Nagyüzemi fermentálási eljárások optimálása

Tárgyszavak: fermentálás; optimálás; méretnövelés; szakaszos üzem; folyamatos üzem.

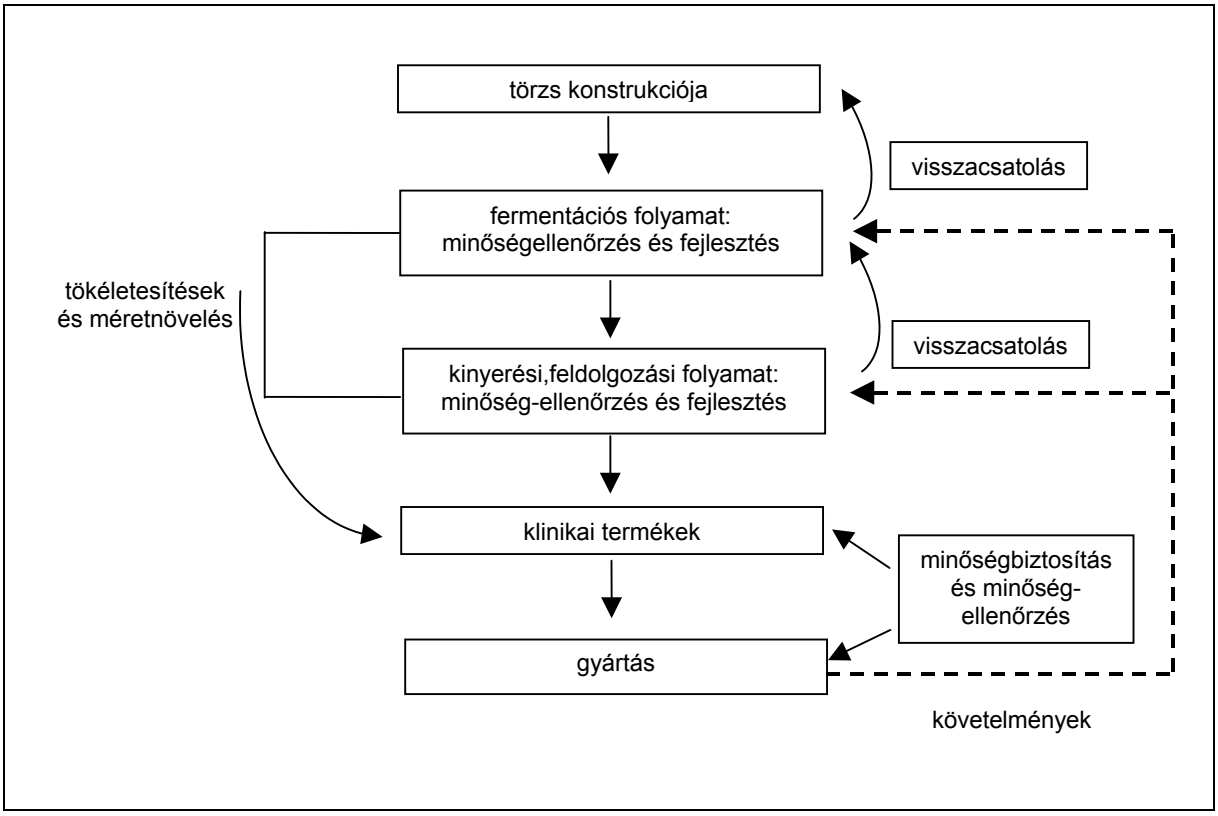
A fermentációs folyamat optimálása beletartozik egy projekt kivitelezhetőségének stratégiai elemzésébe. Optimálás akkor megy végbe, ha a termelés megvalósíthatósága egy kiválasztott szervezetben kimutatható. Ez magában foglalja azt is, hogy egy expressziós rendszert alakítottak ki, amely – legalábbis elméleti szempontból – optimálisnak tekinthető. Hosszadalmas és költséges optimálási munkálatok elkezdése előtt fontos a törzs stabilitáásnak meghatározása legalább annyi generációra, amennyi szükséges a sejtbank kialakításához és nagyipari fermentáláshoz, beleértve az előtenyészeteket is. A plazmidokon alapuló expressziós rendszerek néha instabilak, mert a plazmidok szegregációs stabilitását több paraméter befolyásolja. A stabilitás minden egyes plazmid esetében különböző, és a gazdatörzstől függ; a nagyfokú instabilitás kevés plazmidmásolattal függ össze. A beépített DNS nagysága befolyásolja a stabilitást, minél nagyobb, annál kevésbé stabil. A tenyésztési viszonyok (hőmérséklet, táptalaj összetétele, szaporodási sebesség) szintén módosíthatják a plazmid stabilitását. A plazmidveszteség jelentős az utóexponenciális szaporodási szakaszban, és a plazmid instabilitása fokozódik a génexpressziós periódusban. Gyakran használnak antibiotikumokat a plazmidok stabilizálására. Stabilizálás érhető el a *parB/hok/sok/*-lótusz beültetésével, amely elpusztítja a plazmidmentes sejteket. Másik lehetőség a beültetett rész integrálása a gazda kromoszómájába. Ez gyakori a *Pichia pastoris*-konstrukciók esetében, de a génintegrálás csökkentheti az expresszió mértékét.

