

# Исследование влияния аэрации на динамику роста, изменение концентрации кислорода и pH среды аэробной бактерии *E. coli* BL21, культивируемой в одноразовом биореакторе RTS-8 PLUS. Часть 1

А. Кигитович, С. Дьяченко, В. Сарычев, А. Шевчик, У. Балодис, П. Банковский, А. Жуков, Е. Валявин, Ю. Галимбовская, И. Банковский\*

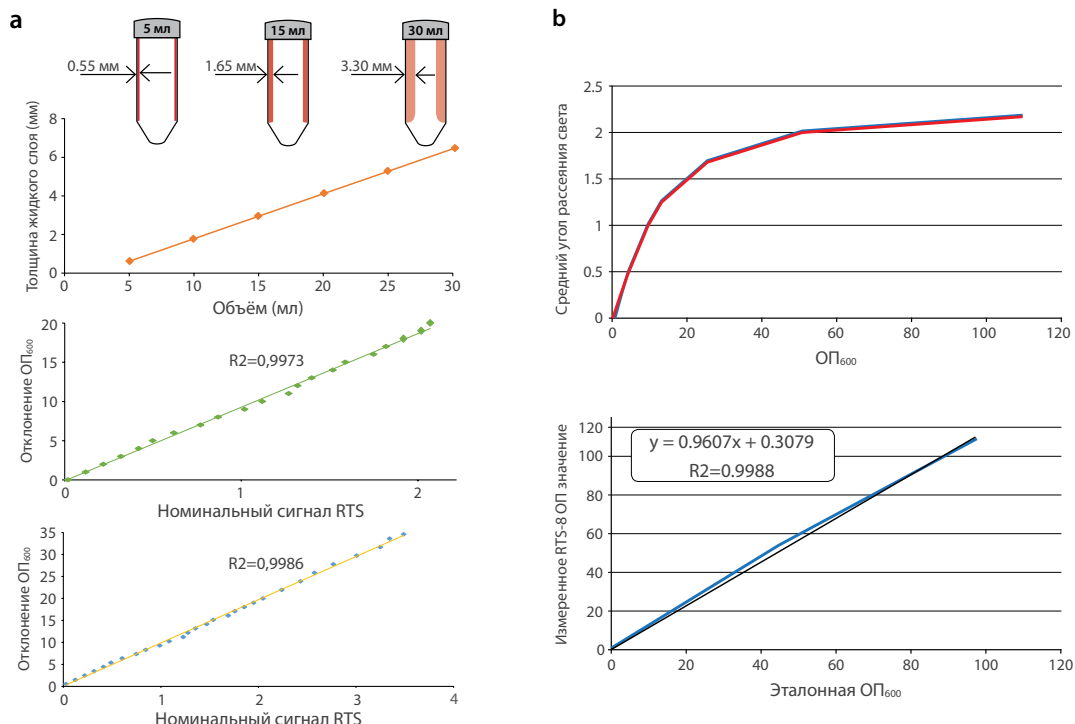
\* Автор-корреспондент, E-mails: science@biosan.lv, igor@biosan.lv

**Ключевые слова:** технология RTS; биореактор; RTS-8; рассеивание света;  $OP_{600}$ ; неинвазивный мониторинг роста; турбидиметрия; флуоресценция; затухание флуоресценции; производство рекомбинантного белка; OTR.

