

Maciej PILAREK, Paweł SOBIESZUK, Kamil WIERZCHOWSKI, Katarzyna DĄBKOWSKA

e-mail: maciej.pilarek@pw.edu.pl

Zakład Biotechnologii i Inżynierii Bioprosesowej, Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Politechnika Warszawska, Warszawa

Aplikacyjność bioreaktora *single-use* z mieszaniem typu *wave* w bioprosesach przeprowadzanych w warunkach tlenowych

Wstęp

Intensywny rozwój inżynierii bioprosesowej w zakresie dotyczącym hodowli *in vitro* izolowanych komórek zwierzęcych, w tym ludzkich, otwiera nowe możliwości aplikacyjne w naukach biomedycznych. Wiąże się z tym konieczność opracowywania nowoczesnych aparatów pozwalających wydajnie prowadzić propagację biomasy komórek danego typu. Wysoki stopień specjalizacji fizjologicznej izolowanych komórek zwierzęcych wymaga wytworzenia bardzo specyficznych warunków procesowych kształtujących syntetyczne środowisko hodowli.

Jednym z istotnych współczesnych problemów badawczych dotyczących powiększania skali hodowli zwierzęcego materiału biologicznego jest intensyfikacja wymiany masy, najczęściej w odniesieniu do transportu gazów oddechowych (tzn. O_2 i CO_2), przy jednoczesnym wymogu zapewnienia możliwie łagodnych warunków hydrodynamicznych w układzie hodowlanym wynikających ze szczególnej wrażliwości komórek zwierzęcych na zjawisko tzw. *hydrodynamicznego stresu komórkowego* [de Jesus i Wurm, 2011; Nienow, 2006].

Szczególna podatność na negatywne naprężenia hydrodynamiczne generowane w układach hodowlanych podczas mieszania mechanicznego i/lub intensywnego napowietrzania, wynika z budowy komórek zwierzęcych, a zwłaszcza z oddzielenia ich cytoplazmy od środowiska zewnętrznego jedynie błoną komórkową.

Ponadto w stosowanych powszechnie układach do hodowli komórek zwierzęcych, wzrost biomasy jest limitowany stężeniem O_2 lub CO_2 rozpuszczonych w medium hodowlanym. Ograniczenia w transporcie O_2 do medium hodowlanego wynikają bezpośrednio z niskiej rozpuszczalności tego gazu w wodzie będącej podstawowym składnikiem (rozpuszczalnikiem) pożywek. Natomiast obecność w układzie hodowlanym zbyt wysokich stężeń CO_2 wywołuje spadek wartości odczynu *pH* oraz zmiany osmomolarności pożywek. Występowanie wszystkich wymienionych ograniczeń wymusza konieczność stosowania nietypowych, aparatów i technik hodowli umożliwiających realizację i powiększanie skali hodowli komórek zwierzęcych prowadzonych w warunkach *in vitro*.

Opracowane pod koniec XX w. bioreaktory typu *single-use* (*disposable bioreactors*) upowszechniły się wspólnie w wielu aplikacjach bioprosesów wymagających prowadzenia hodowli w głębokiej biomasy organizmów wyższych (tj. zwierząt i roślin) zarówno w formie rozproszonej (hodowle komórek i wielokomórkowych agregatów), jak i w postaci zintegrowanej (hodowle tkanek, organów, zasiedlanie komórkami biomateriałów) [Eibl i in., 2009]. Spośród szerokiej gamy dostępnych rozwiązań z zakresu technologii *single-use*, różniących się sposobem realizacji mieszania medium hodowlanego umieszczonego w jednorazowych (ang. *single-use, disposable*) polimerowych naczyniach hodowlanych zastępujących klasyczne reaktory zbiornikowe, największy udział w rynku posiadają bioreaktory z mieszaniem typu *wave* [Eibl i Eibl, 2011; Hillig i in., 2014]. W aparatach tego typu polimerowe naczynie hodowlane umieszcza się na termostatuowanej platformie i zestawia dwufazowy układ hodowlany napełniając naczynie porcją ciekłego medium hodowlanego, i uzupełniając brakującą objętość przepływającą fazą gazową (o zdefiniowanym składzie). Po inokulacji otrzymanego układu hodowlanego gaz-ciecz, całość wprawia się w oscylacyjny ruch o wahadłowych wychyleniach przeciwnych krawędzi platformy bioreaktora. Oscylacyjne wychylenia platformy wymuszają efekt fali wewnątrz polimerowego naczynia hodowlanego,

która wywołuje przepływ medium hodowlanego względem fazy gazowej oraz zapewnia odnawianie powierzchni międzyfazowej gaz-ciecz (Rys. 1).

