

ПРАКТИЧНЕ ВИКОРИСТАННЯ КОНТРОЛЮ РОЗЧИНЕНОГО КИСНЮ ПІД ЧАС КУЛЬТИВУВАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО ШТАМУ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ВИРОБНИЦТВІ ІНСУЛІНУ ЛЮДИНИ

Орлов В.В.

КПШ ім. Ігоря Сікорського, aravolkiv@gmail.com



Відеодоповідь

Abstract

The article describes the observation of the behavior of dissolved oxygen during the cultivation of *Escherichia coli* cells and the possibility of further selection of components for further insulin synthesis depending on the type of dissolved oxygen behavior during each specific cultivation. The practical use of observing the behavior of dissolved oxygen, depending on its nature, in industrial applications, will increase the yield of the target product and simplify the further synthesis process.

Keywords: dissolved oxygen, fermenter reactor, insulin biosynthesis, total protein, refolded hybrid protein

Вступ. Рекombінантні штами *Escherichia coli* [1] є найбільш вивченими та розповсюджуваними для біосинтезу інсуліну в промисловості.

Біосинтез проводять в промислових реакторах-ферментерах [2] різного об'єму (до 50 м³) і конструкцій з датчиками для контролю температури, тиску, аерації, розчиненого кисню [3] та рН. Датчики контролюють всі головні умови роботи ферментерів. Показники датчиків дозволяють в режимі реального часу слідкувати за процесом біосинтезу [4].

В процесі біосинтезу інсуліну важливою умовою є підтримання стаціонарної стадії росту продуцента, як найбільш активної стадії у процесі біосинтезу (рис. 1).

Прискорення продукування культурою *E.coli* цільового продукту відбувається індукції розчином ізопропіл- β -D-1-тіогалактопіранозиду (IPTG) [5]. Індукцію роблять на 7 – 8 годині, під час фази III (рис. 1).

Метою нашої роботи є встановити вплив концентрації розчиненого кисню [6] у біореакторі на інтенсивність накопичення біомаси *E.coli* і кінцевого продукту.

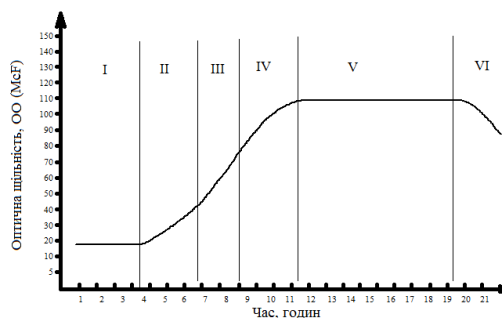


Рис. 1. Типова кінетична крива росту популяції мікроорганізмів в періодичному процесі: I – лаг-фаза(4 години); II – фаза прискорення зростання (3 години); III – фаза експоненціального зростання (2 години); IV – фаза уповільнення зростання (3 години); V – стаціонарна фаза (8 годин); VI – фаза відмирання (2 години)

Матеріали та методи. В роботі використано ферментер періодичного культивування з датчиками контролю перемішуючого пристрою (мішалки),

примусової подачі повітря та подачі розчину підживлення, тиску, рН та температури, що представлений на (рис. 2).

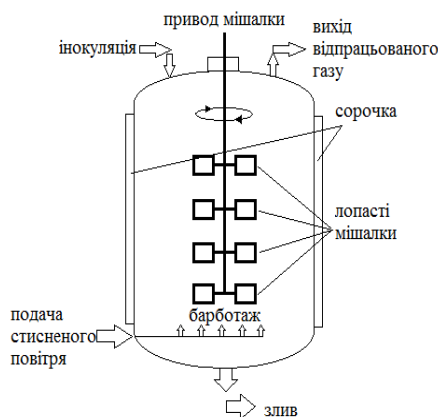


Рис. 2. Ферментер проточної дії з перемішувачем

Культивування [7] проводили при наступних показниках: рН від 6,8 – 7,2; температура 38–42 °С; тиск внутрішніх відпрацьованих газів (ВВГ) 0,8–1,2 бар; діапазон «нормальної» концентрації розчиненого кисню (DO) 20–60 % в ферментері, об'ємом 100 л. Показники температури, рН, розчиненого кисню (DO) та тиску внутрішніх відпрацьованих газів (ВВГ) виводились за на монітор єдиним графіком.

Контроль зростання біомаси йшов вимірюванням оптичної щільності культури денситометром DEN-1В (довжина хвилі 560±15 нм), з цифровим вираженням її в одиницях Мак-Фарланда та обробкою їх за допомогою розрахункових таблиць.

