



## Cultivo celular de alta densidad con *Escherichia coli* en un BIOSTAT® A



Application  
Note

#08

#09

#10

#11

#12

## Introducción

La *Escherichia coli* es comúnmente usada como un organismo hospedero para la producción de proteína recombinante. Debido a su facilidad de manejo, caracterización metabólica y genética muy conocida, cepas de *Escherichia coli* como BL21 (DE3) son usadas para fines de entrenamiento especialmente en ambientes educacionales. Además, muchos protocolos para cultivo de cepas de *Escherichia coli* en sistema cerrado, así como fed-batch, están disponibles.

Workshops de fermentación deben concentrarse en aspectos de aprendizaje sobre crecimiento controlado de células en biorreactores. La práctica operacional de mano de obra debe ser hecha eficiente por una automatización amigable con el usuario. El fácil uso desde el calibrado de las sondas hasta la operación del sistema es esencial para los biorreactores de mesa usados para propósitos educacionales. La interfaz intuitiva con el usuario del BIOSTAT® A acelera el entrenamiento y lo torna ideal para iniciantes en fermentación. Sensores digitales de pH y pO<sub>2</sub> junto con un nuevo Menú PC Tablet haciendo el manejo fácil e intuitivo. Las sondas digitales de pH y pO<sub>2</sub> ayudan a los operadores a reconocer a primera vista si una sonda puede ser usada para el próximo cultivo. Conectores resistentes a la humedad garantizan la transmisión segura de datos al BIOSTAT® A en todos los momentos, hasta cuando los conectores del sensor quedan húmedos. Su nuevo módulo de aeración suministra un control de flujo continuo y automático a través de la gama completa de cada uno de los gases usados y la unidad de refrigeración que permite fermentación en cualquier laboratorio suministrando agua de refrigeración para el recipiente de cultivo independiente de la disponibilidad de una línea de suministro de agua. Para adición necesita de sustrato fed-batch, perfiles de sustrato pueden ser fácilmente implementados en el software para controlar una bomba externa controlada por velocidad.

El objetivo de esta nota de aplicación es mostrar la capacidad del BIOSTAT® A para ejecutar cultivos desafiantes de *Escherichia coli* fed-batch (tasa de crecimiento específico de  $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ ). El pico de densidad celular debe estar arriba de 60 g/l de peso celular seco para acentuar su adecuación como un biorreactor de mesa para fines educacionales.

## 1. Materiales y Métodos

### 1.1 Cepas y medios

El cultivo se hizo con cepas de *Escherichia coli* BI 21(DE3). Medio LB, con 20 g/l de polvo de medio LB (Roth), fue usado para la preparación del primer cultivo de siembra. La segunda siembra y el cultivo principal usaron un medio químicamente definido (Riesenberget al. 1991) (con 10 g/l de glucosa para el segundo cultivo de siembra y 30 g/l de glucosa para el cultivo principal). El medio de cultivo fue autoclavado directamente dentro del UniVessel® 5 l. La glucosa fue agregada por separado, después autoclavada, como una solución stock. Durante el cultivo una solución de alimentación fue suministrada para prolongar la fase de crecimiento con 770 g/l de glucosa y 19,7 g/l de MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O.

### 1.2 Etapas de cultivo

Como un primer paso, alícuotas de un Banco de Células de Trabajo fueron distribuidas en placas de Petri con LB-Agar e incubadas por 24 h a 37 °C. El primer cultivo de siembra fue preparado en un frasco Erlenmeyer de 100 ml, lleno con 20 ml de medio LB e incubado a 37 °C por 14 horas. Con uso de una porción del primer cultivo de siembra, el segundo cultivo de siembra fue inoculado (inicial OD<sub>600</sub> = 0,1) en un frasco Erlenmeyer de 1 l, lleno con 200 ml de medio químicamente definido e incubado por 8 h a 37 °C. Ambos cultivos de siembra fueron incubados en un CERTOMAT® Tplus con una tasa de agitación de 150 rpm y un diámetro de órbita de 50 mm.

El sistema BIOSTAT® A con UniVessel® 5 l fue preparado para cultivo con los siguientes accesorios:

- para control de temperatura – unidad de refrigeración, dedo de refrigeración y manta de calentamiento
- para agitación – láminas de disco 2 × 6 (turbina rushton)
- para gaseificación – una inserción de anillo
- una caja deflectora

El recipiente fue lleno con 3,5 L de medio definido químicamente y densidad celular inicial era OD<sub>600</sub> (densidad óptica a 600 NM) = 0,25.