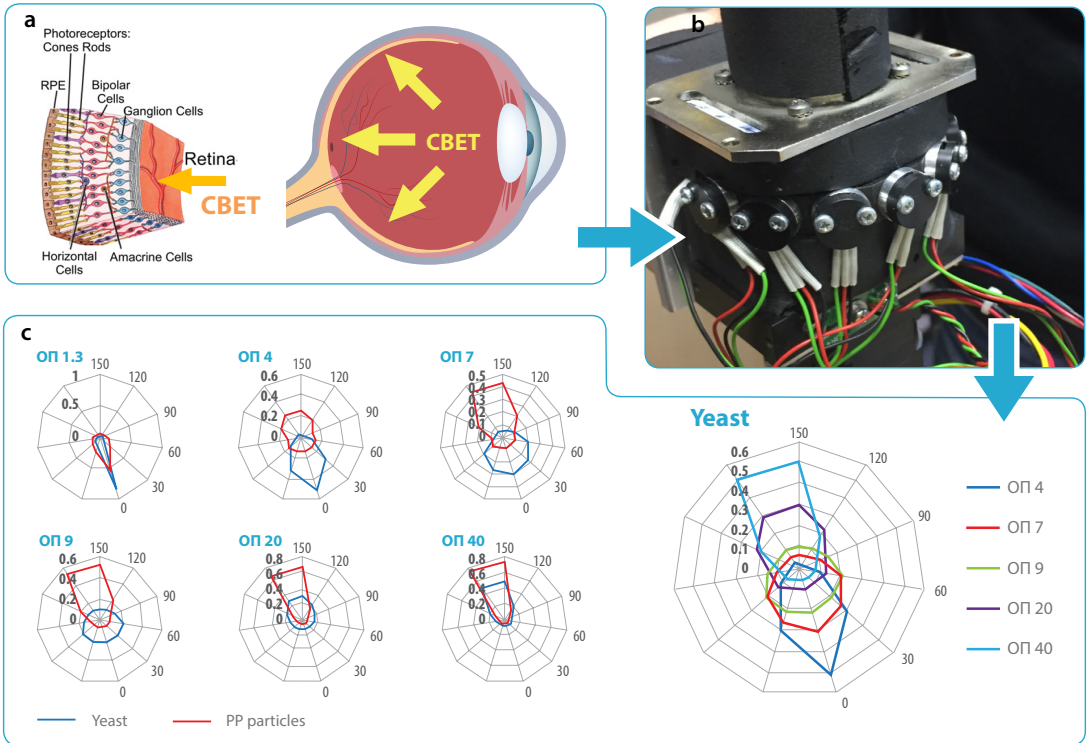
## ВВЕДЕНИЕ

Одноразовые биореакторы с неинвазивными датчиками для измерения и мониторинга концентрации клеток,  $O_2$  и pH находятся в трендах развития биотехнологий. Biosan разработал линию одноразовых биореакторов RTS, которые, в отличие от эксцентричных механизмов распределения питательной среды в колбах Эрленмейера, присущих шейкерам, работают по принципу равномерного центробежного распределения питательной среды, основанного на вращении пробирки вокруг своей оси с изменением направления вращательного движения, что обеспечивает высокоэффективное смешивание и насыщение кислородом для аэробного культивирования.

Принцип смешивания RTS имеет несколько преимуществ, описанных ранее [1], а именно: автоматическая балансировка, пеногашение, одноразовая, компактная конструкция и другие, но одним из наиболее важных нюансов является то, что, благодаря индивидуальному принципу вращения и термостатированию каждой пробирки биореактора, могут применяться разнохарактерные условия поддержания температуры (от 4 до 70 °C) и условия аэрации от анаэробных до аэробных.



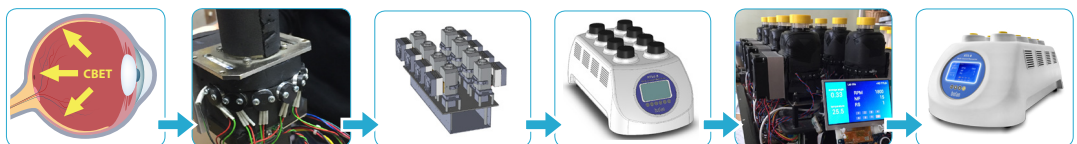
**Рисунок 1а-б:** Принципиальные различия в измерении  $OP_{600}$  и рассеивания света в устройствах RTS, RTS-U и RTS-8.



