



Cultivo celular de alta densidade com *Escherichia coli* em um BIOSTAT® A



Nota de
aplicação

#08

#09

#10

#11

#12

Introdução

A *Escherichia coli* é comumente utilizada como um organismo hospedeiro para a produção de proteína recombinante. Devido à sua facilidade de manuseio, caracterização metabólica e genética bem conhecida, cepas de *Escherichia coli* como BL21 (DE3) são usadas para fins de treinamento, especialmente em ambientes educacionais. Além disso, muitos protocolos para cultivo de cepas de *Escherichia coli* em sistema batelada, bem como batelada alimentada, estão disponíveis.

Workshops de fermentação devem se concentrar em aspectos-chave de aprendizagem sobre crescimento controlado de células em biorreatores. A prática "mãos a obra" deve ser feita de maneira eficiente por uma automação amigável com o usuário. A fácil utilização, desde a calibração das sondas até a operação do sistema é essencial para biorreatores de bancada usados para propósitos educacionais. A interface de usuário intuitiva do BIOSTAT® A acelera o treinamento e o torna ideal para iniciantes em fermentação. Sensores digitais de pH e pO₂ juntamente com um novo menu no PC ou tablet facilitam o manuseio fácil e intuitivo. As sondas digitais de pH e pO₂ ajudam os operadores a reconhecer à primeira vista se uma sonda pode ser usada para o próximo cultivo. Conectores resistentes à umidade garantem a transmissão segura de dados ao BIOSTAT® A em todos os momentos – mesmo quando os conectores do sensor ficam umidos. Seu novo módulo de aeração fornece controle de fluxo contínuo e automático através da gama completa de cada um dos gases utilizados e a unidade de refrigeração permite fermentação em qualquer laboratório fornecendo água de refrigeração para o recipiente de cultura independentemente da disponibilidade de uma linha de fornecimento de água. Para adição precisa de substrato na batelada alimentada, alguns perfis de substrato podem ser facilmente implementados no software para controlar uma bomba externa controlada por velocidade.

O objetivo desta nota de aplicação é mostrar a capacidade do BIOSTAT® A para executar cultivos desafiadores de *Escherichia coli* em batelada alimentada (taxa de crescimento específico de $\mu_{\text{set}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$). O pico de densidade celular deve estar acima de 60 g/L de peso celular seco para acentuar a sua adequação como um biorreator de bancada para fins educacionais.

1. Materiais e Métodos

1.1 Cepas e meios

O cultivo foi realizado usando cepas de *Escherichia coli* BL 21 (DE3). Meio LB, contendo 20 g/L de pó de meio LB (Roth), foi usado para a preparação da primeira cultura de semeadura. A segunda semeadura e a cultura principal utilizaram um meio quimicamente definido (Riesenberg et al. 1991) (contendo 10 g/L de glicose para a segunda cultura de semeadura e 30 g/L de glicose para a cultura principal). O meio de cultura foi autoclavado diretamente dentro do UniVessel® 5 L. Glicose foi adicionada separadamente, após autoclavagem, como uma solução estoque. Durante o cultivo uma solução de alimentação foi fornecida para prolongar a fase de crescimento com 770 g/L de glicose e 19,7 g/L de MgSO₄ · 7H₂O.

1.2 Etapas de cultivo

Como um primeiro passo, alíquotas de um Banco de Células de Trabalho foram distribuídas em placas de Petrie com LB-Agar e incubadas por 24 h a 37°C. A primeira cultura de semeadura foi preparada em um frasco Erlenmeyer de 100 mL preenchido com 20 mL de meio LB e incubado a 37°C por 14 h. Utilizando uma porção da primeira cultura de semeadura, a segunda cultura de semeadura foi inoculada (inicial OD₆₀₀ = 0,1) em um frasco Erlenmeyer de 1L preenchido com 200 mL de meio quimicamente definido e incubado por 8 h a 37°C. Ambas as culturas de semeadura foram incubadas em um CERTOMAT® Tplus com uma taxa de agitação de 150 rpm e um diâmetro órbita de 50 mm.

