

1/1 Tápanyagok mikroba fermentációknál

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

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

N-forrás: szervesen: 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 tápanyagokat használnak (**chemically defined, CD**).



Példa: rekombináns *E.coli* tápanyagai

Oltóanyag (inokulum) tápanyag **Termelő tápanyag** **Rátáplált (feed) tápanyag**

Glicerín 99,5%

- KH₂PO₄
- K₂HPO₄
- (NH₄)₂SO₄
- Na₂C₂H₃O₂·2H₂O
- MgSO₄·7H₂O
- Kanamicin szulfát**
- Tiamin HCl
- Boric acid
- CuSO₄·5H₂O
- MnSO₄·xH₂O
- FeCl₃·6H₂O
- ZnSO₄·7H₂O
- CoCl₂·6H₂O
- Na₂MoO₄·2H₂O

Glicerín 99,5%

- KH₂PO₄
- K₂HPO₄
- (NH₄)₂SO₄
- MgSO₄·7H₂O
- Kanamicin szulfát**
- Tiamin HCl
- Boric acid
- CuSO₄·5H₂O
- MnSO₄·xH₂O
- FeCl₃·6H₂O
- ZnSO₄·7H₂O
- CoCl₂·6H₂O
- Na₂MoO₄·2H₂O
- CaCl₂·2H₂O
- PPG2000**

Glicerín 99,5%

- MgSO₄·7H₂O
- EDTA**
- Kanamicin szulfát**
- Boric acid
- CuSO₄·5H₂O
- MnSO₄·xH₂O
- FeCl₃·6H₂O
- ZnSO₄·7H₂O
- CoCl₂·6H₂O
- Na₂MoO₄·2H₂O
- CaCl₂·2H₂O



Példa: rekombináns *E.coli* tápanyaga

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
	PHOS	Phosphate starvation

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



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

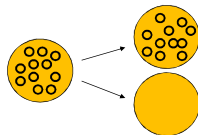
7

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)

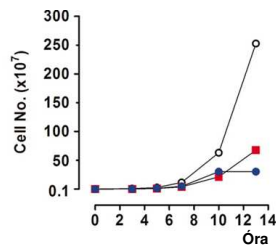


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

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

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 optimuma rendszerint savasabb tartományban van, de pH=5 alatti érték nem jellemző.

Az optimalásnál célszerű megvizsgálni a változó pH profil lehetőségét is.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

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.

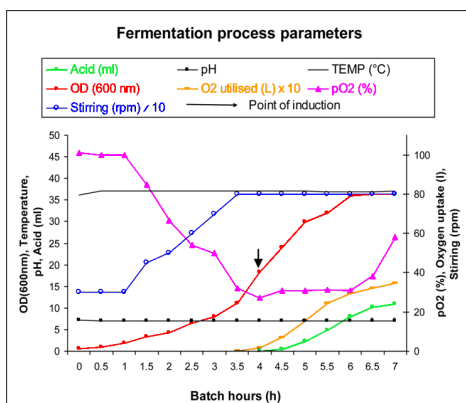
Ezzel összeállt egy kép a bakteriális fermentációról:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

14

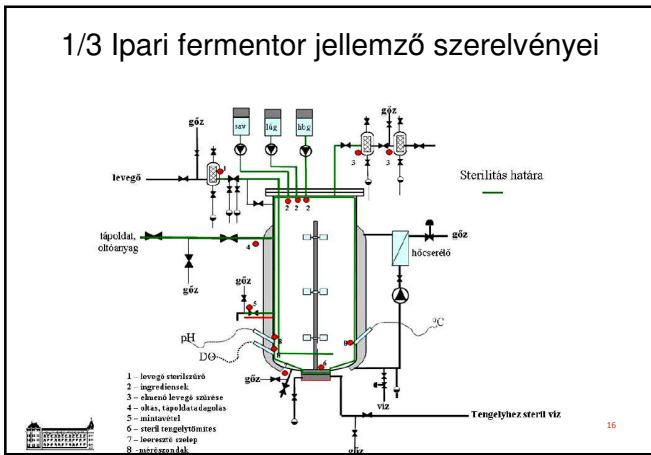
E. coli fermentáció lefolyása egy IPTG-indukálható rekombináns fehérje termelő technológiában



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

15

1/3 Ipari fermentor jellemző szerelvényei



1/4 Fermentációs technikák

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

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

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

17

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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

18

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

19

Módosított Eagle médium (MEM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium

Component	D5546 [1+] g/L	D5648 g/L	D5546 [1+] g/L	D5648 g/L
INORGANIC SALTS				
Calcium Chloride	0.2	0.2	L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001	0.0001	L-Valine	0.094
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.09767	0.09767	VITAMINS	
Potassium Chloride	0.4	0.4	Choline Chloride	0.004
Sodium Bicarbonate	3.7	—	Folic Acid	0.004
Sodium Chloride	6.4	6.4	myo-Inositol	0.0072
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109	0.109	Inosinamide	0.004
AMINO ACIDS				
L-Arginine • HCl	0.084	0.084	D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004
L-Cystine • 2HCl	0.0626	0.0626	Pyridoxal • HCl	—
L-Glutamine	—	0.584	Pyridoxine • HCl	0.004
Glycine	0.03	0.03	Riboflavin	0.0004
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042	0.042	Thiamine • HCl	0.004
L-Isoleucine	0.105	0.105	OTHER	
L-Leucine	0.105	0.105	D-Glucose	1.0
L-Lysine • HCl	0.146	0.146	HEPES	—
L-Methionine	0.03	0.03	Phenol Red • Na	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) vérérszérérumával 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

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*
Epidermal growth factor (EGF)	Mitogen
Fibroblast growth factor (FGF)	Mitogen
Insulin-like growth factors (IGFI and IGFI)	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)	

A szérum aktív komponensei

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



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



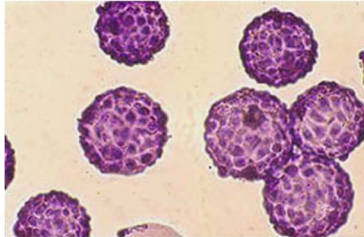
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

Mikrokarreres tenyésztés

Inokulálási/tapadási fázis

kialakult monolayer



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

29

„Spinner flask”

Mágneses keverő, lassú keverés

Mikrokarreres 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 mikrokarrierekkel felületi tenyészetekhez is használható.

