

ChE 437 - Bioprocesses and downstream processing Part III – Downstream Processing

Summer semester exam session

July 5, 2021

Durée - Duration: 60 min.

NOM-NAME:

Ceci est un **examen à livre ouvert**, et vous avez le droit d'utiliser tout document imprimé que vous jugerez adéquat.

*This is an **open-book examination** and you are allowed to use any printed documentation you want*

L'accès à Internet ainsi que l'utilisation d'ordinateurs, tablettes ou smartphones sont cependant interdits.

Access to Internet as well as use of computers, tablets or smartphones is however prohibited.

Lisez les données attentivement, elles contiennent normalement toute l'information nécessaire à la solution. Au moindre doute quant à la terminologie employée, à la formulation de la question ou à la compréhension générale du problème, n'hésitez cependant pas à lever la main.

*Please **read the questions carefully**, they normally contain all the information you need for the answer. Should there be any problem with the understanding of the question, with its formulation or with terminology, raise your hand and do not hesitate to ask.*

Ecrivez svp les réponses sur la feuille de donnée. Si vous deviez avoir besoin de feuilles supplémentaires, mentionnez clairement votre nom sur chaque page.

Please write the answers on the examination sheet. Should you need additional sheets of paper, please do not forget to clearly write your name on each page.

Une réponse sans les unités de mesure correspondantes est une réponse fausse!

An answer without corresponding measuring units will be considered wrong !

Vous pouvez répondre **en français ou en anglais**, comme vous préférez

You may answer **in French or English**, whatever is easier for you

Ecrivez svp de façon **claire et lisible**. Si nous n'arrivons pas à déchiffrer votre réponse elle sera considérée comme fausse !

*Please write in a **readable/legible manner**. If we cannot read your answer, it will be considered wrong!*

Nombre de points / Score : sur/of

Question 1 Linearized filtration data**10 Pts**

Le déroulement d'une filtration est obtenu par mesure du volume de filtrat V_f collecté en fonction du temps t . Ces données peuvent être facilement linéarisées. En reportant $A \cdot t / V_f$ en fonction de V_f / A , on obtient une droite de la forme :

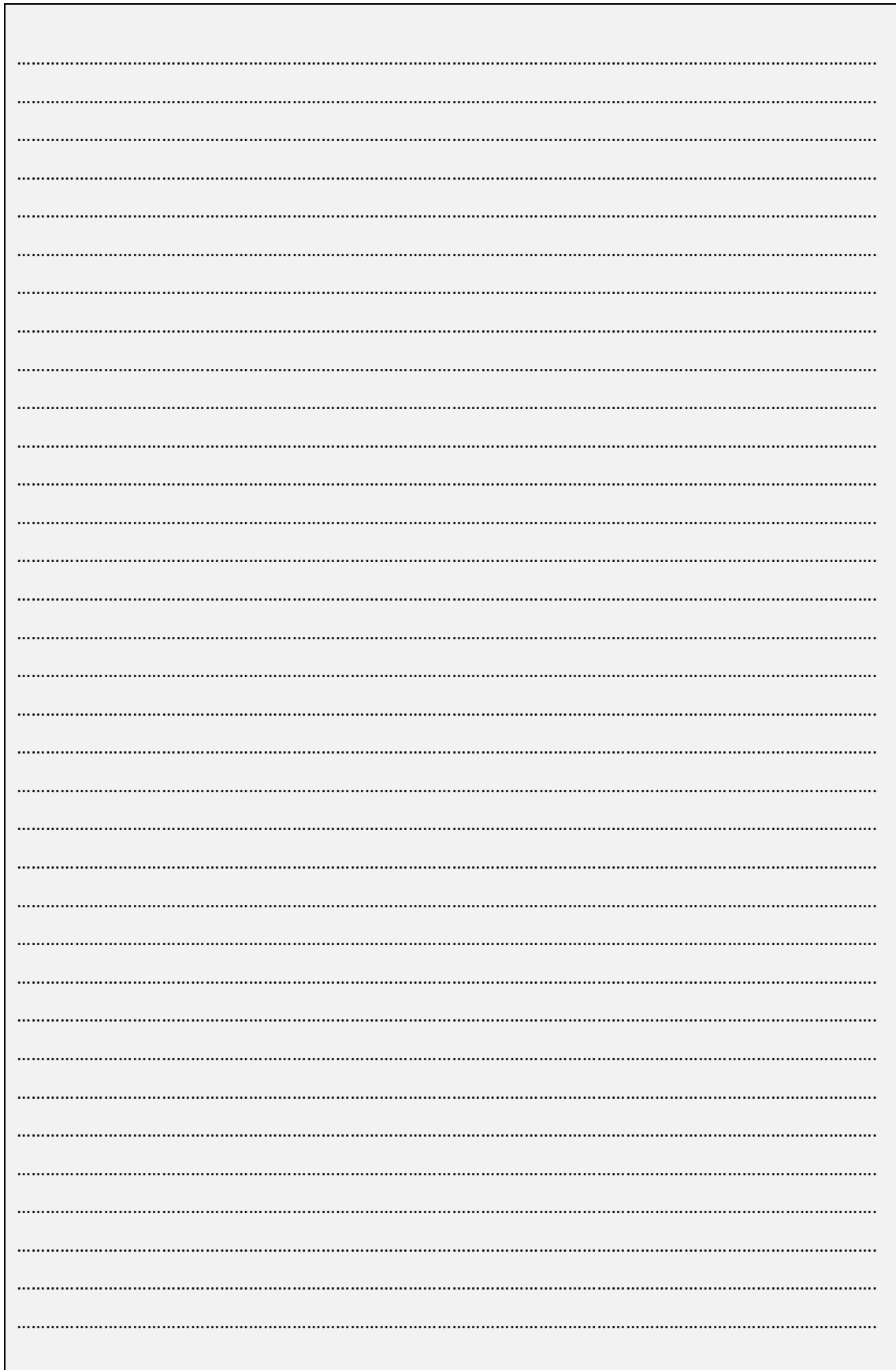
The course of filtration trials is obtained by measuring the collected volume of filtrate V_f as a function of time t can be easily linearized. By plotting $A \cdot t / V_f$ as a function of V_f / A , one obtains a straight line of the form:

$$\frac{A \cdot t}{V_f} = \frac{\eta_l \cdot R_F}{\Delta p} + \frac{\eta_l \cdot \alpha \cdot c_{ms}}{2 \Delta p} \cdot \frac{V_f}{A} = I + S \cdot \frac{V_f}{A} \quad \text{Eq. 1.1}$$

Avec / Where

A	surface du filtre / filter area	[m ²]
c_{ms}	dry matter concentration in the suspension	[kg/m ³]
I	ordonnée à l'origine de la droite / intercept of the straight line	
Δp	différence de pression / pressure difference	[Pa]
R_F	résistance du filtre / filter resistance	
S	pente de la droite / slope of the straight line	
t	temps / time	[s]
V_f	volume de filtrat / filtrate volume	[m ³]
α	résistance spécifique du gâteau / cake specific resistance	
η_l	viscosité du liquide / viscosity of liquid phase	[Pa·s]

- a) En quelles unités s'expriment I, S, R_F and α ? Explicitez le développement, svp!
- b) L'équation 1.1. donne une expression $t = f(V_f)$, c'est-à-dire le temps nécessaire pour collecter un volume de filtrat V_f aux conditions de travail. Sur la base de l'équation (1.1), développez une expression donnant le volume de perméat collecté après un temps, soit $V_f = f(t)$
- a) *Which are the measuring units of I, S, R_F and α ? Please show the development!*
- b) *Equation 1.1. yields an expression $t = f(V_f)$, i.e. the time necessary to collect a volume V_f of filtrate under the working conditions. Based on equation (1.1), please develop an expression that gives the volume of permeate collected after a given time, i.e. $V_f = f(t)$*

A large rectangular area with horizontal dotted lines for writing. The area is bounded by a solid black line on the top, bottom, and sides. The interior is filled with horizontal dotted lines, providing a space for handwritten answers.

