

PROČ PLÁNOVAT A JAK SI VYBRAT SVŮJ FERMENTOR ČI BIOREAKTOR?

Dnešní molekulární a buněčná biologie či biochemie se zvýšeným úsilím charakterizuje strukturu bílkovin a jejich komplexů. Snaží se objasnit vliv trvalých i efemérních změn struktury biopolymerů na jejich funkci a schopnost interagovat s dalšími biopolymery a nízkomolekulárními látkami. I v České republice vynakládá mnoho pracovišť značné prostředky na nákup přístrojů nezbytných pro čištění a následnou charakterizaci biopolymerů a jejich komplexů. Mnohem menší pozornost však překvapivě věnuje přípravě výchozí suroviny – produkci rekombinačního proteinu v dostatečné kvalitě, množství a se správnými posttranslačními úpravami. Řada pracovníků raději opakovaně kultivuje své mikroorganismy, rostlinné či živočišné buňky v malých množstvích, než aby využili možnosti, které skýtá kultivace ve fermentoru nebo bioreaktoru.

Těžko říci, co je příčinou tohoto jevu. Možná, že jedním z důvodů jsou rozšířené představy o složité obsluze fermentorů a bioreaktorů, či o astronomických cenách těchto zařízení. Pokud se rozhodneme pro zařízení od firmy, která se vývojem a výrobou fermentorů a bioreaktorů zabývá již desítky let a vyrábí je ve velkých sériích, ani jeden z mýtů do značné míry již neplatí, zejména pokud jde o přístroje s objemem pracovní nádoby od 1 do 14 litrů (viz obr. 1).

Obr. 1 – BioFlo® 115 fermentor



Vloni jsem měl možnost pobývat několik dní na univerzitě v holandském Nijmegen, kde měli v laboratořích pro praktickou výuku studentů přibližně deset takových malých fermentorů firmy New Brunswick Scientific. Podle vyjádření místních pedagogů jsou studenti schopni si v kurzu fermentačních technologií za několik dní dokonale osvojit práci s fermentory a řešit v krátké době i složitější praktické a teoretické úlohy.

Dalším poměrně rozšířeným mýtem je, že pro malé až střední kultivační objemy stačí u produkčních kultur mikroorganismů a buněčných linií použít tradiční metody kultivace, například třepané kultury bakteriálních, kvasinkových nebo houbových kmenů. Není tomu tak. Ve fermentoru nebo bioreaktoru lze obvykle dosáhnout

až řádově vyšších výtěžků jak biomasy, tak požadované bílkoviny nebo metabolitu na jednotkový objem média. I jednodlitrová či dvoulitrová kultura často umožní při nízkých nákladech a v krátkém čase dosáhnout výsledků, které by při tradičních metodách v podstatě nebyly možné, popřípadě byly možné pouze za nezměrného úsilí. Rozdíl je dán možností přesně měřit a kontinuálně automaticky velmi přesně upravovat základní parametry kultury – pH, koncentraci rozpuštěného kyslíku (DO) či dalších kontrolovaných plynů, teplotu, rychlost míchání kultury a další. Pro běžně kultivované mikroorganismy a buněčné linie navíc dnes výrobce či odborná literatura poskytují detailní návody kultivace.

Typickým příkladem je protokol pro produkci rekombinačních bílkovin v kvasinkách *Pichia pastoris* (Nature Protocols, 2006;1(2):1006-21). Nemalou výhodou používání fermentorů a bioreaktorů je standardizace kultivačních podmínek, z níž vyplývá nepoměrně snadnější přechod na větší objemy kultur (scale up).

Při výběru fermentoru nebo bioreaktoru bychom si měli všimnout nejen mnoha technických detailů, ale též toho, jakou má příslušný výrobce a jeho distributor tradici, jaká je aplikační podpora výrobku a nakolik je zařízení víceúčelové. V neposlední řadě, zvláště pokud předpokládáte, že zařízení může být využito pro komerční účely, je důležité vědět, zda přístroje odpovídají nárokům pro cGMP a zda výrobce poskytuje údaje pro jejich případnou validaci IQ, OQ a PQ.

Jak si vybrat svůj fermentor?

Nejdůležitějším základním předpokladem pro výběr kvalitního zařízení, které by mělo spolehlivě sloužit po řadu let, považuji výběr dodavatele, který disponuje mnohaletými zkušenostmi a je schopen vyrábět a dlouhodobě aplikačně i servisně podporovat nejen malé výzkumné fermentory a bioreaktory, ale i jejich mnohonásobně složitější sourozence o objemu několika desítek až tisíc litrů (viz obr. 2).