**Рисунок 2 а-с:** а) Структура глаза; б) Фотодиоды по периметру Falcon-пробирки; в) Расчет среднего косинуса отклонения света, регистрируемое датчиками

Измерения в биореакторах RTS-1/RTS-1С выполняются путем фотометрического анализа  $ОП_{850}$  в тонком слое суспензии, образованном вращением пробирки вокруг собственной оси с достаточно линейным участком калибровочной кривой концентрации клеток  $ОП_{850}$  (рис. 1а). В приборах RTS-8 и RTS-8 Plus измерения выполняются путем фотометрического анализа  $ОП_{600}$  в невращающейся пробирке. Чтобы это произошло, проводится многосторонний анализ индикатрисы, то есть вероятности угла рассеивания света в зависимости от концентрации клеток, которая затем линейризуется с помощью математической обработки (рис. 1б). Это является инновационным решением для неинвазивного определения концентрации клеток в невращающейся одноразовой Falcon-пробирке биореактора (оптический путь ~30 мм) путем оценки вероятности среднего угла отклонения падающего светового луча, что позволяет правильно измерять  $ОП_{600}$  в диапазоне от 0 до 100. Как видно из рис. 2с, поведение светового луча зависит от концен-

трации клеток микроорганизма, и чем она выше, тем больше угол отклонения падающего светового луча от нуля (угол отклонения прозрачной жидкости обычно составляет  $0^\circ$ ). Если пробирки с суспензией клеток расположить вокруг периметра фотоприемников (рис. 2б), то допустимый угол рассеивания света можно зафиксировать в виде наибольшего сигнала на конкретном фотоприемнике. Поскольку отклонение светового луча имеет тенденцию смещаться от 0 до  $180^\circ$  по мере возрастания концентрации клеток, то, построив калибровочную кривую зависимости индикатрисы от концентрации клеток, мы можем контролировать рост культуры бактериальных клеток в невращающийся пробирке диаметром 30 мм в довольно широком диапазоне клеточной концентрации, позволяющей эффективно измерять анаэробные и микроаэрофильные культуры по сравнению с RTS-1, где измерение выполняется во время вращения пробирки при 2000 об/мин, что может отрицательно влиять на жизнеспособность культур с непереносимостью кислорода.



**Рисунок 3:** Цикл разработки RTS-8 Plus

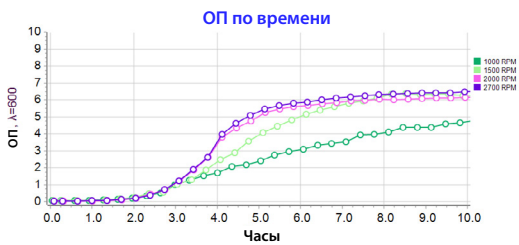
Этот инновационный принцип измерения позволил развить возможности неинвазивного измерения и мониторинга жизненно-важных параметров биопроцесса ферментации, таких как  $O_2$  и pH питательной среды, путем фиксации дополнительных одноразовых флуоресцентных датчиков pH и  $O_2$  (preSens, Германия) на внутренней стенке одноразовой биореакторной Falcon-пробирке и интегрирования специальной оптики в RTS-8 Plus, чтобы иметь возможность обнаруживать и измерять эти сенсорные позиции. Таким образом, в сочетании с нашим измерительным раствором ОП<sub>600</sub>, можно было

