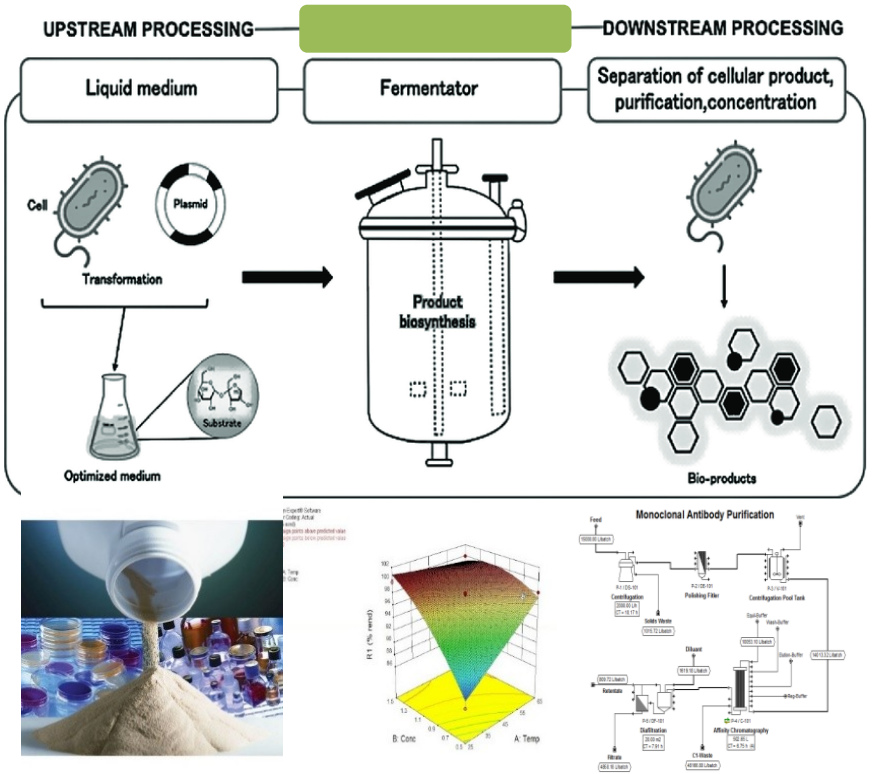
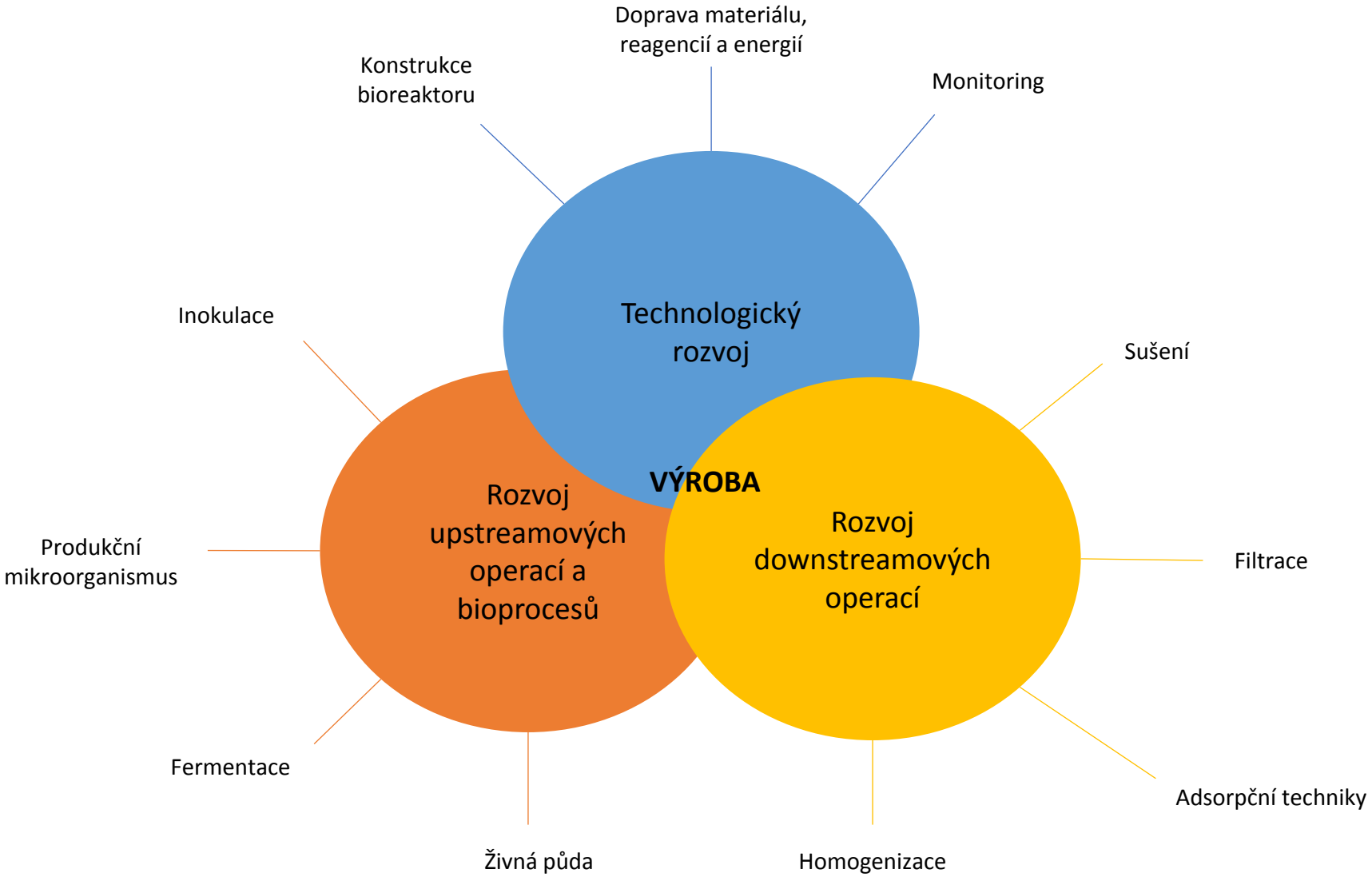
Optimalizace fermentace