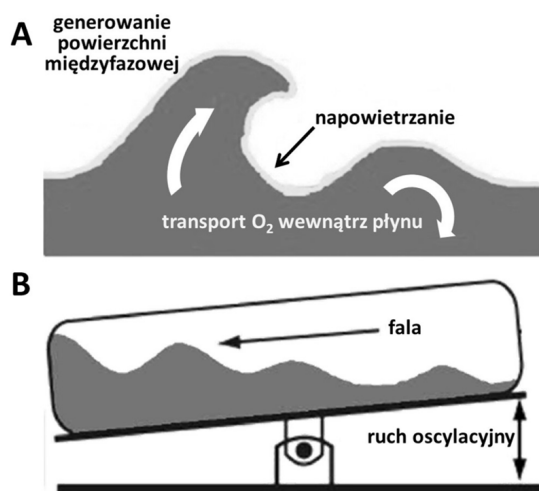
Celem pracy było zbadanie intensyfikacji napowietrzania fazy ciekłej efektem fali generowanej w bioreaktorze typu *single-use* zaopatrzonego w polimerowe naczynie hodowlane umożliwiające zaprezentowanie aplikacyjności mieszania typu *wave* w bioprosesach przeprowadzanych w warunkach tlenowych.

Badania doświadczalne

Bioreaktor. Wykorzystano bioreaktor *ReadyToProcess WAVE™25* (*WAVE 25* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Szwecja) zaopatrzonego w polimerowe naczynie hodowlane o pojemności całkowitej 2 dm³. W naczynie hodowlane wbudowane były dwa miniaturowe sensory optyczne umożliwiające pomiary *on-line* stężenia O_2 rozpuszczonego w fazie ciekłej (*DO*) oraz wartości odczynu *pH* fazy ciekłej. Pomiaru wartości *DO* dokonywano co 60 s. Integralną część układu bioreaktora *WAVE 25* stanowi jednostka kontrolująco-pomiarowa *ReadyToProcess CBCU*, która zapewniała automatyczny odczyt sygnałów emitowanych przez miniaturowe sensory oraz przeprowadzane automatycznie mieszanie składu fazy gazowej dozowanej następnie, zgodnie z zadaną wartością objętościowego natężenia przepływu Q_G fazy gazowej do naczynia hodowlanego.

Materiały. Stosowano wodę dejonizowaną odtlenioną czystym azotem. Mieszanina gazowa O_2 i N_2 została otrzymana w wyniku zmieszania czystych gazów.

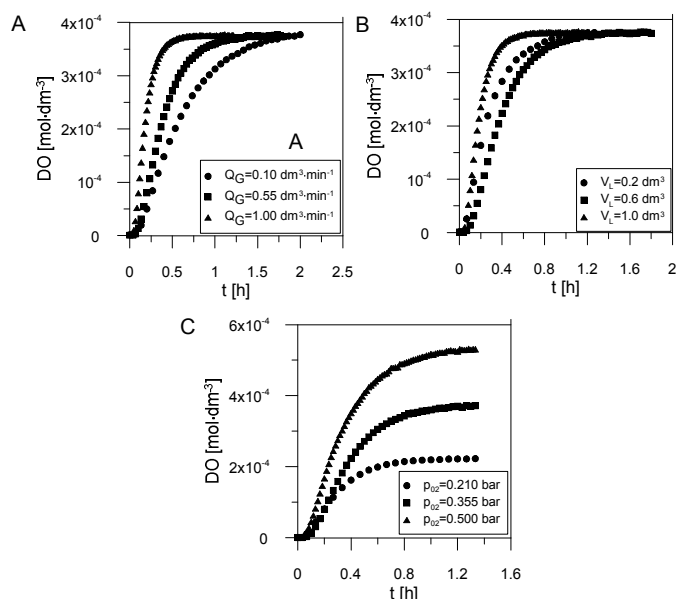
Zakres badań. Przeanalizowano wpływ następujących parametrów procesowych na zmiany *DO* w warunkach mieszania typu *wave* w bioreaktorze *WAVE 25* (dla każdej z wartości pomiar przeprowadzono trzykrotnie): Q_G (0,10; 0,55; 1,00 dm³·min⁻¹), kąt wychyleń α (względem poziomu) platformy bioreaktora (2, 7, 12 deg), częstotliwość ω wychyleń platformy bioreaktora (2, 21, 40 min⁻¹), objętość cieczy V_L w naczyniu hodowlanym (0,2; 0,6; 1,0 dm³); prężność O_2 p_{O_2} w fazie gazowej (0,210; 0,355; 0,500 bar).



