

# Culture de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D dans des bioréacteurs à usage unique et personnalisables, conçus pour la petite échelle

Bernal, C., PhD, Santos Fernandes, C., Ms.C and Niemeijer, M., Ms.C | Getinge Applikon, Heertjeslaan 2, 2629 JG, Delft, Pays-Bas

## RÉSUMÉ

Les bioréacteurs à usage unique sont désormais une technologie largement répandue dans les domaines du développement des bioprocédés et de la fabrication commerciale grâce aux avantages qu'ils offrent par rapport aux bioréacteurs réutilisables : un investissement initial moindre, une mise en service plus rapide et des risques de contamination croisée réduits. Dans le cadre de ce travail, les bioréacteurs Getinge à usage unique, personnalisables et conçus pour la petite échelle (AppliFlex ST) ont été testés. La souche *Saccharomyces cerevisiae* a été cultivée dans une version 0,5 L de ce bioréacteur ainsi que dans une configuration microbienne autoclavable de même taille (Applikon 500 mL), et la croissance dans les deux bioréacteurs a été comparée. La croissance de la culture a été suivie par des mesures hors ligne de la densité optique à 600 nm ( $DO_{600}$ ) et de la concentration en  $CO_2$  dans les effluents gazeux des deux bioréacteurs. Les résultats obtenus montrent que la culture de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D dans les bioréacteurs AppliFlex ST et Applikon présente des tendances similaires en termes de profil de croissance, de mesures de  $CO_2$  dans les effluents gazeux, de température, de pH et d'oxygène dissous ( $dO_2$ ). En conclusion, l'AppliFlex ST peut être utilisé avec succès pour la culture de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

- La souche *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D utilisée dans cette étude a été gracieusement offerte par l'Université Technologique de Delft. Les cultures en flacons agités ont été cultivées à 30°C dans des flacons de 500 mL contenant 100 mL de milieu YPD (eau déminéralisée, 10 g/L d'extrait de levure Bacto, 20 g/L de peptone Bacto, 20 g/L de glucose, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Allemagne) dans un incubateur réglé à 200 rpm et 30°C (Kuhner, Birsfelden, Suisse). Des stocks congelés ont été préparés par ajout de glycérol (30% v/v) pour des cultures en flacons agités de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D en phase de croissance exponentielle et stockés de manière aseptique en aliquots de 1 mL à -80°C.
- L'AppliFlex ST 0,5 L à usage unique et l'Applikon 500 mL en verre autoclavable, tels que présentés en Figure 1 (Getinge Applikon, Delft, Pays-Bas), ont été utilisés pour la culture de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, dans les mêmes conditions : 30°C et pH 5,0 dans des conditions aérobies.
- La configuration du bioréacteur comprenait 2 pales Rushton, 1 sparger en L pour l'entrée de gaz, 1 sortie de gaz avec condenseur, 1 tuyau d'échantillonnage, plusieurs ports d'ajout et un doigt de gant pour la sonde de température. Les deux récipients utilisaient les mini-sondes autoclavables AppliSens pH et  $dO_2$  8 mm (Metroglas AG, Suisse). Dans le bioréacteur en verre autoclavable Applikon 500 mL, les sondes ont été autoclavées avec le bioréacteur, tandis que dans le bioréacteur à usage unique, les sondes ont été autoclavées séparément, puis assemblées dans le bioréacteur sous une hotte à flux laminaire (KOJAI, Vilppula, Finlande).
- Le my-Control a été utilisé pour contrôler le procédé. Dans les deux cas, la température a été contrôlée à l'aide d'un élément Peltier et le pH a été contrôlé à 5,0 par l'ajout d'une base (2M KOH) et d'un acide (1M H2SO4). L'oxygène dissous a été maintenu au-dessus de 40% par l'aération du bioréacteur à 2 vvm.
- Afin de surveiller la croissance cellulaire, des échantillons ont été prélevés pour mesurer la  $DO_{600}$  à l'aide d'un spectrophotomètre (Jenway 7200, Fisher Scientific, Leicestershire, Royaume-Uni). Les taux de croissance spécifiques maximaux ( $\mu_{max}$ ) dans la phase glucose ont été calculés par régression linéaire du logarithme naturel d'au moins sept mesures de  $DO_{600}$ .
- En plus des échantillons  $DO_{600}$  hors ligne, la croissance cellulaire a également été surveillée en ligne à l'aide de mesures de  $CO_2$  dans l'effluent gazeux avec un capteur de  $CO_2$  BlueSens BCP (BlueSens GMBH, Allemagne).