**Figura 1:** BIOSTAT® La configuración para experimento de fermentación de alta densidad celular con *Escherichia coli*

Una vez que la glucosa en medio de cultivo fue completamente consumida una solución concentrada fue suministrada con una tasa de aumento exponencial. La tasa de crecimiento específica fue controlada para  $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$  durante la fase fed batch. Tasas de crecimiento específicas de  $\mu > 0,15 \text{ h}^{-1}$  llevan a producción desfavorable de subproductos metabólicos (Riesenberg et al. 1991).

Además, problemas de refrigeración debido al aumento de la generación de calor pueden ocurrir, especialmente en mayores escalas | volúmenes de cultivo. Durante el cultivo el pH fue controlado a 6,8 a través de la adición de solución de amoníaco 20%. Los niveles de oxígeno disuelto fueron controlados automáticamente para un 20% manteniendo la velocidad del agitador constante a 800 rpm (velocidad de punta = 2,7 m/s) y enriqueciendo el gas aspergido con oxígeno puro.

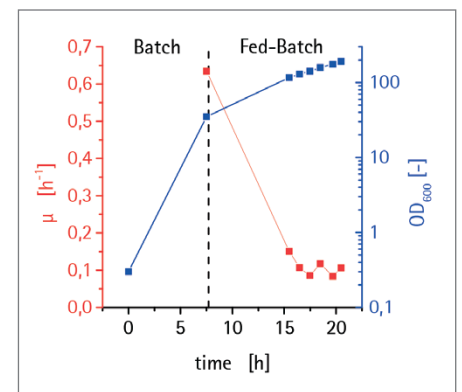
El estado actual de las sondas, calibrados, desvíos y los parámetros de control de proceso están exhibidos directamente, (vea figura 2). El perfil de alimentación exponencial también fue controlado con el recurso de tablet.



**Figura 2:** Calibrado digital de las sondas de pH y  $\text{pO}_2$

## 2. Resultados

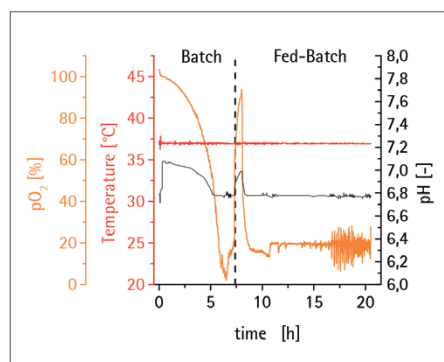
Como un estudio de caso, una fermentación con alta densidad celular de *Escherichia coli* fue realizada para evaluar si un BIOSTAT® A cumple los requisitos de este proceso desafiador. En la figura 3 las características de  $\text{OD}_{600}$  (proporcional al aumento de la densidad celular) y la tasa de crecimiento específico están mostradas para verificar el comportamiento del crecimiento. Durante la fase de sistema cerrado y fed batch la densidad celular aumentó de modo exponencial. La tendencia de la proliferación fue inferior en la fase fed batch debido al  $\mu$  controlado. En el fin de la fase batch una  $\text{OD}_{600}$  de 35 (peso celular seco = 13,6 g/l) fue medida. Esto corresponde a una  $\text{YX/S}$  de 0,45 gDCW/gglucosa, e indica un consumo de sustrato esperado y, por consiguiente, óptimas condiciones de crecimiento (Stanbury et al. 1995). Una densidad celular final de  $\text{OD}_{600} = 191$  (DCW = 72 g/l) fue alcanzada.



**Figura 3:** Comportamiento del crecimiento en fermentación con *Escherichia coli* en un BIOSTAT® A. Las características de  $\text{OD}_{600}$  e  $\mu$  son mostradas.

La figura 4 muestra perfiles de valores medidos de oxígeno disuelto, temperatura y pH. Estos pueden ser usados para evaluar si las condiciones de cultivo fueron óptimas. Dentro de las primeras 6 horas el  $pO_2$  disminuyó de modo exponencial causado por el aumento de la tasa de consumo de oxígeno hasta que el punto ajustado del 20% fue alcanzado.

