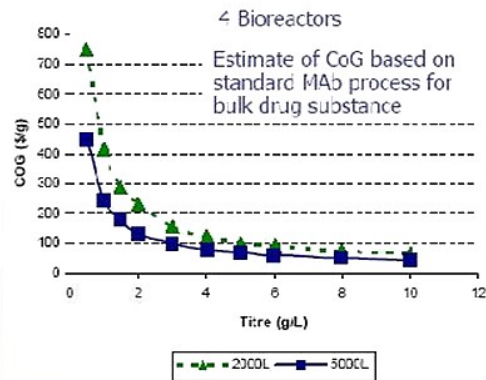
- Important cost benefits as titres go beyond 1g/L
- These diminish as we go beyond 5g/L

Beyond 5g/L

- Downstream cost dominates
- In this example the plateau is just under \$100/g

Challenge in DSP

- Bioreactors decrease in size?
- Cope with increased titres
- Need to drive out costs
- Implications for facility design



Results from Biopharm Services Generic MAb cost model
Bulk API Direct manufacturing costs



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

Egy 1000 literes fed-batch technológia tipikus adatai

Hasznos térfogat:	600-950 liter
Reaktor típusa:	S.U.B. 1000L
Inokulum:	~ 60-80 l (induló térfogat/10) Az inokulum3 tenyészetet átoltják a termelő bioreaktorba, az induló sejtszám $0.4-0.6 \times 10^6$ sejt/ml.
Tápoldat térfogat:	530 l alap tápoldat (PCHO)
Rátáplálás:	adagolás a 3, 5, and 7 napon, „feed” tápoldat
Térfogata:	15% (~90 l) $(V_{\text{alap tápoldat}} + V_{\text{inokulum}}) \times 0.15$
Glükóz adagolás:	Gyakori at-line mérés, kézi adagolás a számított fogyáshoz megfelelően
Fizikai paraméterek:	Hőmérséklet: 37 °C, pH: 7.15, keverés: 40-60 rpm, DO ₂ : 40%, fejnnyomás: 0-50 mbar
Ozmoláriás:	<400 mOsmol
pH szabályozás:	10-16% H ₃ PO ₄ oldattal, 0.5-0.6 M Na ₂ CO ₃ oldattal
Időtartam:	7-9 nap

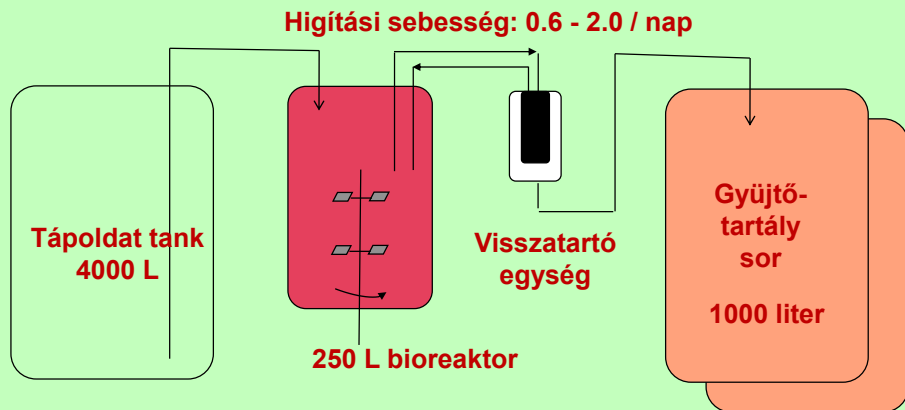


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

46

Tenyésztési módszerek: folyamatos, sejtviisszatartással

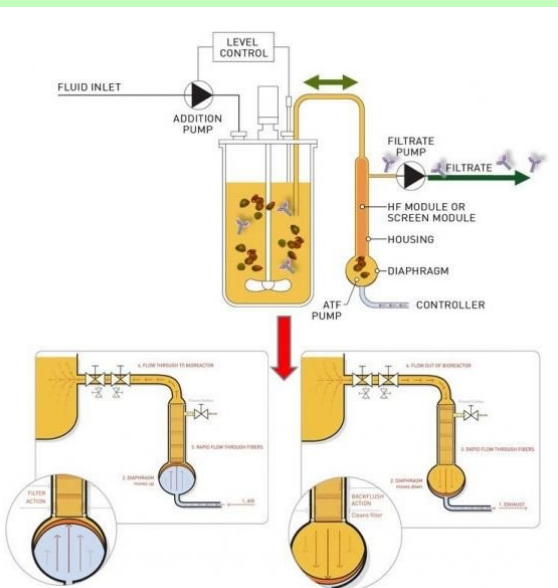
Kevert tank reaktorban szubmerz tenyésztés, folyamatos átfolyással, sejtviisszatartással, vagy sejt és termék viisszatartással.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

Sejtviisszatartásos (perfúziós) technológiák



48

a és Élelmiszertudomány Tanszék

Sejtvisszatartásos (perfúziós) technológiák

Alternatív megoldás: forgó, henger alakú rozsdamentes fémszita.

Résméret: 20 μm Sejtvisszatartás: 8 μm

Élő sejt visszatartás: 97-100%

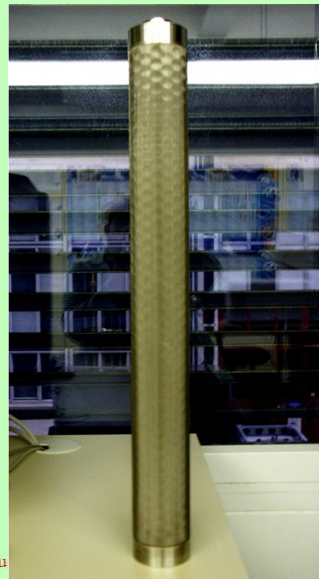
Méret: 50 x 5 cm, folyadékréteg: 1 cm

Fordulatszám: ~1000 rpm

Függőleges áramlás: 1,5 – 3 l/perc

Szűrési sebesség: 12 l/óra

Tisztítás szükséges: 2-10 naponta



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertu

Példa: rekombináns eritropoietin termelése

Upstream:

A BHK/CHO sejtvonal felületi tenyésztése Eagle alap közegen +10% szérum + 10% Bacto tryptose foszfát közeg.

4 nap után az első tápoldat csere: a termelő közeg csak 1,5% szérumot tartalmaz.

3 naponként lefejtés, feltöltés



EPO fermentációs üzem



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

50