Matouš Čihák

Optimalizace fermentace
Teoretický úvod

- Význam mikrobiálních biotechnologií neustále vzrůstá. Značné nároky jsou kladeny na kompletní optimalizaci celé výroby, především však fermentace.
- Každý fermentační proces je nutné optimalizovat do té míry, že bude nejen vhodný pro produkci žádaného produktu, ale současně bude ekonomicky výhodný, bezpečný a šetrný k životnímu prostředí.
- Cílem je dosažení maximálního výtěžku produktu v co nejkratším čase, s nízkými náklady na kultivační podmínky a technologické zařízení, při současném zajištění bezpečnosti provozu i obsluhy, a to s minimálním dopadem na životní prostředí.

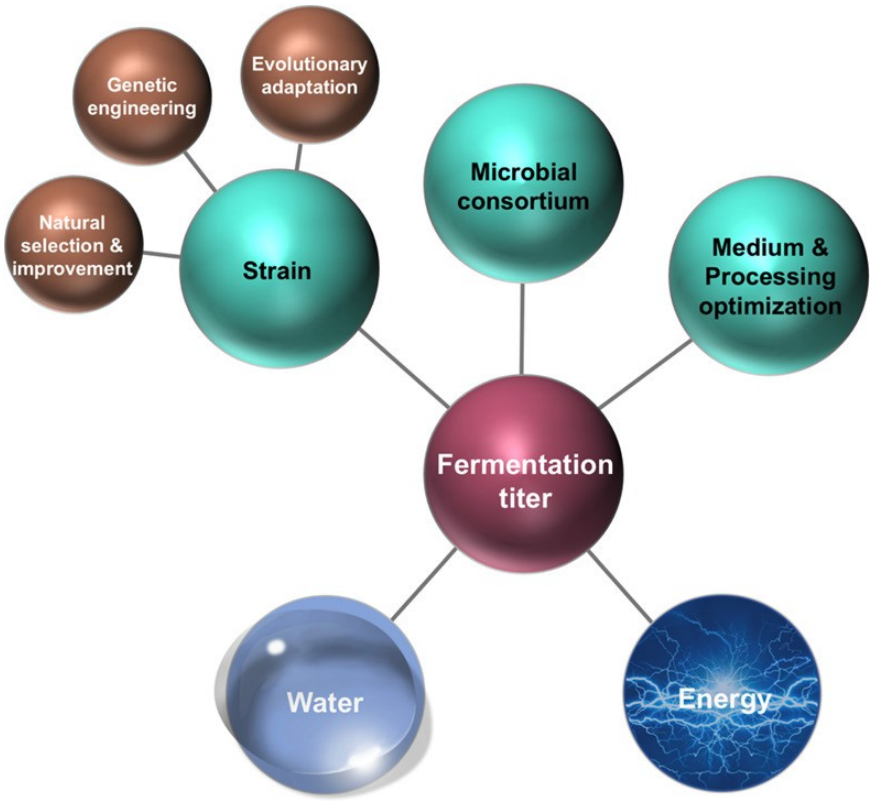



Doprava materiálu, reagencií a energií
Konstrukce bioreaktoru
Monitoring
Technologický rozvoj
Inokulace
Sušení
VÝROBA
Rozvoj upstreamových operací a bioprocesů
Rozvoj downstreamových operací
Produkční mikroorganismus
Filtrace
Fermentace
Adsorpční techniky
Živná půda
Homogenizace