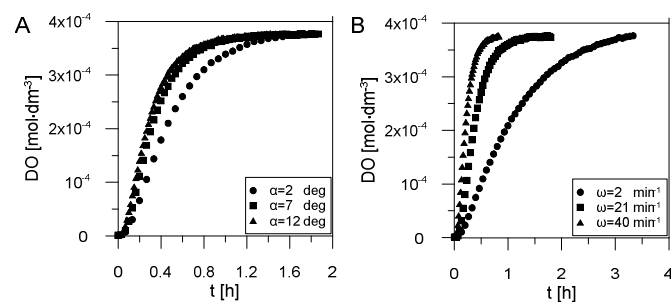
Rys. 1. Mieszanie typu *wave* realizowane w bioreaktorach typu *single-use*: A - powstanie fali wywołuje napowietrzanie pożywki; B - generowanie fali na skutek oscylacyjnego ruchu naczynia hodowlanego

Wyniki i dyskusja

W bioreaktorze WAVE 25 przeprowadzono pomiary wartości DO w czasie prowadzenia procesu napowietrzania falującej fazy ciekłej zamkniętej w polimerowym naczyniu hodowlanym typu *single-use*, w którym nad warstwą falującej cieczy przepływała dozowana do układu mieszanina gazowa o zdefiniowanym składzie. Na rys. 2 oraz rys. 3 przedstawiono uzyskane profile DO od czasu prowadzenia napowietrzania fazy ciekłej dla szeregu parametrów procesowych wpływających na efektywność mieszania typu *wave*. Pomiary przeprowadzono dla trzech reprezentatywnych wartości badanego parametru, przy zachowaniu niezmiennych wartości pozostałych parametrów.



Rys. 2. Zależności wartości DO od czasu prowadzenia napowietrzania fazy ciekłej w bioreaktorze WAVE 25 uzyskane dla reprezentatywnych wartości parametrów charakteryzujących mieszanie gazową i fazę ciekłą, które wypełniają polimerowe naczynie hodowlane typu *single-use*: A - wpływ Q_G , B - wpływ V_L oraz C - wpływ p_{O_2}



Rys. 3. Zależności wartości DO od czasu prowadzenia napowietrzania fazy ciekłej w bioreaktorze WAVE 25 uzyskane dla reprezentatywnych wartości podstawowych parametrów procesowych intensyfikujących napowietrzanie w warunkach mieszania typu *wave*: A - wpływ α , B - wpływ ω

We wszystkich zbadanych wariantach procesu napowietrzania fazy ciekłej w warunkach mieszania typu *wave* uzyskano nasycenie fazy wodnej tlenem. Pozwala to zinterpretować otrzymane wyniki jako uzyskanie równowagi termodynamicznej O_2 -woda w każdym z rozpatrzonych przypadków.

Zgromadzone dane o charakterze ilościowym, jednoznacznie wskazują, że w warunkach mieszania typu *wave* uzyskiwanych w badanym bioreaktorze WAVE 25, możliwe jest wydajne prowadzenie procesu napowietrzania fazy ciekłej, a tym samym uzyskanie warunków odpowiednich do prowadzenia całego szeregu bioprocessów, w których udział biorą komórki charakteryzujące się tlenowym metabolizmem.