O sistema BIOSTAT® A com UniVessel® 5 L foi preparado para cultivo com os seguintes acessórios:

- para controle de temperatura – unidade de refrigeração, dedo de refrigeração e manta de aquecimento
- para agitação – lâminas de disco 2 × 6 (turbina rushton)
- para gaseificação – aspersor tipo anel – chicanas

O recipiente foi enchido com 3,5 L de meio definido quimicamente e a densidade celular inicial era OD₆₀₀ (densidade óptica a 600 nm) = 0,25.



Figura 1: BIOSTAT® A configuração para experimento de fermentação de alta densidade celular com *Escherichia coli*

Uma vez que a glucose no meio de cultura foi completamente consumida um substrato altamente concentrado foi fornecido para uma taxa de aumento exponencial. A taxa de crescimento específica foi controlada para $\mu_{set} = 0,15 \text{ h}^{-1}$ durante a fase de alimentação. Taxas de crescimento específicas de $\mu > 0,15 \text{ h}^{-1}$ levam à produção desfavorável de subprodutos metabólicos (Riesenberg et al. 1991).

Além disso, problemas de refrigeração devido ao aumento da geração de calor podem ocorrer, especialmente em maiores escalas | volumes de cultura. Durante o cultivo o pH foi controlado para 6,8 através da adição de solução de amônia 20%. Os níveis de Oxigênio Dissolvido foram controlados automaticamente para 20% mantendo-se a velocidade do agitador constante a 800 rpm (velocidade da ponta = 2,7 m/s) e enriquecendo o gás aspergido com oxigênio puro.

O estado atual das sondas, calibrações, desvios e os parâmetros de controle de processo são exibidos diretamente, (ver figura 2). O perfil de alimentação exponencial também foi controlado com o recurso de tablet.



Figura 2: Calibração digital das sondas de pH e pO_2

2. Resultados

Como um estudo de caso, uma fermentação com alta densidade celular utilizando *Escherichia coli* foi realizada para avaliar se um BIOSTAT® A cumpre os requisitos desse processo desafiador. Na figura 3 as características de OD_{600} (proporcional ao aumento da densidade celular) e a taxa de crescimento específico são mostradas para verificar o comportamento do crescimento. Durante a fase de sistema fechado e fed batch a densidade celular aumentou exponencialmente. A inclinação da proliferação foi inferior na fase fed batch devido ao μ controlado. No fim da fase batch uma OD_{600} de 35 (peso celular seco = 13,6 g/L) foi medida. Isto corresponde a uma YX/S de 0,45 gDCW/gglicose, indicando um consumo de substrato esperado e, por conseguinte, ótimas condições de crescimento (Stanbury et al. 1995). Uma densidade celular final de $OD_{600} = 191$ (DCW = 72 g/L) foi alcançada.

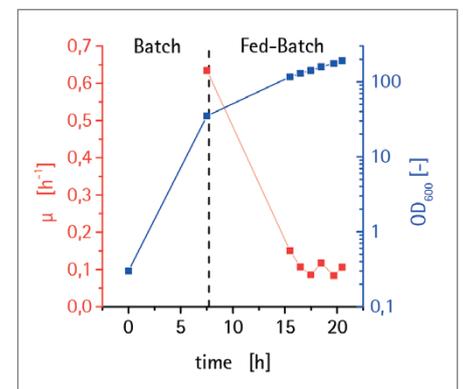


Figura 3: Comportamento do crescimento em fermentação com *Escherichia coli* num BIOSTAT® A. As características de OD_{600} e μ são mostradas.

A figura 4 mostra perfis de valores medidos de Oxigênio Dissolvido, temperatura e pH. Estes podem ser utilizados para avaliar se as condições de cultura foram ótimas. Dentro das primeiras 6 horas o pO_2 diminuiu exponencialmente causado pelo aumento da taxa de consumo de oxigênio até que o ponto ajustado de 20% foi alcançado.

Após $t = 7,5$ h observou-se um aumento significativo de pO_2 , indicando o consumo completo da glicose inicial e o fim da fase em sistema fechado. Durante o restante da fermentação a pO_2 foi controlada adequadamente para o ponto de ajuste. Assim, pode concluir-se que as condições aeróbicas estiveram presentes durante todo o cultivo. O controle de temperatura foi realizado com sucesso, indicando uma capacidade de refrigeração suficiente dos dedos de refrigeração e unidade de refrigeração. Além disso, o controle do pH permaneceu confiável por todo o processo.