Optimalizace fermentace

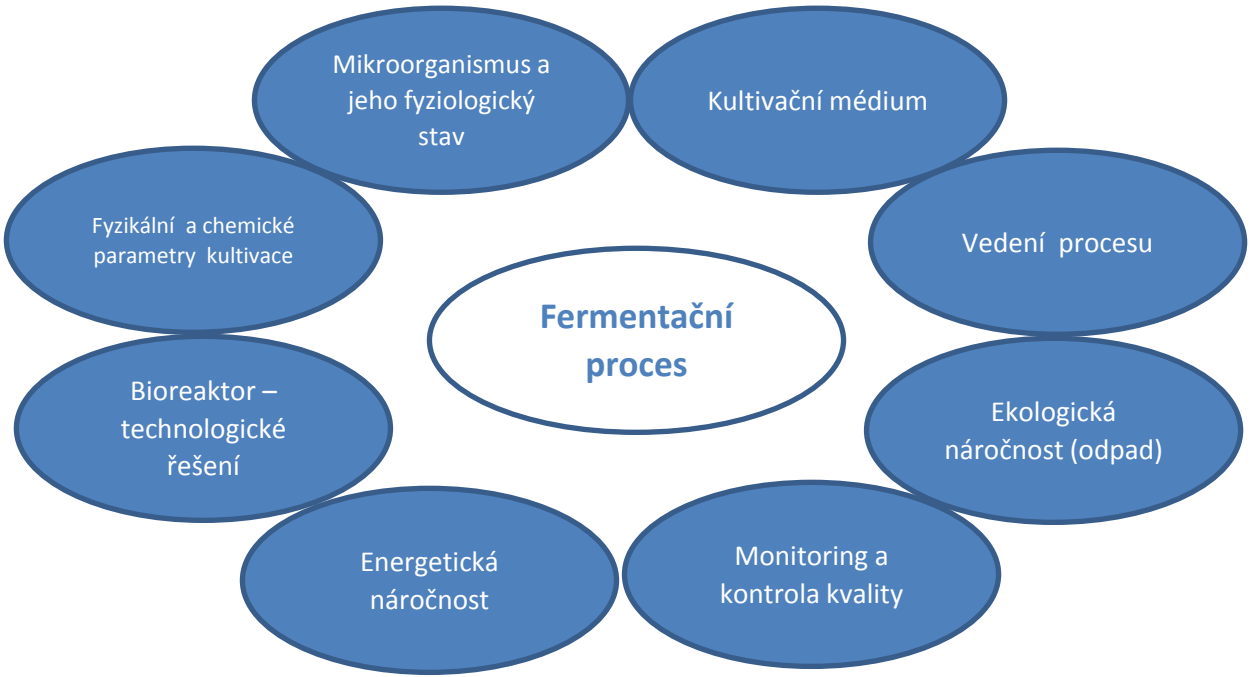
Úvod

- Optimalizace biotechnologické výroby vyžaduje vždy jedinečný přístup, protože je ovlivňována mnoha faktory.
- Významnou roli hrají i vnější vlivy (geografická oblast, přístup k surovinovým zdrojům, finanční trhy, cena energií aj.).
- Strategie pro zlepšení upstreamu fermentačního procesu jsou spojené s výběrem producenta, nastavením operací a složením média pro zvýšení titrů produktů. Vysoké titry produktů následně ovlivňují i separaci a čištění, čímž se šetří spotřeba vody a energie.



Optimalizace fermentace
Úvod

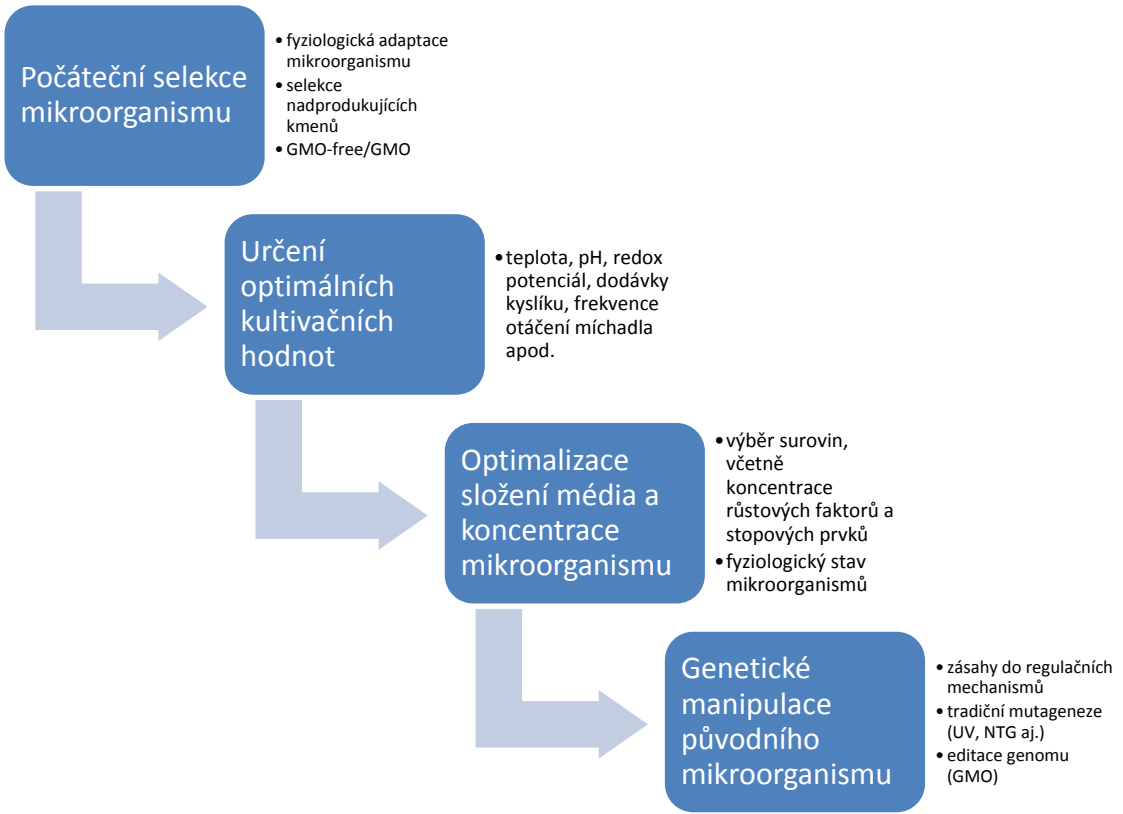
- Zásadní faktory ovlivňující efektivitu fermentačního procesu zachycuje myšlenková mapa:



Optimalizace fermentace

Úvod

- Hlavní rysy technologického procesu a jeho optimalizace je obecně možné vyjádřit schématem:



Optimalizace fermentace

Úvod

- Faktory ovlivňující efektivitu fermentačního procesu jsou co do významu proměnlivé v závislosti na vybraném mikrobiálním procesu.
- Fermentační procesy je možné dělit podle tvorby produktu:

Skupina	Příklad
Produkty energetického metabolismu	ethanol, methan
Produkty jsou zásobní energetické sloučeniny	polyhydroxybutyrát, lipidy, glykogen
Produkty bílkovinné povahy s biologickou aktivitou – enzymy • Extracelulární • Intracelulární	amylasy, beta-galaktosidasa
Produkty tvoří strukturální složky buněk	bílkoviny
Rekombinantní produkty	inzulin, L-asparaginasa
Sekundární metabolity	penicilin G, hyaluronová kyselina
Meziprodukty metabolismu	vitamin B12
Transformované substráty	Ampicilin, steroidy