W zestawie zbadanych parametrów procesowych, których wpływ

na efektywność napowietrzania fazy ciekłej w warunkach mieszania typu *wave* został wykazany w pracy, można wyróżnić dwie grupy czynników procesowych: klasyczne parametry dotyczące mieszania gazowej i fazy ciekłej wypełniającej objętość polimerowego naczynia hodowlanego (tzn. Q_G , V_L i p_{O_2} , których wpływ przedstawiono na rys. 2) oraz charakterystyczne czynniki procesowe bezpośrednio związane z mechanicznie generowanym w układzie efektu fali (tzn. α oraz ω , których wpływ przedstawiono na rys. 3).

Znaczna liczba dostępnych czynników procesowych, które wpływają na proces napowietrzania fazy ciekłej, pozwala na efektywne sterowanie pracą bioreaktora i potencjalne uzyskanie pożądanych warunków wymiany masy w wielu bioprocessach dotyczących hodowli wglębnej komórek prowadzonych w warunkach tlenowych. Ponadto, spośród zbadanych w niniejszej pracy czynników procesowych, największy wpływ na generowanie zjawisk determinujących nadmierną intensyfikację hydrodynamicznego stresu komórkowego negatywnie wpływającego na biomasę komórek organizmów wyższych hodowanych wglębnie w warunkach mieszania typu *wave*, mają prawdopodobnie jedynie parametry procesowe wynikające z oscylacyjnego ruchu podstawy bioreaktora, tzn. α i ω . Ścisła kontrola powyższych parametrów i ich optymalizacja pod kątem wydajności biomasy możliwej do uzyskania w danych warunkach procesowych pozwoli na prowadzenie hodowli wglębnych różnorodnego materiału biologicznego charakteryzowanego przez specyficzność wymagań środowiskowych.

Podsumowanie i wnioski

W pracy przedyskutowano możliwości intensyfikacji napowietrzania fazy ciekłej w bioreaktorze typu *single-use* z mieszaniem typu *wave*.

Wyróżniono dwie grupy czynników procesowych wpływających na efektywność napowietrzania fazy ciekłej w warunkach mieszania typu *wave*: Q_G , V_L i p_{O_2} jako parametry dotyczące mieszania gazowej i fazy ciekłej wypełniającej naczynie hodowlane oraz α i ω jako charakterystyczne parametry związane z efektem fali generowanej w aparacie.

Dla wszystkich zbadanych wariantów napowietrzania fazy ciekłej w warunkach mieszania typu *wave* uzyskano równowagę termodynamiczną O_2 -woda, a tym samym potwierdzono aplikacyjność bioreaktora WAVE 25 do wydajnej realizacji bioprocessów z komórkami o metabolizmie tlenowym.

OZNACZENIA

- α – kąt wychyleń (względem poziomu) platformy bioreaktora, [deg]
- DO – stężenie O_2 rozpuszczonego w fazie ciekłej, mol·dm⁻³
- p_{O_2} – prężność O_2 w gazie, [bar]
- Q_G – objętościowe natężenie przepływu fazy gazowej, [dm³·min⁻¹]
- t – czas, [h]
- V_L – objętość cieczy, [dm³]
- ω – częstotliwość wychyleń platformy bioreaktora, [min⁻¹]

LITERATURA

- Eibl R., Eibl D., (2011). *Single-use technology in biopharmaceutical manufacture*. John Wiley and Sons, Hoboken
- Eibl R., Werner S., Eibl D., (2009). Bag bioreactor based on wave-induced motion: characteristics and applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 115, 55-87. DOI: 10.1007/10_2008_15
- de Jesus M., Wurm F.M., (2011). Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 78, 184-188. DOI: 10.1016/j.ejpb.2011.01.005
- Hillig F., Pilarek M., Junne S., Neubauer P., (2014). Cultivation of marine microorganisms in single-use systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 138, 179-206. DOI: 10.1007/10_2013_219
- Nienow A., (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50, 9-33. DOI: 10.1007/s10616-006-9005-8

Praca sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki, grant nr DEC-2015/17/B/ST8/00631.