Figure 1. Applikon et AppliFlex ST (Applikon Getinge).

## RÉSULTATS

### Taux de croissance

Le taux de croissance de la souche était similaire pour les deux bioréacteurs, comme le montre le Tableau 1.

1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN.PK113-7D	$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )
	Applikon	0,48
	AppliFlex ST	0,47

Tableau 1. Taux de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D dans l'Applikon et l'AppliFlex ST.

## Références

- Junne, S., & Neubauer, P. (2018). How scalable and suitable are single-use bioreactors? *Current Opinion in Biotechnology*, 53, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.04.003>
- Reinecke, T., Biechele, P., Sobocinski, M., Suhr, H., Bakes, K., Solle, D., Zimmermann, S. (2017). Continuous noninvasive monitoring of cell growth in disposable bioreactors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 251, 1009–1017. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.05.111>
- Eibl R., Löffelholz C., Eibl D. (2014) Disposable Bioreactors for Inoculum Production and Protein Expression. In: Pörtner R. (eds) *Animal Cell Biotechnology, Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1104. Humana Press, Totowa, NJ

Getinge France, société par actions simplifiées au capital de 8.793.677,00 euros, dont le siège social est situé à MASSY (91300) – Carnot Plaza, 14/16 Avenue Carnot – immatriculée sous le numéro 562 096 297 RCS EVRY - 02 38 25 88 88 - operation-ventes.projet.fr@getinge.com

## PROFIL de $CO_2$

Le profil de concentration de  $CO_2$  dans les effluents gazeux des deux bioréacteurs était similaire, comme observé en Figure 2. La première phase d'augmentation de la production de  $CO_2$  résulte de l'absorption du glucose et atteint une valeur maximale aux alentours de 9,5 heures de culture en batch. La deuxième phase de production de  $CO_2$  se produit après 12 heures de culture et est due à la consommation d'autres nutriments. Les différences entre les valeurs pourraient être attribuées à l'utilisation de lots de milieu différents et de précultures différentes. À cet égard, d'autres expériences seront menées.

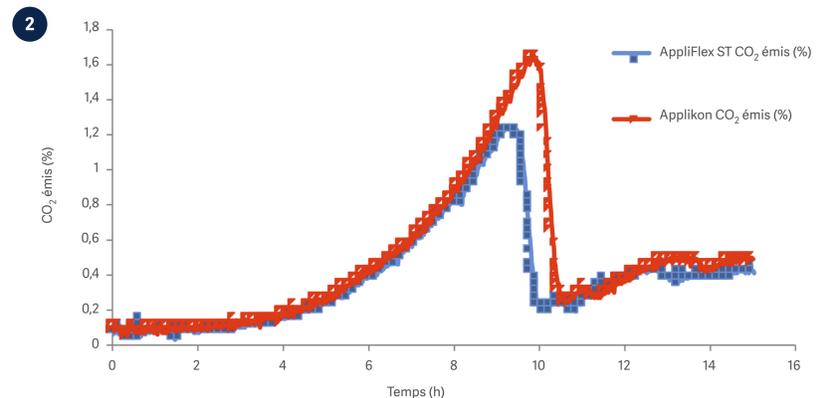


Figure 2. Profil du  $CO_2$  émis par *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK en culture dans du milieu YPD dans les systèmes Applikon et AppliFlex ST.