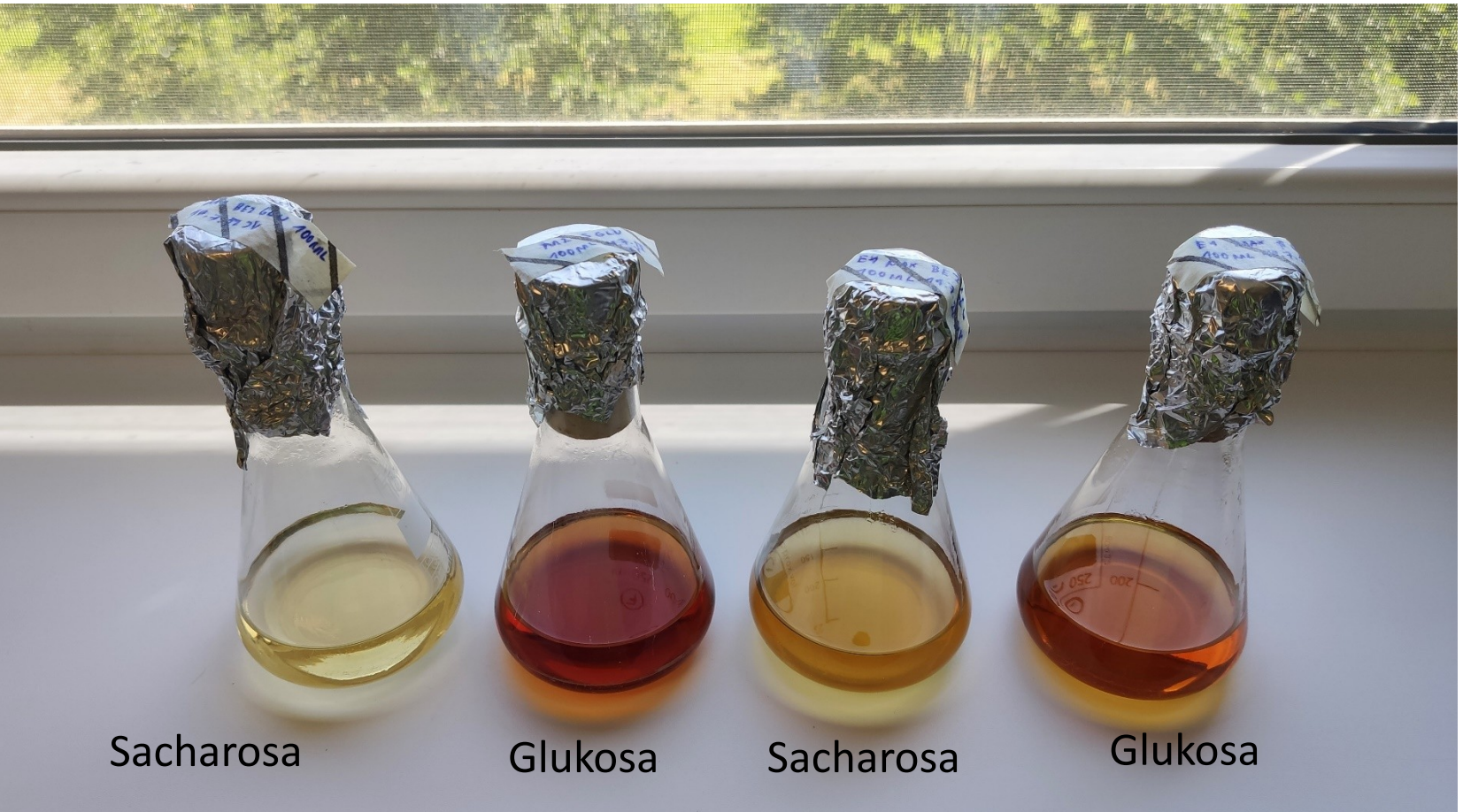
Optimalizace fermentace

Úvod – Faktory ovlivňující optimalizaci bioprocesu – Sterilita

- Významný faktor, který ovlivňuje efektivitu v podstatě každého bioprocesu a může ovlivnit relevantnost dat během optimalizace.
- Jakékoli kontaminace (bakteriální, fágové, kvasinkové, chemické, fenotypové aj.) znamenají ztráty či mají vliv na kvalitu produktu a vedou k nevyhovujícím šaržím.
- Například kontaminace bakteriemi rodu *Bacillus* nebo *Staphylococcus* mohou během výroby kyseliny hyaluronové nejen spotřebovávat živiny, a tím omezit jejich dostupnost pro *Streptococcus zooepidemicus*, ale také svými enzymy, hyaluronát lyázami, snížit molekulovou hmotnost kyseliny hyaluronové.
- Zejména pak dlouhotrvající kontaminace mohou mít fatální následky pro biotechnologický provoz a proto jsou sterilní postupy a čistota prostředí základními předpoklady efektivní produkce.
- Volba vhodných sterilizačních technik musí být v souladu s riziky. Současně musí být sterilizační postupy účinné a finančně únosné.
- V tomto ohledu musí být například brán v úvahu i scale-up sterilizace, protože dosažení sterilizační teploty v celém objemu kultivačního média během autoklávování je v nízkoobjemových fermentorech rychlejší než ve velkoobjemových.

Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace složení média (Maillardova reakce)



Optimalizace fermentace

Úvod – Faktory ovlivňující optimalizaci bioprocesu – Monitoring

- Nastavené kultivační parametry je potřeba během fermentace monitorovat a v případě odchýlení od nastavených hodnot zajistit ideálně automatizovanou regulaci (např. pH pomocí zásaditých roztoků u bakterií mléčného kvašení), aby nebyla ovlivněna efektivita procesu.
- V případě sekundárních metabolitů (např. antibiotik) je nutné monitorovat i růst mikroorganismu či spotřebu konkrétní složky média, abychom rozpoznali nástup produkce cílové látky, která obvykle nastává ve stacionární fázi, a přizpůsobili tomu kultivační podmínky.
- Efektivní a rychlé optimalizace bioprocesu je možné dosáhnout přesným (ideálně real-time) monitoringem s využitím různých technologií a analýz.