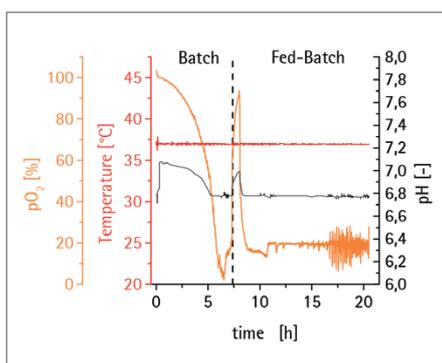


Figura 4: Condições de cultivo mostrando as características de pO_2 , temperatura e pH.

Na figura 5 os parâmetros do processo para controle do oxigênio dissolvido são mostrados. Depois que o ponto definido de pO_2 foi alcançado, oxigênio puro foi fornecido até 1 Lpm durante a fase de batch. Devido ao crescimento mais lento na fase fed batch o aumento da taxa de O_2 foi mais lento e atingiu uma taxa de gaseificação máxima de 4 Lpm (taxa de 80% do total de gaseificação).

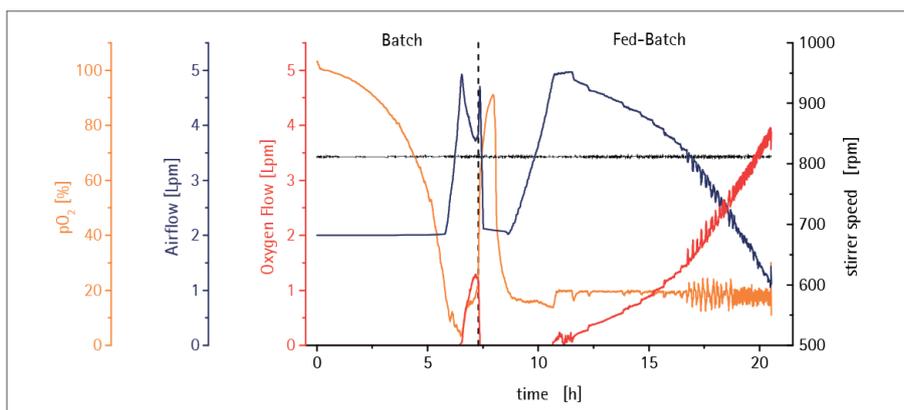


Figura 5: Características de pressão parcial de oxigênio e parâmetros de controle. O pO_2 , velocidade de agitação, taxa de fluxo de gás e taxa de fluxo de gás oxigênio são mostrados.

Na figura 6 as características de adição de anti-espumante são mostradas. No total 10 mL foram fornecidos (o que estava dentro da faixa típica esperada).

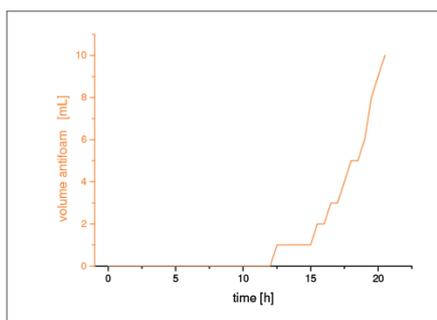


Figura 6: Quantidade adicionada de solução anti-espuma (Antifoam 204, Sigma) durante o cultivo de *Escherichia Coli*

3. Conclusão

A viabilidade de realizar o cultivo batch e fed-batch de alta densidade celular de cepas de *Escherichia coli* BL21 com BIOSTAT® A foi demonstrado nessa nota de aplicação. Densidades celulares bem acima de 60 g/L de peso celular seco puderam ser alcançadas e todos os parâmetros críticos do processo como pH, pO_2 e temperatura puderam ser controlados automaticamente e com sucesso. Devido ao fluxo contínuo de gás nenhum ajuste manual das taxas de fluxo de gás foi necessário e a adição de anti-espumante foi baixa.

Monitoramento remoto e controle do cultivo, mesmo de fora do laboratório, foi possível devido ao uso de um tablet para a operação do BIOSTAT® A. Além disso, a facilidade com a qual os operadores manusearam o BIOSTAT® A provou a sua adequação perfeita para fins educacionais.

Referências

- 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.: SBT1022ac160801
Order No.: 85037-556-05
Ver. 08 | 2016