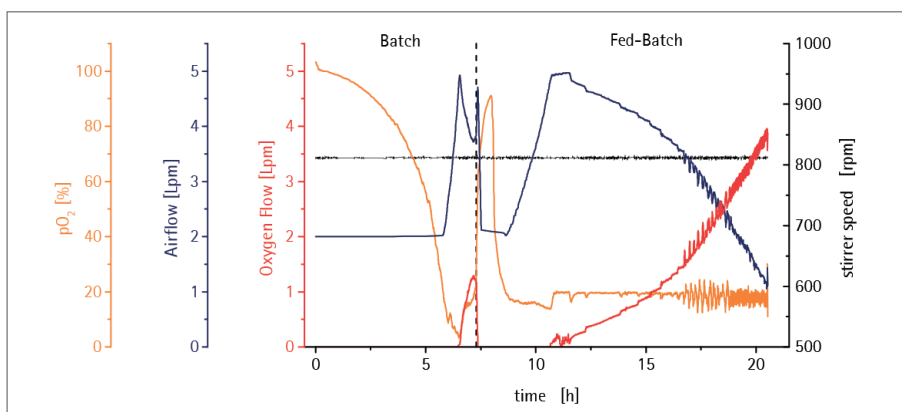
Después de  $t = 7,5$  h se observó un aumento significativo de  $pO_2$ , que indica el consumo completo de la glucosa inicial y el fin de la fase en sistema cerrado. Durante el restante de la fermentación la  $pO_2$  fue controlada de modo adecuado para el punto de ajuste. Así, puede concluirse que las condiciones aeróbicas estuvieron presentes durante todo el cultivo. El control de temperatura fue realizado con éxito, que indica una capacidad de refrigeración suficiente de los dedos de refrigeración y unidad de refrigeración. Además, el control de pH permaneció fiable por todo el proceso.



**Figura 4:** Condición de cultivo muestra las características de  $pO_2$ , temperatura y pH.

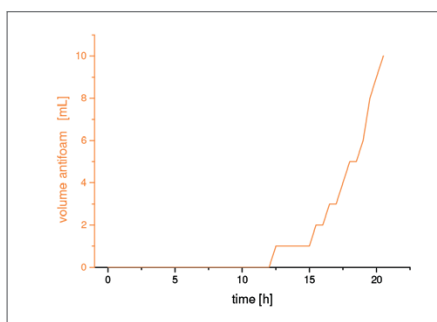
En la figura 5 los parámetros del proceso para control de oxígeno disuelto son mostrados.

Después que el punto definido de  $pO_2$  fue alcanzado, oxígeno puro fue suministrado hasta 1 Lpm durante la fase de batch. Debido al crecimiento más lento en la fase fed batch el aumento de la tasa de  $O_2$  fue más lento y alcanzó una tasa de gasificación máxima de 4 Lpm (tasa del 80% del total de gasificación).



**Figura 5:** Características de presión parcial de oxígeno y parámetros de control.  $pO_2$ , velocidad de agitación, tasa de flujo de gas y tasa de flujo de gas oxígeno son mostrados.

En la figura 6 las características de adición anti-espuma son mostradas. En total 10 ml fueron suministrados (lo que estaba dentro de la franja típica esperada).



**Figura 6:** Cantidad adicionada de solución anti-espuma (Antifoam 204, Sigma) durante el cultivo de *Escherichia coli*

### 3. Conclusión

La viabilidad de realizar el cultivo batch y fed-batch de alta densidad celular de cepas de *Escherichia coli* BL21 con BIOSTAT® A fue demostrado en esta nota de aplicación. Densidades celulares arriba de 60 g/l de peso celular seco pudieron ser alcanzadas y todos los parámetros críticos del proceso como pH,  $pO_2$  y temperatura pudieron ser controlados automáticamente y con éxito. Debido al flujo continuo de gas ningún ajuste manual de las tasas de flujo de gas fue necesario y la adición de anti-espumante fue baja.

Monitoreo remoto y control de cultivo, hasta de fuera del laboratorio, fue posible debido al uso de una tablet para la operación del BIOSTAT® A. Además, la facilidad con que los operadores manejaron el BIOSTAT® A probó adecuación perfecta para fines educacionales.

### Referencias

- Riesenberg D, Schulz V, Knorre WA, Pohl HD, Korz D, Sanders EA, Roß A, Deckwer WD (1991) High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate. Journal of Biotechnology doi: 10.1016/0168-1656(91)90032-Q
- Stanbury PF, Whitaker A, Hall J (1995) Principles of fermentation technology. Pergamon Oxford, Oxford

Sartorius Stedim Biotech GmbH  
August-Spindler-Strasse 11  
37079 Goettingen, Germany  
Phone +49.551.308.0  
Fax +49.551.308.3289  
www.sartorius-stedim.com

USA Toll-Free +1.800.368.7178  
Argentina +54.11.4721.0505  
Brazil +55.11.4451.6226  
Mexico +52.5555.62.1102  
UK +44.1372.737159  
France +33.442.845600  
Italy +39.055.63.40.41  
Spain +34.913.586.098  
Russian Federation +7.812.327.5.327  
Japan +81.3.4331.4300  
China +86.21.68782300

Specifications subject to change without notice.  
Copyright Sartorius Stedim Biotech GmbH. Printed in the EU on paper bleached without chlorine.  
Publication No.: SBT1022es160601  
Order No.: 85037-554-95  
Ver. 06 | 2016