Optimalizace fermentace
Úvod – Faktory ovlivňující optimalizaci bioprocesu – Monitoring

Online

- Teplota - teplotní čidlo
- pH - sondy
- O_2 - kyslíkové sondy
- Rychlost míchání
- Metabolický profil - chemometrický model přes NIR
- Biomasa – optické senzory pro měření buněčné hustoty

Offline

- C- zdroj - LC-MS, kolorimetrie, turbidimetrie
- Produkt (HA) - LC-MS, SEC-MALLS

Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace produkce

Kyselina hyaluronová – extracelulární polysacharid produkovaný bakteriemi rodu *Streptococcus*, který nachází uplatnění ve farmacii a kosmetice.

Humánní inzulin - hormon produkovaný B buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, který snižuje hladinu cukru v krvi. Připravuje se rekombinantně tak, že do DNA bakterie kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* se vpraví lidský gen z krátkého ramene 11. chromozomu pro výrobu lidského inzulinu. Poté se z kvasinek izoluje čistý humánní inzulin.

Ampicilin - širokospektrální antibiotikum ze skupiny aminopenicilinů (beta-laktamových antibiotik), používané při léčbě bakteriálních infekcí od roku 1961. Semisyntetický derivát penicilinu.

Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace kultivačních parametrů

Případová studie optimalizace fermentačního procesu
U vybraných kmenů je testován vliv kultivační teploty a rychlosti míchání na produkci a molekulovou hmotnost HA.

- **Rychlost míchání** (kmen X; Multifors; kontrola 300 rpm) – nárůst Mw při 700 rpm, ale současně pokles výtěžku HA

rychlost míchání	100	300	500	700	900	1100	rpm
OD_{640} (10x)	0,350	0,374	0,366	0,334	0,331	0,318	
HA - mikrobiální kultura	2,743	2,852	2,566	2,782	2,787	2,736	g/L
HA Mw	1,593	1,711	1,833	2,028	1,997	1,926	MDa

Rozdíl proti kontrole

rychlost míchání	100	300	500	700	900	1100	rpm
HA - mikrobiální kultura	-3,8	0,0	-10,0	-2,4	-2,3	-4,1	%
HA Mw	-9,1	0,0	5,2	21,8	19,6	13,8	%

- **Teplota** (kmen X; Multifors; kontrola 37 °C) – nárůst výtěžku HA i Mw při 33 °C

teplota	27	30	33	37	39	42	°C
OD_{640} (10x)	0,321	0,337	0,338	0,371	0,379	0,413	
HA - mikrobiální kultura	2,177	2,597	3,046	2,877	2,857	2,473	g/L
HA Mw	1,808	1,824	1,993	1,831	1,748	1,532	MDa

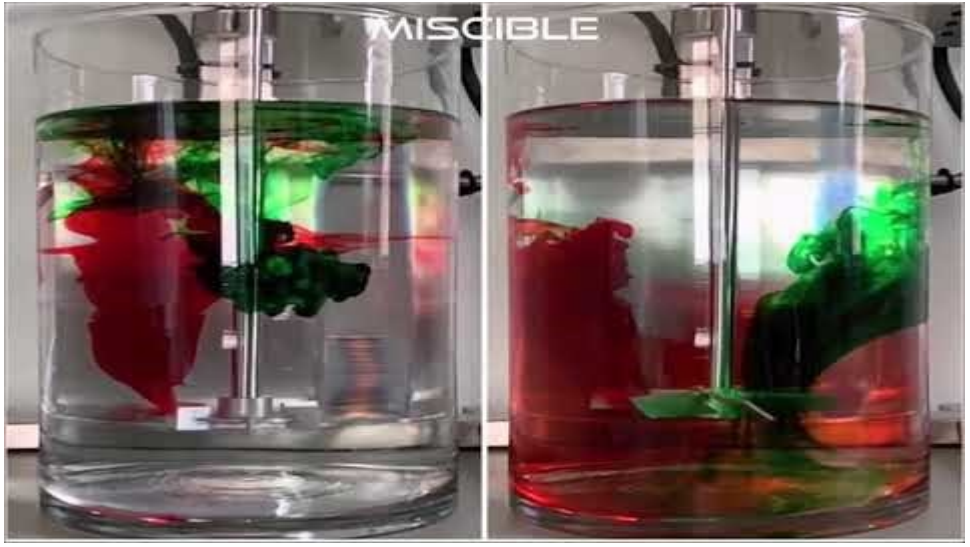
Rozdíl proti kontrole

teplota	27	30	33	37	39	42	°C
HA - mikrobiální kultura	-24,3	-9,7	5,9	0,0	-0,7	-14,0	%
HA Mw	-8,8	-3,7	13,1	0,0	-5,5	-22,3	%

Optimalizace fermentace

Příklady – Výběr míchadla pro fermentační proces

- Typ míchadla může sehrát zásadní roli pro efektivitu bioprocesu. Zatímco pro rekombinantní produkci proteinů v *E. coli* mohou být rychloběžná míchadla lopatkového typu vhodná, nehodí se pro kultivace vláknitých bakterií rodu *Streptomyces* nebo plísní *Penicillium*, u kterých mohou střižnými silami vyvolávat stresové podmínky a narušovat tvorbu mycelia. U nich je vhodnější volit pomaloběžná míchadla s omezením střižných sil (např. typu Maxblend, které je vhodné i pro vysokoviskózní kultivace).