Question 2 Purification of a recombinant protein**10 Pts**

A l'aide d'une souche de *E. coli* BL21 (DE3) j'ai produit une protéine recombinante comprenant une étiquette protéique de type (His)₆ (un His-tag, en bref). Ma protéine a un poids moléculaire de 72 kDa et un point isoélectrique 5.2. Le processus de purification doit comprendre une étape de chromatographie avec comme phase mobile pour la charge de la colonne un tampon phosphate 30 mM, pH 7.0. J'ai à disposition quatre résines : une résine Capto™ **Q**, une résine Capto™ **S**, une résine Capto™ **Phenyl** et une résine **Ni Sepharose™ IMAC**.

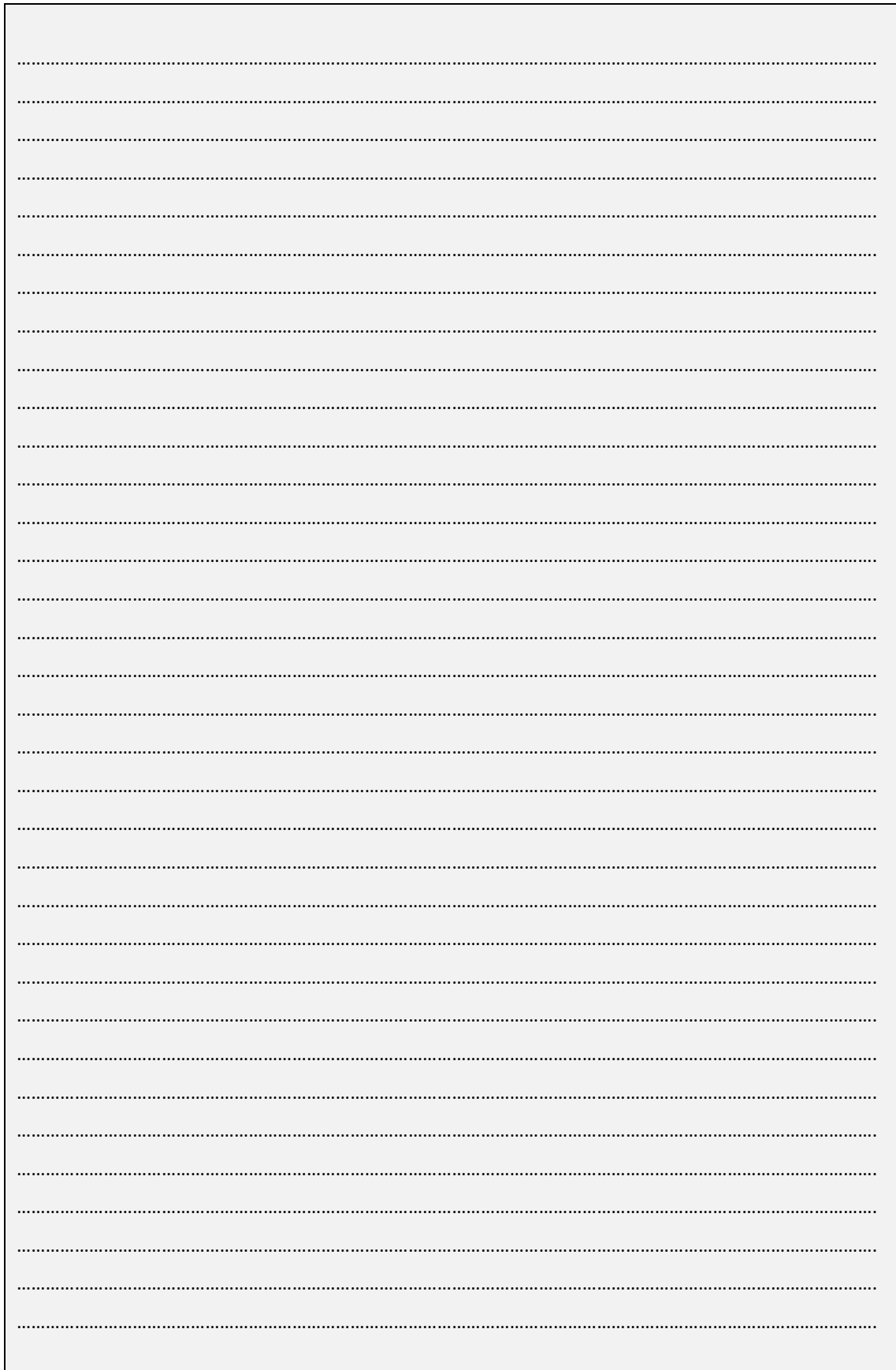
- Partant du bioréacteur, proposez une séquence d'opérations unitaires (y compris l'étape de chromatographie sus-mentionnée) permettant d'aboutir à la protéine purifiée
- Sélectionnez la résine qui vous semble la plus appropriée pour l'étape de chromatographie. Justifiez votre choix
- Dessinez schématiquement le chromatogramme correspondant. N'oubliez pas les différentes étapes du processus, dessinez le signal du détecteur ainsi que le gradient d'élution