## ФОРМУЛИРОВКА ЗАДАЧИ

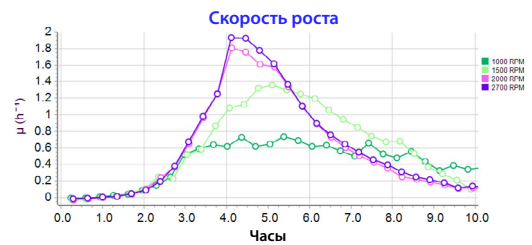
Параллельно с вышеупомянутой оптикой в биореакторе RTS-8 Plus каждая пробирка снабжена индивидуальным механизмом, который выполняет возвратно-прямое вращение (Reverse Spin) с заданной скоростью. Возникающие в результате центробежные силы мгновенно и равномерно распределяют питательную среду как по горизонтали вдоль трубки, так и по вертикали вдоль трубки, обеспечивая таким образом заданную площадь межфазного раздела между воздухом и жидкостью пропорционально интенсивности аэрации. Но помимо этих процессов, определяющих распределение массы, существует еще один барьер диффузии кислорода в пробирку – 1) наличие отверстий в крышке, 2) их количество, 3) их диаметр, 4) расположение отверстий и 5а) материал, пропускающий кислород, 5б) оксид углерода, 5с) другие газы, связанные с процессом. Если мы составим уравнение баланса для этих компонентов, а затем опишем общее уравнение распределение массы кислорода в воздухе в питательную среду во вращающейся одноразовой Falcon-пробирке биореактора, может потребоваться большая, тщательная работа над определением каждого коэффициента процесса. Мы пошли экспериментальным путем в надежде математически описать эти процессы в будущем. Ранее эти зависимости (объем питательной среды и интенсивность вращения) были тщательно изучены и проанализированы с точки зрения скорости роста модельных микробов (*E. coli*, *P. Pastoris*) и на основе известной прямо пропорциональной зависимости скорости роста от аэрации, а также на законах диффузии Фика и газового закона Генри, мы сократили понимание процесса распределения массы в нашем биореакторе до двух очевидных правил, которые: 1. общее распределение кислорода пропорционально к поверхности, к объему, таким образом, уменьшая рабочий объем, скорость распределения массы газа-жидкости достигает более высоких значений, 2. чем выше интенсивность вращения,

реализовать параллельный биопроцесс на единой платформе с независимыми условиями - 1) аэрация, 2) контроль температуры, 3) ОП<sub>600</sub>, 4) pH питательной среды и 5)  $O_2$ . Поскольку 8 независимых биопроцессов могут выполняться на одной платформе параллельно, и поскольку на борту каждого биореактора, помимо 8 многоугольных датчиков ОП<sub>600</sub>, могут быть установлены датчики pH и  $O_2$ , эта конструкция получила сокращенное название Reverse Tube Spinner Plus или RTS-8 Plus (рис. 3). В данной статье мы впервые представляем экспериментальные данные, полученные для биореактора RTS-8 Plus.

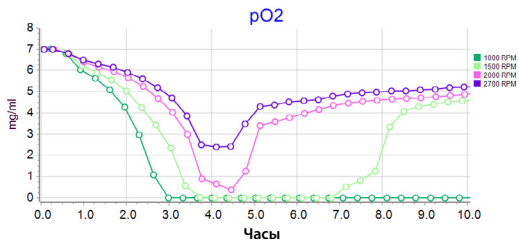
тем быстрее и эффективнее клеточная суспензия распространяется по внутренним стенкам Falcon-пробирок, таким образом, скорость распределения массы газ-жидкости более высокая. Ранее нами была показана зависимость скорости роста клеток *E. coli* и *P. pastoris* от рабочего объема питательной среды и интенсивности вращения одноразовых биореакторных Falcon-пробирок по сравнению с встряхиваемыми колбами [1]. Оказалось, что наиболее интенсивный рост происходит при рабочем объеме 5 мл. Однако, как это влияет на  $O_2$  и pH среды, для биореакторов RTS не исследовалось. Мы взяли эти закономерности за основу наших дальнейших исследований. В этом отчете мы представляем уже не косвенные экспериментальные данные о влиянии аэрации как на скорость роста, так и на выход ОП<sub>600</sub>, а на параметры изменения  $O_2$  и pH питательной среды в процессе аэробной ферментации. Эти данные получены для четырех режимов аэрации: 1 и 2 режимы соответствуют интенсивной аэрации и высокой скорости переноса кислорода (OTR). Эти режимы обеспечены вращением пробки при скоростях 2000 и 2700 об/мин; 3–4 режимы соответствуют полуанаэробной и практически микроаэрофильной аэрации с низкими значениями OTR, обеспеченными вращением пробирки при скоростях 1000 и 1500 об/мин. Хотя из предыдущих экспериментов [1] известно, что рабочий объем 5 мл является наиболее эффективным с точки зрения аэрации, минимальный рабочий объем для правильной работы оптической системы в RTS-8/RTS-8 plus составляет 7,5 мл, для использования меньших рабочих объемов и возможности измерения ОП рекомендуется использовать системы RTS-1/RTS-1C. В этом эксперименте был выбран рабочий объем 10 мл, потому что в прошлом он являлся рекомендованным условием для аэробного культивирования и оказался достаточным в предыдущих экспериментах с небогатыми питательными средами, такими как среда LB.