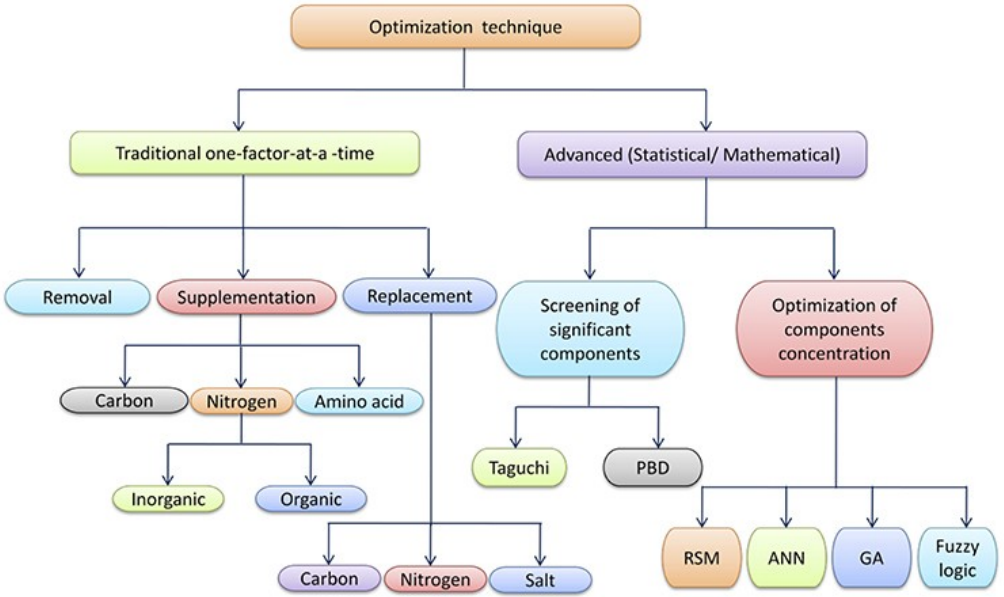
Slow Motion Radial and Axial flow Pattern

Maxblend

Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace složení média

- Růst mikroorganismu a produkce metabolitu je pod nutriční kontrolou (C-zdroj, N-zdroje, AA aj.).
- Příprava optimálních receptur pro ekonomicky výhodnou produkci je dlouhodobý proces, který zohledňuje typ média (chemicky definované vs. komplexní) a účel použití produktu (farmaceutická vs. veterinární výroba antibiotik).
- Nalezení vhodné receptury může být ztíženo požadavky produkce (např. serum-free média), nedostatkem výhodných surovin a dostupných v dostatečném množství aj.
- Výběr surovin a optimální poměry jejich navážek si vyžaduje značné testování, při kterém mohou být využity různé optimalizační techniky a statistické/matematické modely (např. DoE, OFAT, Response surface methodology).



Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace produkce HM inzulinu v *Pichia pastoris*

EXPERIMENT DESIGN

- The fermentation process of *Pichia* is optimized at first to get a good yield from the clone. For this the following parameters have been optimized:
  - Agitation
  - pH
  - % of Dissolve oxygen
  - Aeration
  - Temperature
- A very high methanol feed flow has been applied at first to observe the maximum tolerable limit of the feed at different time of fermentation.
- From the observations we have fixed a reduced fermentation time and applied the following feed strategies to get optimum yield within this time.
  - Feed strategy 1: Methanol feeding starts at a rate of 6.6 mL/LH and increased up to 18.83 mL/LH with a 10% increment in every 2 hours. The feed starts after 7 hour s of methanol adaptation phase.
  - Feed strategy 2: This is similar to the feed strategy 1, only the feed starts after 3 hours of methanol adaptation phase.
  - Feed strategy 3: Initial feed rate is same but final feed rate is 19.67 mL/LH with 20% increment in every 3hours. Feed starts after 6 hours of methanol adaptation phase.
  - Feed strategy 4: Initial feed rate is same but final feed rate is 20.32 mL/LH with 15% increment in every 3hours. Feed starts after 6 hours of methanol adaptation phase.
  - Feed strategy 5: Initial feed rate is same but final feed rate is 19.14 mL/LH with 10% increment in every hour. Feed starts after 7 hours of methanol adaptation phase.