PS : *Escherichia coli* n'est pas capable de sécréter les protéines qu'elle produit vers le milieu de fermentation

*Using an E. coli BL21 (DE3) strain I produced a recombinant protein comprising a (His)₆ protein tag (a His-tag, for short). My protein has a molecular weight of 72 kDa and an isoelectric point of 5.2. The purification process must include a chromatography step with a 30 mM phosphate buffer, pH 7.0, as the mobile phase for column loading. I have four resins available: a Capto™ **Q** resin, a Capto™ **S** resin, a Capto™ **Phenyl** resin and a **Ni Sepharose™ IMAC** resin.*

- Starting from the bioreactor, propose a sequence of unit operations (including the above-mentioned chromatography step) that will lead to the purified protein*
- Select the resin that you think is the most appropriate for the chromatography step. Justify your choice*
- Draw schematically the corresponding chromatogram. Do not forget the different steps of the process, draw the detector signal and the elution gradient.*

PS: Escherichia coli is not able to secrete the proteins it produces into the fermentation medium

A large rectangular area with horizontal dotted lines for writing. The area is bounded by a solid black line on the top, bottom, and sides. The interior is filled with horizontal dotted lines, providing a space for handwritten answers.

Question 3 Penicillin at low pH**10 Pts**

La pénicilline G est extraite d'une phase aqueuse vers une phase organique (acétate d'isoamyle) à des valeurs de pH acides où la molécule se dégrade selon une cinétique de premier ordre. Un milieu de fermentation acidifié a dû attendre 2 heures à 10 °C avant de pouvoir être extrait, et on a pu y mesurer la cinétique de dégradation de la pénicilline. Le tableau 3 ci-dessous donne les résultats avec la concentration de pénicilline résiduelle [P] en fonction du temps.

- Déterminez la constante de vitesse k de la dégradation de la pénicilline
- En quelles unités s'exprime la constante k ?
- Quel était le pH du milieu pendant le stockage ? (aidez-vous du graphe de la Figure 3)
- Au fait, pourquoi extrait-on la pénicilline à des pH aussi bas si cela cause sa dégradation ?

Penicillin G is extracted from an aqueous phase to an organic phase (isoamyl acetate) at acidic pH values where the molecule degrades according to first order kinetics. An acidified fermentation medium had to wait for 2 hours at 10°C before it could be extracted, and the degradation kinetics of penicillin could be measured. Table 3 below gives the results with the concentration of residual penicillin [P] as a function of time.

- Determine the rate constant k for the degradation of penicillin*
- What are the measuring units of the constant k ?*
- What was the pH of the medium during storage? (use the graph in Figure 3)*
- By the way, why is penicillin extracted at such low pH if it causes its degradation?*

Table 3 : Degradation kinetics of penicillin at 10 °C

t [h]	0	0.5	1.0	1.5	2.0
[P] [g/L]	45.0	42.8	40.7	38.7	36.8

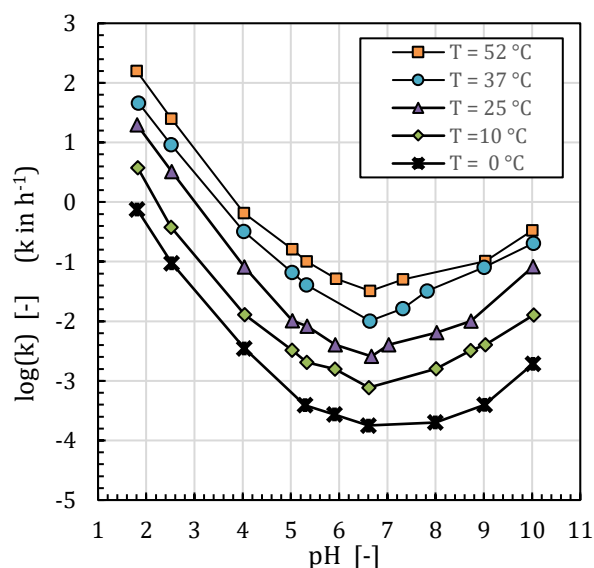


Figure 3: log of 1st order rate constant k of penicillin G degradation as a function of pH and temperature.

