

Udvikling af mikrobioreaktorer til kontinuerlig kultivering af gær

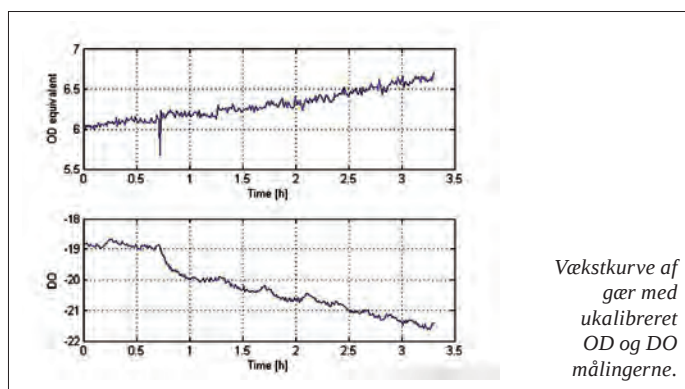
Bioreaktorer med et volumen mindre end 1 mL lover en meget nem håndtering, mange informationer pr. eksperiment og lille pladskrav i laboratoriet og gør det desuden muligt at lave målinger online uden risiko for kontaminering pga. prøvetagning.

*Af Daniel Schüpfer & Krist V. Gernaey, Center for BioProcess Engineering, Institut for Kemiteknik, DTU
Anna Eliasson Lantz, Center for Mikrobiel Bioteknologi, Institut for Systembiologi, DTU
Stuart Stocks, Novozymes A/S*

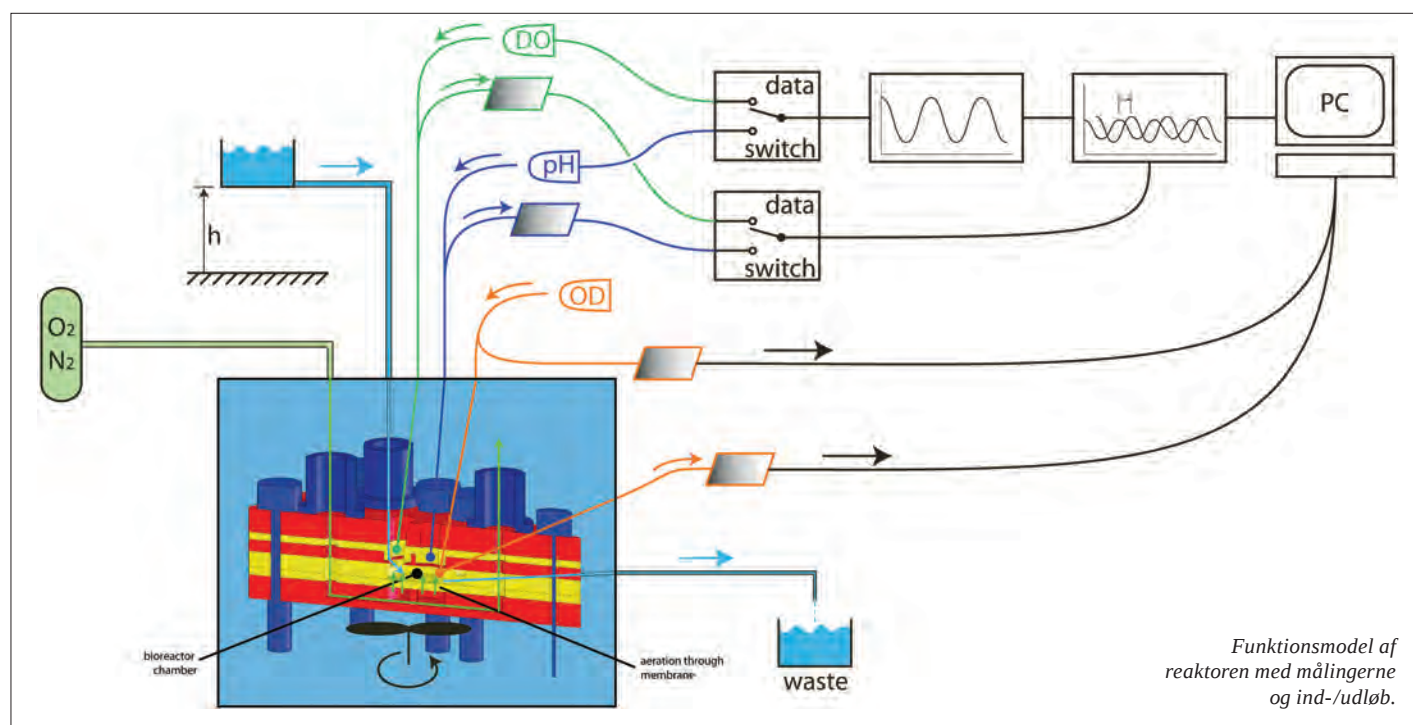
Bioteknologi spiller en mere og mere vigtig rolle i produktionsprocesser i fødevarer-, kemiske og farmaceutiske industrier. Velkendte eksempler af biotekbaserede produkter er enzymer i vaskemiddel eller insulin til sukkersygepatienter.