RESULTS

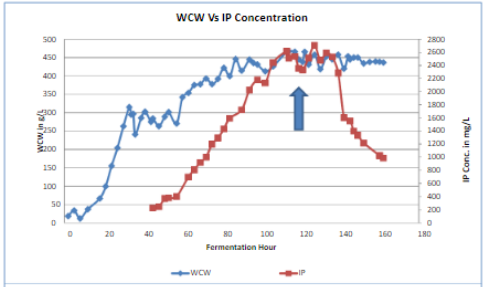


Fig 1: Growth curve of *Pichia* fermentation after applying high feed

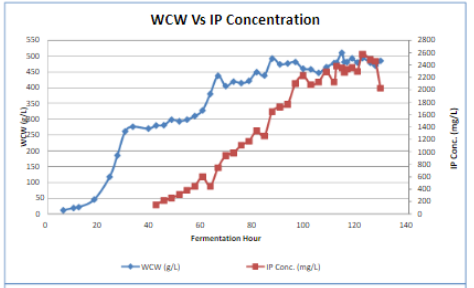


Fig 2: Growth curve of *Pichia* fermentation for feed strategy 1

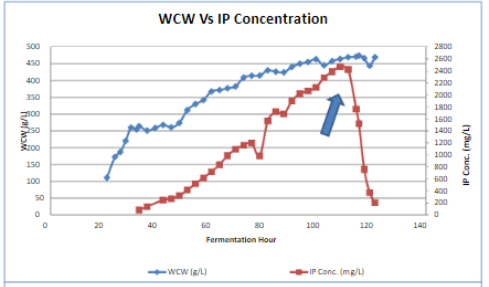


Fig 3:Growth curve of *Pichia* fermentation for feed strategy 2

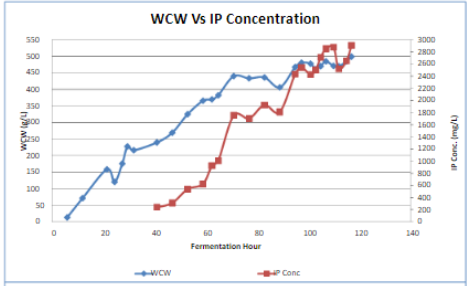


Fig 4: Growth curve of *Pichia* fermentation for feed strategy 3

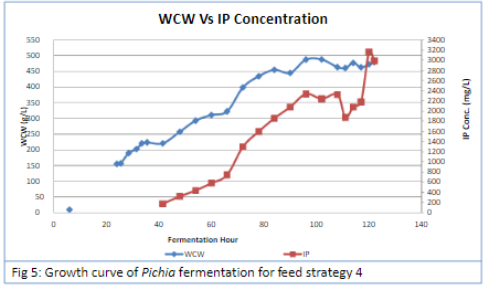


Fig 5: Growth curve of *Pichia* fermentation for feed strategy 4

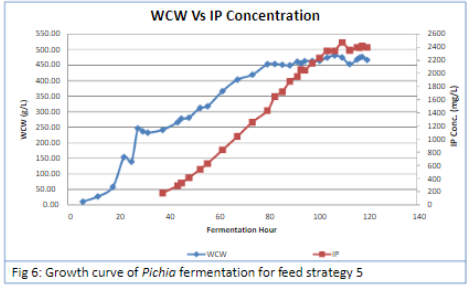


Fig 6: Growth curve of *Pichia* fermentation for feed strategy 5

- Figure 1 is the growth curve of *Pichia* and IP production during fermentation with very high feed rate. With this feed rate cell growth becomes maximum after a certain time period. The IP starts to decrease after a certain time period.
- Figure 2 is the growth curve of *Pichia* and IP production during fermentation with feed strategy 1. Here, cell growth and IP production is smooth but IP starts to decrease after 120 hour of fermentation.
- Figure 3 is the growth curve of *Pichia* and IP production during fermentation with feed strategy 2. Here, cell growth and IP production is smooth but IP starts to decrease after 111 hour of fermentation.
- Figure 4 is the growth curve of *Pichia* and IP production during fermentation with feed strategy 3. Here, cell growth and IP production is not so smooth but IP concentration is very high at the end.
- Figure 5 is the growth curve of *Pichia* and IP production during fermentation with feed strategy 4. Here, cell growth and IP production is not so smooth but IP concentration is very high at the end like the feed strategy3.
- Figure 6 is the growth curve of *Pichia* and IP production during fermentation with feed strategy 5. Here, cell growth and IP production is very smooth and IP concentration is quite good at the end. In this strategy the feed volume is highest than the other feed strategies.

DOI:10.13140/RG.2.2.36659.73764

Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace produkce ampicilinu

Př. 1: Process for the preparation of ampicillin

- Ampicillin is produced in a batch process by enzymatic acylation of 6-aminopenicillanic acid (6-APA) with the aid of phenylglycine derivative such as D-phenylglycine amide.
- High conversions of phenylglycine derivative may be achieved by having the total concentration in the reaction mixture of 6-APA and ampicillin greater than 250 mM and the molar ration of total quantity of phenylglycine derivative to total quantity of 6-APA less than 2.5.
- Higher yields of ampicillin may be achieved when the amount of dissolved 6-APA is kept low, e.g. below 300 mM.

Př. 2: Efficient cascade synthesis of ampicillin from penicillin G potassium salt using wild and mutant penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*

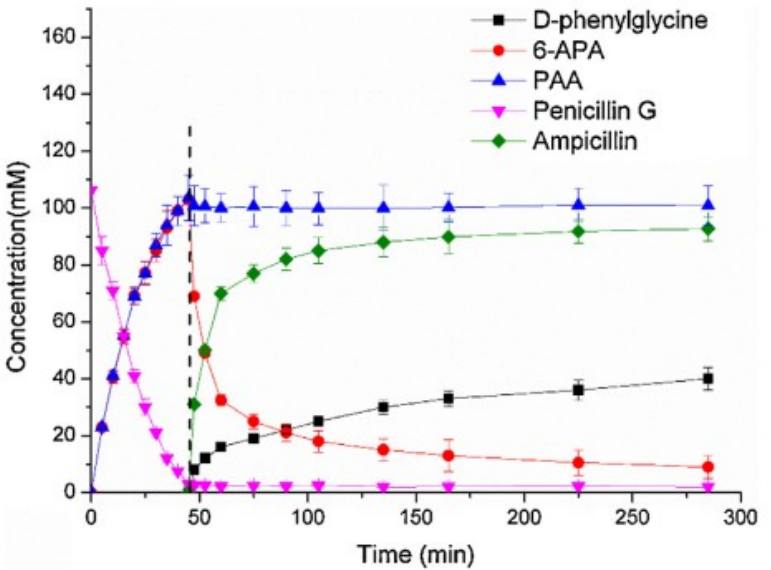


Fig. 6. Time course of two-enzyme two-step cascade synthesis of ampicillin. *Dotted line* is the demarcation line of the first step and the second step. Conditions of the first step: pH 8.0, 28 °C, 4% (w/v) PGK, 0.03 g/mL immobilized wild Af PGA; Conditions of the second step: initial pH 6.3, 28 °C, 150 mM D-PGME, 0.19 g/mL immobilized βF24 G mutant Af PGA.