Source: A. Kheirulomoon et al., *Process Biochemistry* 35, 205-211 (1999)

A large rectangular area with horizontal dotted lines for writing. The area is bounded by a solid black line on the top, bottom, and sides. The interior is filled with horizontal dotted lines, providing a space for handwritten answers.

Question 4 Production d'insuline / Insulin production

5 Pts



- a) Quel changement majeur a été apporté par les firmes Genentech et Eli Lilly à la fin des années 1970 concernant la production d'insuline pour le traitement du diabète ?
- b) En quoi consistait l'ancien mode de production et quels en étaient les inconvénients majeurs ?
- a) *At the end of the 1970s, which breakthrough was introduced by companies Genetech and Eli Lilly in the production of insulin for the treatment of diabetes?*
- b) *How was it produced earlier and which were the main drawbacks of this approach?*

Source : www.humulin.com, 2019 07 02

[illegible]

Question 5 Renaturation / Refolding**5 Pts**

La renaturation à partir d'une solution concentrée de protéines donne généralement de mauvais rendements.

- Expliquez les raisons de cette situation (faites un dessin ou un schéma si vous le jugez nécessaire)

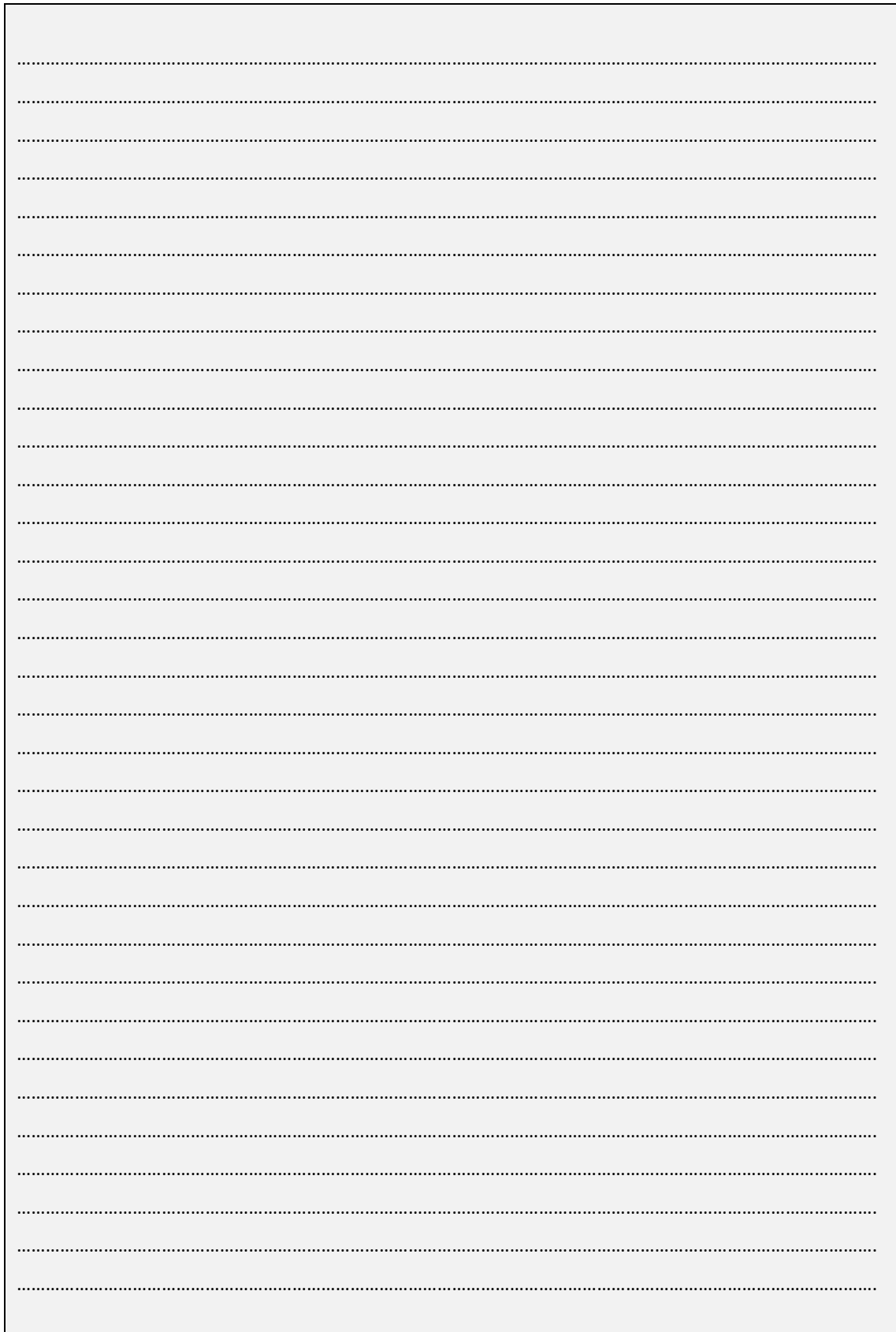
Refolding from a highly concentrated solution of denatured protein usually results in poor yields.