## CONTRÔLE DES PARAMÈTRES

### Contrôle du $dO_2$ et du pH

Les tendances du  $dO_2$  et du pH ont montré les mêmes profils dans l'Applikon et dans l'AppliFlex ST, comme il est possible de le voir sur la Figure 3. Le pH a été correctement contrôlé à 5,0 dans les deux bioréacteurs pendant tout le procédé. Le  $dO_2$  a toujours été maintenu au-dessus de 40% afin d'éviter toute carence en  $O_2$  susceptible d'invalider les mesures.

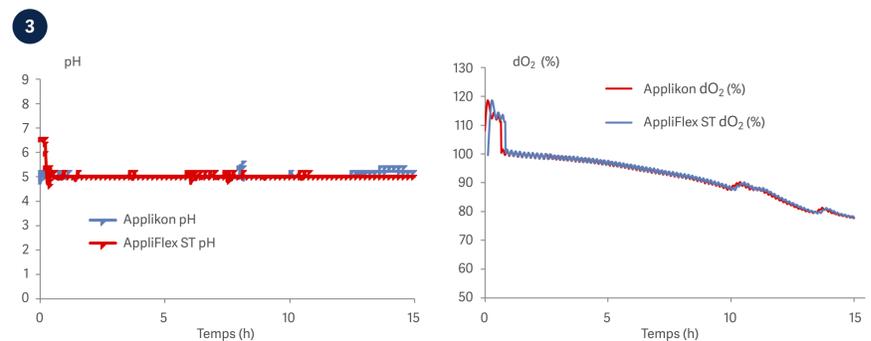


Figure 3. Profils de contrôle du pH et du  $dO_2$  de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK en culture dans du milieu YPD dans l'Applikon et l'AppliFlex ST.

## CONTRÔLE DE LA TEMPÉRATURE

Un élément Peltier maintenait la température à 30°C. Comme le montre la Figure 4, la température était correctement contrôlée à la fois dans le bioréacteur en verre Applikon et dans le bioréacteur en plastique AppliFlex ST.

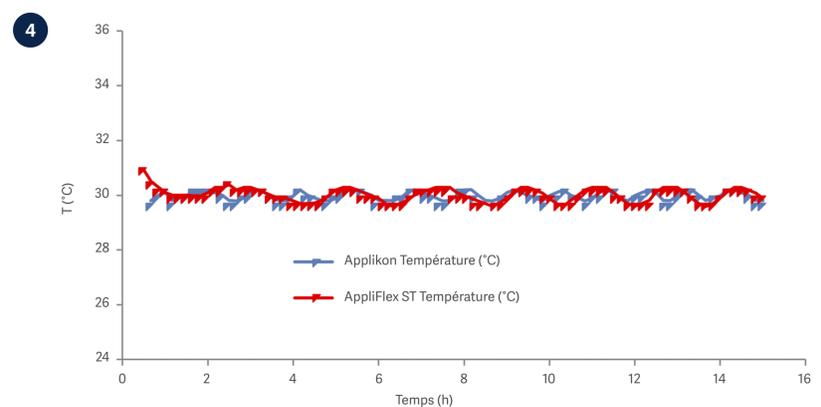


Figure 4. Profil de contrôle de la température de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK en culture dans du milieu YPD dans l'Applikon et l'AppliFlex ST.

## CONCLUSIONS

- La souche *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D a été cultivée avec succès dans les bioréacteurs Applikon et AppliFlex ST grâce à un contrôle adéquat du  $dO_2$  (supérieur à 40%), du pH (5,0) et de la température (30°C).
- Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D a présenté des taux de croissance et des profils de  $CO_2$  émis similaires dans les bioréacteurs Applikon et AppliFlex ST.
- L'AppliFlex ST peut être utilisé pour la culture de *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D; en comparant le profil de croissance de la souche, la culture a montré des tendances de croissance similaires dans l'Applikon et dans le bioréacteur AppliFlex ST à usage unique.