Før en ny bioteknologisk proces fungerer i fuld-skala skal der laves en stor forskningsindsats, hvor f.eks. produktiviteten af forskellige produktionsstammer bliver undersøgt (screening). Almindeligvis foregår dette trin i rystekolber. I en senere fase udfører man forsøg i laboratorieskala for at undersøge indflydelsen af procesvariabler på produktiviteten.

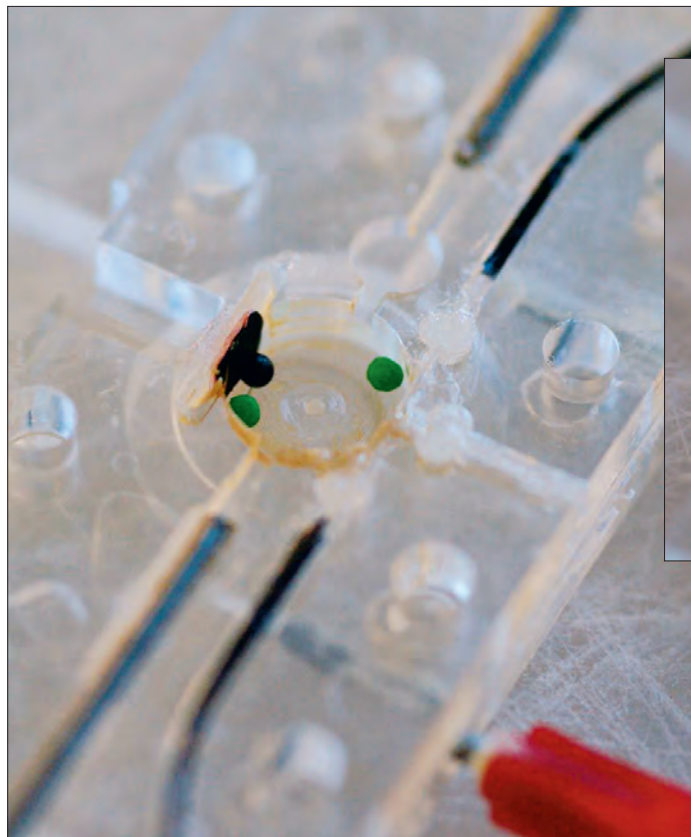
Rystekolbekulturer er nemme at sætte op (typisk med et volumen mellem 100mL og 1L), men de tillader oftest kun batch-kulturer og informationsmængden pr. eksperiment er begrænset. Typisk laver man kun målinger i slutningen af kultiveringen.



Vækstkurve af gær med ukalibreret OD og DO målingerne.



Funktionsmodel af reaktoren med målingerne og ind-/udløb.



Reaktordvolumen med 8mm diameter og 2mm dybde.



Reaktordvolumen med 8mm diameter og 2mm dybde, 1kr. mønt som størrelsessammenligning.

Hvis der er behov for yderlige målinger, skal der tages prøver som forstyrrer processen og medbringer risiko for kontaminering. Reaktorer i laboratorieskala (volumen 1L – 10L) tillader online-målinger og kan opereres som batch, fed-batch eller kontinuerlig kulturer. Til gengæld er anstrengelserne for at sætte i gang, køre og rengøre laboratorieskalareaktorer store. Mikrobioreaktorer (MBR) er et alternativ der har mange fordele:

- Prisen for en MBR er lav fordi den kan fremstilles af billige polymerer.
- Små voluminer (100µL - 1000µL) reducerer udgifter til substrater.
- Online-målinger er mulige for de vigtigste kulturvariabler (optisk densitet (OD), opløst oxygen (DO), pH).
- Tillader batch, fed-batch eller kontinuerlige kultivering.
- Reaktorerne er af engangsmateriale og kan derfor smides ud efter brug (ligesom en sprøjte) og kræver derfor intet rengøringsarbejde.
- En parallelisering af kultiveringerne i flere forskellige reaktorer tillader high-throughput screening med en meget større ydelse af information pr. eksperiment.
- Online-målingerne muliggør undersøgelsen af selve cellekinetikken, som f.eks. hvordan cellerne reagerer på et skift i substratkoncentration eller pH.