A termelőtörzs és az expressziós vektor kiválasztása függ a konstitutív vagy indukálható expressziótól a sejtplazmába vagy a külső közegbe való kiválasztástól. Ha a törzs a laboratóriumon kívülről származik, ellenőrizni kell az eredeti törzs forrására és a klónozási eljárásra vonatkozó dokumentáció minőségét.

Optimálni kell a kérdéses gén kodonfelhasználását a kiválasztott mikroorganizmusban való expresszió megkönnyítésére. Azonnal el kell végezni az expresszió kiszűrését egy rázópalackban olyan klón megtalálása céljából, amely nagyfokú expresszió mellett termeli a rekombináns fehérjét.

Tenyésztési viszonyok optimálása

Ha az optimálás fő célja a termelés maximálása, akkor ez a folyamat csak akkor kezdhető meg, ha egy laboratóriumi tisztítási eljárás és egy minimális minőség-ellenőrző készlet áll rendelkezésre a termék minőségének és mennyiségének meghatározásához. A fermentálási napló érinti a szennyezettségi profilt, és így erősen befolyásolja a feldolgozást (DSP). Hasonlóképpen a fermentálási viszonyok meghatározhatják, hogy a kérdéses fehérje oldékony vagy oldhatatlan alakban lesz-e jelen, amely erősen befolyásolja a feldolgozást, és így a tisztított termék minőségét és hozamát. A nagy hozamból eredő túltermelés bizonyos faktorok – amelyek szükségesek a fehérje megfelelő konfigurációjához – elszegényedéséhez vezethet. Így a fermentációt a tisztítással együtt kell kidolgozni, mivel ezek hatást gyakorolnak egymásra. A fermentálás és a kinyerés kifejlesztői közötti kommunikáció minőségének döntő jelentősége van a folyamat fejlesztésének sikere szempontjából *(1. ábra).*



1. ábra Egy biogyógyszer kifejlesztési szakaszainak kölcsönhatásai

A fermentálási folyamat optimálható egyszerre csak egy faktor megváltoztatásával vagy egyidejűleg több faktor variálásával, majd a kölcsönhatás megfigyelésével, statisztikai analízissel. A kísérletek statisztikai tervezése egy olyan szervezett megközelítés, amely megbízhatóbb információt ad, mint a nem tervezett módszerek. A statisztikai adatelemzés lehetővé teszi a kísérleti változók közötti kölcsönhatások megjelenítését, így a válaszadatok előrejelzését eredményezi olyan területeken, amelyekre nem terjed ki közvetlenül a kísérletezés. A kutató számára az egyik legfontosabb művelet azoknak a változóknak a meghatározása, amelyek hatással lehetnek a termék minőségére vagy a produktivitásra.

A fermentálás elvégezhető szakaszos, rátáplálásos–szakaszos és folyamatos üzemmódban. A folyamatos tenyésztés nem megszokott a gyógyszeriparban, mert nagyobb a mutáció és szennyeződés valószínűsége. A szakaszos eljárások egyszerűek és életképesek. Azonban nagy sejtsűrűség egyedül a rátáplálásos–szakaszos eljárással végezhető el, amely bonyolultabb, de lehetővé teszi a törzs anyagcseréjének szabályozását. A *Saccharomyces cerevisiae* esetében nagy glükózkoncentráció hatására az élesztő fermentatív anyagcserébe kezd még akkor is, ha az oxigén nincs korlátozva. Az anyagcsere szabályozható egy rátáplálásos–szakaszos módszerrel. A tápoldat gükózkoncentrációjának korlátozása lehetővé teszi, hogy a sejtek jól elszaporodjanak az *S. cerevisiae* légzési anyagcseréje során és meggátolja az *E. coli* acetáttermelését. A rekombináns termék produktivitásának összehasonlítása egy napra vonatkozóan, megkönnyíti a leggazdaságosabb eljárás kiválasztását.

A tápoldat lehet teljesen definiált vagy komplex, ha peptonokat is tartalmaz. A komplex tápoldatok könnyen elkészíthetők, olcsók és gyors szaporodást biztosítanak, de nehezen elemezhetők, és az egyes adagok között eltérések lehetnek. A definiált tápoldatok reprodukálható szaporodást biztosítanak és a keletkezett fehérjét tartalmazó felülúszó tisztasága jobb, mint a komplex táptalajok esetében. Mindkét esetben döntő a szénforrás kiválasztása. A nagy glükózkoncentráció acetát felhalmozódásához vezet, amely csökkenti a biomasszahozamot és az expressziós szintet *E. coli*ban, ezért inkább glicerint kell alkalmazni glükóz helyett.