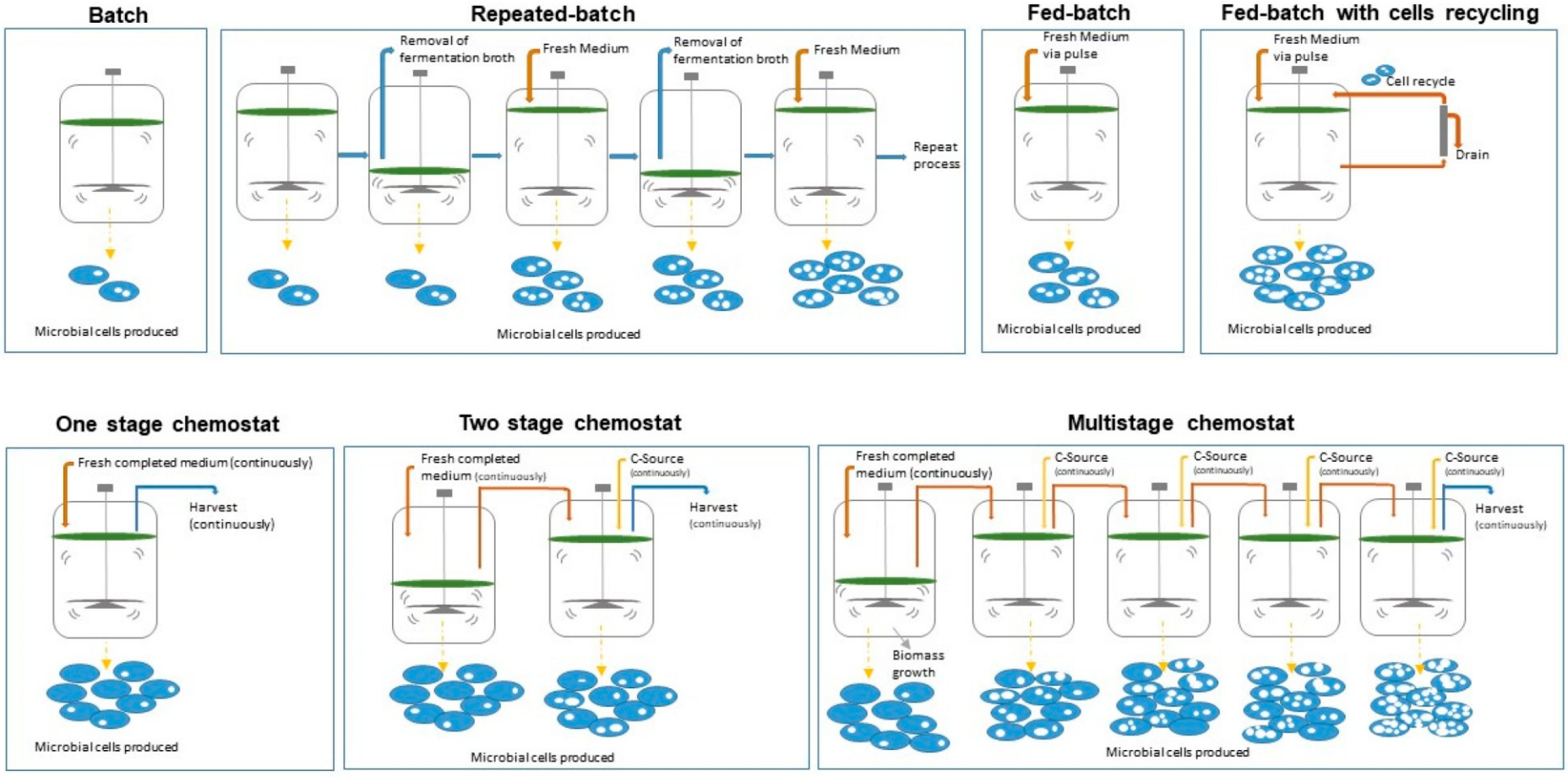
Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace vedení procesu

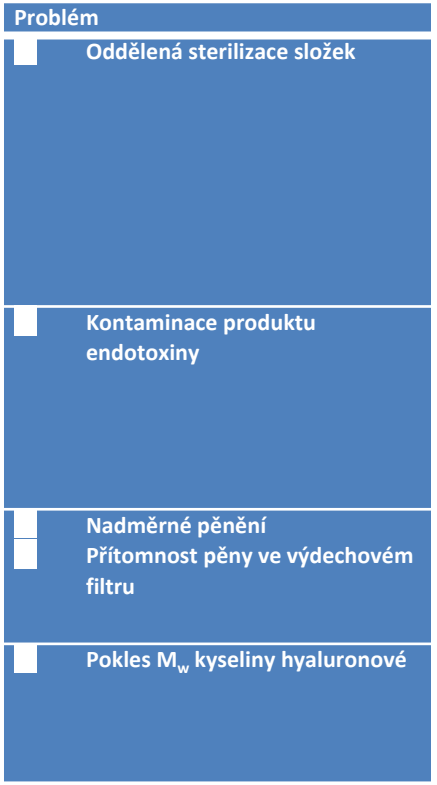
- Výběr vhodného způsobu vedení bioprocesu pro daný produkt je zásadní pro nastavení výrobního cyklu.
- Například ne všechny produkční mikroorganismy si mimo své přirozené prostředí dokáží udržet stabilní produkci po delší dobu, a proto jsou pro kontinuální procesy nevhodné a aplikují se u nich obvykle jednoduché vsádkové fermentace (např. produkce antibiotik).
- Naopak v případě zavedení efektivní produkce kontinuální fermentací (např. polyhydroxybutyrát) je možné ušetřit čas během čištění fermentoru a přípravy další vsádky, nicméně existují rizika kontaminace během prodloužené kultivace a jsou také kladeny vyšší nároky na operátory pro správné řízení procesu.

Optimalizace fermentace

Příklady – Optimalizace vedení procesu



Optimalizace fermentace

Případové studie

- Optimalizace fermentace může přinášet některé problémy, které vyžadují zjištění přesné příčiny a následně optimální řešení: