

MEGBI Vaccine Pilot Plant – 1st Project Report (Feb 2012 – Jan 2013)

مدخل تطبيقي الى البيوتكنولوجيا

تكثير خلايا في داخلها جينات يراد انتاج بروتينها وتنقية هذه البروتينات

Introduction to Biotechnological upstream and downstream processing

جميع التفاصيل باللغة العربية والمصطلحات العلمية باللغتين العربية والانجليزية

Authors:

Samir Mourad, Rihab El Merheb, Layal Chbib

آخر تعديل 2013/03/21



الشركة اللبنانية الالمانية للبيوتكنولوجيا

رقم ٣٩٩ في سجل التجاري بيروت مسجل في تاريخ ٢٨/٥/٢٠٠٩

رأسنحاش – قضاء البترون – لبنان

LG Biotech

Main Road, Ras-Nhache, Batroun, Lebanon

<http://www.aecenar.com/partners/lg-biotech>



مركز أبحاث الشرق الأوسط للجينات والتقنية البيولوجية

رأسنحاش – قضاء البترون – لبنان

**Middle East Genetics and Biotechnology
Institute (MEGBI)**

A Member Institute of AECENAR

Main Road, Ras-Nhache, Batroun, Lebanon

<http://www.aecenar.com/institutes/megbi>

المضمون

4	1. نظرة عامة في عملية انتاج بروتينات علاجية في البيوتكنولوجيا	
6	2. مدخل الى تكثير خلايا في داخلها بروتينات يراد انتاجها (SOURCES AND UPSTREAM PROCESSING)	
6	2.1 مصادر لانتاجات بيوصيدالية (SOURCES OF BIOPHARMACEUTICALS)	
6	2.1.1 ابي كولاى (E. coli) كمصدر لبروتين (protein) علاجي مدمج (recombinant)	
11	2.1.2 خميرة (yeast)	
12	2.1.3 نظام الانتاج بالفطر (fungi)	
13	2.1.4 الحيوانات المعدلة وراثياً (transgenic animals)	
14	2.2 المنبع (UPSTREAM PROCESSING)	
16	3. تحضير هلام انتقائي وتميزي (PREPARATION OF SELECTIVE AND DIFFERENTIAL AGAR)	
16	3.1 أنواع الألهام (TYPES OF AGAR)	
16	3.1.1 هلام المانتول (Mannitol Salt Agar (MSA))	
17	3.1.2 هلام الايوزن بلو (Eosin-Methylene Blue)	
18	3.1.3 هلام المكنكاي (MacConkey Agar)	
19	3.2 الفحصات البيوكيميائية (BIOCHEMICAL REACTIONS) اللتي تستعمل لاثبات وجود ال GRAM POSITIVE COCCI	
19	3.1.4 Catalase test	
20	3.1.5 اختبار الكواجيليز (Coagulase test)	
21	3.1.6 انزيمات الحالة الدموية (Hemolysins)	
22	4. تشغيل البيوريكتور (BIOREACTOR) - عمليات تفصيلية داخل البيوريكتور	
22	4.1 كيفية عمل المفاعل البيولوجي (BIOREACTOR)	
24	4.2 اختبار مع خميرة (S.CEREVISIAE) مع حل ملي ببرنامج BIOPROCESS TRAINER	
32	4.3 اختبار دفع العملية مع ال E. COLI	
34	5. تصميم و تصنيع 300L بيوريكتور (BIOREACTOR/FERMENTER)	
34	5.1 مواصفة (SPECIFICATION)	
34	5.1.1 نظرة عامة	
34	5.1.2 متطلبات (Requirements)	
35	5.2 التصميم (DESIGN)	
35	5.3 CONSTRUCTION	
50	5.4 تصنيع البيوريكتور (MANUFACTURING OF BIOREACTOR)	
52	5.5 تكاليف	
53	6. التحكم (AUTOMATION) للبيوريكتور	
53	6.3 مواصفات (SPECIFICATION)	
53	6.1.1 اجهزة الاحساس (sensors)	
53	6.1.2 محركات (actuators)	
53	6.1.3 شاشة التحكم	
54	6.1.4 الهاردوير (Hardware)	
54	6.1.5 Example for input/outputs of K8061 for the bioreactor system	
54	6.1.6 Extended USB interface Board K8061	
57	7. مدخل الى تنقية البروتينينات (PROTEIN PURIFICATION) المنتوجة داخل خلايا (DOWNSTREAM PROCESSING)	
57	7.1 المبادئ الأساسية للتنقية	
58	7.2 بعض الاشياء الذي يجب الانتباه اليها	
60	7.2.1 تحكم للتنقية عن طريق الكمبيوتر	

61.....	مثال لطريق تنقية بروتين	7.3
62	.8. تكنولوجيا اللقاح (VACCINE TECHNOLOGY)	
62.....	انواع الفاكسينات (VACCINES)	8.1
63.....	باتنت / PRODUCTION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEIN A UNITED STATES PATENT 4617266	8.2
73.....	مراجع بخصوص تنقية بروتين أ (PROTEIN A)	8.3
75.....	الكشف عن تركيز البروتين أ (PROTEIN A CONCENTRATION)	8.4
79	9. مراجع	

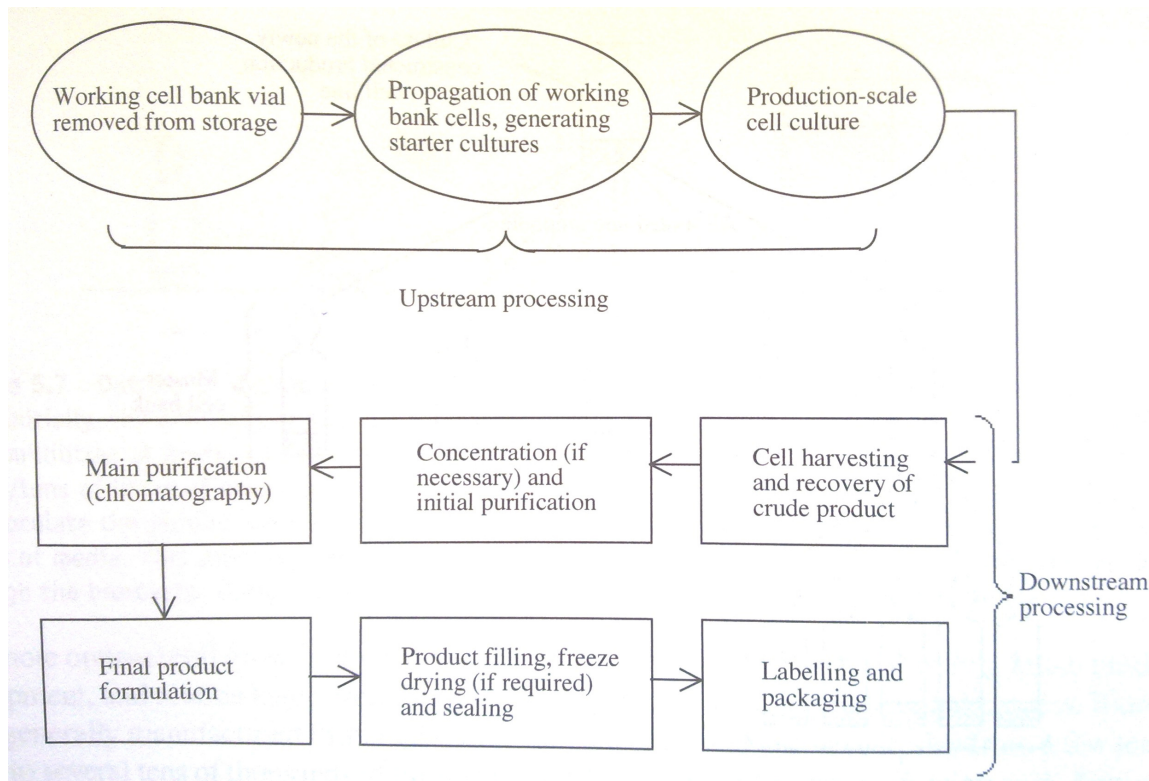
1. نظرة عامة في عملية انتاج بروتينات علاجية في البيوتكنولوجيا

ان انتاج الجزينات الحيوية ينقسم الى معالجة المنبع (upstream) و المصب (downstream).

المنبع عبارة عن جزء من العملية الحيوية (upstream bioprocess) وهو أول خطوة لنمو الجزينات الحيوية عن طريق المفاعلات الحيوية التي تحدث بواسطة خطوط الخلايا البكتيرية أو الحيوانية. وعندما تصل إلى الكثافة المطلوبة يتم حصادها ثم نقلها إلى المصب (downstream) وهي قسم آخر من العملية الحيوية.

المعالجة المتعاقبة للنواتج النهائية لعملية التخمر (downstream processing): هي تنقية المواد الكيميائية، والمستحضرات الصيدلانية والمكونات الغذائية الناتجة عن التخمر أو الاصطناع في الأنسجة النباتية والحيوانية، مثل المضادات الحيوية، وحمض الليمون، وفيتامين (E)، والأنسولين.¹

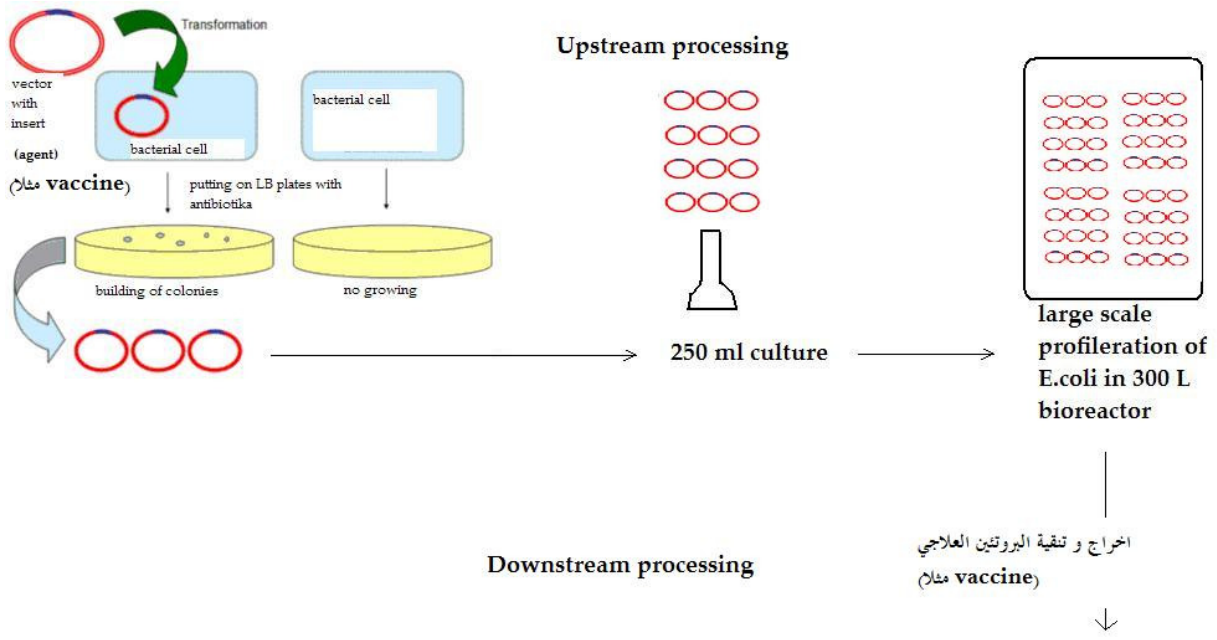
الصورة مأخوذة في الاسفل مأخوذة من [Walsh 2007].



1

من

http://ar.wikipedia.org/wiki/%D9%85%D9%84%D8%AD%D9%82:%D9%82%D8%A7%D8%A6%D9%85%D8%A9%D8%B7%D8%B1%D9%82_%D8%A7%D9%84%D8%AA%D9%86%D9%82%D9%8A%D8%A9_%D9%81%D9%8A%D8%A7%D9%84%D9%83%D9%8A%D9%85%D9%8A%D8%A7%D8%A1



الصورة فوق: مثال

2. مدخل الى تكثير خلايا في داخلها بروتينات يراد انتاجها (sources and

(upstream processing

2.1 مصادر لانتاجات بيوصيدالية (sources of biopharmaceuticals)

2.1.1 إي كولاي (E. coli) كمصدر لبروتين (protein) علاجي مدمج (recombinant)²

تمثل العديد من الكائنات الحية المجهرية أنظمة إنتاج جذابة للبروتين العلاجي. يمكن أن يكونوا مثقفين كالعادة في كميات كبيرة، بشكل رخيص وفي مدة قصيرة، بالطرق القياسية من الإختمار. وسائل إنتاج يمكن أن تبني في أي منطقة عالمية، وسلم الإنتاج يمكن أن يغير كما هو مطلوب.

تعبير بروتين المدمج في الخلايا التي لا يحدثون فيها طبيعيا و إنتاج بروتين معينون مختلفون . الأدوية البيولوجية الأولى المنتجة بهندسة الجينات (genetic engineering) لكسب الموافقة التسويقية (في 1982) كانت الأنسولين المدمج الإنساني (recombinant human insulin) (اسم تجاري humulin) أنتج في إي. كولاي (E. coli). مثال لأكثر دواء بيولوجي مصدق مؤخراً الذي أنتج في إي. كولاي المدمجة هو الذي من keratinocyte kepivance , يستعمل لمعالجة معدل نمو mucositis ، و يوجد العديد من الأمثلة الإضافية.

كنظام إنتاج الدمج ، إي. كولاي يعرض عدد من الفوائد. تتضمن :

1. عمل إي . كولاي (E. coli) كنظام نموذجي لمدة طويلة في الدراسات التي تتعلق بعلم وراثه بروكاريوتيك (prokaryotic). أنه علم الأحياء الجزيئي الذي ميز جيدا

2. مستويات عالية من تعبير (expression) بروتين (protein) مختلفة يمكن أن تنجز في إي. كولاي المدمج (recombinant E. coli). حاليا، مروّجو التعبير العاليين الحديثين يمكن أن يضمّنوا بشكل دوري وصول تلك المستويات من تعبير بروتين مدمج بحدود نسبة 30 بالمائة بروتين خلوي كلي.

3. خلايا إي كولاي تنمو بسرعة على أجهزة بسيطة و رخيصة نسبيا، وتقنية الإختمار الملائمة المبنية جيدا. هذه الفوائد وخصوصا سهولة التلاعب الوراثي بها، جعل من إي. كولاي (E. coli)، نظام إنتاج أساسي للادوية البيولوجية لعدة سنوات.

على أية حال، إي. كولاي (E. coli) أيضا عرضة لعدد من العوائق كالادوية البيولوجية المنتجة. هذه تتضمن:

• تجمع بروتين هيتروولوجوس (heterologous) داخل الخلية

• عدم قابلية لتعهد تعديلات ما بعد الترجمة (translation) (خصوصاً glycosylation³) للبروتين

• وجود ليبوزاكاريد (lipopolysaccharide) (إل بي إس) على سطح إي. كولاي (E. coli).

معظم البروتينات التي تنتج طبيعياً هي داخل خلية إي. كولاي (E.coli) (مثلاً: البروتينات المتشابهة (homologous proteins)⁴). بعض البروتينات تفرز خارج الخلية. البروتين المركب المصنع داخل إي. كولاي يتجمع دائماً في سيتوبلاسم الخلية. البروتين المصنع داخل الخلية يعقد معالجته النهائية عند تنقية البروتين (نسبة إلى الإنتاج خارج الخلية) مثال :

• يتطلب خطوات معالجة أساسية إضافية، وبمعنى آخر: تنقية الخلية بإزالة اللاحقة من حطام الخلية بتقنية التثليل (تنبيد) (centrifugation) أو التنقية ؛

• تنقية أكثر شمولية بواسطة ال chromatographic لكي يفصل البروتين المهم من عدّة آلاف بروتين متشابه إضافي أنتج من قبل خلايا إي. كولاي (E.coli).

تعقيد إضافي من التعبير (expression) العالي المستوى للبروتين المركب هو ادراج تشكيل جسم . إدراج أجسام (أجسام قابلة للكسر ثنائية) وهي تجمعات عديمة الذوبان من منتج مركب مطوي جزئياً.

بسبب طبيعتهم الكثيفة (dense)، يلاحظون بسهولة بإستعمال مجهر الحقل المظلم (dark-field microscopy). من المفترض، عندما يعتبر (expressed) في مستوى عالي ، البروتين الاجنبي (heterologous protein) يُحمل آلية طي البروتين الخلوية الطبيعية تحميلاً زائداً. في مثل هذه الظروف، سيكون من المحتمل اختفاء تلك الرقع الهيدروفوبية (hydrophobic) عادة من المحيط المائية المحيط بالبروتين المطوي (folded) بالكامل يبقى مكشوف في المنتج المطوي جزئياً. هذا، سيروج التشكيل الكلي عن طريق التفاعلات (interactions) الهيدروفوبية بين الجزئيات.

³ **Glycosylation** is the reaction in which a carbohydrate, i.e. a glycosyl donor, is attached to a hydroxyl or other functional group of another molecule (a glycosyl acceptor). In biology glycosylation refers to the enzymatic process that attaches glycans to proteins, lipids, or other organic molecules. This enzymatic process produces one of the fundamental biopolymers found in cells (along with DNA, RNA, and proteins). Glycosylation is a form of co-translational and post-translational modification. Glycans serve a variety of structural and functional roles in membrane and secreted proteins. (from: edited by Ajit Varki ... (2009). Essentials of Glycobiology. Ajit Varki (ed.) (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratories Press. ISBN 978-0-87969-770-9.)

⁴ Heterologous (meaning 'derived from a different organism'), homologous: similar natural protein. Protein homology is biological homology between proteins, meaning that the proteins are derived from a common "ancestor". The proteins may be in different species, with the ancestral protein being the form of the protein that existed in the ancestral species (orthology). Or the proteins may be in the same species, but have evolved from a single protein whose gene was duplicated in the genome (paralogy).

على أية حال، يعرض تشكيل أجسام الإدراج (inclusion bodies) معالجة فائدة واحدة: يسهل الإنجاز لدرجة هامة من التنقية (purification) اللاحقة من قبل خطوة تثفيل (تبييد) (centrifugation) واحدة. بسبب كثافتهم العالية، ترسب أجسام الإدراج بدرجة سرعة أكبر من حطام الخلية (cell debris). مستوى السرعة منخفض بالتثفيل (تبييد) (centrifugation) يسهل للمجموعة السهلة والانتقائية للإدراج مباشرة بعد تسوية (homogenization) خلوية (cellular). بعد التجميع، أجسام إدراج تفتس عموماً مع denaturants قوية، مثل المنظفات (detergents) ، solvents أو urea. هذا يروج للتذويب الكامل من جسم الإدراج (يعني denaturation الكامل للبروتين في ذلك المكان). مادة الديناتوريشن (denaturant) ثم تزال بالتقنيات مثل dialysis أو diafiltration. هذا يسهل طوي البروتين (protein folding) ثانية، نسبة عالية منها ستطوى عموماً كطيته الأساسية، ويكون نشيط حيويًا، مطابق للأساسي.

محاولات المختلفة اجريت لمنع تشكيل اجسام الإدراج عندما تعبير بروتين لجين خارجي (heterologous protein) في إي. كولاى (E.coli). كشفت بعض الدراسات بأن تخفيض بسيط في درجة حرارة نمو الجرثومة (من 37 الى 30 درجة مئوية) يمكن أن ينقص حادّة تشكيل جسم الإدراج بشكل ملحوظ. كشفت دراسات أخرى تعبير البروتين الذي يهمننا كذوبان مشترك (fusion protein) مع thioredoxin سيزيل تشكيل جسم إدراج في أكثر الحالات. ذويريدوكسين (thioredoxin) هو بروتين طبيعي لإي. كولاى (E.coli) تُعبر (expressed) فيه بمستويات عالية. هو موجود في مناطق الالتصاق في إي. كولاى (E.coli) وهو بروتين مستقرّ (stable) على الحرارة. يوجد بلازميد (plasmid) مهندس لتسهيل تعبير البروتين الذي يشمل (thioredoxin) المرتبط بالبروتين الذي يهمننا عن طريق سلسلة من ببتيدات (peptides) قصيرة معرفة بواسطة الإنزيم البروتياز (protease) enterokinase⁵.

⁵ From Wikipedia: (also called **enterokinase**) is an [enzyme](#) produced by cells of the [duodenum](#) and involved in human [digestion](#). It is secreted from intestinal glands (the [crypts of Lieberkühn](#)) following the entry of ingested food passing from the stomach. Enteropeptidase converts [trypsinogen](#) (a [zymogen](#)) into its active form [trypsin](#), resulting in the subsequent activation of [pancreatic](#) digestive enzymes.^{[1][2]}

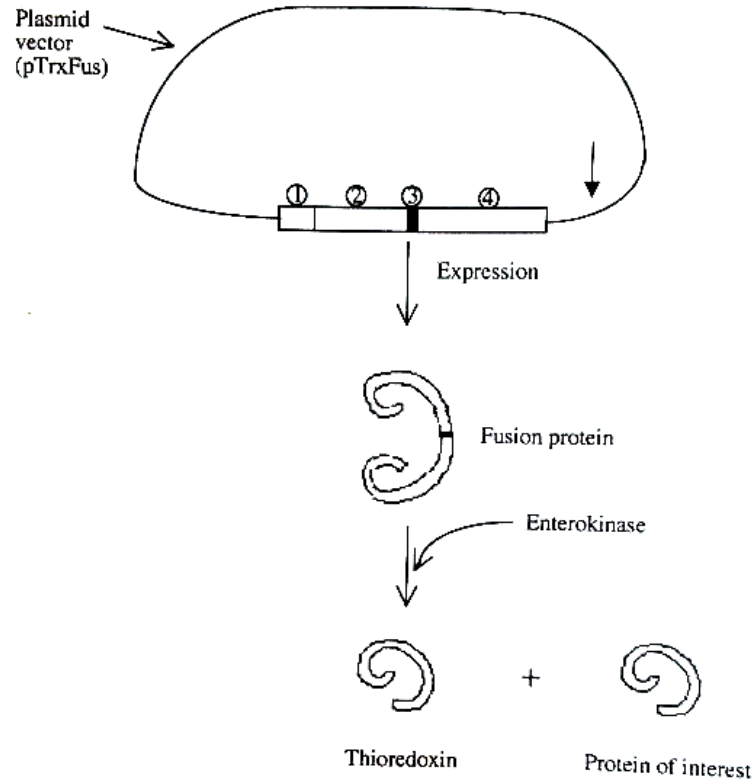
Enteropeptidase is a [serine protease](#) (EC 3.4.21.9) consisting of a disulfide-linked 82–140 kDa heavy chain which anchors enterokinase in the intestinal brush border membrane and a 35–62 kDa light chain which contains the catalytic subunit.^[3] Enteropeptidase is a part of the [chymotrypsin](#)-clan of serine proteases, and is structurally similar to these proteins.

[1] Kunitz M (March 1939). "Formation of trypsin from crystalline trypsinogen by means of enterokinase". J. Gen. Physiol. 22(4): 429–446. doi:10.1085/jgp.22.4.429. PMC 2141988. PMID 19873112.

[2] Kiel B (1971). "Trypsin". In Boyer PS. The Enzymes, 3: Hydrolysis - Peptide Bonds. Amsterdam: Elsevier. pp. 249–275. ISBN 0-12-122703-0.

[3] Huang L, Ruan H, Gu W, Xu Z, Cen P, Fan L (2007). "Functional expression and purification of bovine enterokinase light chain in recombinant Escherichia coli". Prep. Biochem. Biotechnol. 37 (3): 205–17. doi:10.1080/10826060701386695. PMID 17516250.

للشرح انظر الصورة في الاسفل:



- Key: ① = strong promoter
② = thioredoxin gene
③ = nucleotide sequence coding for the peptide sequence which serves as cleavage site for the protease (enterokinase)
④ = gene/cDNA coding for the protein of interest

Gary Walsh, Pharmaceutical Biotechnology – Concepts and Applications, Wiley, 2007, Fig. 5.1

إن البروتين الانصهاري (fusion protein) يعبر دائما في المستويات العالية، بينما يبقى في الشكل القابل للذوبان (soluble form). التجمع في مناطق الالتصاق (adhesion zones) يسهل إطلاقه (release) الإنتقائي (selective) إلى مستنبت (culture media) بالصدمة (shock) التنافضية (osmotic) البسيطة.

هذا يبسط التنقيتها (purification) اللاحقة كثيرا. بعد إطلاقه، البروتين الانصهاري يحتضن (incubated) مع enterokinase، ويُطلق البروتين الذي يهمنا (انظر الصورة فوق). وسيلة بديلة من التخفيض / ازالة تراكم جسم إدراج (inclusion body) تستلزم التعبير (expression) العالي المستوى من كابرونس جزئية (molecular chaperones) سوياً مع البروتين الذي يهمنا.

كابتروونس جزئية (molecular chaperones) هم نفسهم بروتينات الذين يروجون للطي (folding) الصحيحة والكاملة لبروتينات و اعطائهم شكلهم الثلاثي الأبعاد (3-dimensional) النشيط حيويًا (biological active). وينجزون هذا عادة بتوصيل بالبروتين الهدف أثناء المراحل المبكرة من طيها وتوجيه الطي فيما بعد. يمنع / تصحيح حدوث ارتباطات هيدروفوبية (hydrophobic) غير صحيحة.

عدم قدرة البروكاريوتس prokaryotes مثل إي. كولاي لتنفيذ تعديلات ما بعد الترجمة (translation) (خصوصًا glycosylation) يمكن أن يحدّد فائدتهم كأنظمة إنتاج لبعض البروتينات علاجية المفيدة. الكثير من البروتينات المشابهة، عندما تنتج طبيعيًا في الجسم، تكون glycosylated (انظر القائمة في الأسفل).

البروتينات في الجدول هي glycosylated إذا انتجت طبيعيًا في الجسم:⁶

أكثرية الإنترلوكينس (interleukins). IL-1 مستثن من ذلك
IFN- α و IFN- β ، (أكثر الـ IFN- α غير glycosylated)
CNFs
TNFs
Gonadotrophins (FSH, ...)
Blood factors (e.g. Factor VII, VIII and IX)
EPO
Intact monoclonal antibodies

ولكن عند بعض البروتينات السكرية (glycoproteins) عدم وجود المكون الكربوهيدرات (carbohydrate component)، لا يؤثر سلبيًا على نشاطهم الحيوي. الشكل الغير glycosylated من الإنترلوكين (IL-2)، على سبيل المثال، يعرض نشاط حيوي مماثل للأساسي. في مثل هذه الحالات، إي. كولاي يمكن أن تكون كافية كنظام إنتاج. القلق الآخر فيما يتعلق بإستعمال إي. كولاي (E.coli) وجود جزيئات ال بي أس (LPS) على سطحها. الطبيعة pyrogenic لإل بي إس ([Walsh 2007], Ch7) يجعل من الضروري إزالتها من المنتج. ولله الحمد تنجز إجراءات التنقية (downstream processing) المستخدمة عموماً هذا الفصل بدون صعوبة كبيرة.

تعبير بروتين مؤتلف (recombinant) في أنظمة الخلايا الحيوانية (animal cell culture systems)

⁶ Table 5.4 from [Walsh 2007]: Proteins of actual or potential therapeutic use that are glycosylated when produced naturally in the body (or by hydridoma technology in the case of monoclonal antibodies)

التقدم التقني سهّل التلاعب الوراثي في الخلايا الحيوانية مما يسمح إنتاج روتيني للبروتين العلاجي في مثل هذه الأنظمة. إنّ الفائدة الرئيسية من هذه الأنظمة هي قدرتهم على تنفيذ التعديل ما بعد الترجمة (translation) للبروتين المنتج . كنتيجة، العديد من المواد الصيدلانية الحيوية التي هي glycosylated طبيعياً تنتج الآن في الخلية الحيوانية. خلايا ال CHO و BHK أصبحت مستخدمين كثيراً بهذا الخصوص. بالرغم من أن قدرتهم لتنفيذ تعديلات بعد الترجمة (translation) تجعل إستعمالهم مرغوب / ضروري لإنتاج العديد من المواد الصيدلانية، الخلية الحيوانية تعاني عدد من السلبيات. مقارنة مع إي. كولاي، الخلايا حيوانية تتطلب غذاء معقّد جداً، وتنمو ببطء أكثر ومعرضة أكثر بكثير للضرر الطبيعي و أكثر عرضة للضرر المادي. في الشروط الصناعية، هذا يترجم كلفة إنتاج متزايدة. بالإضافة إلى المواد المؤتلفة (recombinant) الصيدلانية الحيوية، الخلايا حيوانية تستعمل لإنتاج المواد الصيدلانية الأخرى المختلفة المستندة حيويًا. مثل اللقاحات و أجسام مضادة أحادية السلالة (monoclonal antibodies) التي تصنع بخلاية hybridoma. سابقاً ل interferon أنتجت أيضاً في خلاية lymphoblastoid معيّن (خلية Namalwa)، والتي تنتج مستويات عالية آي إف إن (IFN-α) طبيعياً.

2.1.2 خميرة (yeast)

رُكّز الإنباه أيضاً على تشكيل أنظمة إنتاج إضافية لمواد مؤتلفة (recombinant) الصيدلانية الحيوية. خلايا خميرة (خصوصاً *saccharomyces cerevisiae*) عرض عدد من الخصائص التي جعلتهم جذابين بهذا الخصوص. هذه الخصائص تتضمن:

- علم أحيائهم الجزيئي درس بالتفصيل، مما سهّل التلاعب الوراثي بهم ؛
- معظم هذه الكائنات الحية مسجلة في الكائنات الآمنة استعمالهم بشكل عام، واستعمالهم منذ القدم في الصناعة (ومثال على ذلك: - في تخمير والخبازة)؛
- ينمون بسرعة نسبية في مواد مغذية رخيصة نسبياً، وحائطهم الخارجي القاسي يحميهم من الضرر الطبيعي؛
- مناسبة صناعياً - أجهزة إختمار / تقنيات متوفرة .
- توفر تقنية تعديل البروتين بعد الترجمة (RNA translation into amino acids).
- الخميرة أكّدت بالتعبير الناجح لأنواع متعددة من البروتين العلاجي .
- على أية حال، هناك عدد من الأضرار عرفت عند إنتاج بروتين من جين خارجي (heterologous protein) في الخميرة. تتضمن:

1. بالرغم من أنه قادر على إنتاج بروتين من جين خارجي (heterologous protein) غليكوزيلي (glycosylated) إلا أن هذا الأخير عنده غليكوزيل مختلفة عن الأساسية (عندما تعزل من مصدرها الطبيعي أو عند تعبيرها في أنظمة تثقيف الخلايا الحيوانية المؤتلفة recombinant .

2. في أكثر الحالات، تبقى مستويات تعبير من جين خارجي (heterologous protein) أقل 5 بالمائة من البروتين الخلوي الكلي. هذه النسبة أدنى جداً من مستويات التعبير المنجزة في إي. كولاي (E.coli) .

على الرغم من مثل هذه الأضرار المحتملة، صدقت عدة مواد recombinant صيدلانية حيوية للإستعمال الطبي العامّ منتجة في الخميرة (Saccharomyces cerevisiae). بشكل مثير للانتباه، أكثر هذه المنتجات ليست glycosylated.

الجزء الأوليكوساخاريدي (oligosaccharide component) للبروتينات السكرية (glycoproteins) التي تنتج في الخمائر تحتوي عموماً على مستويات عالية من المانئوز (mannose). تؤدي مثل هذه الأنماط glycosylation العالية من نوع المانئوز (mannose) عموماً إلى إزالتها السريعة من مجرى الدم (blood stream) . مثل هذه المنتجات، يتوقع أن تكون حياهما قصيرة عندما تعطى إلى البشر بشكل مباشر إلى الدم عن طريق الحقن ، وبعض مكونات سكر الخميرة يمكن أن تكون immunogenic للبشر.

2.1.3 نظام الإنتاج بالفطر (funghi)

الفطر مهم كمنتج لبروتين heterologous، فالعديد منهم يمتلك الكثير من البروتينات المهمة في الإنتاج مثل α -amylase و glucoamylase. تقنية الإختمار المناسبة متواجدة . عموماً، الفطر قادر على التعبير العالي المستوى لبروتينات مختلفة، العديد منهم يبقى داخل الخلية. الإنتاج خارج الخلية للمادة الحيوية الصيدلانية ستكون مفيدة بشكل واضح من ناحية المعالجة النهائية اللاحقة. يمتلك الفطر القدرة أيضاً لتنفيذ التغييرات ما بعد الترجمة (translation) للبروتين المنتج. أنماط glycosylation يمكن أن ينجز ، على أية حال، يختلف عن الأنماط المثالية التي نحصل عليها عندما يبدى البروتين السكري في خط خلية mammalian (cell line) . وهذا يمكن أن يسبب تخفيض مصل (serum) نصف الحياة أو تعقيدات مناعية لدى البشر.

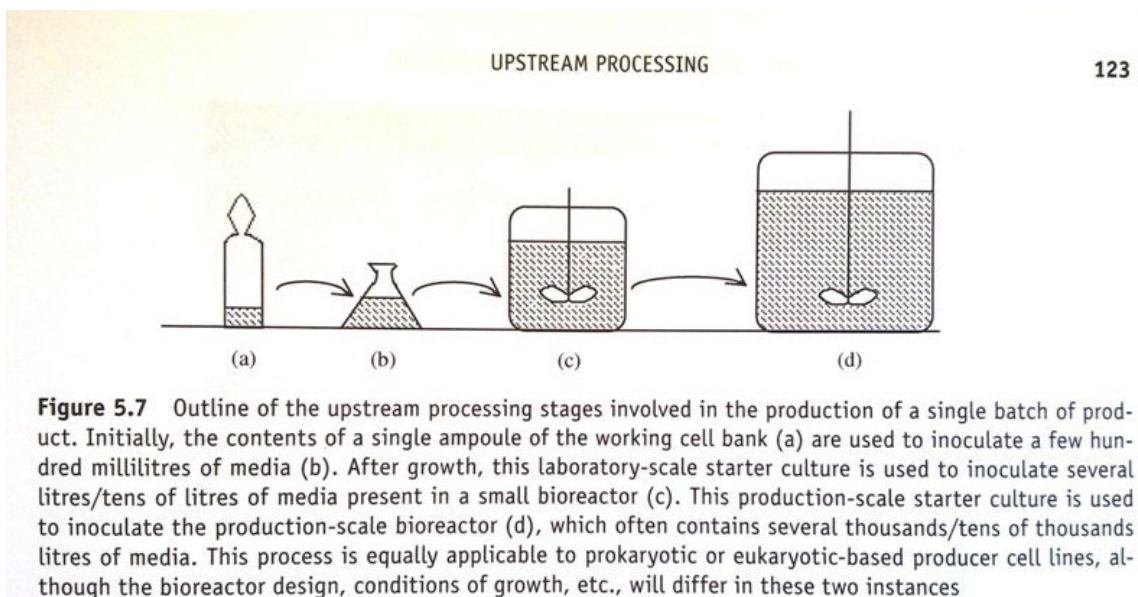
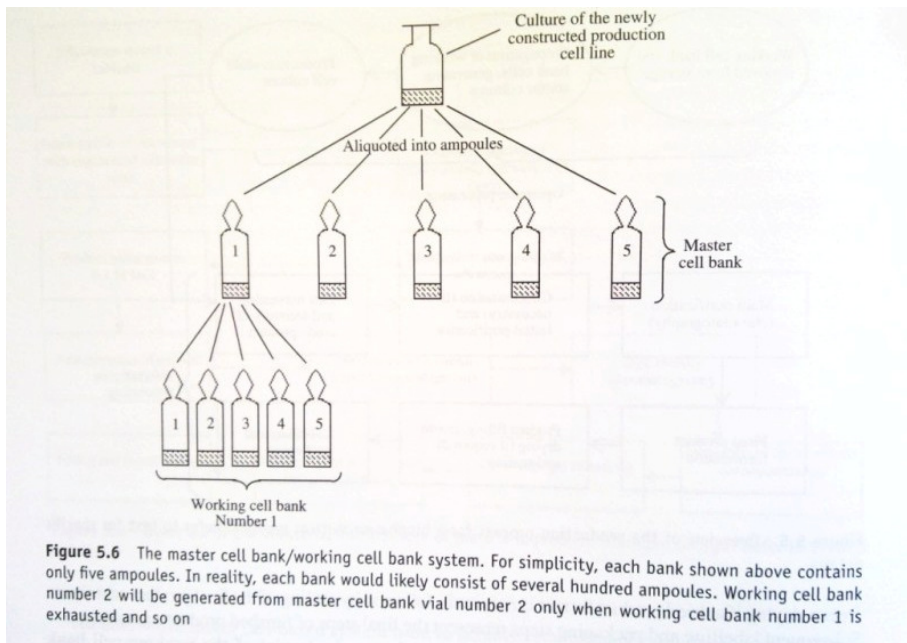
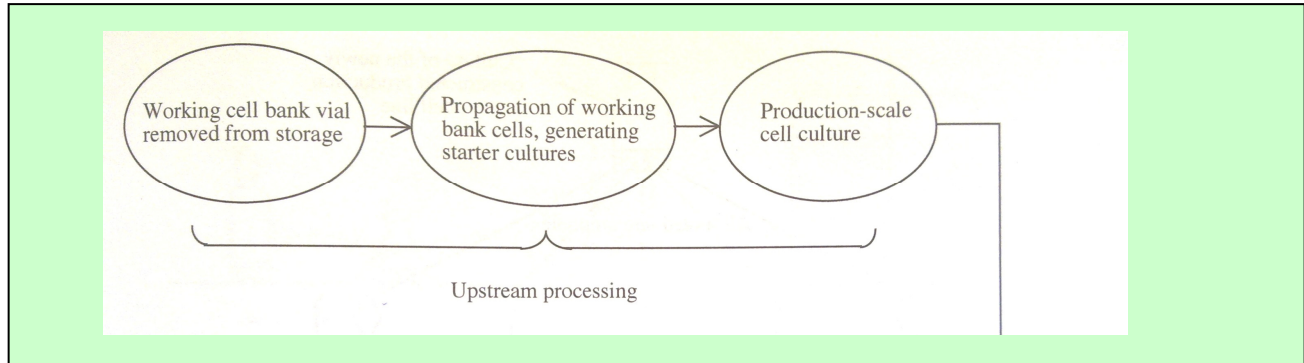
أكثر الفطريات تنتج طبيعياً كميات هامة من الأنزيمات البروتينية إلى خارج الخلية ، التي يمكن أن تخفّض (degrade) المنتج المؤتلف (recombinant). هذه الصعوبة يمكن التغلّب عليها جزئياً بإستعمال الفطري المغير جينياً (mutant) الذي يخفي المستويات المخفضة جداً من الإنزيمات البروتينية. بالرغم من أن الباحثين أنتجوا عدد من البروتين العلاجي المحتمل في الأنظمة الفطرية المؤتلفة (recombinant) ، إلا أنه لم ينتج مواد حيوية صيدلانية. مثل هذه الوسائل لهذا أرادت الحدّ و كسب موافقة تسويقية.

2.1.4 الحيوانات المعدلة وراثياً (*transgenic animals*)

إنتاج بروتين heterologous في حيوانات معدلة وراثياً كسب مؤخرًا إنتباها كثيرا. ان انتاج جيل من الحيوانات المعدلة وراثياً (*transgenic*) في أغلب الأحيان نقوم به مباشرة من خلال عملية *microinjecting* خارجية لل دي إن أي (DNA) إلى البيض (egg).

2.2 المنبع (upstream processing)

From [Walsh 2007], Ch 5



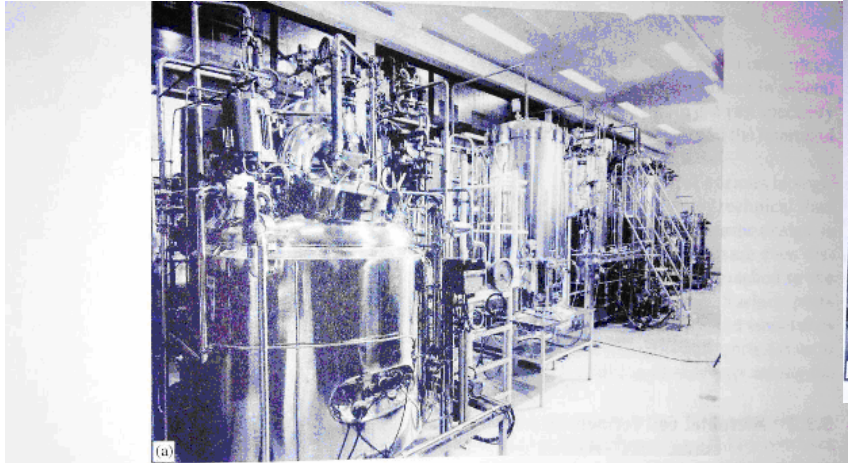


Figure 5.8 Typical industrial-scale fermentation equipment as employed in the biopharmaceutical sector (a). Control of the fermentation process is highly automated, with all fermentation parameters being adjusted by computer (b). Photographs (a) and (b) courtesy of SmithKline Beecham Biological Services, s.a., Belgium. Photograph (c) illustrates the inoculation of a laboratory-scale fermenter with recombinant microorganisms used in the production of a commercial interferon preparation. Photograph (c) courtesy of Pall Life Sciences, Dublin, Ireland

From [Walsh 2007], Ch 5

3. تحضير هلام انتقائي وتميزي (Preparation of Selective and Differential Agar)

لاعاقه (inhibit) تكاثر البكتيريا من فئة الغرام السليبي (gram negative), نحضر هلام (media) يحتوي على potassium tellurite أو Sodium azide (0.1-0.5g/L) أو Thallium acetate (tellurite agar).
لاعاقه (inhibit) تكاثر البكتيريا من فئة الغرام الايجابي (gram positive), نحضر هلام (media) يحتوي على penicillin أو crystal violet (2mg/L) أو (5-50 units/ml).

3.1 أنواع الأهلام (Types of Agar)

3.1.1 هلام المانتول (Mannitol Salt Agar (MSA))

Used for the isolation of staphylococci. The pathogenic one will appear as yellow colonies with yellow zones, but the small red or pink colonies with no color changes to surrounding are the nonpathogenic.

يستعمل لعزل ال staphylococci الخلايه المضره ستظهر كمستعمرات صفراء ومحيطها أصفر, أما الغير مضره ستكون مستعمرات صغيره باللون الأحمر أو الوردي بدون تغير بلون المحيط.

الطريقه
Procedure:

- 1) 5g Enzymatic Digest of Casein
- 2) 1g Enzymatic Digest of Animal Tissue
- 3) 1g Beef extract
- 4) 10g D-mannitol
- 5) 75g Sodium Chloride
- 6) 0.025g Phenol red
- 7) 15g Agar
- 8) Add purified water to obtain 1L (اضافه ماء للوصول الى 1 ليتر)
- 9) Adjust pH to 7.4 ± 0.2 at 25°C (ضبط ال بي أتش).

Boil to dissolve, autoclave 15 minutes to 121°C , cool to 60°C and pouring into Petri dishes.

نغلي المزيج لتذوب المواد, نطهر لمدة 15 دقيقه على حراره 121 درجه مئوية, نتركها لتبرد قليلا وتصل الى 60 درجه مئوية ومن ثم نسكبها في أوعيه خاصه. (Petri dishes)

Storage

التخزين

Stored at 2 - 30°C. once opened and recapped, place container in a low humidity environment at the same storage temperature, protect from moisture and light by keeping container tightly closed.

ألتخزين ما بين 2 و 30 درجة مئوية. عندما تتعرض للهواء يجب وضعها بدرجة ألتخزين, ابعادها عن الرطوبة والضوء بغلق العبوة باحكام.

Packaging

الطرد

Mannitol salt agar	code No	7143A	500g
		7143B	2Kg
		7143C	10Kg

Expiration

الانتهاء

Dehydrated medium should be discarded if not free following or change in color.

3.1.2 هلام الايوزن بلو (Eosin-Methylene Blue)

Used for the isolation of Gram-negative bacteria, and to differentiate between that fermenting and nonfermenting microbes of lactose and sucrose.

يستعمل لعزل ال Gram-negative bacteria ، و للفرقة ما تين التي تخمر السكريات والتي لا تستطيع.

Lactose ferment colonies were either black or dark center with colorless outer, however the non ferment are colorless.

النوع الذي يخمر يظهر على شكل مجموعات سوداء او وسطها غامق اللون, التي لا تخمر تكون شفافة.

Under acidic condition the dyes produce a dark purple complex associated with green metallic sheen (acidity caused by the fermentation of lactose or sucrose).

تحت تأثير الحموضة, الصباغ سيتغير للون الأخضر المعدني اللامع. و اختلاف الألوان يعود لاختلاف انواع اليكتيريا.

E.coli: dark center and a greenish metallic sheen.

Enterobacter: large, mucoid pinkish colonies.

Salmonella: non colored colonies.

Procedure:

ألطريقه

- 1) 10g bacto peptone
- 2) 5g bacto lactose
- 3) 5g bacto sucrose
- 4) 2g dipotassium phosphate
- 5) 13.5g bacto agar

6) 0.4g bacto eosin y

7) 0.065g bacto methylene blue

8) Add purified water to obtain 1L (اضافه ماء للوصول الى 1 لتر)

Adjust PH to 7.2, boil to dissolve, autoclave 15 minutes to 121°C, cool to 60°C and pouring into Petri dishes.

نضبط ال بي أتش، نغلي المزيج لتذوب المواد، نطهر لمدة 15 دقيقة على حراره 121 درجه مئوية، نتركها لتبرد قليلا وتصل الى 60 درجه مئوية ومن ثم نسكبها في أوعيه خاصه (Petri dishes).

EMOB Agar

For testing strains of bacteria for sensitivity to phage. In this case 5g of NaCl/1L is to be added into the medium and the medium is to be made without added sugars to a final concentration of 1% as in the typical EMB.

3.1.3 هلام المكنكاي (MacConkey Agar)

Supports the growth of all *Salmonella* and *Shigella* strains and give differentiation between these enteric pathogens and the coliform group (inhibit gram positive).

Colonies of coliform bacteria are brick-red and are surrounded by a zone of precipitate bile.

Salmonella and *Shigella* do not ferment lactose but give an alkaline reaction when grow, its colonies are noncolored and transparent.

هذا الهلام يدعم تشكل مستعملرات ال *Salmonella* و *Shigella* و يميز بين ال coliform group و enteric pathogens. مجموعات ال coliform تكون أحمر قرميدي و محاطه باللون الاصفر.

مجموعات ال *Salmonella* و *Shigella* غير قادره على تخمير اللاكتوز ولاكن تشكل محيط قلوي و تكون غير مرئيه.

Procedure:

الطريقه

1) 17g peptone

2) 3g proteose peptone (difco or polypeptone)

3) 10g lactose

4) 5g NaCl

6) 1 mg crystal violet

7) 30 mg neutral red

8) 1.5g bile salts

8) 13.5g agar

9) Add purified water to obtain 1L (اضافه ماء للوصول الى 1 لتر)

Adjust pH to 7.1±0.2, boil to dissolve, autoclave 15 minutes to 121°C, cool to 60°C and pouring into Petri dishes.

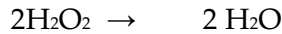
نضبط ال بي أتش ,نغلي المزيج لتذوب المواد,نظهر لمدة 15 دقيقة على حراره 121 درجه مئويه,نتركها لتبرد قليلا وتصل الى 60 درجه مئويه ومن ثم نسكبها في أوعيه خاصه (Petri dishes)

3.2. الفحصات البيوكيميائية (Biochemical reactions) التي تستعمل لاثبات وجود ال gram positive cocci

3.1.4 Catalase test

A solution of dilute H₂O₂ is added to a bacterial smear on a glass slide.

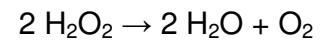
The formation of bubble (O₂) is evidence of catalase activity.



نضيف بضع قطرات من سائل الهيدروكساييد المخفف الى البكتيريا الموجوده على الزجاجه, اذا ظهرت فقاعات هواء فهذا دليل على قدرتها على صناعه هذا الانزيم.

آلية الفعل

السبب في تضمين الكاتالاز في خانة المواد ذات الفعل الحفزي هو قدرته على تحليل فوق أكسيد الهيدروجين إلى ماء وأكسجين جزيئي. ولكي يتم هذا التفاعل فإنه يحتاج إلى جزيئين من فوق أكسيد الهيدروجين، حيث يعمل الأول كمستقبل للإلكترونات والثاني كمعطي لها.



Catalase test



Catalase reaction

The catalase test is also one of the main three tests used by microbiologists to identify species of bacteria. The presence of catalase enzyme in the test isolate is detected using hydrogen peroxide. If the bacteria possess catalase (i.e., are catalase-positive), when a small amount of bacterial isolate is added to hydrogen peroxide, bubbles of oxygen are observed.

The catalase test is done by placing a drop of hydrogen peroxide on a [microscope slide](#). Using an applicator stick, a scientist touches the colony, and then smears a sample into the hydrogen peroxide drop.

- If the mixture produces bubbles or froth, the organism is said to be 'catalase-positive'. Staphylococci[31] and Micrococci[32] are catalase-positive. Other catalase-positive organisms include Listeria, Corynebacterium diphtheriae, Burkholderia cepacia, Nocardia, the family Enterobacteriaceae (Citrobacter, E. coli, Enterobacter, Klebsiella, Shigella, Yersinia, Proteus, Salmonella, Serratia, Pseudomonas), Mycobacterium tuberculosis, Aspergillus, and Cryptococcus.
- If not, the organism is 'catalase-negative'. Streptococcus[33] and Enterococcus spp. are catalase-negative.

While the catalase test alone cannot identify a particular organism, combined with other tests, such as antibiotic resistance, it can aid identification. The presence of catalase in bacterial cells depends on both the growth condition and the medium used to grow the cells.

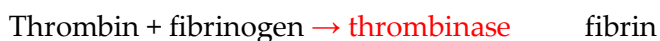
Capillary tubes may also be used. A small amount of bacteria is collected on the end of the capillary tube (it is essential to ensure that the end is not blocked, otherwise it may present a false negative). The opposite end is then dipped into hydrogen peroxide which will draw up the liquid (through capillary action), and turned upside down, so the bacterial end is closest to the bench. A few taps of the arm should then move the hydrogen peroxide closer to the bacteria. When the hydrogen peroxide and bacteria are touching, bubbles may begin to rise, giving a positive catalase result.

3.1.5 اختبار الكواجيليز (Coagulase test)

اختبار الكواجيليز يستخدم للتفريق بين بكتيريا العنقودية الذهبية والأنواع الأخرى من بكتيريا العنقودية. الاختبار يستخدم بلازما الارنب الذي تم تطعيمه بالبكتيريا العنقودية. الانبوب يتم حضنه عند درجة حرارة 37 لمدة ساعة ونص. إذا كانت النتيجة سلبية تم اسمرار الاختبار إلى 18 ساعة..

- إذا كانت النتيجة ايجابية، البلازما سوف يتخثر ويظهر على شكل قطع متجمعه.
- إذا كانت سلبية، البلازما لا يتغير.
- مجموعة من البكتيريا العنقودية موجبة الكواجيليز : العنقودية الذهبية، انايروبيس، العنقودية هايكس، العنقودية انترميدس، العنقودية لوتري..

Caagulase act by a thrombinase like action. In normal blood clotting, the following raction occur.



Caagulase acts within host tissues to convert fibrinogen to thrombin.

Add 0.5 ml of dillute rabbit plasma to a small sterile tube contain the tested bacteria and put them in a water bath to 37°C

Result: fibrin formation (clot plasma) → coagulase positive (staphylococcus aureus needs 4 hours).

العملية تعتمد على تجمد الدم و تحويل مادة الفيبرينوجن الى ثرومين.

نضيف 0.5 مل من بلازما أرنب مخففه الى انبوب مطهر يحتوي على البكتيريا التي ندرسها ونضعه في حوض التسخين على 37 درجة مئوية.

اذا تجمد البلازما, فهذا دليل على قدرتها على صناعه هذا الانزيم. (تحتاج 4 ساعات S. aureus).

3.1.6 إنزيمات الحالة الدموية (Hemolysins)

إنزيمات الحالة الدموية (Hemolysins) هي ذيفانات خارجية (exotoxins) تنتجها وتؤدي إلى انحلال كرات الدم الحمراء معملياً.

Test how will lyse the red blood cells.

We incubate the bacteria on a nutrient agar supplement with 5% concentration of sheep blood.

Result:

1. Alfa hemolysins: partially lyse, produce green zone.
2. Beta hemolysins: complete lysis, clearing of hemoglobin.
3. Gamma hemolysins: no lysis, no changes.

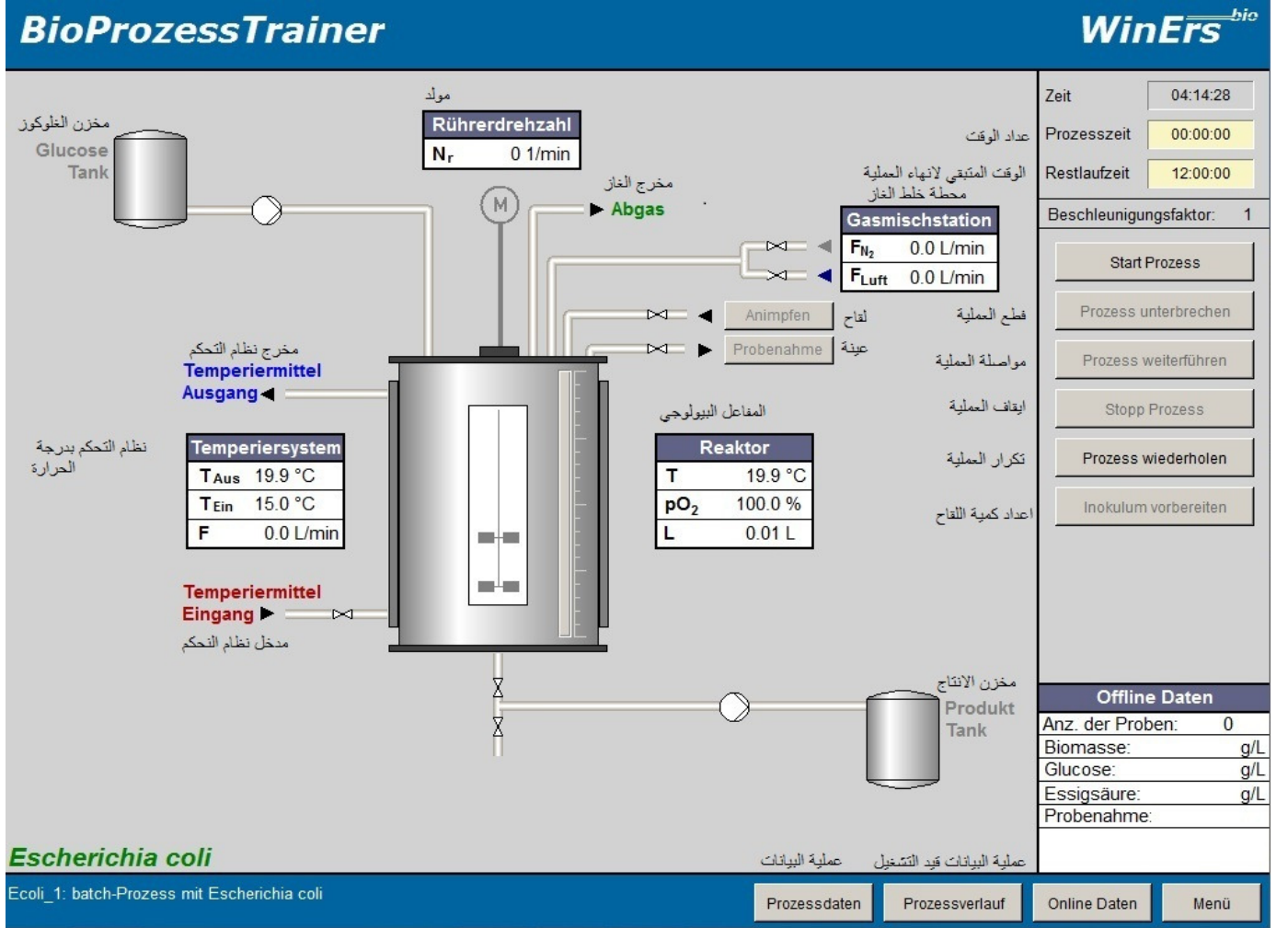
سيتم تكسير الكرويات الحمراء. نزرع البكتيريا على هلام مغذ مدعم بدم خروف بكتافه 5%.

اذا ظهر اللون الاخضر على الهلام فهذا يعني التكسير الجزئي, اذا لم يتغير اللون يعني ان الخلايه لم تتكسر, اما اذا اختفى اللون الاحمر يعني تكسير كامل.

4. تشغيل البيورياكتور (bioreactor) - عمليات تفصيلية داخل البيورياكتور

4.1 كيفية عمل المفاعل البيولوجي (bioreactor)⁷

الصورة في الاسفل مأخوذة من برنامج حاسوبي من [Hass, Pörtner 2011] و اضيفت اليها الترجمة العربية للمصطلحات. بهذا البرنامج يمكننا ان نرى ديناميك النظام على مدار الوقت اذا تم تشغيله والتدخل فيه. بالتالي سنقوم بمحاكاة



(simulation) تجربة (experiment) مع !. كولي.

بالتالي نقوم بتشغيل مثالي للبيورياكتور

ويمكننا ان نعمل ذلك حقيقياً او بحاكات (simulation) باستخدام برنامج BioProcessTrainer

أولاً : نقوم بادخال 10 لتر من المستنبت (medium) الكلوكوز الى المفاعل .

⁷ معظم مضمون هذه الفقرة من [Hass, Pörtner 2011]

ثانياً: تشغيل المحرك الكهربائي (Ruehrer) بسرعه الأولى 50 دورة / دقيقة .

ثالثاً : نفتح محطة دمج الغاز (Gasmischstation) ونثبت سرعة دخول الغاز الى المفاعل البيولوجي على 10 لتر/دقيقة.

رابعاً : تشغيل نظام التحكم بدرجة الحرارة (Temperiersystem) وهو عبارة عن أنبوب يلتف حول المفاعل و يدخل فيه السائل من الطرف الأسفل و يخرج من الطرف الأعلى , و يكون السائل بارداً أو ساخناً بحسب درجة حرارة المفاعل .
الهدف من هذا النظام ابقاء درجة الحرارة في المفاعل ثابتة .

خامساً : نحدد كمية البكتيريا (اذا استخدمنا البرنامج BioProcessTrainer بالضغظ على (Inokulum vorbereiten)) ثم ندخلها الى المفاعل البيولوجي (اذا استخدمنا البرنامج BioProcessTrainer بالضغظ على (animpfen)) على أن تدخل الكمية خلال 20 ثانية .

سادساً: نأخذ عينة من المفاعل (اذا استخدمنا البرنامج BioProcessTrainer: من خلال الضغظ على (Probenahme)). و في البرنامج على الفور تظهر كمية كل مكون من مكونات العينة في جدول المعلومات تسمى (offline daten) و هي على الشكل التالي (biomasse,glucose , essigsauere).

- الغاز الذي يدخل الى المفاعل يخرج منه عبر المخرج المسمى الAbgas.
- (اذا استخدمنا البرنامج BioProcessTrainer: عندما نضغظ على (online daten) خلال العملية يظهر جدول يبرز المتغيرات الحالية لكل من : معدل الحرارة المستنبت (T), معدل الحجم المستنبت (V), pH , pO2 , كمية الأوكسيجين و ثاني أو أكسيد الكربون (CO2,O2)).
- (اذا استخدمنا البرنامج BioProcessTrainer: عندما نضغظ على (Prozessverlauf) نحصل على رسم بياني لكل من : درجة الحرارة , سرعة المحرك , الحجم الاجمالي للمفاعل , ال pH و pO2 , في اللحظة التي نضغظ بها , هذه المعطيات نحصل عليها من خلال مجسات موصولة الى المفاعل).
- (اذا استخدمنا البرنامج BioProcessTrainer: عندما نضغظ على (Prozessdaten) نحصل على رسم بياني لنفس المعطيات السابقة و لكن لفترة من الوقت و ليس للحظة التي نضغظ بها).

4.2 اختبار مع خميرة (*S.cerevisiae*) مع حل ملي ببرنامج BioProcessTrainer

zellspezifische Produktionsrate q_{Mab}
[mg Zelle⁻¹ h⁻¹):

(5.63)
$$q_{Mab}(D) = \frac{\bar{c}_{Mab}(D) - c_{Mab,0}}{X_v(D)} D \quad (5.74)$$

(5.64) [L⁻¹):

(5.65) **5.2.3 Experimente zu Prozessführungen mit *Saccharomyces cerevisiae***

(5.66) **Experiment Hefe_1: batch-Prozess mit *Saccharomyces cerevisiae***

(5.67) **Aufgabe:** Durchführung und Auswertung einer batch-Kultivierung zur Analyse wichtiger Prozessgrößen

mmol (5.68) **Ziel:** Beschreibung der Wachstumsphasen sowie der Phasen, in denen der Crabtree-Effekt bzw. die Diauxie wirken. Bestimmung spezifischer Wachstums- und Umsatzraten.

dem M
genden M
• Laufze
• Prober
• Biotro
• Gluco
• Ethar
• Temp
• pO₂
▶ Starten
tavier
maß d
▶ Die Sa
im aer
gelt. I
bis au
finder
▶ Neh
Gluc
min
▶ Die
brau
ende

Grundlagen: Kap. 3.4 und Kap. 4.1
Auswertungsgleichungen: Kap. 5.2.2.2

Einstellungen am BioProzessTrainer:

► Wählen Sie aus dem Hauptmenü das Experiment **Hefe_1**. Hierdurch wird der **BioProzessTrainer** initialisiert. Nach der Initialisierung befinden sich $V_R = 10$ L einer auf 35°C temperierten und mit Sauerstoff gesättigten ($p\text{O}_2 = 100\%$) Mediumlösung im Reaktor. Die Anfangskonzentrationen für Glucose und Ethanol betragen:

- Glucose: 10 g L^{-1}
- Ethanol: 0 g L^{-1}

Die Konzentration an Biomasse X_R nach dem Anpflanzen soll bei 4 g L^{-1} liegen.

► Berechnen Sie die erforderliche Biomassekonzentration X_I im Inokulum (Volumen Inokulum $V_I = 200 \text{ mL}$)

$$X_I = X_R \frac{V_R + V_I}{V_I} \quad (5.75)$$

Vorgehensweise:

- Bereiten Sie ein Datenblatt gemäß beiliegendem Muster (siehe Beispiellösung) für die folgenden Messgrößen vor:
- Laufzeit t
 - Probenvolumen (hier 10 mL)
 - Biotrockenmassekonzentration
 - Glucosekonzentration
 - Ethanolkonzentration
 - Temperatur
 - $p\text{O}_2$
- Starten Sie das Experiment **Hefe_1** durch Aktivieren des Start-Buttons (aerob/anaerob) gemäß den Hinweisen auf der DVD.
- Die Sauerstoffkonzentration im Medium wird im aeroben Fall bei 60% Luftsättigung geregelt. Im anaeroben Fall wird die Luftsättigung bis auf 0% absinken. Hinweise zur Regelung finden sich in Kap. 6.
- Nehmen Sie Proben (zu Biotrockenmasse, Glucose und Ethanol) im Abstand von ca. 30 min (Prozesszeit).
- Die *batch*-Kultur ist mit dem kompletten Verbrauch an Substraten (Glucose, Ethanol) beendet.

- Tragen Sie die Daten für die Messgrößen in die vorbereitete Tabelle gemäß Musterlösung ein.
- Wiederholen Sie das Experiment unter anaeroben Bedingungen. Zur Wiederholung des Teil-Experiments drücken Sie den Wiederholungs-Button entsprechend den Hinweisen auf der DVD.
- Zum Beenden des Experiments **Hefe_1** drücken Sie den Ende-Button entsprechend den Hinweisen auf der DVD.

Auswertung:

- Stellen Sie aus den Rohdaten die Verläufe von Biotrockenmasse, Glucose- und Ethanolkonzentration als Funktion der Zeit dar.
 - Unterteilen Sie den Verlauf in die exponentielle Phase (aerobes Wachstum mit Crabtree-Effekt bei Glucoseüberschuss und Ethanolbildung, Diauxie bei niedrigen Glucosekonzentrationen und Ethanolverbrauch).
 - Berechnen Sie in den jeweiligen Zeitintervallen zwischen zwei Probenahmen die im Folgenden aufgeführten Größen und stellen Sie diese ebenfalls als Funktion der Zeit dar.
 - spezifische Wachstumsrate μ
 - Verdopplungszeit t_D
 - spezifische Substrataufnahmerate für Glucose q_{Glc}
 - spezifische Substrataufnahmerate für Glucose q_{Glc} und Ethanol q_{Eth} (bei Glucoselimittierung)
 - spezifische Ethanolbildungsrate $q_{p,\text{Eth}}$ bei Glucoseüberschuss
 - Ausbeutekoeffizient Biotrockenmasse/Glucose $Y_{X_{\text{Tro}}/\text{Glc}}$ unter den verschiedenen Prozesszuständen (vgl. Kap. 3.4)
 - Ausbeutekoeffizient Biotrockenmasse/Ethanol $Y_{X_{\text{Tro}}/\text{Eth}}$ unter den verschiedenen Prozesszuständen (vgl. Kap. 3.4)
- (Vorbereitung für Experimente in Kap. 5.3)
- Vergleichen Sie dabei die differentielle und die integrale Methode zur Bestimmung der genannten Kenngrößen.

Beispiellösung zu HEFE_1

Experiment Nr HEFE_1 aerobe Prozessführung

Name HEFE_1
Organismus *Saccharomyces cerevisiae*Startvolumen 10,0 L
Anfangskonzentration Glucose 10,0 g/L
Anfangskonzentration Ethanol 0,0 g/L
Animpfkonzentration 4,0 g/L
Temperatur 35,0 °C
Sauerstoffgehalt 60,0 %

Probe #	Laufzeit t [min]	Laufzeit t [h]	Biotrockenmasse X [g/L]	Glucose G [g/L]	Ethanol E [g/L]	Temperatur T [°C]	pH pH [-]	pO ₂ pO ₂ [%]
1	5,00	0,08	4,1	9,4	0,2	34,9	6,9	60,0
2	30,00	0,50	4,7	7,2	0,8	35,0	6,7	59,9
3	60,00	1,00	5,4	4,1	1,7	35,0	6,4	60,0
4	90,00	1,50	6,3	0,9	2,4	35,0	6,1	62,1
5	120,00	2,00	6,9	0,0	2,2	35,0	6,0	60,0
6	150,00	2,50	7,0	0,0	1,7	35,0	6,0	60,0
7	180,00	3,00	7,1	0,0	1,3	35,0	6,0	60,0
8	210,00	3,50	7,2	0,0	0,9	35,0	6,0	60,1
9	240,00	4,00	7,3	0,0	0,6	35,0	6,0	60,1
10	270,00	4,50	7,4	0,0	0,3	35,0	6,0	60,2
11	300,00	5,00	7,4	0,0	0,1	35,0	6,0	59,9
12	330,00	5,50	7,4	0,0	0,1	35,0	6,0	60,0
13	360,00	6,00	7,4	0,0	0,0	32,0	6,0	72,0

HEFE_1: Auswertung der Kenndaten der aeroben Kultivierung nach der differentiellen Methode

Laufzeit t [h]	Intervallmitte t [h]	Vol. vor Probe V _i [L]	Vol. nach Probe V _{i+1} [L]	μ [1/h]	t_d [h]	q_{Glc} [1/h]	q_{Eth} [1/h]	$Y_{XTG/Glc}$ [-]	$Y_{XTG/Eth}$ [-]
0,08		10	9,99						
0,50	0,29	9,99	9,98	0,327	2,118	1,200	0,327	0,273	-1,000
1,00	0,75	9,98	9,97	0,277	2,500	1,228	0,356	0,226	-0,778
1,50	1,25	9,97	9,96	0,308	2,253	1,094	0,239	0,281	-1,286
2,00	1,75	9,96	9,95	0,182	3,812	0,273	-0,061	0,667	3,000
2,50	2,25	9,95	9,94	0,029	24,087	0,000	-0,144	-	0,200
3,00	2,75	9,94	9,93	0,028	24,433	0,000	-0,113	-	0,250
3,50	3,25	9,93	9,92	0,028	24,780	0,000	-0,112	-	0,250
4,00	3,75	9,92	9,91	0,028	25,127	0,000	-0,083	-	0,333
4,50	4,25	9,91	9,90	0,027	25,473	0,000	-0,082	-	0,333
5,00	4,75	9,9	9,89	0,000	-	0,000	-0,054	-	0,000
5,50	5,25	9,89	9,88	0,000	-	0,000	0,000	-	-
6,00	5,75	9,88	9,87	0,000	-	0,000	-0,027	-	0,000

HEFE_1: Auswertung der Kenndaten der aeroben Kultivierung nach der integralen Methode

Laufzeit t [h]	Intervall- mitte t [h]	Vol. vor Probe [L]	Vol. nach Probe [L]	μ [1/h]	t_d [h]	q_{Glc} [1/h]	q_{Eth} [1/h]	$Y_{XTG/Glc}$ [-]	$Y_{XTG/Eth}$ [-]
0,08	-	10	9,99	0,521	1,331	2,312	0,799	0,225	-0,799
0,50	0,29	9,99	9,98	0,367	1,889	1,459	0,426	0,251	-0,426
1,00	0,75	9,98	9,97	0,250	2,767	0,855	0,172	0,293	-0,172
1,50	1,25	9,97	9,96	0,172	4,024	0,487	0,027	0,354	-0,027
2,00	1,75	9,96	9,95	0,116	5,979	0,253	-0,056	0,459	0,056
2,50	2,25	9,95	9,94	0,074	9,384	0,103	-0,099	0,715	0,099
3,00	2,75	9,94	9,93	0,042	16,436	0,012	-0,116	3,417	0,116
3,50	3,25	9,93	9,92	0,019	36,439	-0,036	-0,113	-0,532	0,113
4,00	3,75	9,92	9,91	0,004	185,548	-0,051	-0,096	-0,074	0,096
4,50	4,25	9,91	9,9	-0,004	-191,610	-0,040	-0,070	0,091	0,070
5,00	4,75	9,9	9,89	-0,003	-274,205	-0,009	-0,038	0,296	0,038
5,50	5,25	9,89	9,88	0,008	90,707	0,036	-0,006	0,209	0,006
6,00	5,75	9,88	9,87	0,027	25,421	0,088	0,022	0,309	-0,022

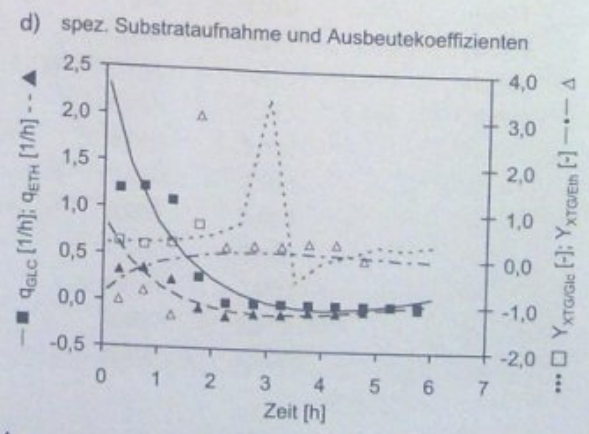
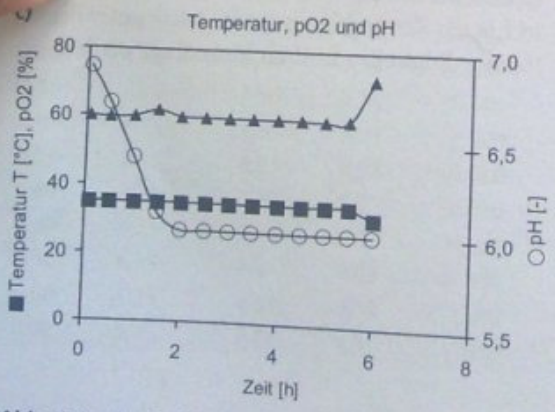
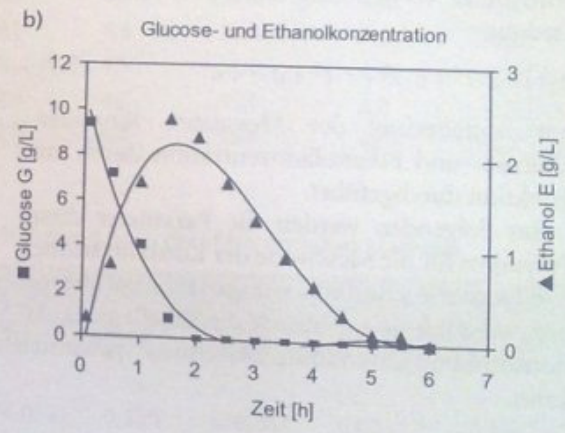
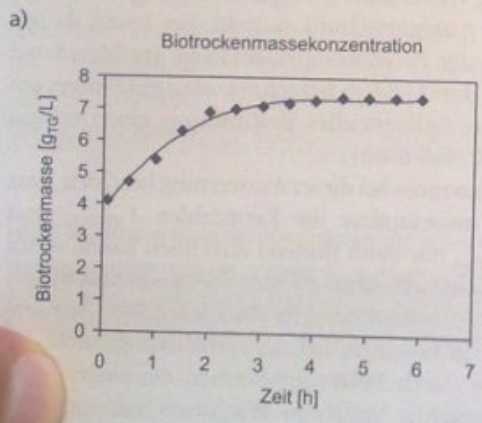


Abb. 5.2 a-d Grafische Darstellung der Ergebnisse und Auswertungen für die aerobe Kultivierung HEFE_1

In den grafischen Darstellungen der Ergebnisse und Auswertungen wurden die Kenngrößen sowohl mit der differentiellen Methode, als auch mit der integralen Methode berechnet. Differentiell erhaltene Größen sind in den Grafiken durch diskrete Symbole gekennzeichnet. Integral berechnete Größen sind in den Grafiken durch Linien verbunden (Abb. 5.2 d).

Anhand der Grafiken kann man erkennen, dass eine exponentielle Wachstumsphase für maximal 2,0 Stunden, also ungefähr bis zum Abbau der Glucose anhält. Ferner sieht man, dass der Crabtree-Effekt – also die Erzeugung von Ethanol unter aeroben Bedingungen – über den ganzen Konzentrationsbereich der Glucose zu beobachten ist. Ein Abbau von Ethanol ist erst zu beobachten, wenn die Glucose vollständig abgebaut ist.

Die integrale Berechnung von Kennzahlen wird unter Verwendung eines Polynoms vierter Ordnung

$$z(t) = a \cdot t^4 + b \cdot t^3 + c \cdot t^2 + d \cdot t + e \quad (5.76)$$

zur Annäherung der Messdaten Biomasse-, Glucose- und Ethanolkonzentration durch eine Funktion durchgeführt.

Im Folgenden werden die Parameter dieses Polynoms für die Messwerte der Konzentrationen von Biomasse sowie Glucose und Ethanol angegeben, wie man sie z. B. durch die Tabellenkalkulationsfunktion „Trendlinie berechnen“ gewinnen kann.

	X	Glc	Eth
a	0,0015	0,0152	-0,0119
b	0,0143	-0,3716	0,2406
c	-0,3990	3,0074	-1,5830
d	2,1490	-9,7415	3,4557
e	3,8253	10,6680	-0,2621
R ²	0,9902	0,9836	0,9668

Die entsprechenden Ableitungen ergeben sich aus einem Polynom dritter Ordnung

$$\frac{dz(t)}{dt} = 4a \cdot t^3 + 3b \cdot t^2 + 2c \cdot t + d \quad (5.77)$$

In der Abb. 5.2 d erkennt man deutlich den ausgleichenden Charakter der unterlegten Polynome. Die Kenngrößen aus der integralen Bestimmung weisen eine geringere Streuung auf (in der oben gezeigten Grafik täuscht dies etwas, da mit Hilfe der Polynomrepräsentation der Messdaten auch dort Größen berechnet werden können, wo bei der differentiellen Bestimmung eine Division durch Null droht).

Man muss bei dieser Auswertung beachten, dass sich insbesondere die Kennzahlen $Y_{XTG/Glc}$ und $Y_{XTG/Eth}$ nur dann sinnvoll errechnen lassen, wenn überhaupt Wachstum von Biomasse stattfindet. Dies ist insbesondere bei der integralen Auswertung zu beachten. Bei der Annäherung der Messwerte durch Polynome können die eingesetzten statistischen Verfahren Wachstum anzeigen, wo tatsächlich keines stattfindet. Die entsprechend errechneten Kennzahlen müssen daher unter diesen Randbedingungen kritisch hinterfragt werden.

Experiment Nr. HEFE_1 anaerobe Prozessführung

Name Organismus HEFE_1
*Saccharomyces cerevisiae*Startvolumen 10,0 L
Anfangskonzentration Glucose 10,0 g/L
Anfangskonzentration Ethanol 0,0 g/L
Animpfkonzentration 4,0 g/L
Temperatur 35,0 °C
Sauerstoffgehalt 0,0 %

Probe #	Laufzeit t [min]	Laufzeit t [h]	Biotrockenmasse X [g/L]	Glucose G [g/L]	Ethanol E [g/L]	Temperatur T [°C]	pH pH [-]	pO ₂ pO ₂ [%]
1	0,00	0,00	4,0	9,7	0,1	35,0	7,0	-0,4
2	30,00	0,50	4,1	7,8	1,0	35,0	6,8	-0,4
3	60,00	1,00	4,2	5,6	2,1	35,0	6,6	-0,4
4	90,00	1,50	4,2	3,2	3,3	35,0	6,3	-0,4
5	120,00	2,00	4,3	1,0	4,3	35,0	6,1	-0,5
6	150,00	2,50	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2
7	180,00	3,00	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2
8	210,00	3,50	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2
9	240,00	4,00	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2
10	270,00	4,50	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2
11	300,00	5,00	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2
12	330,00	5,50	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2
13	360,00	6,00	4,3	0,0	4,8	35,0	6,0	-0,2

HEFE_1: Auswertung der Kenndaten der anaeroben Kultivierung nach der differentiellen Methode

Laufzeit t [h]	Intervall- mitte t [h]	Vol. vor Probe V _i [L]	Vol. nach Probe V _{i+1} [L]	μ [1/h]	t_d [h]	q_{Glc} [1/h]	q_{Eth} [1/h]	$Y_{XTG/Glc}$ [-]	$Y_{XTG/Eth}$ [-]
0,00		10,00	9,99						
0,50	0,25	9,99	9,98	0,049	14,036	0,938	0,444	0,053	-0,111
1,00	0,75	9,98	9,97	0,048	14,383	1,060	0,530	0,045	-0,091
1,50	1,25	9,97	9,96	0,000	-	1,143	0,571	0,000	0,000
2,00	1,75	9,96	9,95	0,047	14,729	1,035	0,471	0,045	-0,100
2,50	2,25	9,95	9,94	0,000	-	0,465	0,233	0,000	0,000
3,00	2,75	9,94	9,93	0,000	-	0,000	0,000	-	-
3,50	3,25	9,93	9,92	0,000	-	0,000	0,000	-	-
4,00	3,75	9,92	9,91	0,000	-	0,000	0,000	-	-
4,50	4,25	9,91	9,9	0,000	-	0,000	0,000	-	-
5,00	4,75	9,9	9,89	0,000	-	0,000	0,000	-	-
5,50	5,25	9,89	9,88	0,000	-	0,000	0,000	-	-
6,00	5,75	9,88	9,87	0,000	-	0,000	0,000	-	-

HEFE_1: Auswertung der Kenndaten der anaeroben Kultivierung nach der integralen Methode

Laufzeit t [h]	Intervall- mitte t [h]	Vol. vor Probe [L]	Vol. nach Probe [L]	μ [1/h]	t_d [h]	q_{Glc} [1/h]	q_{Eth} [1/h]	$Y_{XTG/Glc}$ [-]	$Y_{XTG/Eth}$ [-]
0,00		10	9,99	0,061	11,378	1,224	0,603	0,050	-0,603
0,50	0,25	9,99	9,98	0,044	15,584	1,175	0,574	0,038	-0,574
1,00	0,75	9,98	9,97	0,031	22,081	1,045	0,508	0,030	-0,508
1,50	1,25	9,97	9,96	0,021	32,938	0,860	0,416	0,024	-0,416
2,00	1,75	9,96	9,95	0,013	53,275	0,642	0,310	0,020	-0,310
2,50	2,25	9,95	9,94	0,007	99,306	0,414	0,199	0,017	-0,199
3,00	2,75	9,94	9,93	0,003	255,019	0,197	0,095	0,014	-0,095
3,50	3,25	9,93	9,92	0,000	17060,531	0,014	0,007	0,003	-0,007
4,00	3,75	9,92	9,91	-0,001	-573,953	-0,112	-0,053	0,011	0,053
4,50	4,25	9,91	9,9	-0,001	-593,558	-0,157	-0,073	0,007	0,073
5,00	4,75	9,9	9,89	0,000	29816,419	-0,096	-0,043	0,000	0,043
5,50	5,25	9,89	9,88	0,002	311,562	0,095	0,049	0,023	-0,049
6,00	5,75	9,88	9,87	0,005	131,084	0,439	0,215	0,012	-0,215

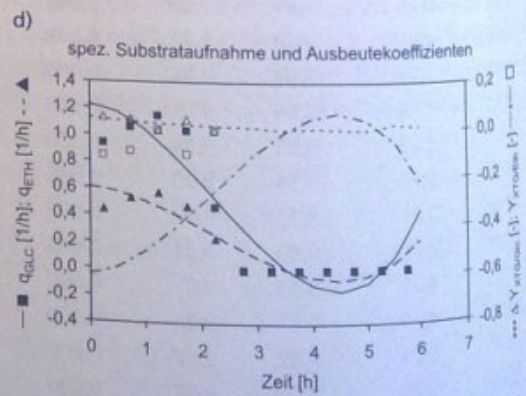
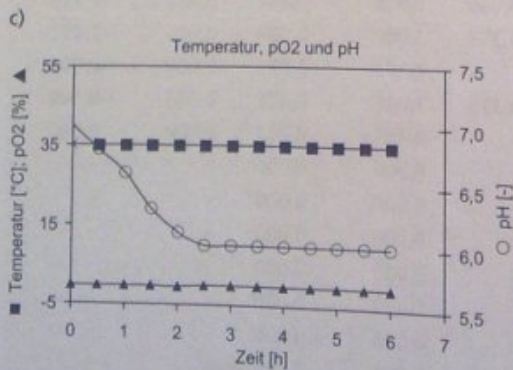
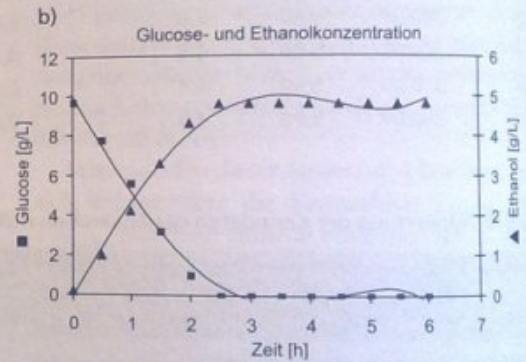
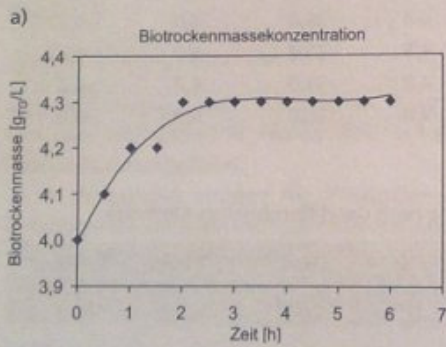
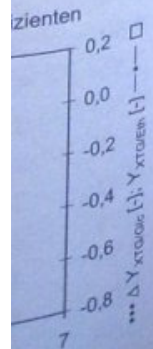
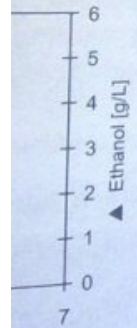


Abb. 5.3 a-d Grafische Darstellung der Ergebnisse und Auswertungen für die anaerobe Kultivierung HEFE_1

e

$Y_{XTG/Eth}$
[-]
-0,603
-0,574
-0,508
-0,416
-0,310
-0,199
-0,095
-0,007
0,053
0,073
0,043
-0,049
-0,215



5.2 Experimente zum Wachstumsverhalten der Beispielorganismen

Die Berechnung der Kenngrößen der anaeroben Hefekultivierung erfolgt mit den gleichen Methoden wie die Berechnung der Kenngrößen der aeroben Kultivierung. Damit die Auswertungen der aeroben (Abb. 5.2) und der anaeroben Kultivierung (Abb. 5.3) einfacher zu vergleichen sind, ist die Zeitachse beibehalten worden. Es ist aber zu beachten, dass die Auswertung der Kenngrößen nur bis zum vollständigen Verbrauch der Glucose sinnvoll ist. Weil im anaeroben Betrieb dann kein Wachstum mehr erfolgt, ergeben Berechnungen von Kennzahlen, die die Wachstumsrate beinhalten keinen Sinn.

Im Vergleich der beiden Kultivierungen fällt auf, dass die Wachstumsphase bei der anaeroben Kultivierung kürzer ist als bei der aeroben Kultivierung. Die Hefezellen haben keine Möglichkeit, Ethanol zur Energiegewinnung umzusetzen. Dies zeigt sich deutlich im Ausbeutekoeffizienten Biotrockenmasse/Glucose. Dieser ist bei der anaeroben Prozessführung deutlich geringer.

Die Erwartung für den Ausbeutekoeffizienten Biotrockenmasse/Ethanol ist für die anaerobe Prozessführung Null, da kein Abbau von Ethanol zur Energiegewinnung stattfinden kann.

Experiment Hefe_2: batch-Prozess mit *Saccharomyces cerevisiae* bei verschiedenen anfänglichen Biomasse- und Substratkonzentrationen sowie bei verschiedenen Temperaturen

Aufgabe: Durchführung und Auswertung von batch-Kultivierungen mit verschiedenen Anfangskonzentrationen und bei verschiedenen Temperaturen.

Ziel: Ermittlung optimaler Parameter zur Erzielung einer hohen Ausbeute.

Grundlagen: 4 und 5

Führen Sie ein Experiment durch...

Überlegen Sie sich hierzu eine Sie mit möglichst wenigen Experimenten wertbaren Aussagen kommen könnten. Zeichnen Sie einen schematischen Versuchsplan [Soravia and

Auswertung:

Bereiten Sie die Daten wie in Experiment 1 auf und werten Sie diese entsprechend aus.

- Welche Startzellkonzentration würden Sie als optimal ansehen?
- Welche optimalen Anfangskonzentrationen für Glucose würden Sie nach Ihren Ergebnissen vorschlagen (Begründen Sie Ihre Vorschläge)?
- Vergleichen Sie diese Werte mit den Ergebnissen der aeroben Kultivierung.

Führen Sie ein Experiment mit den gewählten Bedingungen durch und überprüfen Sie, ob Ihre Prognosen zutreffen.

Experiment Hefe_3: batch-Prozess mit *Saccharomyces cerevisiae*; Bestimmung des respiratorischen Quotienten während einer Kultivierung.

Aufgabe: Durchführung einer einfachen batch-Kultivierung mit geregelter pO_2 -Einstellung des $k_L a$ -Wertes in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl mit den online gemessenen Sauerstoffkonzentration im Abgas und der gelösten Sauerstoffkonzentration c_{O_2} .

Bestimmung des Verlaufs des respiratorischen Quotienten (RQ) während einer batch-Kultivierung mit Hilfe der Abgasanalytik.

Ziel: Verfolgen des $k_L a$ -Wertes aus den gemessenen Größen während einer Kultivierung und Ermittlung des Zusammenhangs zwischen $k_L a$ und der Rührerdrehzahl.

Bestimmung des RQ während einer batch-Kultivierung mit *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3 اختبار دفع العملية مع ال E.coli

المهمة : اجراء و تقييم تكبير البكتيريا اذا لقمح المستنبت مرة واحدة في البداية ب E.coli (batch cultivation).

الهدف : وصف لمرحلة النمو، وتحديد سرعة النمو.

الاعدادات على برنامج التدريب BioProcessTrainer:

-> نختار من القائمة الرئيسية الاختبار (Ecoli_1) . و هكذا يتم استهلال (initialization) ال BioProzessTrainer. خذ

القيم (values) الابتدائية من شاشة التحكم ل BioProzessTrainer

كثافة البيوماس (biomass) بعد التلقيح يجب ان تكون تقريباً 0.5g في اللتر.

-> احسب كثافة البيوماس (biomass) اللازمة في حجم اللقاح اذا هو يساوي 200 ml .

طريقة العمل:

عد ورقة معطيات (data sheet) بعد قياس المتغيرات... (انظر في الاسفل باللغة الالمانية)

mit Saccha-

Experiment Ecoli_1: batch-Prozess mit Escherichia coli

ostat-Kulti-
nungsrate

Aufgabe: Durchführung und Auswertung einer batch-Kultivierung zur Analyse wichtiger Prozessgrößen.

s zwischen
Konzentra-
boliten als
estimmung
aten.

Ziel: Beschreibung der Wachstumsphasen, Bestimmung spezifischer Wachstums- und Umsatzraten.

imente in
rch, wobei
 $D = 0 \text{ h}^{-1}$
 μ_{\max} eine
Ergebnis-

Grundlagen: Kap. 3.3 und Kap. 4.1
Auswertungsgleichungen: Kap. 5.2.2

Einstellungen am BioProzessTrainer:

- ▶ Wählen Sie aus dem Hauptmenü das Experiment **Ecoli_1**. Hierdurch wird der **BioProzessTrainer** initialisiert. Entnehmen Sie die anfänglichen Messwerte und Zustandsgrößen der Bedienoberfläche des **BioProzessTrainers**.

ü das Ex-
er BioPro-
eine Che-
n etwa im
g aus dem

Die Konzentration an Biomasse X_R nach dem Animpfen soll bei $0,5 \text{ g L}^{-1}$ liegen.

- ▶ Berechnen Sie die erforderliche Biomassekonzentration X_I im Inokulum (Volumen Inokulum $V_I = 200 \text{ mL}$)

erechneten
as.
hwerte als
Ermitteln
nungsrate

Vorgehensweise:

- ▶ Führen Sie die Kultivierung **Ecoli_1** in Analogie zum Experiment **Hefe_1** durch. Bereiten Sie ein entsprechendes Datenblatt für die folgenden Messgrößen vor:
 - Laufzeit t
 - Probenvolumen (hier 10 mL)
 - Biotrockenmassekonzentration
 - Glucosekonzentration
 - Essigsäurekonzentration
 - pO_2 [%]

ess-
coli

Auswertung:

teten Ex-
n im We-
ente mit
nd ausge-
genen Ex-
zt darge-

- ▶ Stellen Sie aus den Rohdaten die Verläufe von Biotrockenmasse, Glucose- und Essigsäurekonzentration als Funktion der Zeit dar.
- ▶ Unterteilen Sie den Verlauf in die exponentielle Phase (konstante Wachstumsrate), Phase verzögerten Wachstums, stationäre Phase und Absterbephase.

▶ Worauf ist Ihrer Meinung nach das Ende des Zellwachstums zurückzuführen (Substratlimitierung oder Metaboliteninhibierung)?

▶ Berechnen Sie in den jeweiligen Zeitintervallen zwischen zwei Probenahmen die im Folgenden aufgeführten Größen und stellen Sie diese ebenfalls als Funktion der Zeit dar.

- spezifische Wachstumsrate μ
- Verdopplungszeit t_d
- spezifische Substrataufnahmerate für Glucose q_{Glc}
- Ausbeutekoeffizient Biotrockenmasse/Glucose $Y_{X_{TG}/Glc}$

(Vorbereitung für Experimente in Kap. 5.3)

▶ Vergleichen Sie dabei die differentielle und die integrale Bestimmung.

Experiment Ecoli_2: batch-Prozess mit Escherichia coli bei verschiedenen Anfangszell- und -substratkonzentrationen

Aufgabe: Durchführung und Auswertung von batch-Kultivierungen bei verschiedenen Anfangskonzentrationen an Biomasse und Glucose.

Ziel: Ermittlung optimaler Anfangsbedingungen.

Grundlagen: Kap. 3.3 und Kap. 4.1
Auswertungsgleichungen: Kap. 5.2.2.2

Führen Sie batch-Experimente gemäß **Experiment Ecoli_1** durch, wobei Sie die Anfangskonzentrationen an Biotrockenmasse zwischen $0,1 \text{ g}_{TG} \text{ L}^{-1}$ und $1 \text{ g}_{TG} \text{ L}^{-1}$ sowie an Glucose zwischen 2 und 40 g L^{-1} variieren.

Überlegen Sie sich hierzu eine Strategie, wie Sie mit möglichst wenigen Experimenten zu wertbaren Aussagen kommen können (z. B. faktorieller Versuchsplan [Soravia and Orth 2006]).

Auswertung:

Bereiten Sie die Daten wie in **Experiment Ecoli_1** auf und werten Sie diese entsprechend aus:

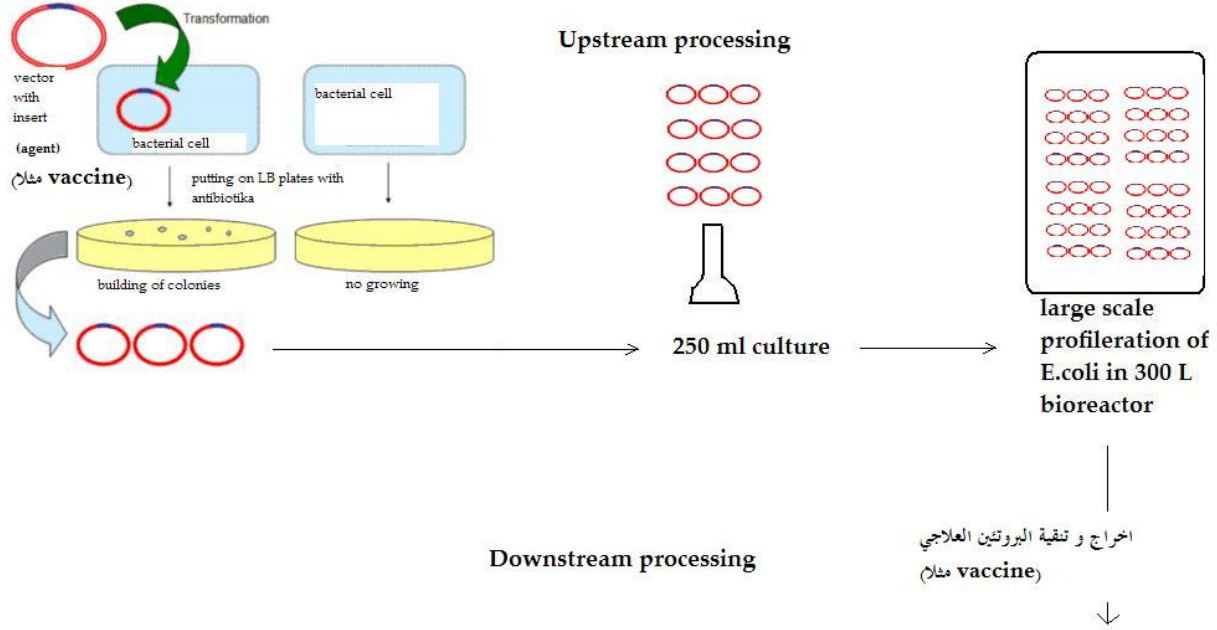
- Welche Startzellkonzentration würden Sie als optimal ansehen?
- Welche optimalen Anfangskonzentrationen für Glucose würden Sie nach Auswertung der Ergebnisse vorschlagen (Begründung)?
- Vergleichen Sie...

5. تصميم و تصنيع 300L بيوريكتور (bioreactor/fermenter)

5.1 (Specification) مواصفة

5.1.1 نظرة عامة

نريد ان نبني 300L بيوريكتور (bioreactor/fermenter) لتصنيع البروتينات (proteins) العلاجية في الجرسومة E.coli.



5.1.2 متطلبات (Requirements)

[Req1] It has to be a 300 L fermenter

[Req2] The tube is 1 m high and with has a radius of 318 mm

[Req3] Two steel sheets 316 1mx2m have to be used

[Req4] Sensors: 1. pH sonde, 2. temperature, 3. oxygen, each is 12 mm x 120 mm 4. filling level (dt. Füllstandsmesser)

[Req5] Motor: ca. 1-8 U/sec., d.h. 60 – 480 U/min.

[Req6] NaOH, HCl inlet, each is controlled with a valve (not a motor). That means it has to be above (or on higher level as) the fermenter tube.

[Req7] One oxygen inlet

[Req8] LB media inlet, recombinant culture inlet

[Req9] For temperature control: heat exchanger

5.2 التصميم (design)

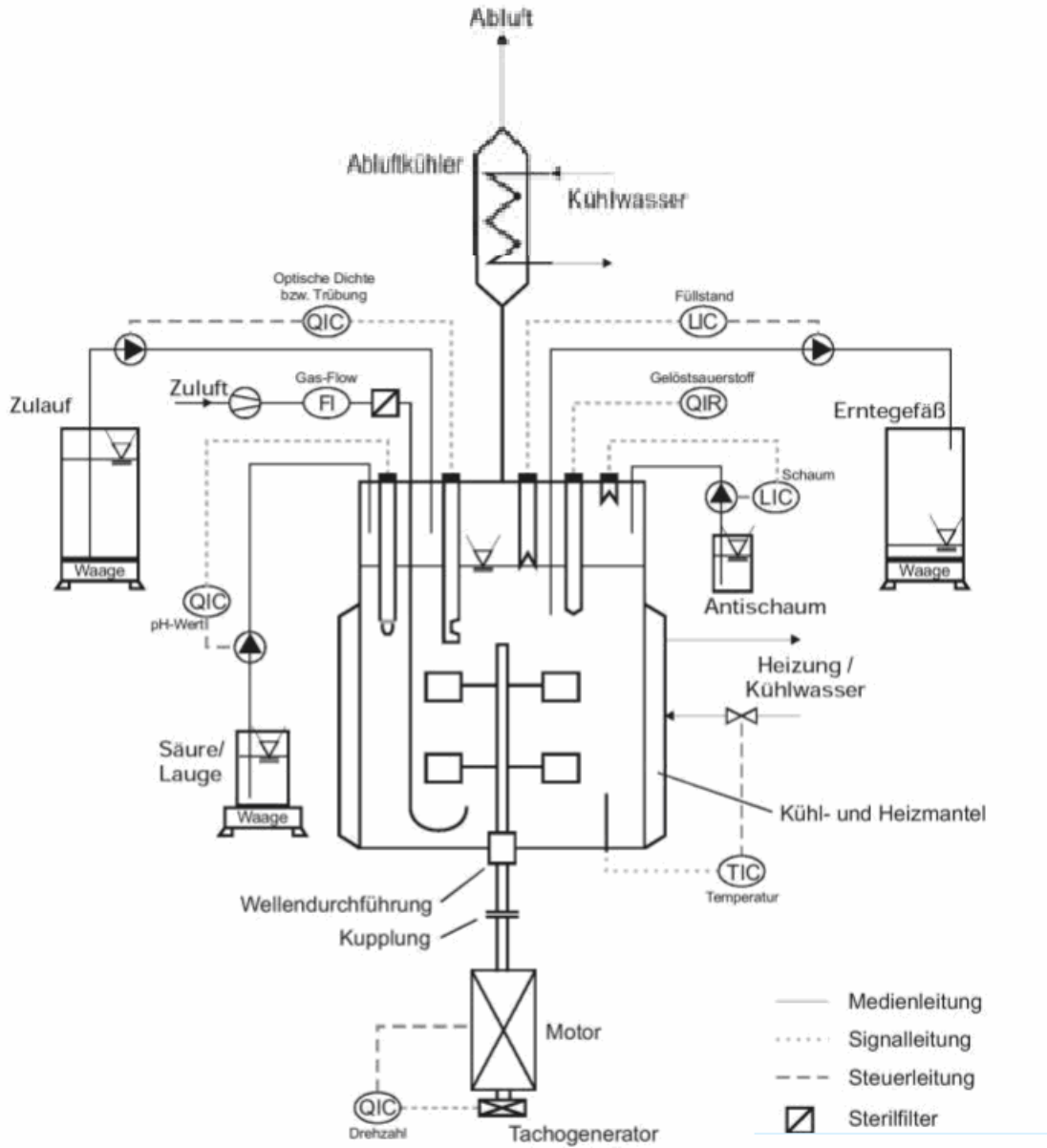
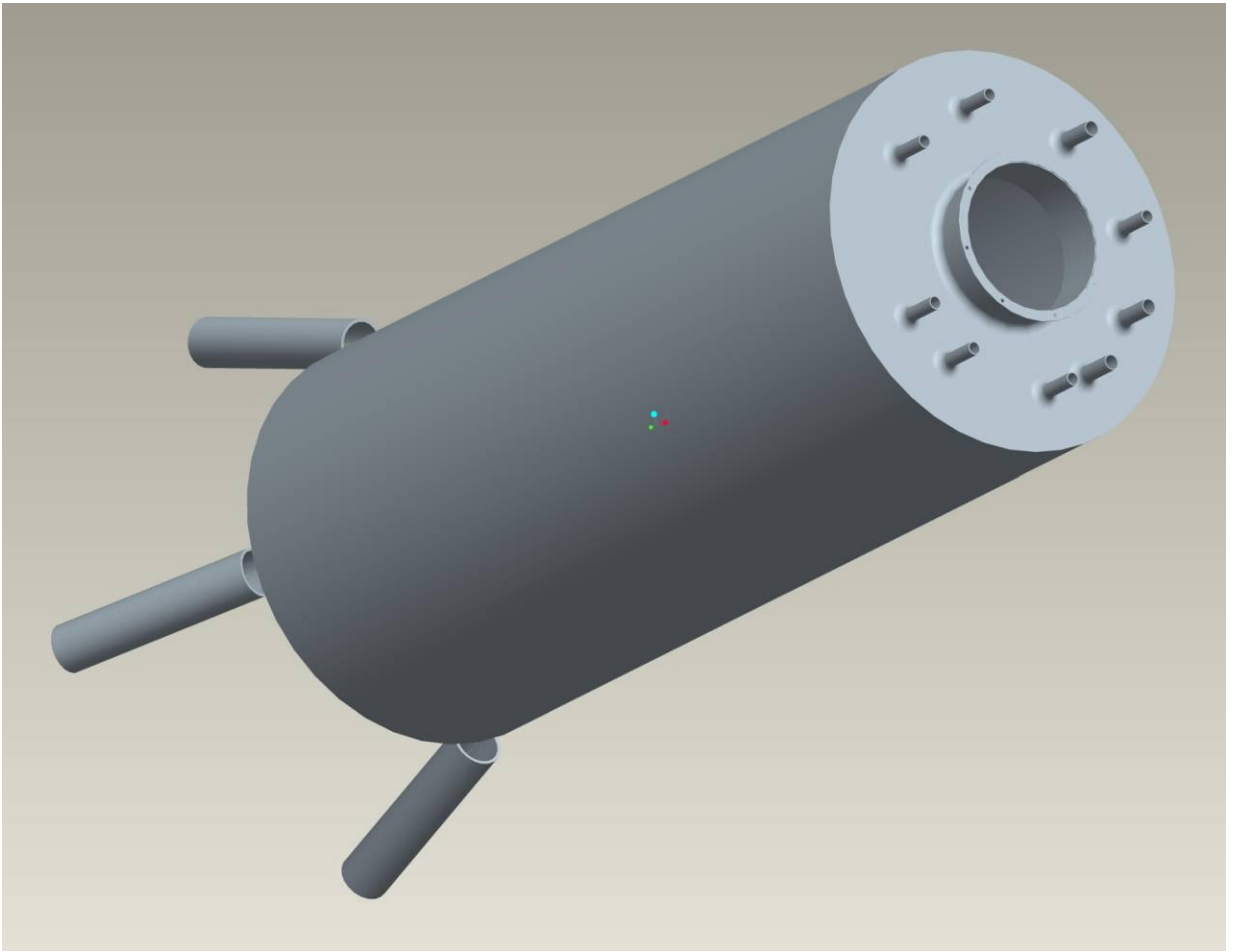


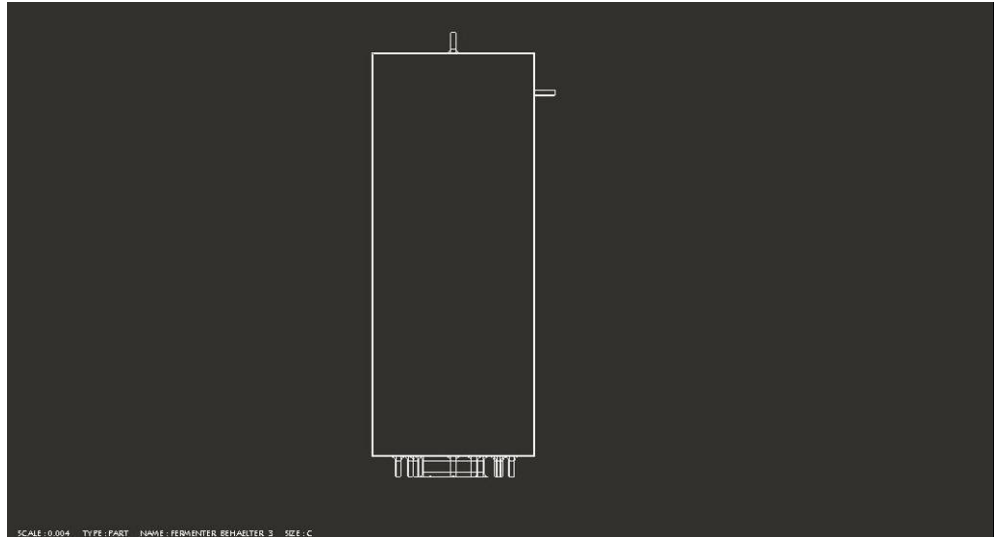
Figure: Instrumentation

Construction 5.3

الخزان (1)

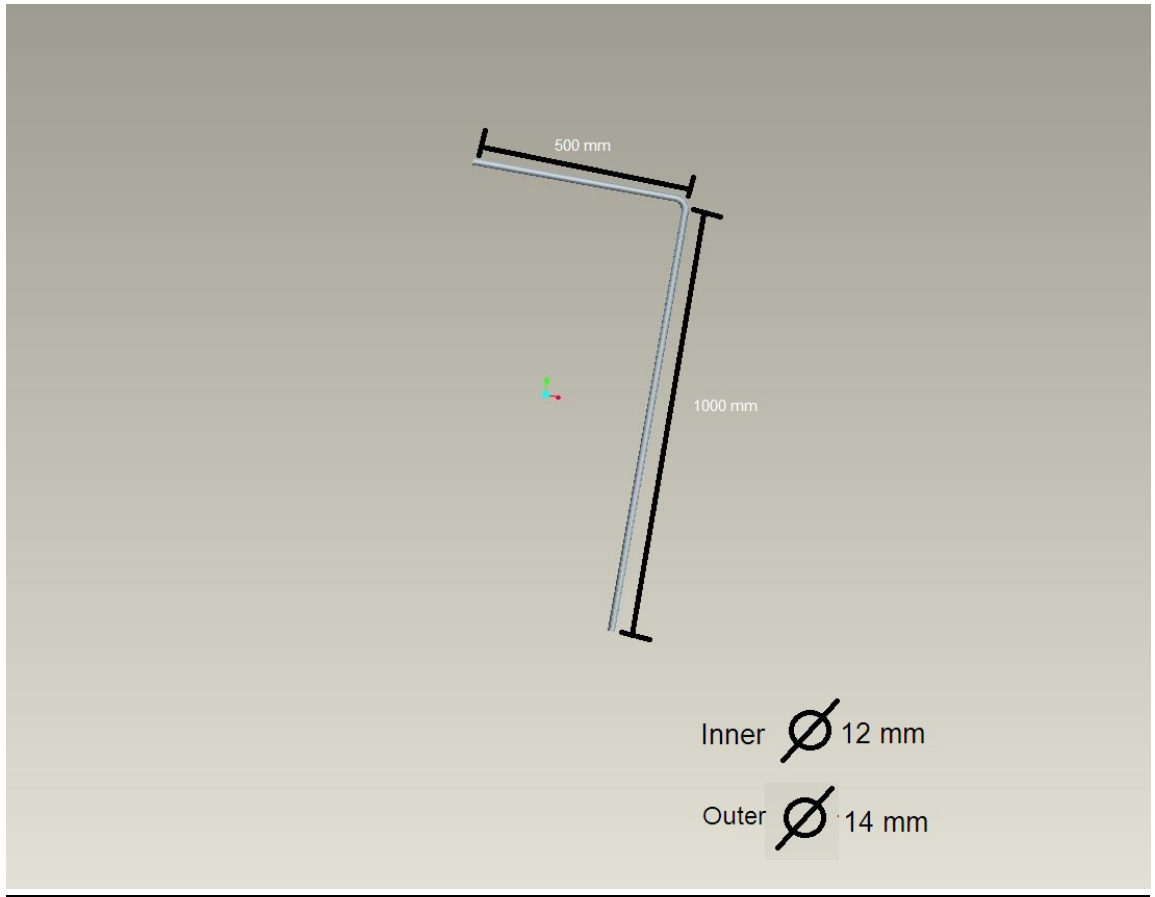


الخزان هو القطعة الأساسية للبيوريكتور



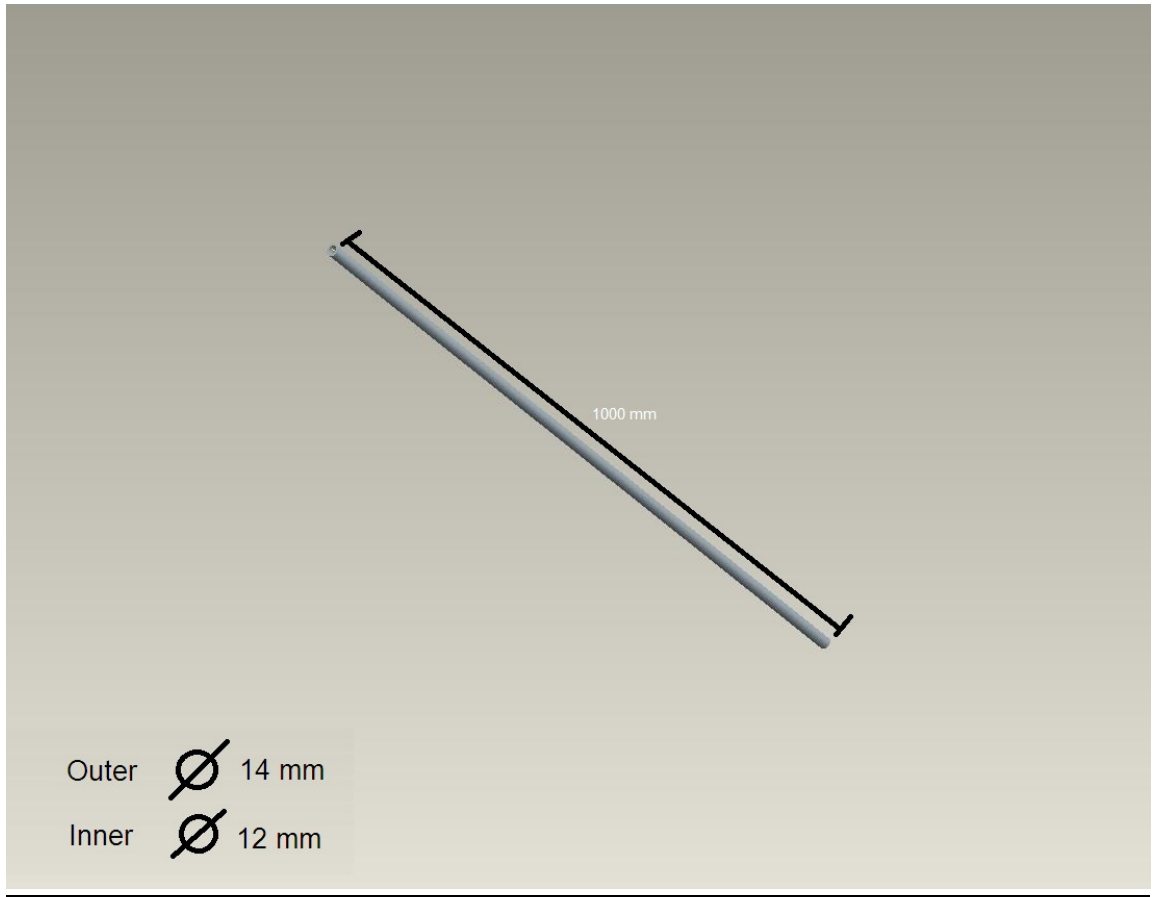
الرسمه التكنيكية للخزان

(2.)مدخل السائل القلوي(base)



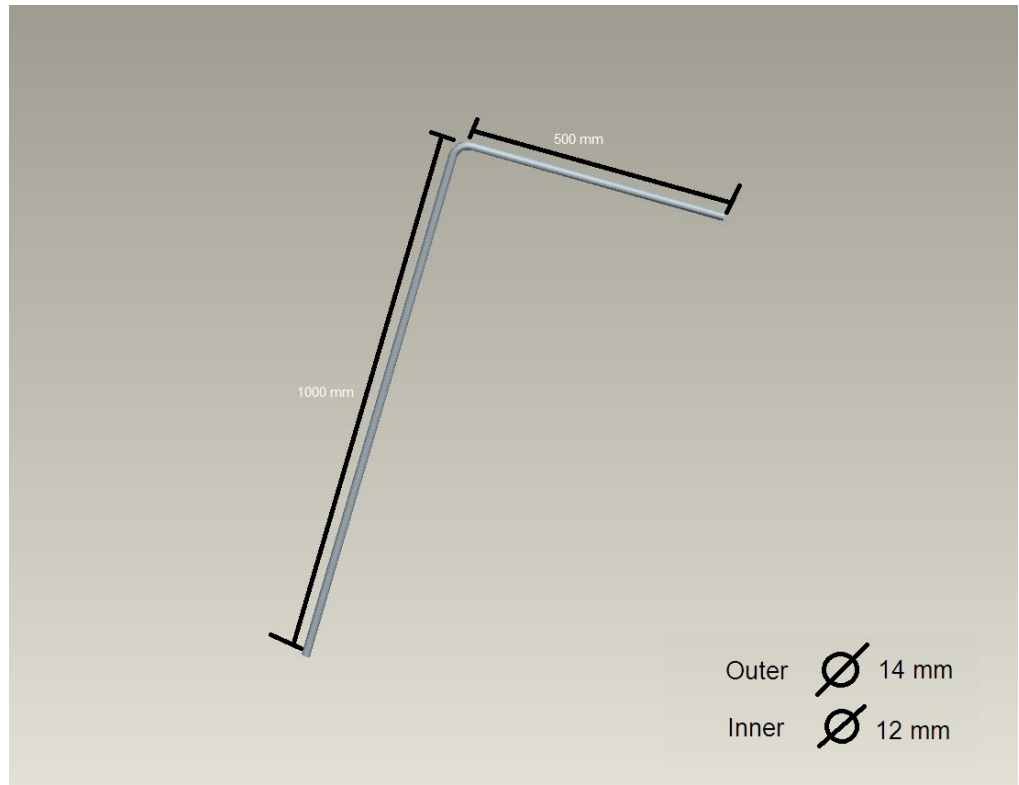
بهذا الأنبوب يتم ادخال سائل قلوي

(3.) بمجرخ الغاز



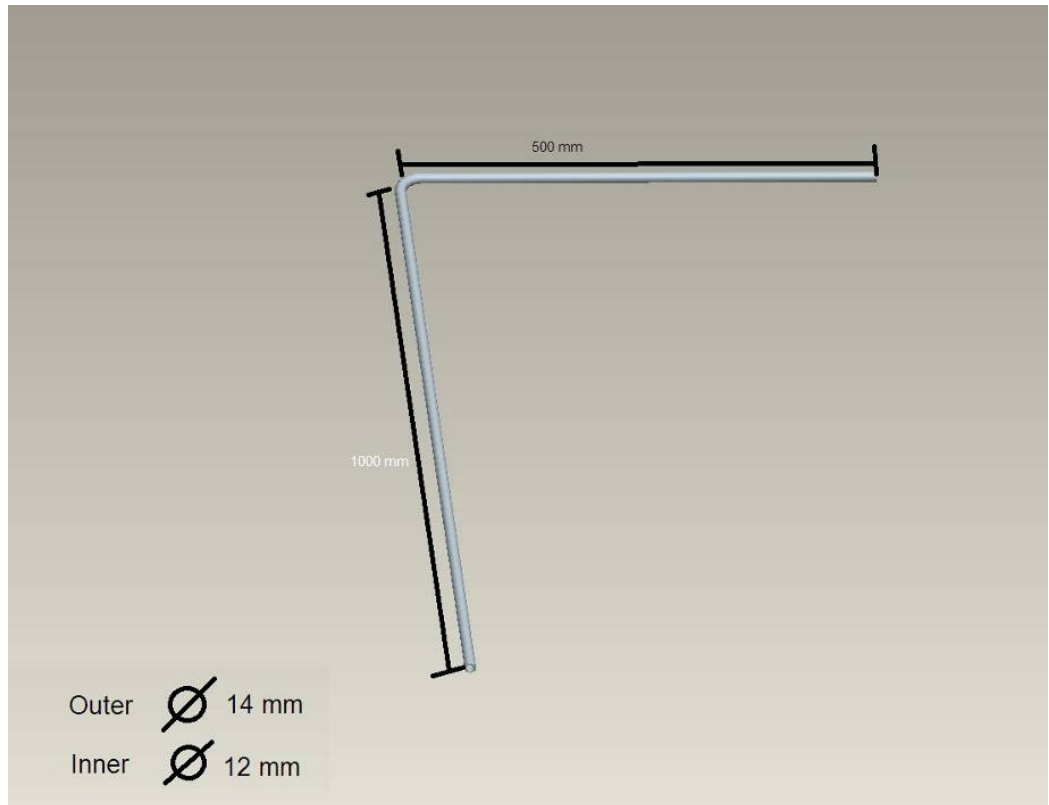
هذا الأنبوب يخرج الغازات المستهلكة

(4.) مدخل اللقاح



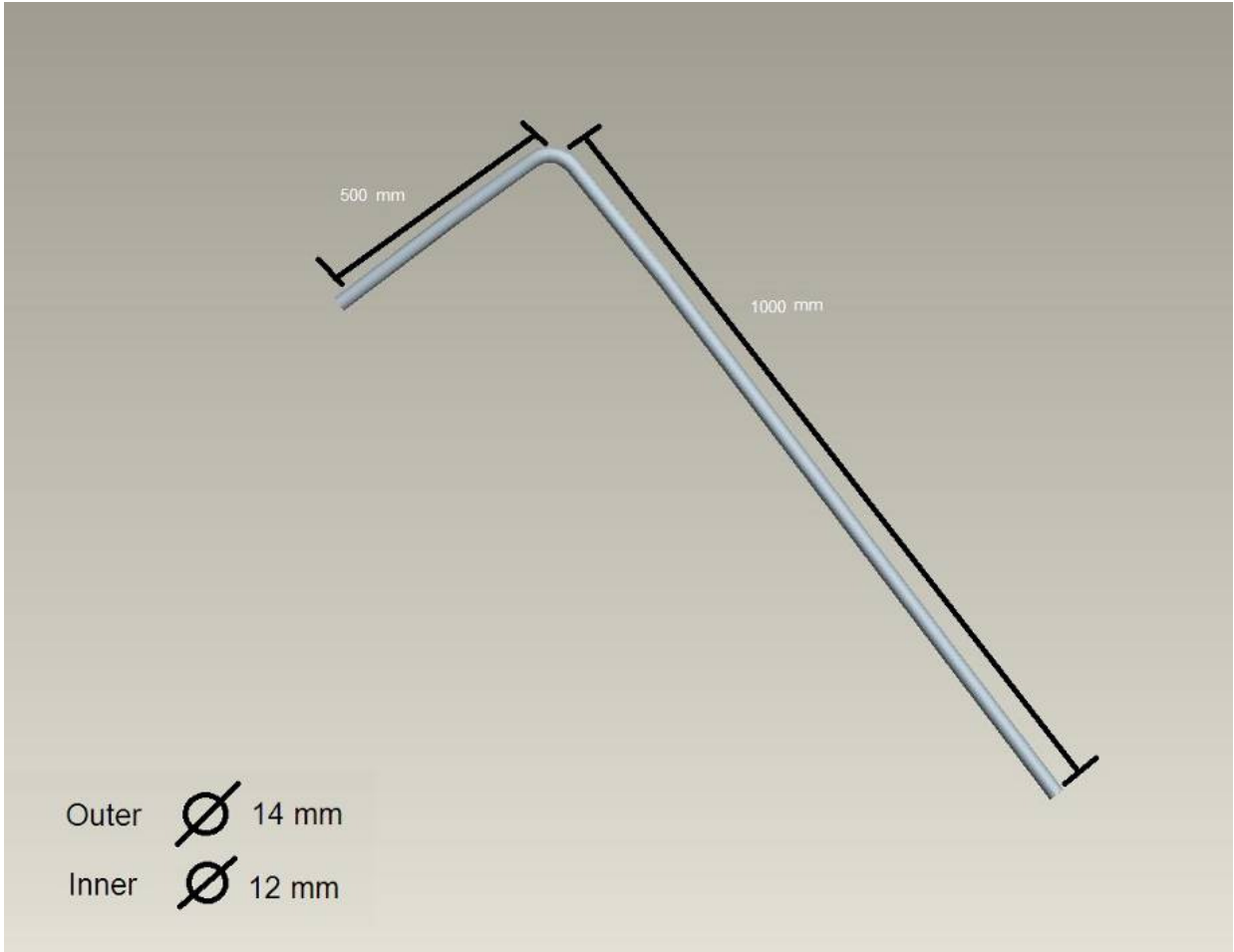
هذا الأنبوب يدخل لقاحا في الخزان

(مخرج الانتاج (5)

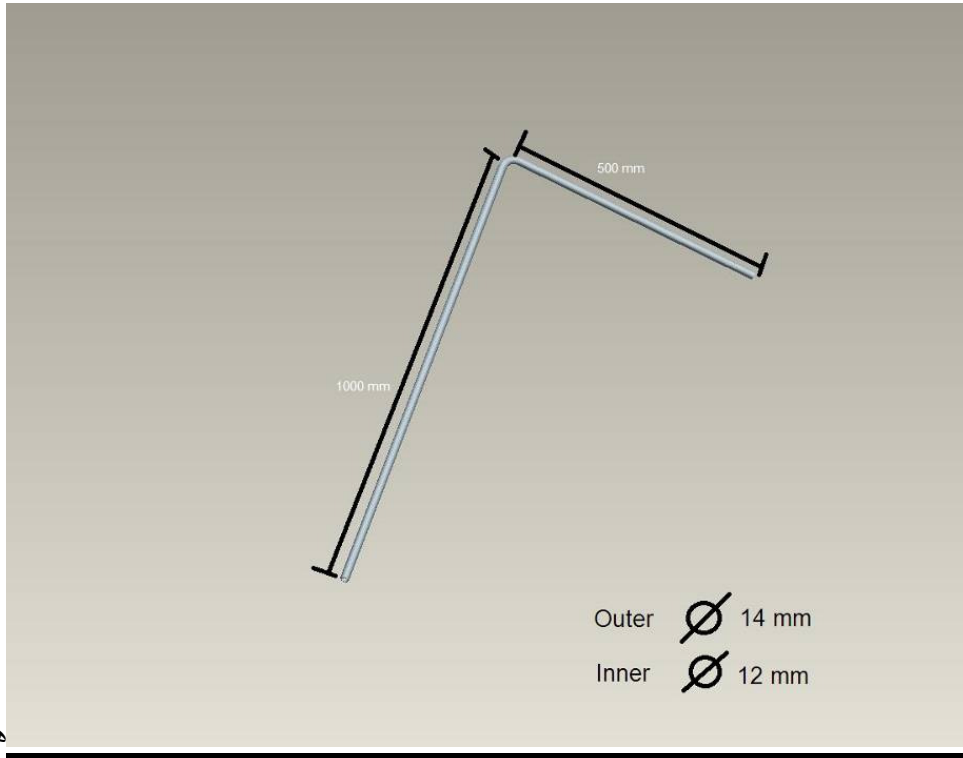


هذا الأنبوب يخرج الانتاج النهائي

(6.)مدخل الغذاء



هذا الأنبوب يدخل غذاء للبكتاريا

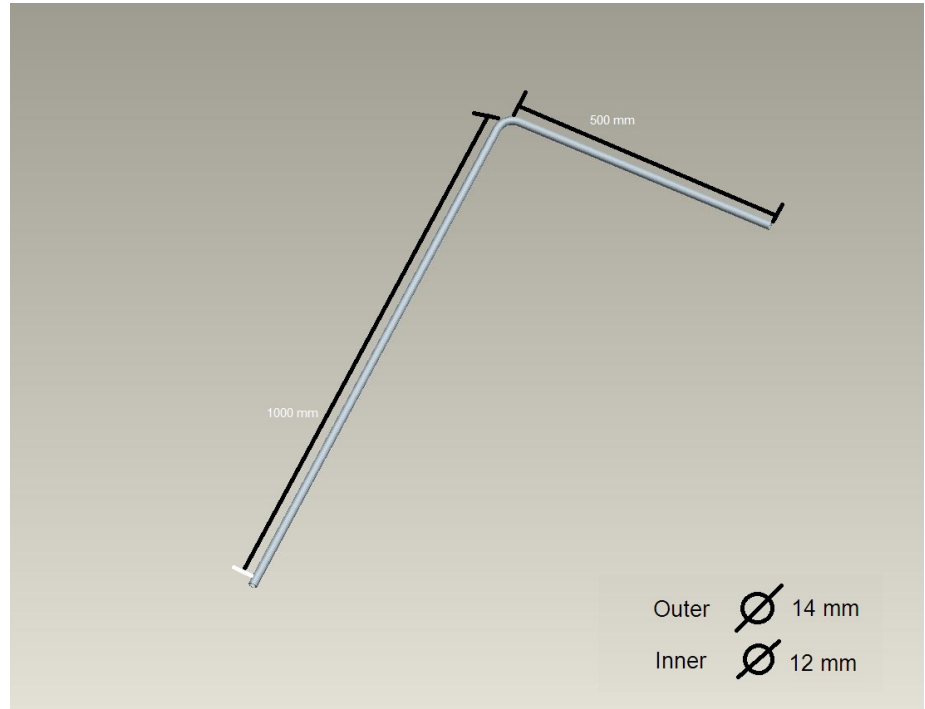


هذا الأنبوب

مخرج العينات (7.)

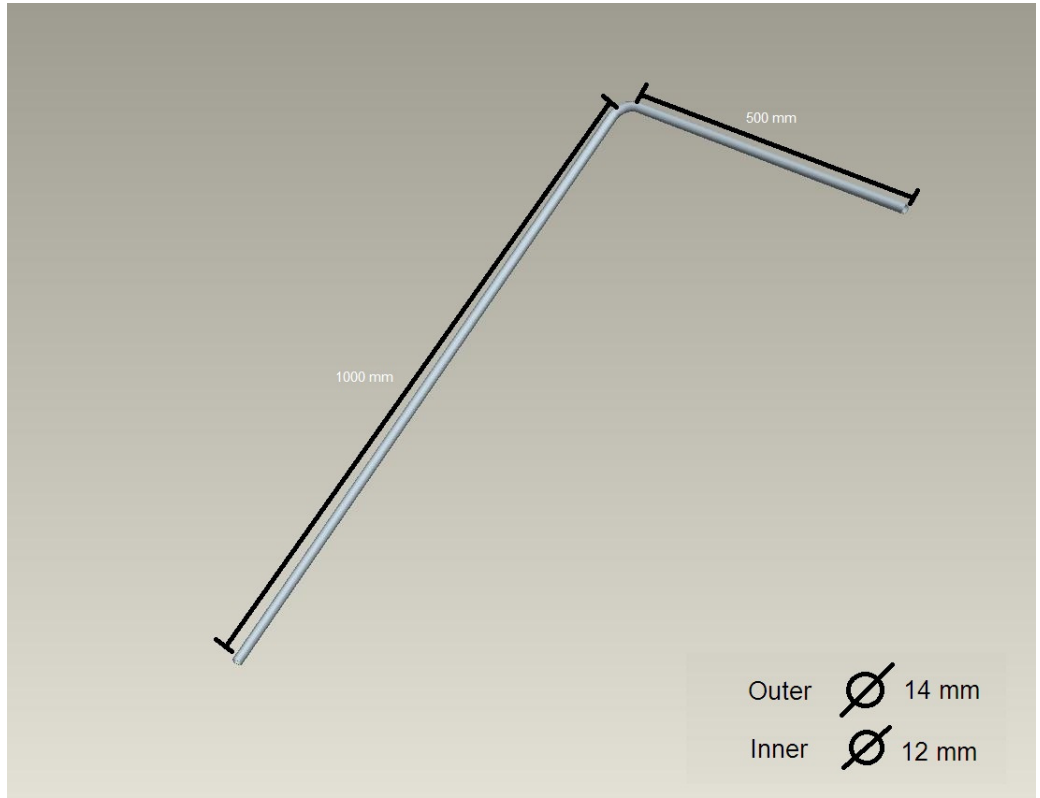
يخرج عينات التي تفحص في المختبر

(8.) مدخل السائل الحمضي

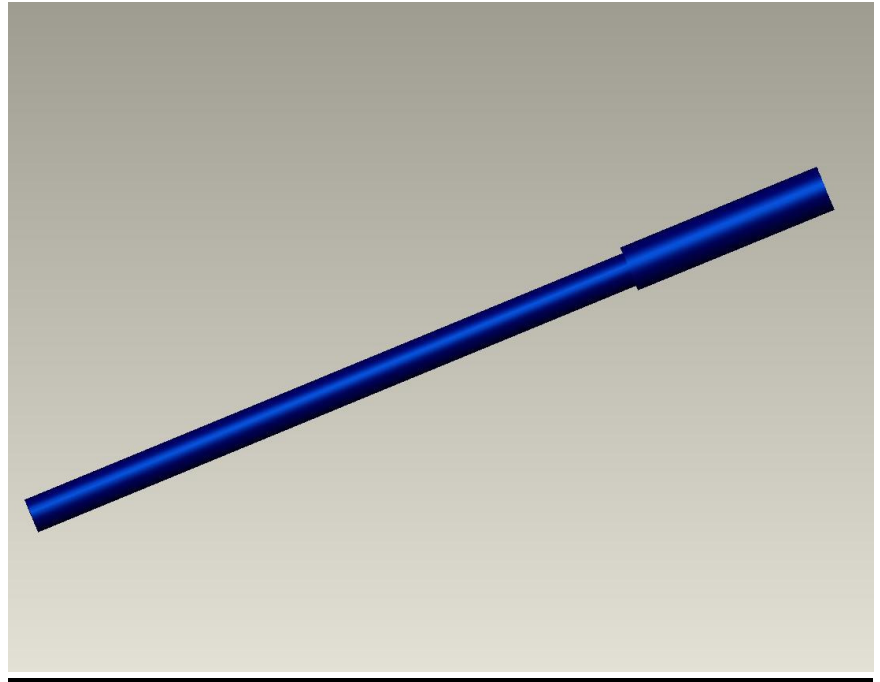


هذا الأنبوب يدخل سائل حمضي في الخزان

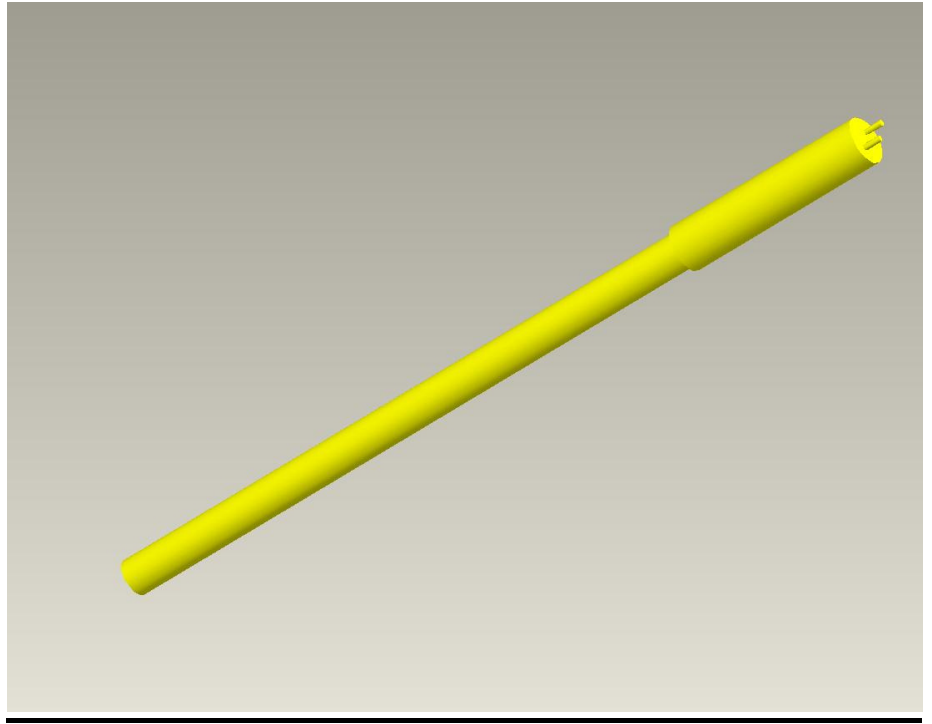
(9.) مدخل الأكسيجين



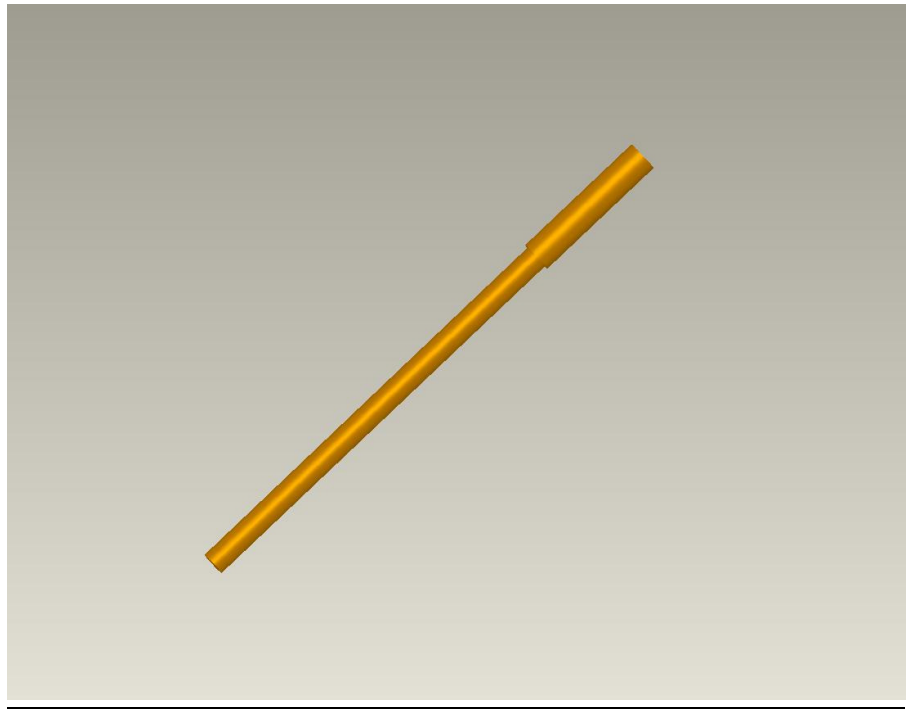
العمليات في الخزان هي بحاجة الى أكسيجين الذي يدخل عبر هذا الأنبوب
(10.) محسس الحرارة



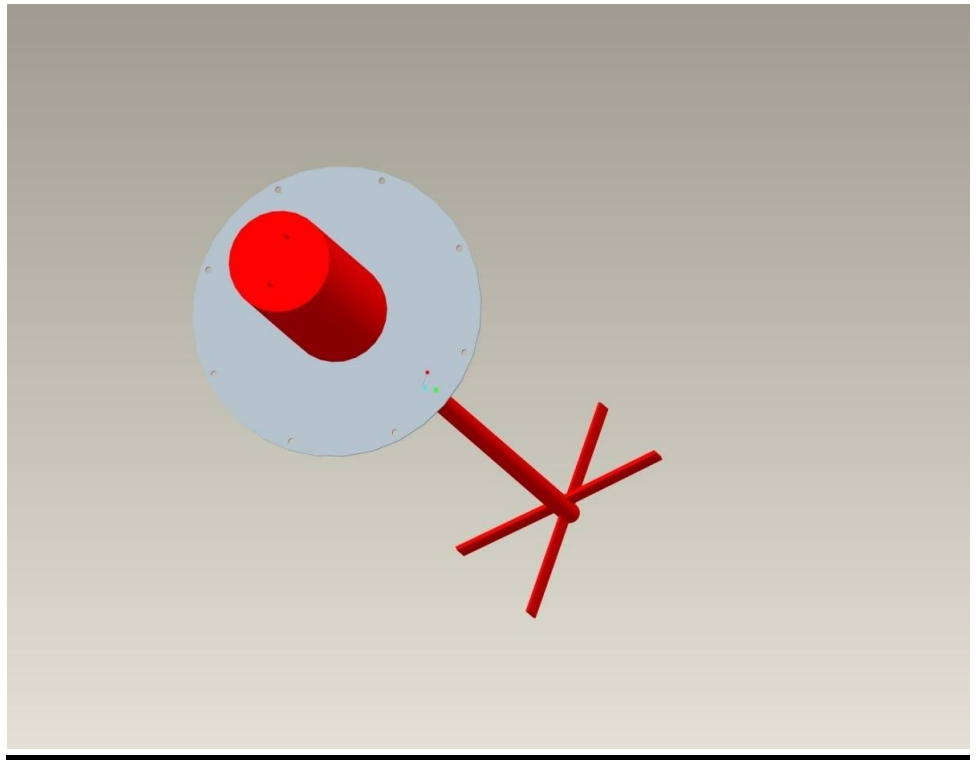
محسس الحرارة يقيس درجة الحرارة داخل الخزان
(11.) محسس الأكسيجين



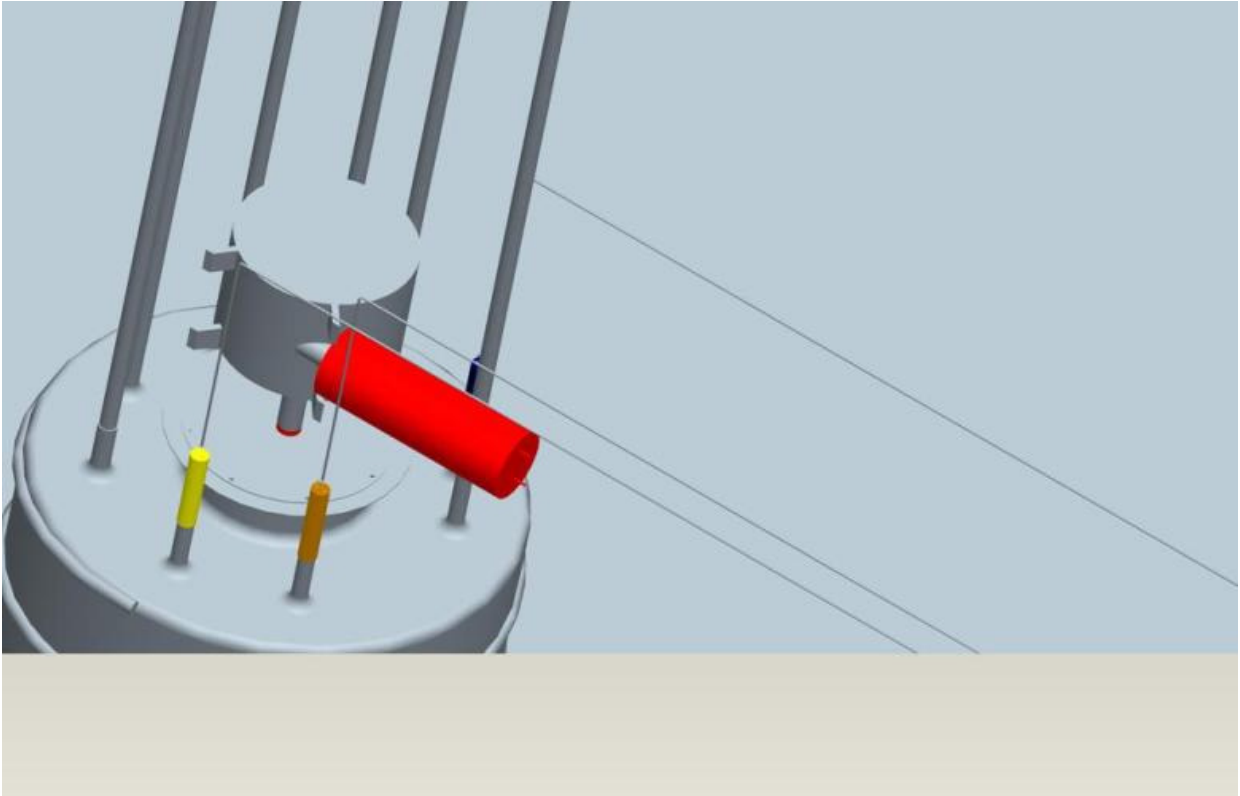
محسس الأكسجين يقيس كمية الأكسجين داخل الخزان
(12.) محسس الرقم الهيدروجيني (pH value)



محسس الرقم الهيدروجيني يقيس الرقم الهيدروجيني للسائل داخل الخزان
(13.) المحرك



المحرك يجر السائل داخل الخزان



Zur Anpassung der Drehgeschwindigkeit (Motor hat 1400 rpm) wird ein Getriebe eingesetzt.

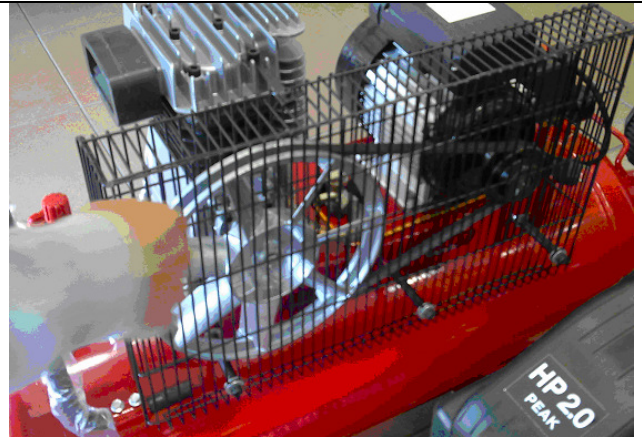


Vom Schrottplatz hat das obige Getriebe 53 USD gekostet. Als Getriebeöl muss unbedingt 90iger Öl eingesetzt werden (0,5-1 Liter, 1Liter kostet 6 USD).

Das Getriebe links kostet 300 USD, das Getriebe oben rechts 280 USD. Händler: Seitenstrasse links vor Jamal&Chaban (wenn man aus der Innenstadt kommt), Tripoli, Libanon



Alternativ dazu kann eine Umsetzung auf die folgende Art geschehen:



Zur **Abdichtung** des Rührerrohres gegen die obere Reaktrowand wird eine einfache Gleitringdichtung verwendet.

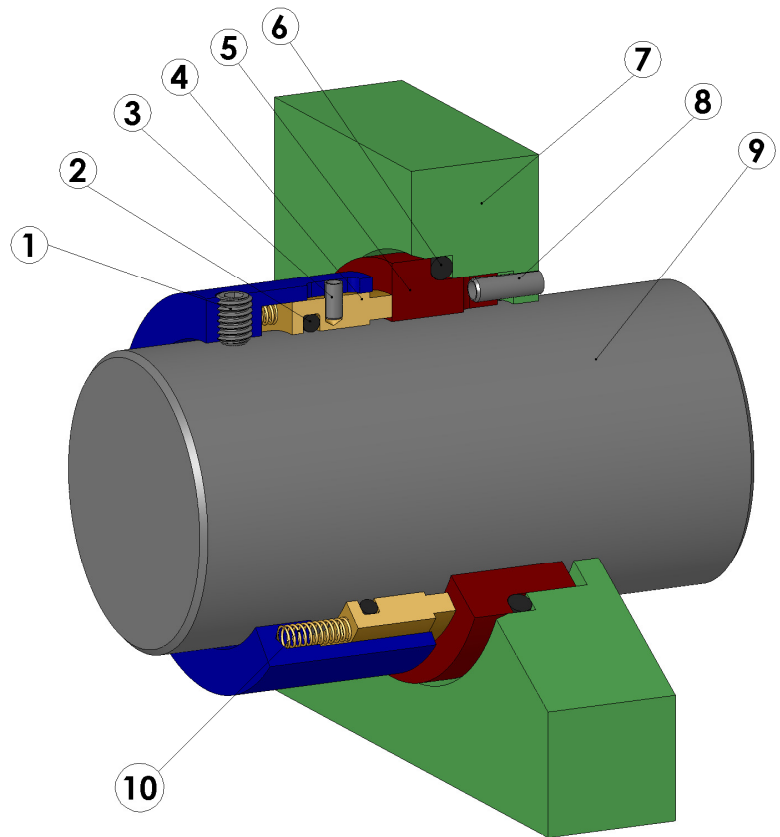


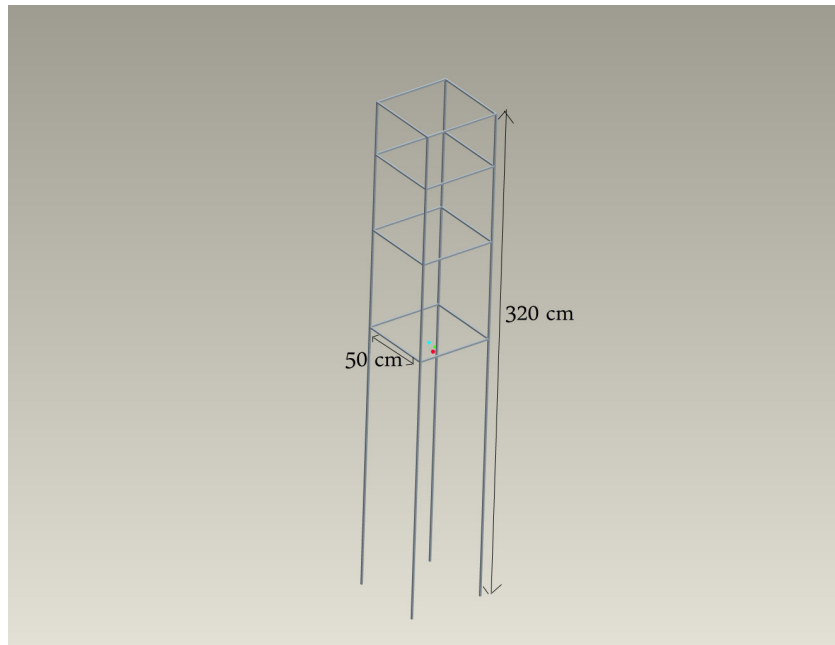
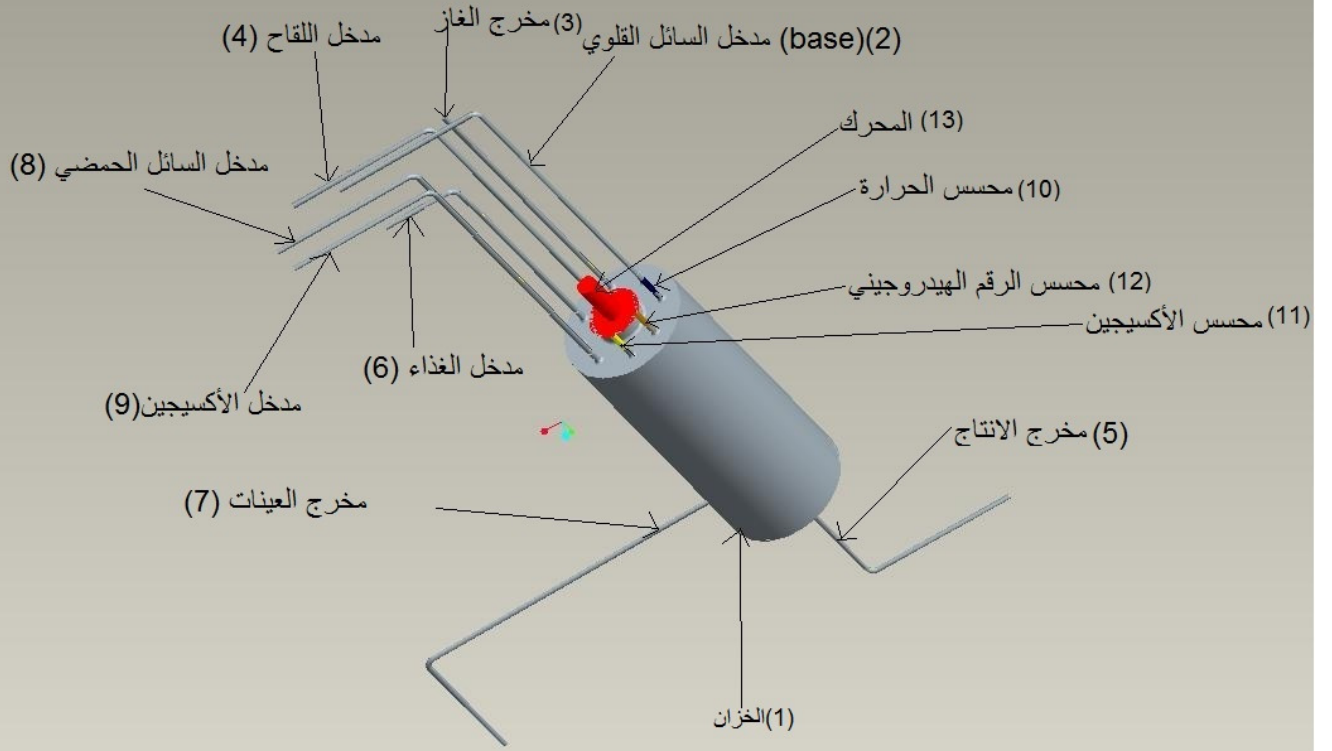
Fig.: Gleitringdichtung

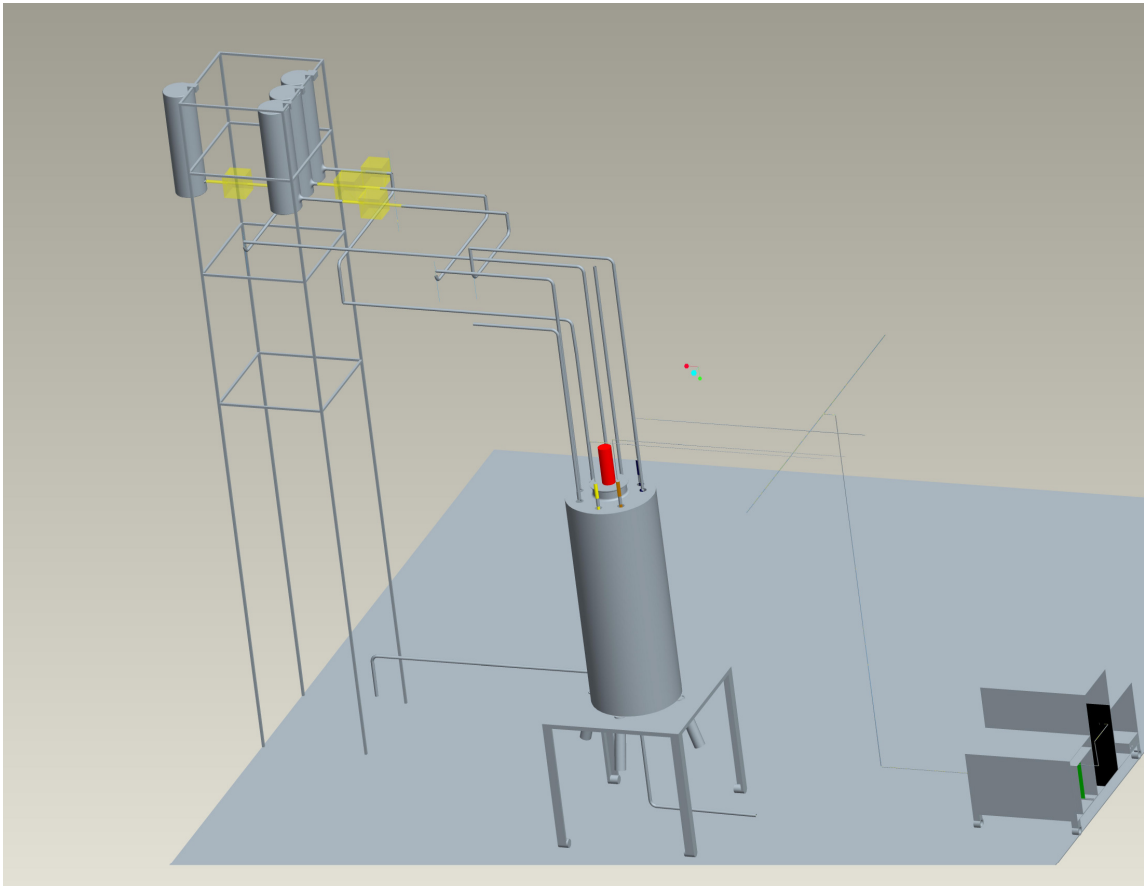
Schnitt durch eine drehrichtungsunabhängige, einfachwirkende Gleitringdichtung.

- 1) Gewindestift
- 2) O-Ring (Sekundärdichtung)
- 3) Spannstift als Verdrehsicherung für den Gleitring (4)
- 4) Gleitring
- 5) Gegenring
- 6) O-Ring (Sekundärdichtung)
- 7) Gehäusewand (nur angedeutet)
- 8) Spannstift als Verdrehsicherung für den Gegenring (5)
- 9) Welle/Achse
- 10) Federn

Gleitringdichtungen oder auch sogenannte dynamische Dichtungen übernehmen die Abdichtung rotierender Wellen gegenüber einer Wand, z. B. eines Maschinengehäuses. Hauptkomponenten sind zwei aufeinander gleitende Bauteile, der befederte Gleitring (im oberen Bild Position a) und ein Gegenring. Einer der beiden Ringe sitzt starr im stationären Gehäuse (Stator) (im oberen Bild Position d), der andere ist mithilfe von Verdrehsicherungsstiften auf der rotierenden Welle befestigt (Rotor). Die Flächen zwischen diesen beiden Teilen sind - abhängig von der Art der Gleitringdichtung - zumeist plan und bestehen in der Regel aus Kohlenstoff-Graphitwerkstoffen, Metall, Keramik, Kunststoff oder kunstharzgebundenem Kohlenstoff.

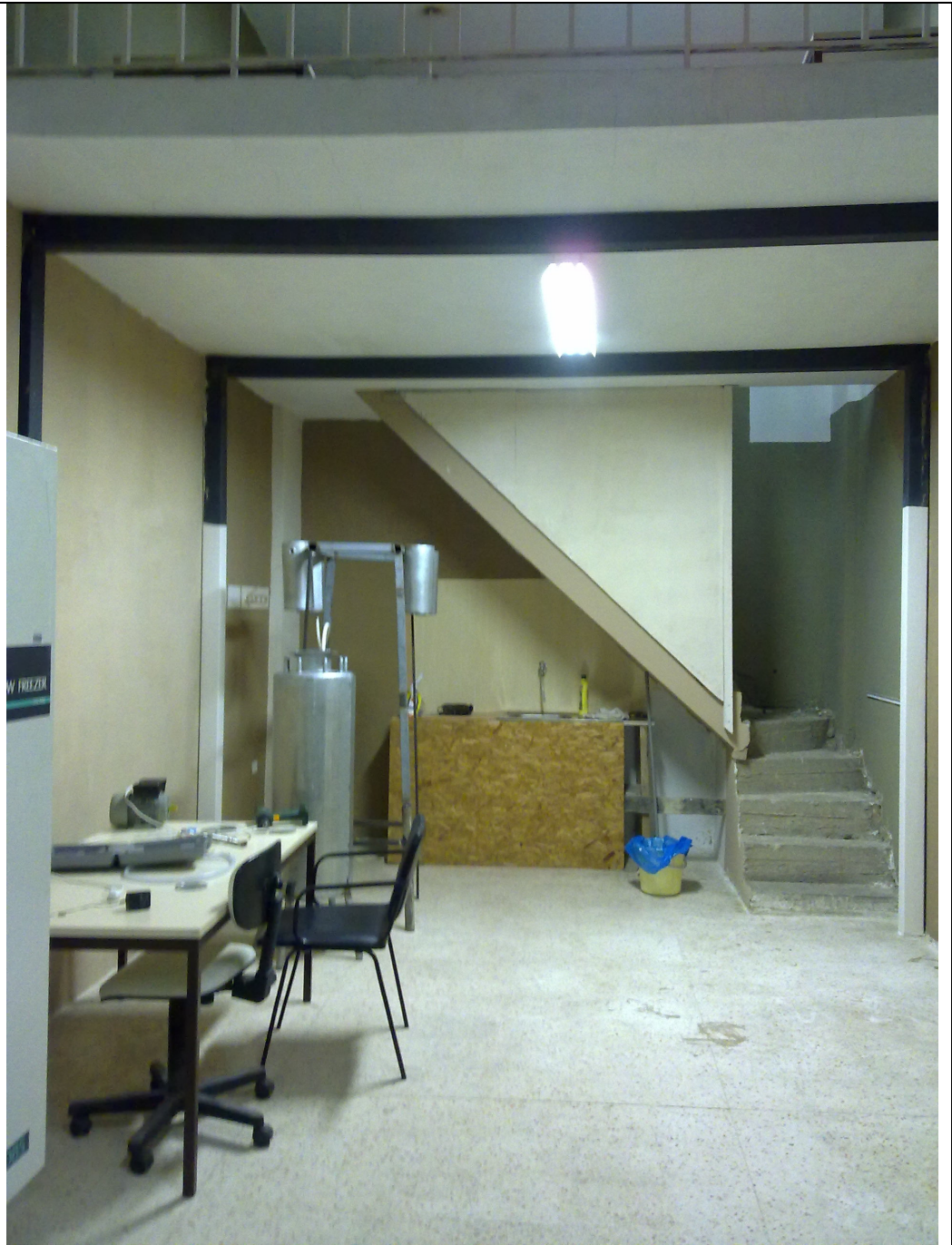
البيوريكتور





5.4 تصنيع البيوريكتور (Manufacturing of bioreactor)





لان المحرك يدور 1450 مرة في الدقيقة ونحتاج 200 مرة في دقيقة نحتاج وسيلة لتخفيض سرعة الدوران. وذلك سيحقق ان شاء الله مثل الصورة في الاسفل

material piece list for initial inner bioreactor

piece	Length (m)	number	cost per meter or piece	Cost of pieces
fermenter box		1	\$500	\$500
motor for fermenter		1	\$60	\$60
Rohr	1,13	1	\$40	\$45
	0,73	1	\$40	\$29
	0,90	4	\$40	\$144
	0,65	2	\$40	\$52
	0,51	2	\$40	\$41
Stange	3,00	4	\$15	\$180
	0,50	8	\$15	\$60
Valve		5	\$15	\$75
			Costs (without sensors)	\$1.186,20

6. التحكم (automation) للبيوريكتور

3.3. مواصفات (Specification)

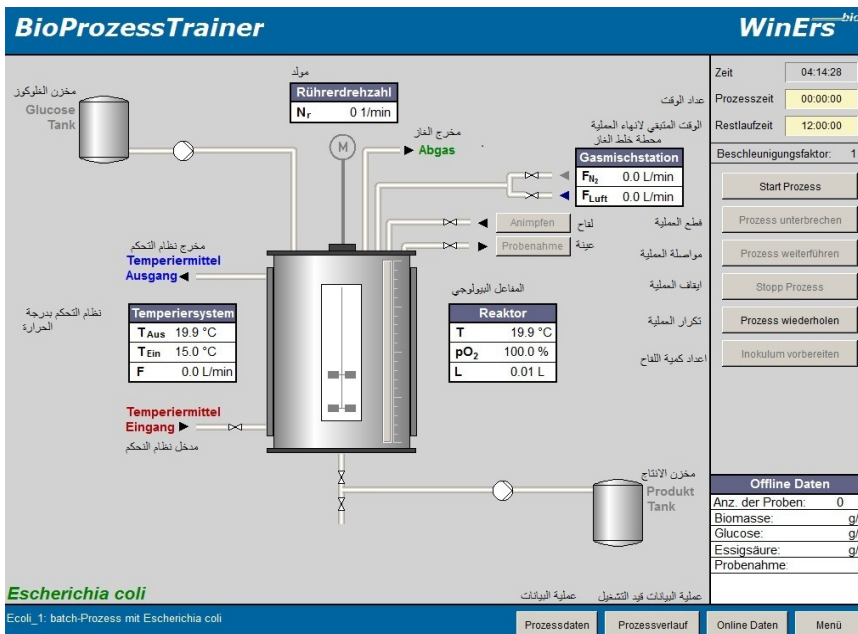
6.1.1 أجهزة الاحساس (sensors)

		مقياس الحرارة داخل البيوريكتور
		...

6.1.2 محركات (actuators)

		المولد

6.1.3 شاشة التحكم



- K8061 Test & Diagnosis Utility (Rev. V1.1)
- USB cable
- Boards for sensors und actuators

6.1.5 Example for input/outputs of K8061 for the bioreactor system

#	Unit	Type	Symbol	Input/Output	Port/Pin	Signal	part/range	Remark
1	Emergency switch (Software)	switch	N	I	PH0	Digital	0-1	Bioreactor control OFF
1	rotor	switch	C	O	PJ0-3	Digital	0-1	Turning ON/OFF
1	Pump for heating water	220 V pump with relais	M	O	PA0-1-2	Digital	Stufen 0,1,2,3	Pump control
1	Speed counter with photocell	Hitachi	S _G	I	PT7	digital (impulses)	50 Hz	Drehzahlzähler für Generator
2	Level meter	Farnell	L	I	PA3-4	digital	0-100%	Bioreactor tank
1	Control valve	Danfoss	V	O	PB3-4	digital/analog	1-2/3-1	...
1	Control valve	Danfoss	V	O	PB3-4	digital/analog	1-2/3-1	...
...
5	Temperature sensor	Pt100 TFK01	T	O	PAD00-PAD04	analog (4-20 mA)	-200 - +600°C	
3	Pressure sensor	Mano-meter	p	I	PAD08-PAD10	analog (4-20 mA)	0-180 bar	
3	Mass flow	Danfoss	dm/dt	I	PAD11-PAD13	analog (4-20 mA)		

Table 6.1: Specification for actuators and sensors

Remark:

In sensors for the output signal is 4-20 mA standard, ie the lowest measured value corresponds to 4 mA, 20 mA corresponds to the top and what is below 4 mA for line fault detection. Actuators at the output signal must be amplified.

6.1.6 Extended USB interface Board K8061

The Velleman K8061 module has 33 Ein-/Outputs and is connected via a USB port on the PC. The connection is galvanically-optically isolated, so that damage to the PC is not possible.

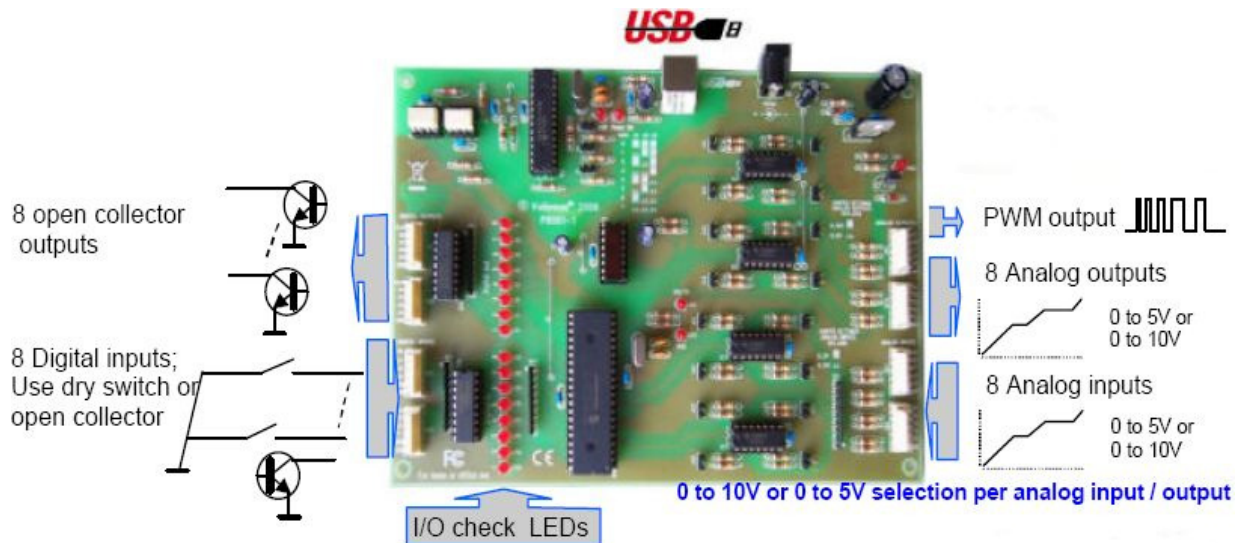


Abb. 8.1-2: I/O-Karte K8061

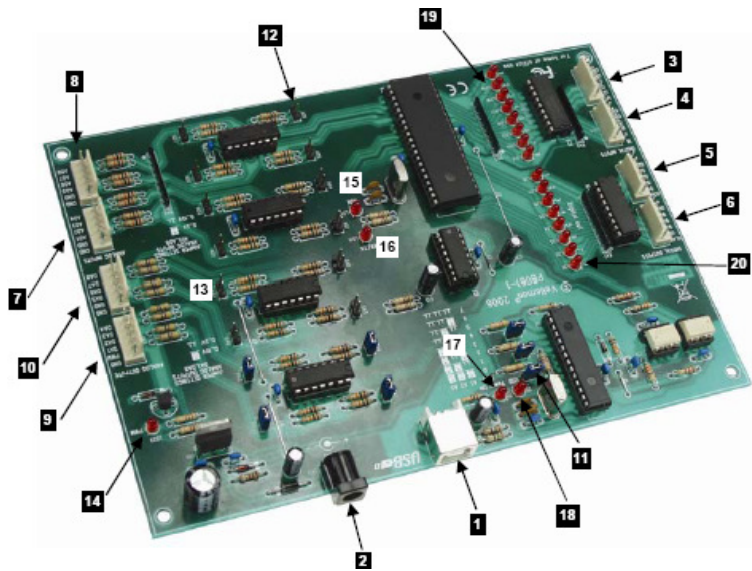
Characteristics:

- 8 analog Inputs with 10 bit-Auflösung: 0...5 V oder 10 VDC / 20 k Ω
- 8 analog Outputs with 8 bit-Auflösung: 0...5 V oder 10 VDC / 47 Ω
- 8 digital Inputs: „Open Collector“-Kompatibel (Anschluss an GND=0) with integrated LED display
- 8 digitale „Open Collector“-Outputs (max. 50 V/100 mA) with integrated LED display
- One 10 bit PWM-Ausgang: 0 bis 100% „Open Collector“-Ausgang (max 100 mA / 40 V) with integrated LED display
- General response time: 4ms per command
- USB Port: 2.0

Specifications:

- Power consumption from USB port: about 60 mA
- can be connected to the PC up to 8 cards
- Powered by PS1205 adapter: 12Vdc / 300 mA
- PWM frequency: 15.6 KHz
- Standard time: 48 ms (Microchip and K8061D.DLL drivers)
- Enhanced Execution time: 21 ms (K8061_C.DLL V1.0 for RE applications use)
- PCB Dimensions: 195 x 142 x 20mm (2.7 "x 5.6" x 0.8 ").