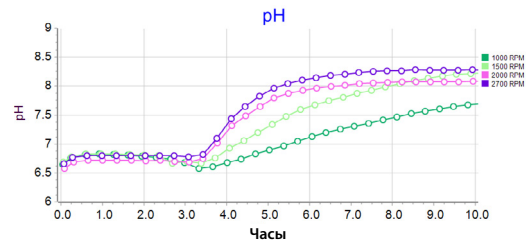
**Рисунок 4:** Влияние интенсивности вращения на динамику роста клеток с использованием питательной среды LB.



**Рисунок 5:** Влияние интенсивности вращения на скорость роста ОП<sub>600</sub>



**Рисунок 6:** Влияние интенсивности вращения на динамику изменения концентрации кислорода в суспензии клеток.



**Рисунок 7:** Влияние интенсивности вращения на динамику изменения pH в среде культуры.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Одноразовые Falcon-пробирки биореактора были заполнены питательной средой и закрыты навинчивающимися крышками со специальными дыхательными отверстиями, которые закрывались мембраной, полупроницаемой для кислорода. Затем эти пробирки на 50 мл помещали в RTS-8 Plus, и процесс ферментации запускался синхронно.

Рабочий объем был 10 мл, температура культивирования 37 °C, интервалы измерения (MI) датчиков каждые 20 минут, время возвратного вращения (RST) изменения вращения пробирки 1 раз в секунду, интенсивность вращения трубок производилось согласно подписям в легенде (рис. 4). Интенсивность аэрации изменяли путем изменения скорости вращения или угловой скорости ( $\omega$ ) пробирки биореактора в дискретных диапазонах  $\omega=1000$  об/мин (зеленая кривая),  $\omega=1500$  об/мин (светло-зеленая),  $\omega=2000$  об/мин (розовая кривая) и  $\omega=2700$  об/мин (фиолетовая кривая).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ДИСКУССИЯ

Рассмотрим полученные данные о зависимости изменения скорости роста, потребления кислорода и pH питательной среды от интенсивности вращения Falcon-пробирки. Из полученных данных (рис.4) видно, что увеличение интенсивности вращения Falcon-пробирки

приводит к ускорению скорости роста оптической плотности (ОП<sub>600</sub>) и, следовательно, клеток, концентрация которых соответствует значениям ОП<sub>600</sub>. Наибольшая разница в ОП<sub>600</sub> между всеми вариантами скорости вращения наблюдается через 4–5 часов культивирования, а затем, через 10 часов, ОП<sub>600</sub> всех вариантов сравнивается в диапазоне 6,0–6,5 ОП<sub>600</sub>, что является максимально возможным размером выработки биомассы клеток *E. coli* BL21 с использованием среды LB.

А теперь рассмотрим полученные данные в координатах скорости роста ОП<sub>600</sub> в зависимости от времени ферментации (Рис. 5).

Из рис.5 видно, что возрастание  $\omega$  от 1000 до 1500, а затем 2000 об/мин приводит на каждом шаге к 0,7-кратному увеличению максимальной скорости роста ОП<sub>600</sub> (значение выражается в ОП<sub>600</sub> ч<sup>-1</sup>). Дальнейшее возрастание от  $\omega$  2000 об/мин до  $\omega$  2700 об/мин не приводит к увеличению скорости роста. Следовательно, в одной среде LB при 10 мл рабочего объема биореактора условия аэрации, достигаемые при  $\omega$  2000–2700 об/мин для этого штамма, не являются ограничивающими. В то же время, диапазон ниже  $\omega$  2000 об/мин приводит к условиям ограничения кислорода. Более того, данные, представленные на рис. 6, подтверждают упомянутые выше наблюдения.