Čeho si všimnout při výběru fermentoru? Zejména bychom si měli uvědomit, jaké organismy a buněčné linie budeme kultivovat, jaké budeme mít reálné nároky na účinnost míchání a provzdušňování kultury, na rychlost zahřívání a chlazení během kultivace, zda má být zařízení autoklávovatelné, či nám lépe vyhovuje sterilizace na místě, zda dáváme přednost míchání přes magnetickou spojku nebo přímému míchání. Dále bychom měli vzít v úvahu, jaká je uživatelská přívětivost a univerzalita zařízení a ovládacího softwaru. Řada zmíněných parametrů

spolu navzájem souvisí a změnou jednoho často měníme i ostatní.

Obr. 2 – BioFlo® 510 fermentor



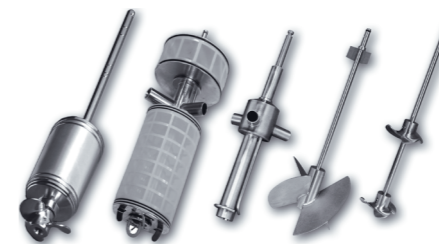
Jedna ze základních otázek začínajících uživatele je, jak velkou fermentační nádobu pořídit. Především je třeba vzít v úvahu pracovní objem nádoby a nikoliv její udávaný celkový objem. Např. nádoba o velikosti 1,3 l fermentoru BioFlo® 115 od firmy New Brunswick Scientific má pracovní objem 0,4 až 1,0 l, zatímco nádoba o celkové velikosti 7,5 l k témuž typu fermentoru má pracovní objem 2,0 až 5,6 l. S velikostí nádoby souvisí i počet dostupných vstupů a výstupů ve víku, jichž je u 1,3 l nádoby 10 a u 7,5 l nádoby 16. Z technických detailů, které by neměly být opomenuty, je třeba zmínit chladič (kondenzátor) výstupních plynů z nádoby fermentoru či bioreaktoru. Kvalitní nerezový chladič je naprosto nezbytný pro delší kultivace nebo pro kultivace při vyšších teplotách, neboť zabraňuje nežádoucímu odpařování a zahušťování kultivačního média.

Několikrát byla zmíněna otázka dokonalého provzdušnění a míchání kultury tak, aby se každá buňka v každém okamžiku kultivace nacházela v optimálních podmínkách. Tato otázka není triviální. Kromě tvaru a velikosti nádoby, výkonu motoru míchadla a způsobu přenosu tohoto výkonu do nitra nádoby ovlivňuje míchání zejména tvar a velikost míchadla. Pokud například použijete pro vláknité houby nebo savčí buňky jednoduchou a výkonnou Rushtonovu turbínku s plochými kolmými listy, která je optimální pro kultivaci jednobuněčných mikroorganismů, obdržíte místo kýžené prospívající kultury jemnou sekanou. Některé savčí buňky může poškodit dokonce i přímý kontakt s bublinami vzduchu. Adherentní buňky je navíc nutno kultivovat na suspenzních mikročasticích či jiných nosičích. New Brunswick Scientific klade

velký důraz na vývoj nových turbínek a způsobů míchání i provzdušňování kultivačního média a nabízí pro své fermentory či bioreaktory mnoho možností, včetně kompartmentace kultivačního prostoru, která zajišťuje maximální ochranu citlivých buněk při zabezpečení jejich dokonalého zásobení kyslíkem a živinami (viz obr. 3 ukázkou některých míchadel).

Je třeba rovněž zvážit, jaký uživatelský komfort nabízí řídicí jednotka, kolik obsluží či kolik má přímo integrováno pump, ventilů pro vzduch a jiné plyny, respektive dalších vstupů a výstupů a samozřejmě i jakou část laboratorního prostoru celý systém zabírá. Pokud dáme přednost obsluze fermentoru či bioreaktoru pomocí

Obr. 3 – Míchadla



externího počítače i tam, kde to není nutné (např. BioFlo® / CelliGen® 115), je dobré opět zvážit, nakolik je software uživatelsky přívětivý pro každodenní rutinní používání a nakolik zároveň v případě potřeby umožňuje programování i velmi složitých experimentů. Nikdy není na škodu, pokud

řídicí software umožňuje připojit i zařízení jiných výrobců tak, jak to zvládá například BioCommand® od firmy New Brunswick Scientific, který je plně kompatibilní se standardem OPC (Open Process Control) a může být použit pro propojení, monitorování a ovládání jakýchkoliv laboratorních přístrojů kompatibilních s OPC. Pokud si chcete pořídit fermentor nebo rozšířit vaše dosavadní fermentační kapacity, neváhejte se poradit s týmem odborníků ze společnosti Eppendorf Czech & Slovakia, s. r. o. (eppendorf@eppendorf.cz).

RNDr. Milan ŘEZKA,
obchodní zástupce pro New Brunswick
Scientific, milan.rezka@eppendorf.cz