

УДК 57.576.08

Панкратова Н.А., Табакова Д.А., Гусева Е.В.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ E-COLI В РЕАКТОРЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Панкратова Наталья Александровна: студентка 4 курса факультета информационных технологий и управления РХТУ им. Д.И. Менделеева, Россия, Москва, e-mail: natali_p999@mail.ru

Табакова Дарья Александровна: студентка 1 курса магистратуры факультета информационных технологий и управления РХТУ им. Д.И. Менделеева, Россия, Москва

Гусева Елена Владимировна: к.т.н., доцент кафедры кибернетики химико-технологических процессов РХТУ им. Д.И. Менделеева, Россия, Москва

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125047, Москва, Миусская пл., д. 9

В настоящее время огромное внимание уделяется использованию модифицированной E.coli для получения рекомбинантных белков. В данной статье рассмотрен процесс культивирования E.coli в реакторе периодического действия. Рассмотрено влияние параметров процесса на культивирование.

Ключевые слова: культивирование; Esherichia coli; рекомбинантный белок; биореактор периодического действия

INVESTIGATION OF E-COLI CULTIVATION IN BATCH BIOREACTOR

Pankratova N.A., Tabakova D.A., Guseva E.V.

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

At present time much attention is paid to the use of modified E. coli for the production of recombinant proteins. This article considers the process of E.coli cultivation in batch reactor. The influence of parameters on the cultivation process is considered.

Key words: cultivation; Esherichia coli; recombinant protein; batch bioreactor

Кишечная палочка (лат. *Escherichia coli*) является грамотрицательной палочковидной бактерией и относится к семейству энтеробактерий (лат. *Enterobacteriaceae*) факультативных анаэробов. Это один из самых известных микробов в мире, и он включает в себя различные виды штаммов. Например, комменсальные E.coli безвредны и широко распространены в природе. Кроме того, они также являются нормальными жителями желудочно-кишечного тракта, помогая синтезировать витамины «К», «В», и участвуют в переваривании пищи и всасывании. Другие штаммы вызывают инфекции, которые приводят к заболеванию кишечника (энтеропатогенные, энтеротоксигенные и др. *E.coli*). Существуют патогенные организмы, вызывающие заболевания вне кишечного тракта (экстраинтестинальные кишечные палочки) [1]. Семейство *Enterobacteriaceae* включает в себя как подвижные (жгутиконосные), так и неподвижные (безжгутиковые) роды палочковидных бактерий. Данный род назван по имени немецкого педиатра Теодора Эшериха (Theodor Escherich). Она живет в кишечнике человека и животных и выполняет важные функции в иммунной системе. Эта бактерия обладает возможностью получать энергию двумя способами: с помощью дыхания и путем ферментации с образованием смеси органических кислот. Она служит индикатором фекальных загрязнений, например, в воде. Благодаря своим способностям к различным способам метаболизма бактерии могут адаптироваться к самым разным условиям жизни.

В настоящее время огромное внимание уделяется использованию модифицированной *E.coli* для получения рекомбинантных белков [2, 3]. Экспериментальные исследования по культивированию рекомбинантной *E.coli* были проведены в Научно-исследовательском институте имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи (Москва).

Экспериментальная установка представляет собой ферментер периодического действия рабочим объемом 20 литров фирмы Bioengineering (Швейцария) (рис. 1). Ферментер оснащен магнитной мешалкой с регулируемым числом оборотов, датчиками температуры, pO_2 , pH и уровня пены, портами для отбора проб и донным клапаном для отбора готового продукта. К ферментеру подведены линии греющего пара, воды, сжатого воздуха, который проходит через два стерилизующих воздушных фильтра с клапанами. Перистальтические насосы служат для поддержания определенного уровня pH, засева и подачи подпитки. Перемешивание осуществляется мешалкой с двумя крыльчатками с шестью лопастями каждая. Аэрация производится при помощи барботера, который обеспечивает оптимальное распределение воздуха. В ферментере на стенках закреплены четыре отбойники для повышения эффективности перемешивания. В процессе культивирования проводится автоматический непрерывный контроль процесса при помощи программного обеспечения BioSCADA.



Рис. 1 Ферментер периодического действия NLF (компания Bioengineering, Швейцария), (б) - Геометрические размеры и конструкция мешалки, (мм)

В качестве питательной среды была использована среда LB (Luria-Bertani), состоящая из хлористого натрия, триптона, дрожжевого экстракта, KN_2PO_4 и $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, растворенных в очищенной воде. Среда была приготовлена в объеме 19 л и стерилизована непосредственно в ферментере перед засевом биосуспензии.

Стерилизация ферментера осуществляется автоматически (для этого необходимо выставить нужные параметры) при $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 45 минут. Параллельно с ферментером стерилизуются фильтры входящего и выходящего воздуха.

В качестве пеногасителя использовали разбавленную в 10 раз эмульсию силиконового пеногасителя. В процессе культивирования происходила периодическая подпитка раствором глюкозы. Кроме того, в ферментёр добавляли раствор антибиотика перед засевом.

Процесс культивирования *Escherichia coli* проводился при температуре 37°C , аэрации 20,0 л/мин. Начальные значения pH среды и скорости перемешивания составили, соответственно, 7,2 и 250 об/мин.

Продолжительность процесса составила 8 часов. Время окончания процесса определялось по значению оптической плотности среды (рис.2). Посевную среду подавали с помощью перистальтического насоса. Значение pH среды поддерживалось автоматически по заданной программе, используя 10% раствор аммиака, с помощью перистальтического насоса.



Рис. 2. Зависимость DO *Escherichia coli* от времени культивирования

Кислородный датчик определяет концентрацию растворенного кислорода, если она ниже 30%, скорость перемешивания увеличивают на 50 об/мин. Пробы для определения оптической плотности отбирали каждые 30 минут и измеряли на спектрофотометре марки ФОТОМЕТР КФК-3 в кювете при длине волны 630 нм. В качестве нулевой пробы была использована питательная среда, разбавленная водой очищенной в 10 раз (объем пробы 2 мл). Для измерения оптической плотности проба культуральной жидкости также была разведена водой очищенной в 10 раз (объем пробы 2 мл). Процесс культивирования продолжался до прекращения прироста оптической плотности в двух последовательных пробах через час. После этого культуральная жидкость передается на концентрирование. Время ее хранения не должно превышать 24 часа.

Для определения количества накопленного внутриклеточного белка были отобраны пробы (20 мл) культуральной жидкости из ферментера. Пробы центрифугировали при 14000 об/мин, собранный осадок был заморожен в морозильной камере при минус $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ для дальнейшего проведения анализа наличия белка с помощью электрофореза.

Список литературы

1. Решедько Г.К. *Escherichia coli* как возбудитель зоокомиальных инфекций в ОРИТ/ Решедько Г.К., Щербников А.Г., Морозов М.В., Решедько Л.А. // Болезни и возбудители. – 2011. – Т.13, № 4. – Стр. 314-321.
2. Rosano G.L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges/ Rosano G.L., Ceccarelli E.A. // *Frontiers in Microbiology*. – 2014. – 17 p.
3. Baolei Jia and Che Ok Jeon. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives/ Jia B., Jeon C.O. // *Open Biology*. – 2017. – 17 p.