Disse fordele resulterer i mere information pr. eksperiment (online målinger), billigere forsøg (små voluminer, mindre manuelt arbejde) og muligheden for at afprøve effekten af produktionsparametre på cellerne i den lille skala før der bliver opskaleret.

Udfordringerne ligger i,

- at få alt (3 målinger, omrøring og både ind- og udløb) korrekt samlet
- at forhindre luftbobler i systemet – 3 luftbobler fylder næsten hele reaktoren

- at koble MBR sammen med den »store« verden (pumper, lyskilder, sensorer)
- at skaffe en effektiv omrøring i reaktoren.

Vores fremtidige vision er at laboratorier vil have muligheden for at købe en MBR ligesom man køber andet laboratorie-engangsudstyr i plast: Steriliseret og pakket ind. Efter brug smides reaktoren ud. Derfor er det at lave et billigt design, noget som er centralt i vores udvikling af MBR.

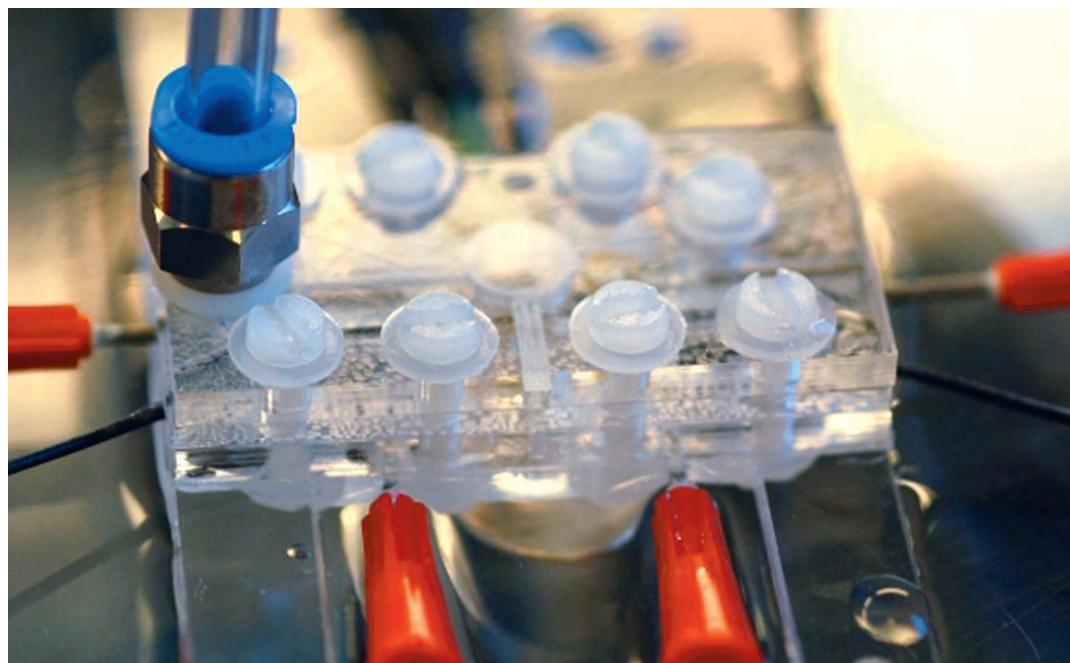
Reaktordesign

Vores reaktor har et arbejdsvolumen på 100 µL og bruger bagegær (*Saccharomyces cerevisiae*) som produktionsstamme. Dette volumen giver plads til ca. 10 millioner celler og er udformet som en cylinder med 8 mm diameter og 2 mm højde. Reaktoren samt fluidik- og optiske forbindelser fylder 50x25x15mm. Vi har et vand-baseret opvarmningssystem som i vores tilfælde fastholder temperaturen i reaktoren på 30 °C som er den optimale væksttemperatur for gæren vi benytter.

Gærcellerne har brug for ilt for at kunne vokse aerobt. Ved konventionelle dyrkningsmetoder i laboratorieskala omrøres reaktoren og der blæses steril luft gennem væsken for at opnå iltning. I mikrobioreaktorerne ville 2-3 luftbobler fylde hele reaktoren. Derfor laver man iltforsyningen gennem et membran på oversiden af reaktoren. Små molekyler (f.eks. O₂ og CO₂) diffunderer igennem membranen. Membranen forhindrer samtidig kontaminering.