Отриманні в процесі відмивки тільця включення передавались на стадію рефолдінгу [8] з розрахунком загального білку (ЗБ). А виділення рефолдованого гібридного білку (РГБ) [9] проводиться на 14 – 15 годину за температури 12° С та корекції (при необхідності) рН до 11. В розчин додавали 10 % хлорид цинку. В подальшому проводили осадження [10] гібридного білку до чіткого розділення фаз. Після декантації далі проводиться сепарація, а потім ферментативний гідроліз.

Розщеплення ГБ здійснювали трипсином на першій стадії, а в подальшому – карбоксипептидазою. Трипсин та карбоксипептидаза є дуже дорогими компонентами, тому їх витрата впливає на кінцеву ціну продукту загалом.

В цій роботі ми розглянуто результати 10 послідовно проведених експериментальних культивувань (серій).

Результати та обговорення. Процес культивування робочої культури в ферментері супроводжувався зміною всіх перерахованих вище показників. Найбільш показовою, для даної технології отримання інсуліну, є зміна в процесі біосинтезу концентрації DO.

На (рис. 3) наведені графіки культивувань. Поведінку DO можна характеризувати по типам як «змія» (рис. 3a) без різких змін, «їжак» (рис. 3b) без коливань на початку та різкими коливання DO після індукції, «паркан» (рис. 3c) де вже на початкових стадіях росту починались різкі коливання DO.

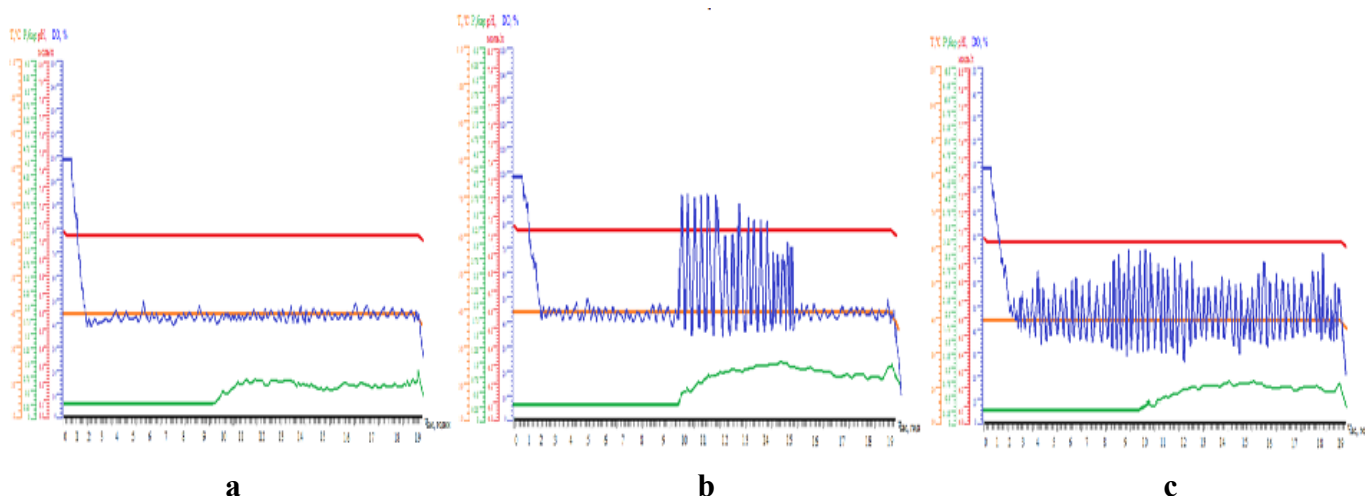


Рис. 3. Динаміка змін показників при культивуванні продуцента і біосинтезу інсуліну. Червона крива – рН середовища, помаранчева крива – температура (за Цельсієм), зелена крива - внутрішній тиск відпрацьованих газів (бар), синя крива – концентрація розчиненого кисню, %

Результати всіх спостережень зведено в (табл. 1). При всіх рівних умовах спостережень, вигляд графічного відображення показнику концентрації DO та є показником кінцевого результату спостережень ЗБ та в подальшому, РГБ. Як видно найбільш продуктивним є «їжак», другим йде «паркан», а потім «змія»

Таблиця 1. Результати культивувань 20 серій культури с різним типом динаміки поведінки розчиненого кисню на графіку культивування