**Таблица 1:** Зависимость  $OP_{600}$ , при которой наблюдается гипоксия, взаимности от интенсивности вращения пробирки.

$\omega$ (об/мин)	$\mu_{\text{макс}}$	$OP_{600}$
<b>2700</b>	1.95	4
<b>2000</b>	1.8	3.75
<b>1500</b>	1.35	2.5
<b>1000</b>	0.7	1.75

Из данных, представленных на рис. 6, видно, что при переходе культуры в логарифмическую фазу роста наблюдается увеличение интенсивности потребления кислорода из среды, расходуемой на аэробную генерацию АТФ. Если при условиях интенсивной аэрации (соответствующей  $\omega=2000$  об/мин и  $\omega=2700$  об/мин) культура клеток не впадает в гипоксический шок, то при интенсивности аэрации, соответствующей  $\omega$  от 1500 и ниже, наблюдается гипоксия, что значит, скорость переноса кислорода (OTR) ниже, чем интенсивность скорости поглощения кислорода (OUR) культурой. Интересно отметить, что этот переход наблюдается при  $OP_{600}$  в среде соответствующей значениям, приведенным в таблице 1.

Таблица 1 представляет собой практический интерес и может служить ориентиром для масштабирования биопроцесса. В дальнейшем мы предлагаем более детальное исследование зависимости распределения массы кислорода от интенсивности вращения пробирки с целью получения алгоритма снижения токсического действия гипоксии при ферментации.

Теперь рассмотрим, что происходит с pH питательной среды при ферментации и как на этот параметр влияет интенсивность аэрации.

Необходимо отметить два участка зависимости pH от времени ферментации – 1. стабильное сохранение pH в исходном диапазоне pH 6,8, 2. ощелачивание питательной среды до pH 8,3 с момента ограничения оксигенации. Из полученных данных (рис. 7) следует, что изменение микроорганизмами pH среды не является реакцией на ограничение кислорода (гипоксию), а является результатом другого процесса, не связанного с аэробными процессами. Поскольку источником углерода для цикла трикарбоновых кислот, как правило, являются кетокислоты, образующиеся в результате дезаминирования и дезамидирования аминокислот, присутствующих в LB (триптолитический гидролизат молочного белка казеина), то становится понятным, что касается ощелачивания питательной среды до pH 8,3 - точка сдвига равновесия аммиачного раствора  $NH_4OH$  в сторону газообразного аммиака  $NH_3$  после 4-5 часов ферментации.

## ВЫВОДЫ

В этом отчете мы представили экспериментальные данные, отражающие влияние интенсивности аэрации на динамику роста, скорость роста, изменение потребления кислорода и изменение pH питательной среды, полученные с помощью RTS-8 Plus. Неинвазивное многоугловое измерение  $OP_{600}$  на основе вероятности отклонения угла рассеивания света в сочетании с неинвазивным измерением и мониторингом  $O_2$  и pH, реализованным в инновационных разработках Biosan и preSens, Германия, является эффективным в измерении и наблюдении этих параметров во время параллельных процессов ферментации. На основании полученных данных можно судить о перспективах использования одноразовых параллельных биореакторов RTS-8 Plus с возможностью выполнения параллельного биопроцесса с неинвазивным измерением и наблюдением концентрации клеток, pH и  $O_2$ . Данные, полученные с помощью этого уникального и инновационного устройства, могут быть использованы для дальнейшего масштабирования биопроцесса на других типах биореакторов, поскольку полученные результаты дают полное представление о том, что происходит с динамикой распределения массы наиболее важного ограничивающего субстрата – а именно кислорода в процессе аэробного культивирования.

## ИСТОЧНИКИ

[1] В. Банковский и другие (1 мая 2017).

Reverse-Spin® технология перемешивания  
— Инновационный принцип выращивания микроорганизмов.

Исходник: [biosan.lv/rts-tehno](http://biosan.lv/rts-tehno)