Connections of the K8061:



- 1: K8061-PC USB port
- 2: power supply (12VDC non-stabilized, at least 300mA)
- 3 and 4: Digital inputs 1-4/5-8: External "LOW" activate (with GND).
- 5 and 6: Digital Outputs 1-4/5-8: "open collector" outputs
- 7 and 8: Analog inputs 1-4/5-8: With their help, you can digitize read an analog voltage applied to it via the PC.

These inputs require a stable DC voltage (0-5V or 0-10V).

7. مدخل الى تنقية البروتينات (protein purification) المنتوجة داخل

خلايا (downstream processing)

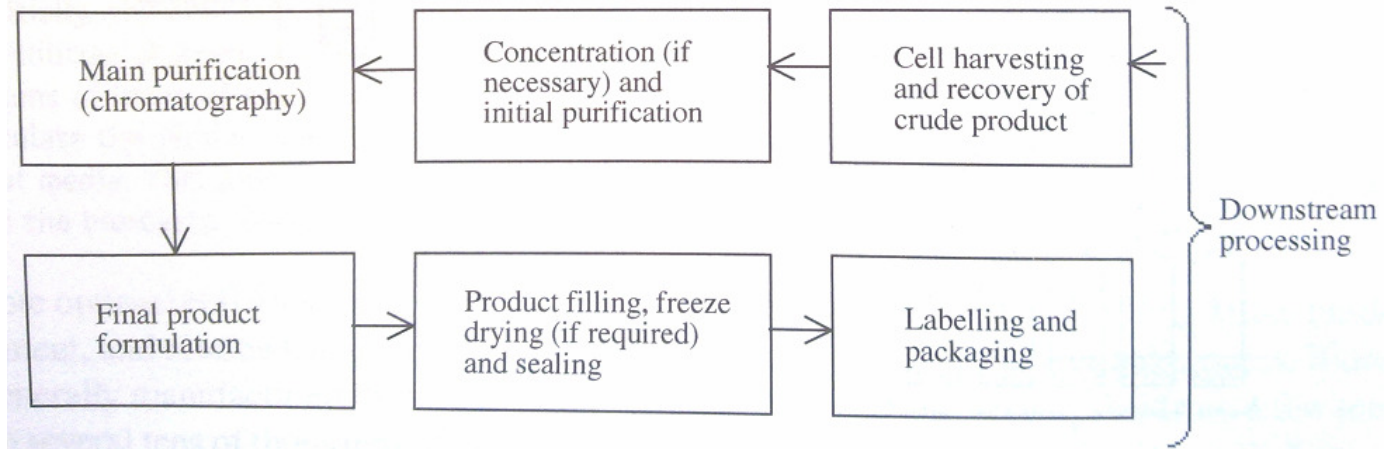


Fig.: From [Walsh 2007]

تنقية البروتين هو عبارة عن سلسلة من العمليات تهدف إلى عزل نوع واحد من البروتين من خليط معقد.

تنقية البروتين هي عملية مؤلفة من عدة مراحل : اخراج أولي , ترقيد بالاختلاف , غسيل , كروماتوغرافي (chromatography) للأنواع المختلفة , وغيرها

7.1 المبادئ الأساسية للتنقية

احد الطرق لتدمير الغلاف الخارجي للبكتيريا هو من خلال الصدمة الحرارية وذلك بوضعه في الثلاجة (-20°C) ومن ثم في درجة حرارة الغرفة (25°C) حتى يذوب السائل وبعدها مباشرة في الثلج مرة اخرى و تكرر الخطوات ثلاث مرات.

ومن بعدها نقوم بالتنبيذ (centrifugation) على درجة 3000 دورة في الدقيقة (rpm) فنحصل على البروتين المطلوب ولكنه موجود مختلط مع بقايا الخلية المكسورة وغيرها من مكونات البكتيريا

وهنا تبدأ التنقية الفعلية للبروتين من خلال استعمال الكبريتات الأمونيوم ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ammonium sulfate) كمحفز لترقيد (precipitation) البروتين وذلك من خلال جذب البروتين أكثر من المياه وباختلاف تركيز (concentration) الكبريتات الأمونيوم (ammonium sulfate) سيختلف البروتين المرقد وذلك بسبب جذبته المختلف وبذلك نفصل البروتين عن الأشياء الكبيرة الموجودة

ومن المفضل استعمال مرحلة تليها وهي الاستشراب (chromatography).

أحيانا بين هذه المراحل نستعمل dialysis لتخلص من الكبريتات الأمونيوم ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (ammonium sulfate)

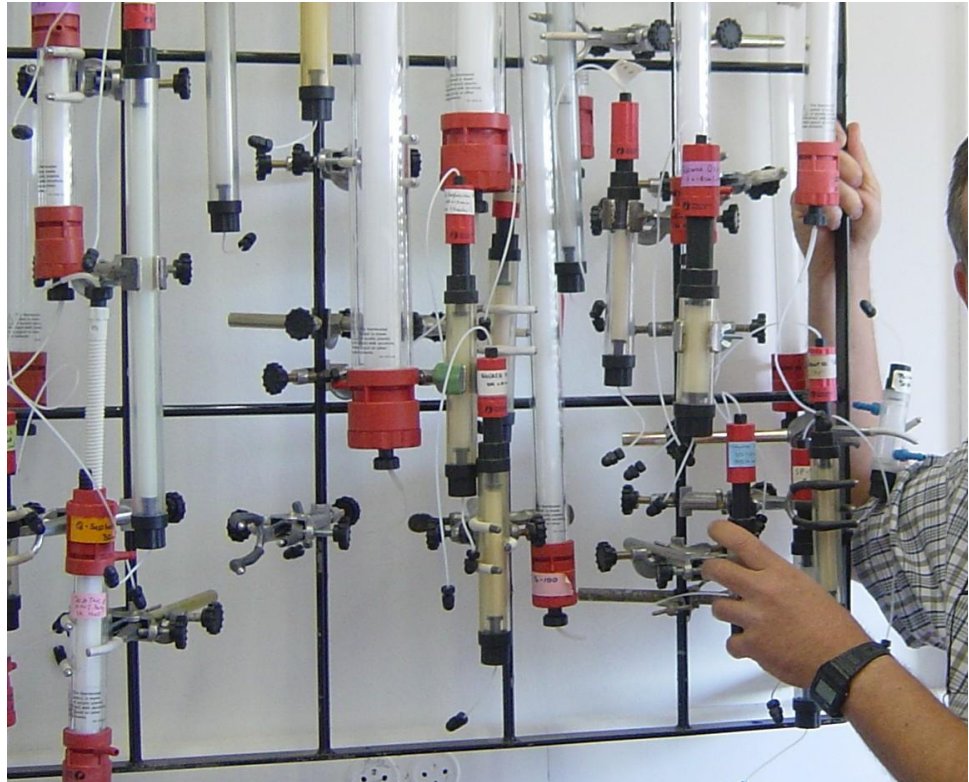
7.2 بعض الاشياء الذي يجب الانتباه اليها

الأهم في كل هذه المراحل هو الحفاظ على بنية البروتين وذلك لا يتحقق الا من خلال أن نخلق له محيط مشابه للمحيط البيولوجي الذي كان يتواجد فيه كالرقم الهيدروجيني (pH value).

ولهذا السبب سنضيف اليه % 0.85 NaCl. يعطي جو مائي قريب لذلك الذي كان متواجدا داخل الخلية. كما يجب المحافظة على الرقم الهيدروجيني pH 7.4 تقريبا وذلك من خلال اضافة ("phosphate buffered saline") PBS. ومن المهم جدا أن لا نعرض البروتين للهواء لأنه يتسبب بالأكسدة للبروتين .

ال sepharose هو مادة جاذبة توضع على chromatography column.

مثال لـ chromatography columns في نطاق مختبري (laboratory scale).



من: <http://wolfson.huji.ac.il/purification/index.html>

مثال لـ chromatography columns في نطاق انتاجي (production scale).

من:

GE Healthcare

Bedienungsanleitung BioProcess LPLC- und MPLC-Säulen



GE Healthcare

Data file 18-1115-23 AD

BioProcess Column

BPG Columns 100, 140, 200, 300 and 450 series

BPG™ columns are glass chromatography columns designed for industrial applications which demand high standards of hygiene. The columns are constructed from component materials of the highest quality and withstand the harsh conditions used for cleaning in place of packed separation media. An overview of column characteristics is shown in Table 1. The columns are characterized by:

- Hygienic design and operation. Microbial attachment and growth is hindered through the use of calibrated precision glass, high grade electropolished stainless steel and an absence of dead pockets.
- Easy, efficient packing and running with the singlescrew adapter.
- Operating pressures matching most BioProcess™ Media.
- All polymeric materials meet the requirements for USP class VI, described in USP <88> Biological Reactivity Tests, *In Vivo*.



Fig 1. BPG column family.

BioProcess MPLC/HPLC Systems

BioProcess™ MPLC/HPLC systems comprise a family of stainless steel, liquid chromatography systems for use in process-scale applications where high pressures (20–80 bar) are required. Reliable 24 hour-a-day unattended operation contributes to cost-effective processing, all the way from feed introduction to final fractionation. BioProcess MPLC/HPLC systems simplify chromatographic procedures and offer:

- UNICORN™ software that meets GMP requirements, including electronic signatures and records
- Precise control of gradient with feedback (Type II system only)
- Compact, modular and sanitary design
- Multi-product processing, prepared for automated CIP
- Compatible MPLC and HPLC columns

General system description



Fig 1. BioProcess MPLC and HPLC systems allow cost-saving, unattended operation in biopharmaceutical processing.

BioProcess MPLC/HPLC system – Type

The BioProcess MPLC/HPLC system – Type II is an advanced gradient system designed to blend solvents continuously. Control of the blending system is based on conductivity, NIR, or refractive index of the solvents; this results in very accurate and reproducible gradients. The inclusion of a bubble trap in the gradient system ensures that the mobile phase is free of air.

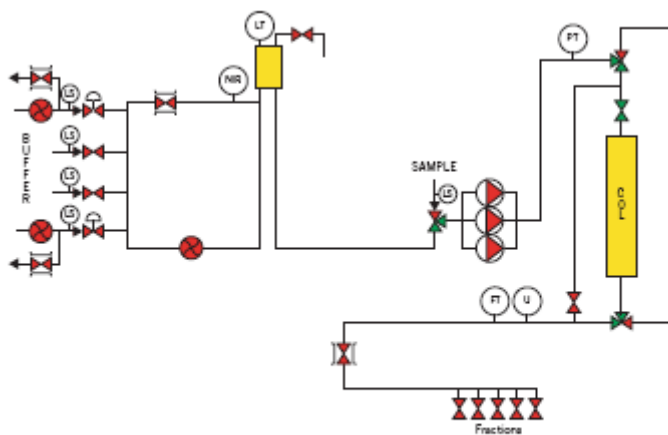


Fig 3. Piping and instrumentation diagram of a BioProcess MPLC/HPLC system – Type II.

The standard configuration includes 4 inlet lines, gradient blending loop with conductivity measurement or NIR detection, bubble trap, pressure transmitter, flow meter after the column, UV detector, and 5 fractionation valves. All systems are controlled by UNICORN software.

Several additional features/components are available to ensure that systems match specific needs. These options include:

- 2 extra inlet buffer lines
- 5 extra fractionation valves
- magnetic coupling of circulation pump
- temperature control before or after the column
- conductivity meter in gradient blending system or after the column
- pressure transmitter after the column
- pH meter before and after the column
- refractive index detector for fractionation or gradient blending system
- valve feedback
- filter module
- injection loop
- heat exchanger

UNICORN control

UNICORN control software provides a single familiar interface for both chromatography and membrane separations. It provides efficient control of the process as well as flexible method programming, extensive data evaluation and powerful reporting functionality. In addition, UNICORN is compliant with FDA 21 CFR Part 11, satisfying the regulatory requirements for electronic records and signatures.

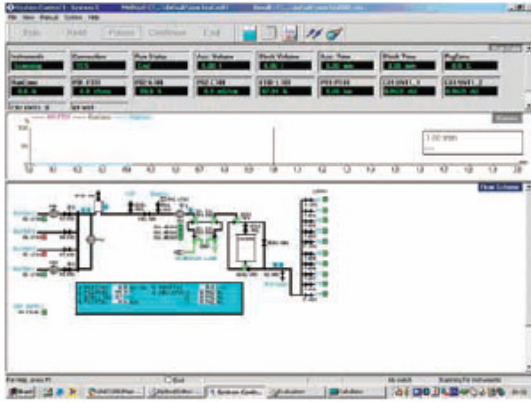


Fig 4. Same familiar interface for both chromatography and membrane system



Fig 5. BioProcess HPLC systems and HPLC columns are especially suitable for purifying small biomolecules with media such as SOURCE. MPLC system and column combinations are also available for similar applications.

7.3 مثال لطريق تنقية بروتين

Please refer to [Mourad 2003] Samir Mourad, "Purification and characterization of a Glucose-I phosphatase from *Pantoea Agglomerans*", Karlsruhe, 2003, www.aecenar.com/publications

8. تكنولوجيا اللقاح (Vaccine technology)

8.1 انواع الفاكسينات (vaccines)

تطبيق تكنولوجيا اللقاح تصنع أساس العلاج العصري ويلعب دور رئيسي في الطب البشري والطب البيطري ويشكل العنصر الوحيد للسيطره على عدده امراض معديه (infections).

اللقاح يبحث عن استمرار الية الدفاع الطبيعي من خلال جهازنا المناعة.

يحتوي اللقاح على مواد للوقايه

بعض اللقاحات تكون فعالة عندما تأخذ (تعطى) شفويا معظمها تأخذ من خلال الاهل او حسب برنامج زمني

مقتوله ميتة او غير ناشطة (Attenuated, dead or inactivated bacteria)

قتل فيروس أو بكتيريا هي عملية ابعاد او تقليل خطر الاصابه بمرض عادة يكون بالحرارة أو بمواد كيميائية

Attenuated and inactivated viral vaccines

لقاح ضد فيروس مقتول وغير فعال

تستعمل أجزاء الفيروس التي تنتشر في خلايه حيوانيه مثل بويضه ملقحه أو نسيج من خلايه جنين الدجاجه كلقاح

Toxoids and antigen based vaccines

لقاح اساسه ماده السامه المعالجه أو الجسم الغريب

بدايتا يتطلب تكبير التكتيريا من ثم معالجه ماده السامه التي صنعتها البكتيريا بالفرملايد

اما اللقاح الذي يعتمد على الجسم الغريب يتألف من أجزاء من الاجسام الغريبه الموجوده على مسبب المرض

The impact of genetic engineering on vaccine technology

تأثير هندسة الجينات على تقنية اللقاح

تكنولوجيا ربط ال دنا جعل من الممكن تصنيع أي بوليبيتايد موجود على سطح مسبب المرض و هذا البوليبيتايد بعد عزله من الجسم المصنع

يمكن ان يستعمل كوحدات اللقاح

Peptide vaccine

لقاح يعتمد على بيتايد

لقاح يعتمد على صناعة بابتيد مشابه بتركيبته من الاسيد امينه الى قطعه قصيره من بوليبيتايد تابع للجسم المسبب للمرض

Legionella pneumophila ATCC 33152

Phospholipase A2

Vaccine vector

لقاح يعتمد على الفيكتور يتم بادخال س دنا أو جين يرمز للمرض مستخرج من جسم مسبب لمرض داخل جسم غير مسبب للمرض ليتم اظهاره على سطح الخلية اذا ظهر يمكننا اعتماد هذه الخلايه لدعم جهاز المناعه ضد هذا المسبب

امثلة

Escherichia coli ATCC 25922

Escherichia coli ATCC 35150

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus aureus

Production of Staphylococcus aureus Protein A United States / باتنت 8.2 Patent 4617266

Inventors:

Fahnestock, Stephen R. (Brookeville, MD)

Application Number:

06/489326

Publication Date:

10/14/1986

Filing Date:

04/28/1983

Export Citation:

[Click for automatic bibliography generation](#)

Assignee:

Genex Corporation (Gaithersburg, MD)

Primary Class:

[435/69.1](#)

Other Classes:

435/69.3, 435/69.4, 435/69.7, 435/252.31, 435/320.1, 435/839, 536/23.1

International Classes:

C12N15/09; C07H21/04; C07K14/31; C12N1/20; C12N15/75; C12N15/90; C12P21/00; C12N15/09; C07H21/00; C07K14/195; C12N1/20; C12N15/74; C12N15/87; C12P21/00; (IPC1-7): C12P21/00; C12N1/00; C12N1/20; C12N15/00

Field of Search:

435/68-71, 435/172, 435/253, 435/317, 435/172.3, 935/6, 935/11, 935/29, 935/38

View Patent Images:

Other References:

- Kreft et al, Current Topics in Microbiology and Immunity vol. 96, pp. 1-17, (1982).
Young, Journal of General Microbiology, vol. 119, pp. 1-15 (1980).
Sven Lofdahl, et al., Gene for Staphylococcal Protein A, 10/26/82, pp. 697-701, PNAS, vol. 80.
Arne Forsgren, Significance of Protein A Production by Staphylococci, 08/04/70, pp. 672-673, Infection and Immunity, vol. 2.
John Sjoquist, et al., Localization of Protein A in the Bacteria, 05/23/72, pp. 190-194, Eur. J. Biochem, vol. 30.
Roger Lindmark, et al., Extracellular Protein A from Methicillin-Resistant Strain of Staphylococcus aureus, 10/26/76, pp. 623-628, Euro. J. Biochem, vol. 30.

Primary Examiner:

Tanenholtz, Alvin E.

Attorney, Agent or Firm:

Bernard, Rothwell & Brown

Claims:

What is claimed is:

1. A plasmid vector comprising a DNA sequence specifying Protein A; expression signals operably linked to said DNA sequence for directing expression of the Protein A DNA sequence in a Gram-positive microorganism of the species "B. subtilis"; a selectable phenotypic marker which is expressable in a Gram-positive microorganism of the species "B. subtilis"; and a region of sequence homology with a chromosome of a Gram-positive microorganism of the species "B. subtilis", said region of sequence homology being capable of permitting integration of the Protein A DNA sequence into said chromosome.
2. The plasmid vector of claim 1 further comprising a selectable phenotypic marker which is expressable in E. coli and a functional E. coli replicon.
3. A method of producing Protein A comprising cultivating in a nutrient medium a transformed Gram-positive microorganism of the species "B. subtilis" transformed by a vector containing a nucleotide sequence coding for Protein A and expression signals operably linked to said DNA sequence for directing expression of Protein A in the transformed microorganism, to produce protein A; wherein the vector contains a DNA fragment homologous to a region of the chromosome of said microorganism, and the nucleotide sequence coding for Protein A is integrated into the microorganism host chromosome under recombination conditions.
4. The method of claim 3 wherein the vector is a plasmid capable of replication in E. coli.
5. The method of claim 4 wherein plasmids are prepared which contain DNA fragments homologous to different regions of the chromosome of the Gram-positive microorganism, and such plasmids are linearly integrated into their respective homologous regions of the host chromosome under recombination conditions resulting in multiple insertions into the host chromosome.
6. The method of claim 4 wherein the plasmid contains a DNA fragment homologous to sequences of the chromosomes of more than one species of Gram-positive bacteria.
7. The method of claim 4 wherein the plasmid contains more than one copy of the nucleotide sequence coding for

Protein A.

8. The method of claim 4 wherein the plasmid contains more than one copy of the nucleotide sequence coding for Protein A.

9. The method of claim 4 wherein the plasmid contains two tandem copies of the nucleotide sequence coding for Protein A.

10. A protein A-producing strain of a Gram-positive microorganism of the species "B. subtilis", wherein the chromosome of said microorganism comprises a heterologous Protein A gene under the requesting central of expression signals capable of directing expression of the Protein A gene.

11. A method of producing Protein A comprising cultivating in a nutrient medium a strain of *Bacillus subtilis*, having the identifying characteristics of strain GX3305 (ATCC No. 39345).

12. *Bacillus subtilis* strain GX3305 (ATCC No. 39345).

Description:

BACKGROUND OF THE INVENTION

Protein A is a cell wall component produced by nearly all strains of *Staphylococcus aureus* (see e.g. Forsgren, A., *Infection and Immunity* 2: 672-673 [1970]); and Sjoquist, J. et al., *Eur. J. Biochem.* 30: 190-194 [1972]). Protein A is useful in that it binds strongly and specifically to the Fc portion of immunoglobulin IgG from a variety of mammalian sources, including human (Kronvall, G. et al., *J. Immunol.* 103: 828-833 [1969]). Thus this protein has been used in diagnostic applications and has potential therapeutic value.

In most *S. aureus* strains, at least 70% of the Protein A produced is covalently linked to the peptidoglycan of the cell wall (Sjoquist, J. et al., *Eur. J. Biochem.* 30: 190-194 [1972]). The site of attachment is the C-terminal region of the Protein A molecule (Sjodahl, J., *Eur. J. Biochem.* 73: 343-351 [1977]). Some Protein A (15-30%) is generally excreted into the growth medium, and there are several circumstances under which the fraction of Protein A which is excreted can be increased. Some methicillin resistant strains of *S. aureus* excrete essentially all their Protein A (Lindmark, R. et al., *Eur. J. Biochem.* 74: 623-628 [1977]). Low levels of puromycin increase the amount of excreted Protein A, presumably by truncating the protein and thereby eliminating its C-terminal cell wall attachment site, and protoplasts excrete nearly all the Protein A which they synthesize (Movitz, J., *Eur. J. Biochem.* 68: 291-299 [1976]).

Protein sequence information is available for Protein A from *S. aureus* strain Cowan I (Sjodahl, J., *Eur. J. Biochem.* 78: 471-490 [1977]). The Cowan I strain contains approximately 2×10^5 molecules of Protein A per cell (Sjoquist, J. et al., *Eur. J. Biochem.* 30: 190-194 [1972]).

Protein A is synthesized in *S. aureus* only during exponential growth, and synthesis ceases as the culture approaches stationary phase (Movitz, J., *Eur. J. Biochem.* 48: 131-136 [1974]). The level of synthesis of Protein A in *S. aureus* is highly variable, and is strongly influenced by the growth conditions in some as yet poorly defined ways (Landwall, P., *J. Applied Bact.* 44: 151-158 [1978]).

The Protein A gene from *S. aureus* strain Cowan I has been cloned in *E. coli*. Lofdahl, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 697-701 (1983). This gene is contained in a 2.15 kilobase insert bounded by EcoRV restriction sites. The gene has been inserted into a plasmid and cloned in *E. coli*, where low levels of expression have been achieved. The chimeric plasmid which contains the Protein A gene has been designated "pS

."

Currently, industrial production of Protein A is carried out using mutant strains of *S. aureus*. A major disadvantage of using *S. aureus* to produce Protein A is that all available production strains are human pathogens. Although many genetic engineering experiments have been conducted using *Escherichia coli*, that organism is not suitable for efficient production of Protein A, since it does not export protein outside the cell. Furthermore, *E. coli* possesses disadvantageous pathogenic properties as well, i.e., produces endotoxins.

There thus remains a need for the production of Protein A by means which are both safe and efficient.

SUMMARY OF THE INVENTION

In accordance with the present invention, Protein A-producing Gram-positive bacteria are prepared by introduction into Gram-positive cells which do not normally produce Protein A, vectors containing the nucleotide sequence coding for Protein A and expression signals directing expression of the Protein A gene in the microorganism. Protein A can be produced by cultivating such cells in a nutrient medium under protein-producing conditions.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A method of achieving high level production of Protein A in Gram-positive microorganisms without substantially inhibiting the growth of the host has been discovered. The method involves transformation of a Gram-positive microorganism by introduction therein of a vector containing the nucleotide sequence coding for Protein A. A Protein A gene may be obtained from Protein A-producing microorganisms, such as the above-mentioned strains of *S. aureus*. A preferred source of the gene is plasmid pS

, which has been cloned in *E. coli*. See Lofdahl, S., et al. (supra). The gene may advantageously be excised from that clone by digestion with endonuclease EcoRV.

The Protein A gene may contain its natural expression signals (i.e., transcriptional and translational initiation sequences), or those signals may be replaced by other expression signals recognizable by the Gram-positive host microorganism. Replacement of the natural expression signals with other recognizable Gram-positive expression signals may be accomplished using conventional methods of molecular biology. Such replacement involves cleavage of the natural expression signals from the Protein A sequence and fusion of the desired expression signals to the Protein A gene.

Construction of the Protein A-producing strains of this invention involves inserting, by recombinant DNA techniques, the Protein A gene into a plasmid vector. Such a vector may be prepared in vitro and inserted directly into the Gram-positive bacterial host by transformation techniques. The vector is preferably cloned in another organism for amplification and purification prior to transformation of the ultimate Gram-positive host cells. The microorganism used for the intermediate cloning step may be an organism in which the vector will be maintained and express selectable phenotypical properties. *E. coli* is the preferred microorganism for the intermediate cloning step.

When the vector is constructed in vitro and first cloned in *E. coli*, it advantageously contains a functional *E. coli* replicon as well as a phenotypic marker for *E. coli*. The vector also advantageously contains a phenotypic marker for the Gram-positive host microorganism. In one embodiment of the present invention, the vector also contains a functional replicon permitting autonomous replication in the Gram-positive bacteria selected. One or more copies of the Protein A gene may be inserted into this vector, and the vector then used to transform the appropriate Gram-positive microorganism.

In preferred embodiments of this invention, the vector does not contain a replicon capable of functioning in the Gram-positive microorganism selected, but rather contains a DNA sequence homologous to a region of the chromosome of that Gram-positive microorganism. This construction permits linear integration of the vector into the host chromosome in the region of homology. The vector is again advantageously constructed in vitro and first cloned in *E. coli* as above; however, if desired, the gram-positive bacterial host may be transformed directly with the chimeric plasmid. Such a vector transforms the Gram-positive microorganism by recombination with the homologous region of Gram-positive host chromosome. An advantage of this method is that there is less likelihood of loss of the Protein A sequence from the host, due to negative selection favoring plasmid-free cells, and Protein-A producing strains prepared in this manner have been found to be genetically stable.

The Gram-positive host microorganisms employed in this invention are advantageously selected from non-pathogenic strains which do not normally synthesize Protein A. Although the invention will be described in detail with regard to *Bacillus subtilis*, it is to be understood and will be appreciated by those skilled in the art that the invention is applicable to a variety of Gram-positive microorganisms. Particularly preferred host microorganisms are well known industrial strains of the genera, *Bacillus* and *Streptomyces*. Generally, it has been found that Protein A is produced at optimum levels during the exponential growth phase of the organisms, and production slows considerably thereafter. It has also been found that the period of Protein A synthesis can be extended using sporulation deficient (*spo*⁻) Gram-positive hosts. When *spo*⁻ hosts are used, the resulting strains are generally genetically more stable, the level of Protein A is higher, and, because fewer proteases are produced by these cells, the Protein A product is more stable.