Серія	Час процесу, годин	Час індукції, година культивування	Оптична щільність на момент індукції, ОО	Фінальна оптична щільність, ОО	Тип графіку DO	ЗБ з серії, кг	РГБ з серії, кг.
1	19	7	55	132,0	«їжак»	1,105	0,513
2	19	8	60	129,5	«їжак»	1,087	0,510
3	19	7	57	131,8	«змія»	0,806	0,423
4	19	8	62	129,9	«змія»	0,822	0,433
5	19	8	59	128,5	«їжак»	1,098	0,511
6	19	8	61	131,2	«їжак»	1,086	0,568
7	19	7	56	133,2	«змія»	0,815	0,429
8	19	8	54	127,3	«паркан»	0,995	0,502
9	19	7	55	128,6	«паркан»	1,023	0,505
10	19	8	60	130,4	«змія»	0,836	0,415

Розглянемо також матеріально – кількісний бік. В (табл. 2) зведені результати в залежності від умовних типів поведінки DO під час процесу.

Таблиця 2. Середнє та відсоткове значення отриманого загального та рефолдованого білка гібридного в залежності від умов поведінки концентрації розчиненого кисню під час культивувань

Отриманий ЗБ з серій «їжаків», кг	Отриманий РГБ серій «їжаків», кг	Отриманий ЗБ з серій «змій», кг	Отриманий РГБ серій «змій», кг	Отриманий ЗБ з серій «парканів», кг	Отриманий РГБ з серій «парканів», кг
1,105	0,513	0,806	0,423	0,995	0,502
1,087	0,510	0,822	0,433	1,023	0,505
1,098	0,511	0,815	0,429		
1,086	0,516	0,836	0,415		
Σ ср.зн.= 1,094	Σ ср.зн. = 0,512	Σ ср.зн. = 0,819	Σ ср.зн. = 0,425	Σ ср.зн. = 1,009	Σ ср.зн. = 0,503
100%	100%	75,6%	82,8%	91,6%	98,2%

Висновки. Поведінка DO ще під час процесу дає уяву про кількість цільового білку з кожної серії. Поведінка DO культури по типам «їжак» та «паркан», вигідніша за «змію». Висновок з цього такий, що максимальні показники виходу цільового продукту при «екстремальній» поведінці робочої культури. Цей ефект при промислових об'ємах ведення процесу може принести швидкий вигреш і в отриманій кількості продукту.

Список використаної літератури:

1. Nabih A. Baeshen Mohammed N. Baeshen Abdullah Sheikh Roop S. Bora Mohamed Morsi M. Ahmed Hassan A. I. Ramadan Kulvinder Singh Saini and Elrashdy M. Redwan. Cell factories for insulin production. BioMed Central. 2014. P. 2–3.
2. М.Г. Зінченко Біохімічні і мікробіологічні основи харчової та бродильної техноло-гії : навч. посібник / М. Г. Зінченко. – Харків : НТУ «ХПІ», 2009. С. 55 – 56.
3. Yaoguang Wei Yisha Jiao Dong An Daoliang Li Qiong Wei. Review of Dissolved Oxygen Detection Technology: From Laboratory Analysis to Online Intelligent Detection. MDPI. 2019. P. 2–14.
4. Andreas Schmieder Dirk Weuster-Botz. High-performance recombinant protein production with Escherichia coli in continuously operated cascades of stirred-tank reactors. Society for Industrial Microbiology and Biotechnology. 2017. P. 1022–1025.
5. Luciana Gomes Gabriel Monteiro and Filipe Mergulhão. The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by Escherichia coli Biofilms. MDPI. 2019. P. 2–4.
6. Yongxue Ding You Pan Mark Gibson Troy McSherry and Steven P. Allen. Oxygen Control Strategy and Yield of Recombinant Antibody Fragments Produced in Fermentation. MDPI. 2019. P. 1–3.
7. Hans Peter Sørensen¹ and Kim Kusk Mortensen. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of Escherichia coli. BioMed Central. 2005. P. 4–5.
8. Maria K. Eiberle Alois Jungbauer. Technical Refolding of Proteins: Do we have Freedom to Operate?. Biotechnology Journal. 2010. P. 5–15.
9. Hiroshi Yamaguchi 1. and Masaya Miyazaki. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. Biomolecules. 2014. P. 242–247.
10. Nan Wang Kai Ren Rong Jia Wenting Chen and Ruirui Sun. Expression of a fungal manganese peroxidase in Escherichia coli: a comparison between the soluble and refolded enzymes. BMC Biotechnology. 2016. P. 4–12.