Omrøring – eller hellere mangel på omrøring – er én af de vigtigste problemer i mikrosystemerne. Pga. de små dimensioner og de lave flydehastigheder kommer Reynolds tal nemlig til at ligge omkring 1. Derfor er strømmen laminar (i stedet for turbulent) og der kræves nogle særlige systemer for at opnå turbulent flow eller i det mindste en transient region. En god omrøring garanterer en god O₂-transport (høj k_La) som er nødvendig for at kunne sikre aerob vækst af cellerne (hvis det er ønsket). I vores system, som skal være enkelt og billigt, sørger en lille magnetomrører for omrøring af reaktoren. Dette system sørger for en god blanding af væsken (O₂ skal ind, CO₂ skal ud, og næringsstofferne skal ligelig fordeles) på den ene side og holder på den anden side cellerne suspenderet.

Det lille volumen/masse muliggør at man kan arbejde uden store gradienter i væskefasen, og tillader også hurtigt tempera- ►



Hele reaktoren med ind-/udløb ved siderne, varmesystemet ved nedre billedekant og luftslangen fra oversiden.

turskifte. Det kunne f.eks. være vigtigt ved prøvetagninger at temperaturen af prøven hurtigt kan ændres, fordi cellerne helst ikke skulle vokse videre efter prøvetagning.

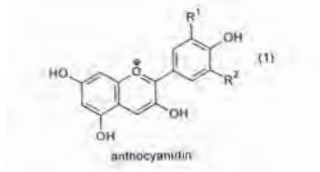
Målinger

Vi måler nu de tre vigtigste kulturvariabler: Optisk densitet

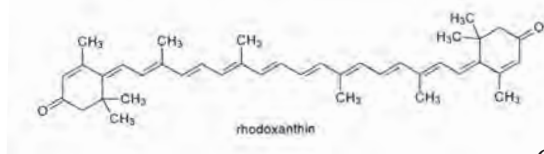
Nyt om...

... planter der tager solcreme på

Man har iagttaget, at visse oprindeligt grønne planter bliver røde i kraftigt solskin. Det skyldes ofte dannelse af anthocyaniner.



Aloeplanten, *Aloe arborescens*, der bl.a. dyrkes i Negevørkenen, bliver også rød i stærk sol. Den bruges i en række kosmetiske præparater. I dette tilfælde skyldes farve-skiftet dannelsen af et carotenoid, rhodoxanthin, der absorberer lys nogenlunde i det samme område som røde anthocyaniner. Ved at absorbere det kraftige sollys forhindrer farvestofferne skade på planten.



Carl Th.

Aloe plants turn red in the desert, Chemistry World 2005 (april), side 26; Optical properties of rhodoxanthin accumulated in *Aloe arborescens* leaves. Photochemical and Photobiological Science (2005) 4, side 333.

(optical density; OD), opløst oxygen (dissolved oxygen; DO) og pH. Alle tre målinger er baseret på optiske principper.

OD er en transmissionsmåling. Lys med en bølglængde af 600nm bliver sendt igennem reaktoren og amplituden af lys-signalet som forlader reaktoren igen viser hvor meget lys der er blevet absorberet. Da Lambert-Beers lov gælder svarer mængden absorberet lys til koncentrationen af celler. For denne måling lægges to optiske fibre ind i reaktoren, den ene for at bringe lyset ind og den anden for at samle lyset op. Målingen kunne i princippet udføres med en lysdiode (LED) og en fotodiode.

DO og pH, til gengæld, kræver en speciel sensor som er baseret på fluorescens. Sensoren aktiveres af et sinusformet lys med en særlig bølglængde (forskellig for DO og pH) og en særlig frekvens. Sensoren producerer lys af en anden bølglængde med samme frekvens, men med et vist faseskift hvilket afhænger af DO/pH. Målingen af dette faseskift, dvs. forskellen i fase mellem input- og outputlyset (90 grader faseskift ved en frekvens af 5kHz svarer til en forskel af $5e^{-5}$ sek) kræver en meget følsom måling, som kan udføres med en lock-in amplifier (LIA). En LIA får to inputsignaler, et af dem er referencesignalet og det andet er det effektive signal som skal måles og kommer fra sensoren. Ved en given frekvens måler LIA'en så faseskiftet mellem de to signaler, selvom signal-to-noise ratio'en er meget dårligt. For at holde systemet så lille som mulig valgte vi at programmere LIA'en i LabView.