- *Explain why, using schemes or drawings if you see fit*

Question 6 Modern trends inDSP**5 Pts**

- a) Expliquez brièvement ce qu'est le **downstream bottleneck**
- b) Discutez de quelle(s) manière(s) chacune des techniques ci-dessous pourrait contribuer à réduire l'impact du downstream bottleneck et augmenter la productivité ?
- Chromatographie sur monolithe
 - SMB – Simulated Moving Bed Chromatography
 - ISPR – *In Situ* Product Recovery

- a) *Briefly explain what the **downstream bottleneck** is about.*
- b) *Discuss in which way(s) each of the techniques below could contribute to reduce the impact of the downstream bottleneck and improve productivity?*
- *Monolith chromatography*
 - *SMB - Simulated Moving Bed Chromatography*
 - *ISPR - In Situ Product Recovery*

A large rectangular area with horizontal dotted lines for writing. The area is bounded by a solid black line on the top, bottom, and sides. The interior is filled with horizontal dotted lines, providing a space for handwritten answers.

Question 7 Membranes, membranes membranes ...**5 Pts**

Lors de filtrations sur membrane, on doit toujours lutter contre la pression osmotique. Comment se fait-il alors qu'en filtrant le même milieu de fermentation clarifié sur des membranes de microfiltration, d'ultrafiltration, de nanofiltration ou d'osmose inverse on ait besoin d'appliquer des pressions transmembranaires très différentes de 1, 5, 20 et 80 bar respectivement ?

In membrane filtrations, osmotic pressure must always be countered. Why is it then that when filtering the same clarified fermentation medium on microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration or reverse osmosis membranes one needs to apply very different transmembrane pressures of 1, 5, 20 and 80 bar respectively?

Question 8 Concentration of a protein**10 Pts**

J'ai 50 L d'une fraction éluée d'une colonne d'affinité et contenant 2.5 mg/mL d'un fragment d'anticorps de poids moléculaire 75 kDa. J'ai réduit ce volume à 5 L par ultrafiltration, et la concentration finale d'anticorps dans le rétentat était de 19.86 mg/mL.

- a) Quel est le facteur de rétention R de ma protéine-cible ?
- b) Quelle fraction de mon produit ai-je perdue au cours de l'étape de concentration ?
- c) Pouvez-vous estimer le seuil de coupure nominal (NMWC) de la membrane utilisée ?

I have 50 L of a fraction eluted from an affinity column and containing 2.5 mg/mL of an antibody fragment with a molecular weight of 75 kDa. I reduced this volume to 5 L by ultrafiltration, and the final antibody concentration in the retentate was 19.86 mg/mL.

- a) What is the retention factor R of my target protein?*
- b) What fraction of my product did I lose during the concentration step?*
- c) Can you estimate the nominal molecular weight cut-off (NMWC) of the membrane I used?*