Transformation of the Gram-positive microorganism may be accomplished by any suitable means. A particularly preferred transformation technique for these organisms is to remove the cell wall by lysozyme digestion, followed by transformation of the resulting protoplasts. Chang, S., et al. *Molec. Gen. Genet.*, 168, 111-115 (1979). Alternatively, cells competent for transformation can be transformed by a modification of the method of Anagnostopoulos, C., et al., *J. Bacteriol.*, 81, 741-746 (1961), as described in Example III below.

The procedures used to clone the Protein A gene and construct Protein A-producing strains of *B. subtilis* described herein are, except where otherwise indicated, accomplished by using conventional techniques of molecular biology. Segments of DNA containing the sequence coding for Protein A are isolated. If the sequences contain the natural expression signals for Protein A, the segments may be inserted into an appropriate vector without further modification. If the sequences do not contain the natural expression signals, or it is desired to replace them, the existing expression signals (if present) may be enzymatically removed and a DNA sequence containing the desired expression signals may then be fused to the Protein A gene. The Protein A sequences attached to the desired expression signals may then be inserted into an appropriate vector.

Vectors appropriate for transformation of *B. subtilis* are generally plasmids, and are advantageously constructed in *E. coli*. Such vectors contain a functional *E. coli* replicon, a phenotypic marker for *E. coli*, and a phenotypic marker for *B. subtilis*. The vector may also contain a *B. subtilis* replicon, but preferably it does not and instead contains a DNA sequence homologous to a region of the *B. subtilis* chromosome. Insertion of the homologous DNA sequence into the

vector permits recombination of the vector with the *B. subtilis* chromosome, where it can be maintained at a copy number of one per genomic equivalent.

One or more copies of the DNA sequences coding for Protein A and the desired expression signals are then inserted into the vector. The presence of the *E. coli* replicon and phenotypic marker in the vector permit its cloning and maintenance in *E. coli*, and allow for selection of clones containing the vector.

When an intermediate cloning step in *E. coli* is employed, one or more *E. coli* colonies which carry the Protein A-containing plasmid are grown on suitable nutrient media, and the plasmids are isolated therefrom. Cells of *B. subtilis* (i.e. competent cells of protoplasts) are then transformed by introduction therein of the vector and successful transformants are selected by means of the *B. subtilis* phenotypic marker. Vectors containing a *B. subtilis* replicon are capable of reproducing in the host and producing Protein A when the cells are grown under protein-producing conditions. Alternatively, vectors not containing a *B. subtilis* replicon but instead containing a DNA sequence homologous with the host chromosome will recombine with the host chromosome and be replicated along with the host chromosome.

Preferred plasmid vectors for the cloning procedures described herein are graphically illustrated in the drawings.

FIG. 1 depicts a vector designated pGX251, which was constructed from the *E. coli* vector pBR322 and the *B. subtilis* vector pC194. In FIG. 1, the pC194 sequence 10 containing *B. subtilis* replicon 30 is fused to pBR322 sequence 20 containing *E. coli* replicon 40. The pC194 sequence contains the CAT gene, which specifies resistance to chloramphenicol. The pBR322 sequence contains a galactokinase (galk) gene, a gene specifying ampicillin resistance (amp) and a transcription termination sequence 70 derived from bacteriophage lambda. Plasmid pGX251 contains a unique EcoRV restriction site which provides a convenient insertion site for the EcoRV fragment 60 from pS

which contains the protein A gene (pra). The most prevalent orientation of the pra gene is illustrated, but either orientation can be employed, since the pS

EcoRV segment contains the appropriate expression signals.

FIG. 2 depicts plasmid pGX284, which is the preferred vector for the practice of the present invention. In FIG. 2, pBR322 sequence 15, containing *E. coli* replicon 55 was fused to pC194 sequence 25 containing no replicon. Like vector pGX251, pGX284 specifies ampicillin (amp) and chloramphenicol (CAT) resistance, contains the galactokinase (galk) gene, contains the lambda transcription termination sequence and the unique EcoRV recognition sequence 65, providing an insertion site for the Protein A gene-containing segment 45. In addition, pGX284 contains a segment of *B. subtilis* chromosomal sequences 35. The presence of these sequences and the absence of a *B. subtilis* replicon permits linear integration of this vector into the chromosomes of *B. subtilis* transformants.

A further embodiment of the present invention involves preparation of vectors differing in their homologous chromosomal DNA sequences, but still containing one or more copies of the Protein A gene. Thus, vectors can contain sequences from different regions of the *B. subtilis* chromosome, or even from chromosomes of different species of *Bacillus*. This permits integration of the vectors into different parts of the host chromosome in the corresponding regions of homology resulting in transformants with more than one vector incorporated in the host chromosome.

Transformed *B. subtilis* cells are grown in a nutrient medium under protein-producing conditions resulting in the production of Protein A by the cells and the secretion of Protein A into the medium. Protein A may then be purified from the medium after removing intact cells using conventional techniques.

Those skilled in the art will recognize that, although the present disclosure describes cloning and expression of the entire Protein A gene, functional segments of that gene or fusions of the gene with other DNA segments can also be cloned and expressed in accordance with the teachings herein. Such segments and fusions are, therefore, intended to be within the scope of this invention.

The invention is further illustrated by the following examples which are not intended to be limiting. For the DNA manipulation described in this and the following examples, the restriction endonucleases and other enzymes used were purchased from New England Biolabs, Inc., Bethesda Research Laboratories, Inc., Boehringer Mannheim GmbH, and were used in the conventional manner as recommended by the manufacturer, except as noted otherwise.

EXAMPLE I

Isolation of a DNA sequence containing the Protein A gene and Promoter

Region

Plasmid pSPAI (consisting of a 7.6 kilobase pair insert of DNA derived from *S. aureus* strain 8325-4 in *E. coli* vector pBR322) at a concentration of 110 µg/ml was digested with restriction endonuclease EcoRV at 256 units/ml in a buffer ("EcoRV buffer") containing 150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoethanol for 1 hour at 37° C., then for an additional 30 min. with an additional 256 units/ml EcoRV endonuclease. A small EcoRV fragment (2.15 kb) was isolated by agarose gel electrophoresis and electroelution, and found to obtain the Protein A gene and promoter region (see Examples II and IV).

EXAMPLE II

Insertion of the 2.15 kb pair fragment into Plasmid pGX251

Plasmid pGX251 (containing an *E. coli* replicon derived from plasmid pBR322, a *B. subtilis* replicon derived from plasmid pC194, the gene for ampicillin resistance, the gene for chloramphenicol resistance and a unique EcoRV site) was linearized by restriction endonuclease digestion with EcoRV (640 units/ml) at a concentration of 40 µg/ml in EcoRV buffer for 1 hour at 37° C. Digestion was terminated by incubation for 8 minutes at 65° C. and was determined to be complete by agarose gel electrophoresis. The 2.15 kb EcoRV fragment from Example I and linearized pGX251 were ligated at a concentration of 200 µg/ml EcoRV fragment, 100 µg/ml linearized pGX251, in a buffer ("ligation buffer") containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 0.5 mM ATP, and 100 µg/ml bovine serum albumin, and 4×10⁵ Units/ml T4 DNA ligase at 5° C. for 15 hours.

Calcium-shocked *E. coli* strain SK2267 (F⁻, gal⁻, thi⁻, T₁^R, hsdR4, recA⁻, endA⁻, sbcB15) cells (0.2 ml), prepared as described by R. W. Davis, et al., "Advances Bacterial Genetics" Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1980) were transformed with the ligation mixture containing 0.2 µg linearized pGX251 and 0.4 µg of the 2.15 kb Eco RV fragment. Colonies were selected on standard L-broth plates containing 50 µg/ml ampicillin. An ampicillin resistant transformant designated strain GX3311 produced approximately 1 µg/A₆₀₀ unit of Protein A, determined by the method of Lofdahl, et al. (supra). The plasmid carried by this strain, designated pgX2901, consisted of a single copy of the 2.15 kb Eco RV fragment in pGX251.

EXAMPLE III

B. subtilis competent cell transformation by pGX251 containing Protein A

gene and Protein A production therewith

Competent cells of *B. subtilis*, strain BR151 (Lovett, P. S., et al., *J. Bacteriol.*, 127, 817-828 (1976)) were transformed with 0.3 µg/ml plasmid pGX251 containing the protein A gene. To prepare competent cells, *B. subtilis* strain BR151 was grown overnight at 37° C. on tryptose blood agar base (Difco). Cells were resuspended in 10 ml SPI medium supplemented with 50 µg/ml each of lysine, tryptophan, and methionine to give a reading of 50-70 on a Klett-Summerson colorimeter equipped with a green filter (Klett Mfg. Co., New York). SPI medium consists of 1.4% K₂ HPO₄, 0.6% KH₂ PO₄, 0.2% (NH₄)₂ SO₄, 0.1% sodium citrate 2H₂ O, 0.5% glucose, 0.1% yeast extract (Difco), 0.02% Bacto-Cusamino acids (Difco), and 0.02% MgSO₄ 7H₂ O. The cultures were incubated at 37° on a rotary shaker (200-250 rpm) for 3-4 1/2 hours until logarithmic growth ceased and the cells entered early stationary phase. The cells were then diluted 10 fold into the same medium supplemented with 0.5 mM CaCl₂. Incubation was continued for 90 min. The cells were then centrifuged for 5 min. at room temperature, and resuspended in 1/10 volume of spent medium. 1 ml aliquots of the cell suspensions were frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C. for use.

For transformation, the frozen competent cells were thawed quickly at 37° and diluted with an equal volume of SPII medium supplemented as above with amino acids. SPII is the same as SPI except that the concentration of MgSO₄ is increased to 0.04% and 2 mM ethyleneglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) is added. Cells (0.5 ml) are mixed with 0.1 to 5 µg of DNA in 13×100 mm glass tubes. The cell suspensions are rotated at 37° C. for 30 min. Penassay broth (Difco) (1-2 ml) is then added and incubation continued for 60 min. at 37° C. Cells are then recovered by centrifugation, resuspended in 0-2 ml Penassay broth, and plated on LB agar plates containing 5-10 µg/ml chloramphenicol.

Successful transformants were selected at 5 µg/ml chloramphenicol. The transformed *B. subtilis* strain was designated GX3308. This strain was shown to produce small quantities of Protein A by the procedure of Lofdahl, et al. (supra), but lost the plasmid quickly upon culturing in a nutrient medium.

EXAMPLE IV

Insertion of 1 copy of the 2.15 kb fragment into Plasmid pGX284

Plasmid pGX284 (containing an *E. coli* replicon derived from plasmid pBR322, the gene for ampicillin resistance, the gene for chloramphenicol resistance, a unique EcoRV site, and an undetermined *B. subtilis* chromosomal sequence) was linearized by endonuclease digestion with EcoRV at a concentration of 40 µg/ml in EcoRV buffer for 1 hour at 37° C. Digestion was terminated by incubation for 8 minutes at 65° C. and was determined to be complete by agarose gel electrophoresis. The 2.15 kb EcoRV fragment from Example I and linearized pGX284 were ligated at a concentration of 200 µg/ml EcoRV fragment, 100 µg/ml linearized pGX284 under the conditions described in Example II.

Calcium-shocked *E. coli* strain SK2267 cells were transformed with the ligation mixture containing 0.2 µg linearized pGX284 and 0.4 µg 2.15 kb EcoRV fragment. Colonies were isolated on standard L-broth plates containing 50 µg/ml ampicillin. An ampicillin resistant transformant designated strain GX3320 produced approximately 1 µg/A₆₀₀ unit of Protein A. The plasmid carried by this strain, designated pGX2907 was determined to consist of a single copy of the

2.15 kb EcoRV fragment inserted into pGX284. Transformed Strain GX3320 has been deposited with the American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA and has been designated ATCC No. 39344.

EXAMPLE V

B. subtilis protoplast transformation by pGX284 containing single copy of

Protein A gene and production of Protein A therewith

Protoplasts derived from *B. subtilis* strain 1S53 (spo0AΔ677) were transformed with 0.1 µg/ml plasmid pGX2907 containing a single copy of the Protein A gene. Strain 1S53 was obtained from the Bacillus Genetic Stock Center, Ohio State University, Dept. of Microbiology, 484 West 12th Ave., Columbus, Ohio 43210 USA. Successful transformants were selected at 5 µg/ml chloramphenicol. A transformant (designated strain GX3305) was found to produce approximately 50 µg/ml Protein A in the extracellular growth medium when grown in a medium containing (per liter) 33 g tryptone, 20 g Yeast extract, 7.4 g NaCl, 12 ml 3M NaOH, 8 g Na₂ HPO₄, 4 g KH₂ PO₄ for 17 hours at 37° C. GX3305 has been deposited with the American Type Culture Collection, Rockville, Md., U.S.A. and has been designated ATCC No. 39345.

EXAMPLE VI

Insertion of 2 tandem copies of the 2.15 kb fragment into Plasmid pGX284

From the same transformation described in Example IV, an ampicillin resistant transformant was isolated (designated strain GX3202-2) which was determined by restriction endonuclease digest analysis to carry a plasmid (designated pGX2907-2) in which two tandem copies of the 2.15 kb EcoRV fragment had been inserted into pGX284.

EXAMPLE VII

B. subtilis transformation by pGX284 containing two tandem copies of

Protein A gene and production of Protein A therewith

Competent cells of *B. subtilis* strain BR151 were transformed with 0.3 µg/ml plasmid pGX2907-2, containing two tandem copies of the Protein A gene. Successful transformants were selected at 10 µg/ml chloramphenicol. One transformant designated strain GX3302-2 was grown in a standard fermenter (8L) containing 2×L Broth for 7 hours. The final yield of Protein A was 47 mg/l in the extracellular growth medium as determined by IgG binding activity by a competitive ELISA procedure as described by Lofdahl et al. (supra).

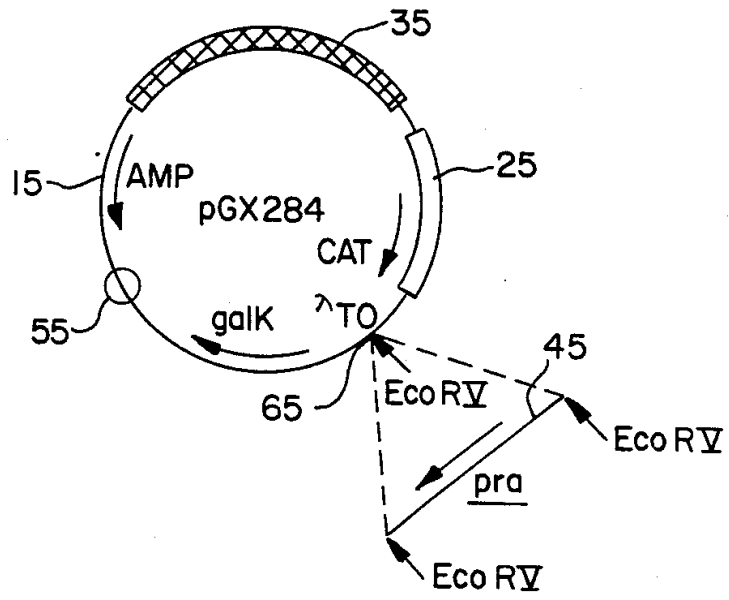


Fig. 1

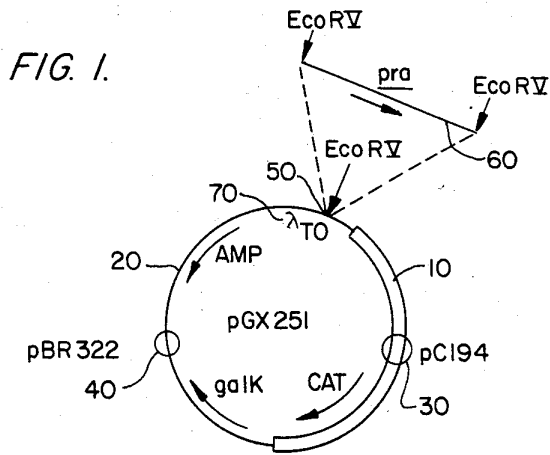
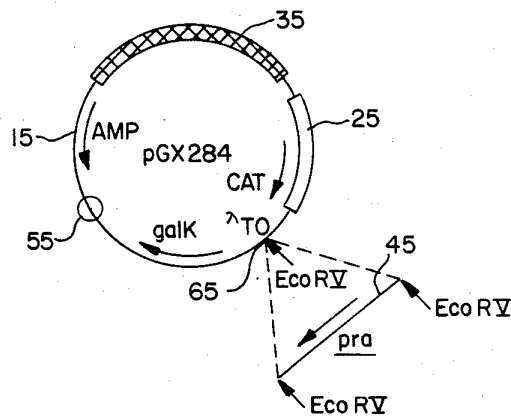


FIG. 2.



8.3 مراجع بخصوص تنقية بروتين آ (Protein A)



Process Biochemistry [Volume 33, Issue 3](#), March 1998, Pages 263-266

Article Title: Purification of protein A from *Staphylococcus aureus* by affinity chromatography using crosslinked macroporous glycidyl polymer.

Author(s): Muniyasamy, N.
Ambedkar, S.S.
Naik, S.R.

Found In: Process biochemistry (Barking, London, England) Process
biochemistry. Process biochem. 1998. v. 33 (3)
p. 263-266.

Note(s): Includes references

NAL Subject(s): bacterial proteins
extraction
purity
rapid methods

N. Muniyasamy, S. S. Ambedkar and S. R. Naik*

Research and Development, Hindustan Antibiotics Ltd, Pimpri, Pune, 411 018 India

(Received 13 February 1997; revised version received 29 April 1997; accepted 6 May 1997)

Abstract

A new process for the purification of protein A from *Staphylococcus aureus* has been developed achieving purity of more than 98% with a recovery of 30%. The process involves extraction employing a specific buffer containing Toluene-Triton X-100-EDTA and subsequent purification using macroporous glycidyl copolymer. The process has been successfully used to purify protein A of both extracellular and intracellular origin. The process is simple, rapid, inexpensive and efficient when compared to many other reported processes. © 1998 Elsevier Science Ltd

Keywords: nickel removal, *staphylococcus zureus*, purification, affinity chromatography.

Introduction

Protein A is produced intracellularly or extracellularly [1] by *Staphylococcus aureus*. It is covalently linked to the cell wall and binds specifically to the Fc portion of IgG [2].

Protein A is used in different immunological tests [3] and also in the affinity purification of monoclonal antibodies. Its major therapeutic application is the removal of IgG from plasma in the treatment of certain types of cancer [4] and in the induction of endogenous interferon [5]. For therapeutic application protein A should be in a highly purified form and completely free from associated toxins.

Protein A is generally purified by gel filtration [6-8] or affinity purification [9] using an immobilized form of IgG. The matrices for IgG immobilization so far reported are: Sepharose 4B, Sepharose 6B, DEAE-Sephadex and DEAE-cellulose [10]. Application of these matrices in the purification process suffers from

There are very few reports available in the literature and no data that document the influence of process conditions on the productivity and/or economics of purification steps.

In the present communication we used glycidyl methacrylate ethylene glycol dimethacrylate, a synthetic polymer as an IgG ligand binder/coupling agent and developed a simple, rapid, reproducible and single step process for purification of protein A from *S. aureus* cells. The developed process is feasible for large scale purification of both extracellular and intracellular protein A.

Materials and methods

Chemicals

All media constituents (e.g. peptone, beef extract, glucose) were purchased from Himedia (Bombay, India). Protein A was obtained from the Sigma

one or more of the following disadvantages when compared with the multistep procedure of gel filtration; the use of hazardous chemicals to activate the matrix (e.g. cyanogen bromide), high cost and numerous operational limitations.

*To whom correspondence should be addressed.

Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) penicillinase (ELISA grade) and polymer matrix glycidyl methacrylate ethylene glycol dimethacrylate (GMEGDMA) are the products of R & D Division, Hindustan Antibiotics Ltd (Pune, India). Other chemicals used were of analytical grade and procured from local suppliers.

263

Volume 83, Issue 2, 15 November 1977, Pages 329–331



Purification of protein a from *Staphylococcus aureus* by affinity chromatography on polyacrylamide activated with thiophosgene

[A.Kalyan Rao](#), [B. Swaminathan](#), [John C. Ayres](#), [Joseph Mendicino](#)

8.4 الكشف عن تركيز البروتين آ (Protein A concentration)

[Biotechnology Techniques](#)

October 1996, Volume 10, [Issue 10](#), pp 779-782

Protein A quantitation by competitive ELISA using penicillinase

[N. Muniasamy](#), [G. M. Bhopale](#), [S. S. Ambedkar](#), [S. R. Naik](#)

[Look Inside Get Access](#)

Summary

A simple, sensitive and specific competitive ELISA method using penicillinase as a marker for quantitation of protein A has been developed. The sensitivity of the assay is 20 ng/ml. This method is useful for estimating the protein A concentration in fermented and extracted samples.

PROTEIN A QUANTITATION BY COMPETITIVE ELISA USING PENICILLINASE

N. MUNIASAMY, G.M. BHOPALE, S.S. AMBEDKAR & S.R. NAIK*

Research and Development, Hindustan Antibiotics Ltd.,
Pimpri, Pune - 411 018. India.

SUMMARY : A simple, sensitive and specific competitive ELISA method using penicillinase as a marker for quantitation of protein A has been developed. The sensitivity of the assay is 20 ng/ml. This method is useful for estimating the protein A concentration in fermented and extracted samples.

INTRODUCTION : Protein A is a bacterial cell-wall protein found in some strains of *Staphylococcus aureus* (Bjork et al., 1972). Some methicillin-resistant strains also produce protein A extracellularly (Landwall, 1978). Protein A has potential applications in immunodiagnosics (Langone, 1980), affinity purification of monoclonal antibodies and in the extracorporeal removal of IgG from plasma (Freiburghaus et al., 1988).

Protein A is quantified according to its ability to interact with the Fc portion of IgG employing different immunological methods (Mancini et al., 1965; Laurell, 1972). However, the majority of these methods are either insensitive or time consuming or both (Landwall, 1978). Until now, ELISA methods, protein A-peroxidase (Considine et al., 1986) and protein A-alkaline phosphatase (Lofdahl et al., 1983) conjugates have been used. However, these ELISA methods have disadvantages: the need for high-cost

enzymes, limited availability of reagents and usage of carcinogenic chemicals (Harinath and Cheimaraj, 1992). To overcome these problems, we report here a simple, specific, inexpensive and sensitive ELISA (Competitive) for quantitation of protein A using penicillinase as an enzyme marker.

MATERIALS AND METHODS :

Preparation and Purification of Protein A-Penicillinase Conjugate :

Protein A-penicillinase conjugate was prepared by the method of Avrameas (1969). To prepare the conjugate, 2.0 ml phosphate buffer (0.1M, pH 7.0) containing 100 µl 4% glutaraldehyde, 0.2 mg penicillinase (specific activity 800 IU/mg) and 0.3 mg protein A were mixed and incubated at $30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$ for 3 h with shaking and then dialysed against phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) at 4°C . The dialysed conjugate was purified using Sepharose 6B column (1.2 cm x 45 cm). The fractions of 2 ml were collected using phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0; flow rate 30 ml/h) and absorbance of fractions was measured at 280 nm (Fig.1). Protein A-penicillinase conjugate was confirmed in 18th fraction by immunodiffusion method (Forsgren & Sjoquist, 1969) and iodometric test (Joshi et al., 1984) for protein A and penicillinase respectively.

Fermentation :

Staphylococcus aureus (ATCC 2492) was grown in 15L fermenter (New Brunswick Scientific Co.) using the culture media described by Forsgren & Sjoquist (1969). The fermentation conditions for growth and biomass separation were followed as described by Sjoquist et al. (1972).

Protein A Extraction :

The extraction methods adopted for the intra-cellular protein A were: heat extraction (Forsgren & Sjoquist, 1969), lysostaphin (Sjoquist et al., 1972) and surfactant (0.5ml of Triton X 100 in 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 agitated for 2 h). The protein A in extracted samples was confirmed qualitatively and quantitatively by immunodiffusion method (Forsgren & Sjoquist, 1969) and ELISA respectively.

Protein A Assay :

Each well of a microtitre plate was coated with 200 µl human IgG solution (2 µg/ml in 0.05 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ buffer, pH 9.6). The plates were incubated (12 h at 4°C) and washed three times with saline (0.8% w/v) containing Tween 20 (0.05% w/v) solution. Protein A standards and protein A-penicillinase conjugate (1:40 dilution) were diluted in phosphate buffer saline (PBS, 0.01 M, pH 7.0) containing bovine serum albumin (BSA) 50 ng/ml (PBBS). The PBBS was prepared as described by Considine et al. (1986). The protein A standards (5-3000 ng/ml) were prepared in PBBS or in extracting reagents or in sterile growth media viz. Trypticase soy broth, casein hydrolysate, yeast extract. The aforementioned media are commonly used for extracellular protein A production (Landwall, 1978). In each well of the microtitre plate 100 µl conjugate was added and then followed by 100 µl standard protein A or test samples. The contents in the well were mixed, incubated (1 h at 37°C) and washed as mentioned earlier. Starch-Iodine penicillin v solution (200 µl) was added to each of the well and kept at room temperature ($30^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) for 30 min. The Starch-Iodine Penicillin V solution was prepared as described by Joshi et al. (1984). The enzyme-substrate reaction was stopped by adding 50 µl H_2SO_4 (1 M) and then read at 630 nm on EIA plate reader (Model: EL 310, BIO-TEK Instruments, Inc., USA). The persistence or decolourization of the blue colour indicates the presence or absence of protein A, respectively (Ambedkar et al., 1987). The intensity of the blue colour is directly proportional to the protein A concentration. Standard curve was drawn by plotting protein A concentration on X-axis and B-Bo plotted on Y-axis, where B and Bo are the absorbance values at 620 nm of tests and control wells respectively. A straight line was obtained for 20-2000 ng/ml which was selected from the linear portion of the each standard curve by linear regression analysis using the method of least squares (Howel et al., 1963).

RESULTS AND DISCUSSION :

Microtitre plate assay was carried out using 6 replicates for different protein A concentration in PBBS as described earlier. The correlation coefficient (r^2) and residual errors were calculated (Table 1) for each of standard curve, A standard graph is drawn (Fig. 2), which is suggestive of a good fit between dependent and independent variables. The correlation coefficient values are indicated even for the largest possible value of r^2 that could be observed if the relationship between the variables are correct and results are highly correlated (Waugh, 1952).

Further, the penicillinase-based ELISA was studied to validate the reproducibility of quantitation of protein A. The absorbance (B-Bo) values were determined for each of the protein A concentrations (in PBBS) and coefficient of variation was calculated (Table 2) by conducting 6 replicates of a number of protein A concentration. The values of coefficient of variation ascertain a good reproducibility, within 20-2000 ng/ml protein A concentration. Thereby suggesting penicillinase based ELISA is more sensitive than peroxidase based ELISA (Considine et al., 1986).

It was also observed that in Trypticase soy broth, casein hydrolysate yeast extract and extracting reagents did not interfere during quantitation of protein A. The values of protein A obtained from different extracts after their dilution by 100 and 200 times clearly indicate the accuracy, non interferences by the reagents and reliability of penicillinase based ELISA method (Table 3).

Our findings are in agreement with the earlier report of Sjoquist et al., (1972) that the efficiency of extraction of protein A from the cell of *S. aureus* is higher with lysostaphin as compared to heat

9. مراجع

[Walsh 2007] Gary Walsh, "Pharmaceutical Biotechnology – Concepts and Applications", Wiley, Chichester/England, 2007

[Hass, Pörtner 2011] Volker C. Hass, Ralf Pörtner, „Praxis der Bioprozesstechnik – mit virtuellem Praktikum“, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2011

[Mourad 2003] Samir Mourad, "Purification and characterization of a Glucose-1-phosphatase from *Pantoea Agglomerans*", Karlsruhe, 2003, www.aecenar.com/publications