Max. 10.000 liter (pl: interferon, tPA)

Energiabevitel kisebb, kevesebb O₂ 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

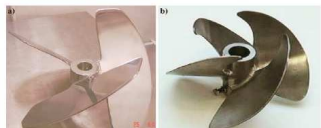


Fig. 13 (a) An ABC® "cylinder cut" impeller (used down-pumping); (b) Hayward Tyler up-pumping B2 hydrofoil



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

Léptéknövelés 1000 literre



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Léptéknövelés 10 000 literre



szék

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



Courtesy of HyClone

Disadvantages:

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



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)

Unimation Thermo Fisher_NEV



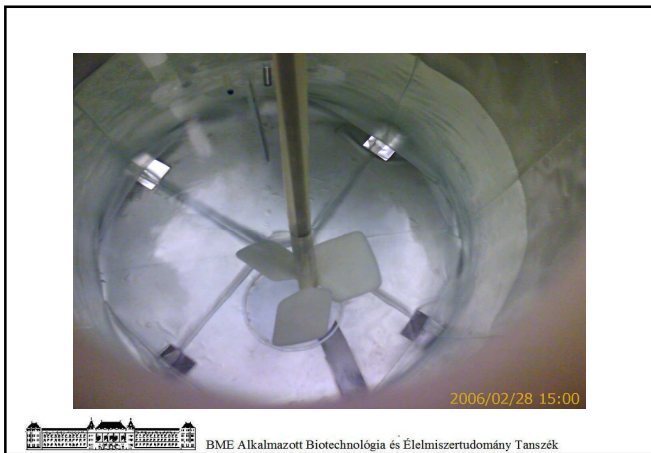
Egyszer-használatos bioreaktor zsák

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 cultura Media or Cell addition, ...
5.8	Multi port fitment - Can be used for: Component addition inlet, Cell cultura 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 Kloenpak connector
13	Sensing probe assembly to be connected to (12) by Kloenpak 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:

Batch

Fed-Batch

Continuous

Perfusion

BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

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 szakaszosban, de toxikus metabolitok felhalmozódása hat a termelésre és a termékminőségre.

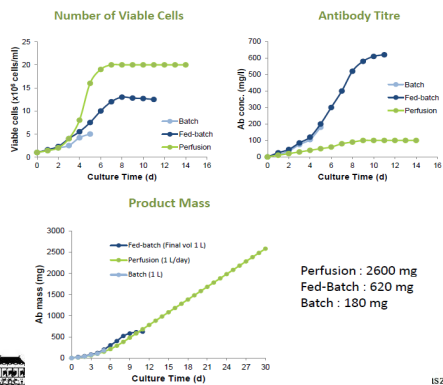
Folytonos (perfúziós): sejtkoncentráció $3-5 \times 10^7$ sejt/ml, 6-8 hét, termék is koncentráltabb, a szükséges reaktortérfogat a szakaszosnak csak 1%-a. Jó a szubsztrát ellátottság, és jó a toxikus metabolitok eltávolítása.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

43

Tenyésztési módszerek összehasonlítása



iszék

44

Titernövelés: csökkenő költségek

Titre Improvements

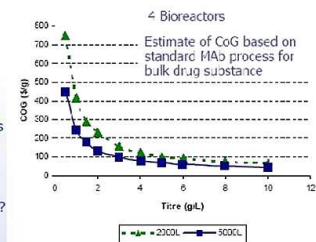
- Important cost benefits as titres go beyond 1g/L
- These diminish as we go beyond 5g/L

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

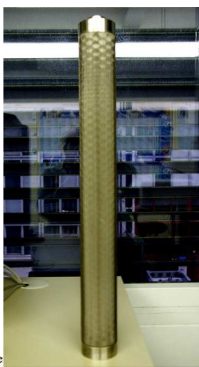


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

45

Sejtviisszatartásos (perfúziós) technológiák

Alternatív megoldás: forgó, henger alakú rozsdamentes fémszita.
 Résméret: 20 µm Sejtviisszatartás: 8 µm
 Élő sejt viisszatartás: 97-100%
 Méretek: 50 x 5 cm, folyadékréteg: 1 cm
 Fordulatszám: ~1000 rpm
 Független áramlás: 1,5 – 3 l/perc
 Szűrési sebesség: 12 l/óra
 Tisztítás szükséges: 2-10 naponta



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

Példa: rekombináns eritropoietin termelése

Upstream:
 A BHK/CHO sejt vonal felületi tenyésztése Eagle alap közegen +10% szérum + 10% Bacto tryptose foszfát közegen.

4 nap után az első tápoldat csere: a termelő közegen csak 1,5% szérumot tartalmaz.
 3 naponként lefejtés, feltöltés



EPO fermentációs üzem



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

50