Lehetőleg kerülni kell az állati eredetű nyersanyagok alkalmazását. Ha ez nem lehetséges, akkor a nyersanyagokat olyan helyen kell termelni, amely mentes az átvihető szivacsos agysorvadástól (TSE).

A tápoldat pH-jának optimálása döntő jelentőségű, különösen fehérjetermelő élesztők esetében, amelyek igen széles pH-intervallumban szaporodnak. A pH megválasztása a kifejezett rekombináns fehérje stabilitásától függ. Ha a *P. pastoris*t alacsony pH-nál tenyésztik, elkerülhető a proteáz lebomlása (pH = 2,2 alatt is).

A hőmérsékletnek fontos szerepe van a kifejeződött fehérje oldékonyságában és a produktivitásban is. A hőmérséklet csökkenése 30-ról 25 °C-ra a

metanolindukciós szakaszban négyszeresére növeli a *P. pastoris*ban klónozott galaktózoxidáz hozamát.

Rátáplálásos–szakaszos eljárás során az exponenciális adagolás lehetővé teszi, hogy a sejtek állandó sebességgel szaporodjanak, amely kedvező a rekombináns fehérjék kifejeződése szempontjából. Az oldott oxigén gyakran gátló tényező, ha már nagy szaporodási sebességet sikerült elérni. A metilotróf élesztők esetében döntő, hogy a sejtek légzési anyagcsere állapotában maradjanak. Így elkerülhető, hogy a tápoldatban túl sok metanol halmozódjon fel, ami igen toxikus. Nyomással növelhető az oxigén oldódása a tápoldatban, de egyúttal fokozódik az oldott szén-dioxid koncentrációja is, így ez a módszer nem megfelelő. Az oldott oxigén korlátozása nem mindig káros a jó expresszió szempontjából. A rekombináns fehérje kifejeződésének indukálási időpontja akkor optimális, ha az oxigénfelvétel maximális szinten van, de az oldott oxigén koncentrációja nulla.

A termelés által befolyásolt tényezők: generációk száma, mutációs valószínűség, tápoldat sterilezése, hőmérséklet- és pH-szabályozás minősége, keverés, levegőztetés és nyomás. Az eljárás bővítésének előkészítésére legjobb módszer először visszaállítani a tenyésztési viszonyokat félüzemi szintre, majd a méretek növelésének hatására a tápoldat egyre heterogénebb lesz. Nagy fermentálókban a reaktor bizonyos részeiből az oxigén eltávolítható.

Az eljárást jellemezni és minősíteni kell a hibatűrés, megbízhatóság és reprodukálhatóság kimutatása céljából. Minden berendezést minősíteni kell a jó gyártási gyakorlat szempontjából (üzembe állítás minősítése, helyszíni tisztítás és sterilezés, karbantartás, kalibrálás). A fermentálási napló javítható egészen a III. klinikai fázisig, amelyet a termelés végső méretének elérésekor kell elvégezni.

Egy heterológ fehérjetermelés optimálása a jól tervezett rekombináns törzs kialakításával kezdődik. A fermentációfejlesztési stratégia magában foglalja a törzs és a rekombináns fehérje viselkedésének ismeretét. A fejlesztés során figyelembe kell venni a feldolgozásból való visszacsatolást, a termelés végső méretét és a jó gyártási gyakorlat igényeit. Bár a fermentálási eljárás lehető legnagyobb mértékű szabványosítására irányuló trend észlelhető, kimutatták, hogy még a legkisebb változások is nagymértékben növelhetik a produktivitást. A fermentálási eljárás optimálását két szakaszban kell végezni. Először az ismert útvonalak lehetővé teszik a racionális és tudományos optimálást. A második szakaszban a kifejeződött fehérje tulajdonságainak vizsgálata kimutatja a meghatározható, szokatlanabb paramétereket. Így pl. egy kofaktor vagy szubsztrátum alkalmazása stabilizálhat egy enzimet és fokozhatja a végső produktivitást.

(Dr. Pálfi Ágnes)

Thiry, M.; Cingolani, D.: Optimizing scale-up fermentation processes. = Trends in Biotechnology, 20. k. 3. sz. 2002. p. 103–105.

D'Anjou, M. C.; Daugulis, A. J.: Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. = Biotechnology Letters, 2000. 22. sz. p. 341–346.

Enfors, S.: Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. = Journal of Biotechnology, 85. k. 2. sz. 2001. p. 175–185.