Alle tre målinger kræver deres lyskilde (LED), nogle optiske elementer (linser, optiske fibre etc.) og en fotodiode som måler lysamplituden. Især fluorescensmålingerne stiller nogle særlige krav fordi det udsendte lys er svagt. Alle tre systemer er ikke invasive (derfor ingen problemer med kontaminering) og måler online (dvs. prøvetagning er ikke nødvendig). Et LabView program står for opsamling af alle måledata og kan (i en senere fase af projektet) også regulere procesvariabler som temperatur, DO eller pH.

Resultater

I et første proof-of-concept forsøg blev der kørt kultiveringer med almindelig tørgær – det tillader en hurtig opstart uden prækulturer som igen sørger for flere kultiveringsforsøg i udviklingsfasen, hvor vi er meget fokuseret på undersøgelse af

	MBR	Rystekolbe	Bench-scale
Volumen	100µL	100mL – 1L	1-5L
Batch	Ja	Ja	Ja
Kontinuerlig kultivering	Ja	Nej	Ja
Iltforsyning	Membran	Kontakt med luft	Bobler
Omrøring	Magnetomrører	Ryste / omrøre	Impeller
Optisk tæthed	Online	Prøvetagning	Prøvetagning
Opløst ilt	Online	Nej	Muligvis online
pH	Måling online	Via prøvetagning	Kontrolleret
Prøvetagning	Ikke muligt	Forstyrrer processen	Nemt
Håndtering (setup, rengøring)	Nemt	Nemt	Arbejdsintensivt
Information per eksperiment	Højt	Lavt	Højt

funktionaliteten af systemet. Til gengæld tillader det ingen sammenligning med data fra andre laboratorieskala kulturer.

Både batchkulturer og kontinuerlige kulturer over syv dage er blevet kørt hvor alle hjælpesystemer (måling af OD & DO, blanding, temperaturregulering, ind- og udløb) var i brug. Det viste sig, at systemet virker som forventet, følgelig er proof-of-concept udviklingsfasen ved at blive afsluttet. Naturligvis findes der også forskellige ting som kan forbedres.

I næste udviklingsfase (som er i gang nu) arbejdes på opgradering af systemerne for en mere robust MBR og derefter skal der køres kultiveringer med laboratoriegær-stammer fra DTU Biosys. Dette vil tillade at sammenligne data fra mikrobioreaktorerne med eksisterende data fra rystekolbe-, batch, og kontinuerlige kulturer i laboratorieskala. Desuden skal der undersøges om mikrobioreaktorer giver den samme ranking i forhold f.eks. til produktivitet af forskellige stammer som f.eks. rystekolber.

Konklusion

Mikrobioreaktorer er fleksible og billige systemer som er velegnet til parallel kultivering af mikroorganismer i screeningsforsøg. Online-målingerne sørger for et højt informationsindhold per forsøg. Den større mængde data i forhold til rystekolbeforsøg forventes at gøre opskalering lettere. Regulering af procesvariabler i mikrobioreaktoren tillader at udføre forsøgene under kontrollerede forhold.

Vi vil meget gerne sige tak til Novozymes Bioprocess Academy for deres omfattende støtte af dette projekt.

*email: Daniel
Schäpper, dsc@kt.dtu.dk*

Referencer:

Zhang et al., A Well-Mixed, Polymer-Based Microbioreactor With Integrated Optical Measurements, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 93, No. 2, 2006
 Szita et al., Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput bioprocessing, *Lab Chip* 2005, 5, 819-826
 Lee et al., Microbioreactor arrays with integrated mixers and fluid injectors for high-throughput experimentation with pH and dissolved oxygen control, *Lab Chip*, 2006, 6, 1229-1235

Smart2Pure

**Ingen kompromis– begge
ASTM Type I og Type II med
samme system.**

**Tilslut Smart2Pure til
vandhanen og få op til 6 l/tim.
rent vand (type II) og op til
1 l/min. (type I).**

**Dette system vil overholde alle
krav for vandrenhed til alle
kritiske applikationer som
HPLC, ICP osv.**

**Systemet er let at bruge og
meget rengøringsvenligt.**

**Systemet sælges komplet –
køreklart – til de bedste i
priser i Danmark.**



Systemet forhandles af

POLYGEN

Tlf. 70101088

E-mail: info@polygen.dk



**Yderligere information:
www.polygen.eu**