

Тоомас ПААЛМЕ, Калле ТИЙСМА, Тыну ЛУМАН, Анне КАХРУ,
Райво ВИЛУ

УПРАВЛЯЕМОЕ НА ЭВМ ПЕРИОДИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* С ДОБАВЛЕНИЕМ СУБСТРАТА В УСЛОВИЯХ ЛИМИТА ГЛЮКОЗЫ

Периодическое культивирование микроорганизмов с добавлением субстрата позволяет в ряде случаев заметно увеличить выпуск производства аминокислот, антибиотиков и т. д. Теоретические проблемы указанного способа разработаны достаточно детально (Wang и др., 1979; Pirt, 1979; Dunn и др., 1979), однако реализация режимов такого выращивания представляет весьма сложную задачу, особенно в случае полностью автоматизированного исполнения. В настоящей работе реализован один из возможных алгоритмов автоматического управления процессом роста бактерий *Escherichia coli* в периодическом с подпиткой режиме культивирования, используя созданный в ИХБФ АН ЭССР комплекс ферментер-ЭВМ. Особое внимание уделено процедуре автоматического определения конца периодической фазы культивирования.

Материал и методика

В работе использовали бактерии *Escherichia coli* К 12 W 3350. Состав среды выбирали исходя из химического состава культивируемой биомассы. Так 100 г сухой биомассы содержит 12 г азота (N); 1,5 г фосфора (P); 1,6 г калия (K); 0,3 г магния (Mg) и 0,3 г серы (S) (Pirt, 1983).

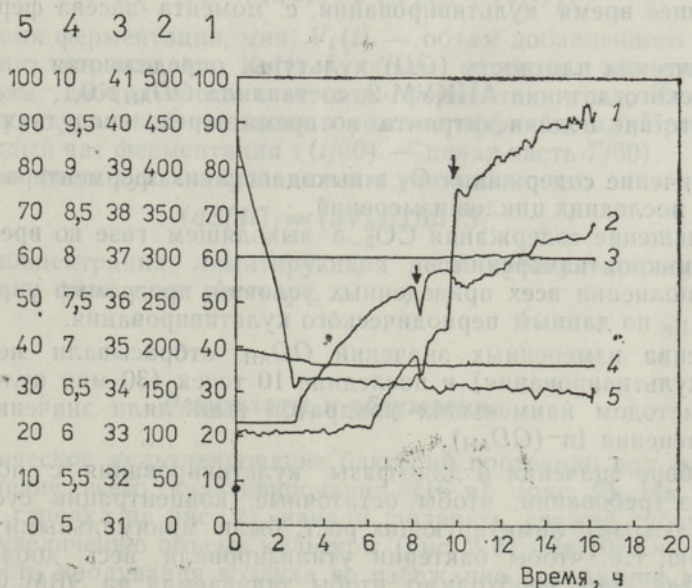


Рис. 1. Изменение автоматически контролируемых параметров во время культивирования *E. coli*: скорость продувания воздуха, л/ч (1); обороты мешалки, об/мин (2); температура, °C (3); pH (4) и рО₂ (5).

Культивирование *E. coli* проводили в среде следующего состава (начальный объем в пересчете на весь объем культуры 3,5 л): NH_4Cl — 4 г, KH_2PO_4 — 6 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 32 г, MgSO_4 — 2 г, глюкоза — 16 г. Количество содержащейся глюкозы и NH_4Cl достаточно для синтеза 8 г сухой бактериальной массы при значении $Y_{XS}=0,5$; количество остальных компонентов соответствует синтезу 100 г сухой бактериальной массы. Исходя из указанного обстоятельства, растущей культуре в фазе подпитки добавляли раствор, содержащий только NH_4Cl (50 г/л), глюкозу (200 г/л) и следующие микроэлементы (мг/л): CaCl_2 — 1000, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 150, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 50, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 10, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 10, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 10.

Измерение адениновых нуклеотидов и морфометрических характеристик культуры с помощью счетчика Культера проводили по методике, описанной А. Кахру и др. (Kahru и др., 1983).

Культивирование бактерий осуществляли при температуре 37°C в автоматизированном комплексе ферментер-ЭВМ, созданном на базе ферментера «Ultraferm-1601» (ЛКБ, Швеция) (Тийсма и др., в печати). рН культуральной жидкости поддерживали автоматически при значении 6,8, добавляя в ферментер раствор КОН. Уровень растворенного кислорода при $p\text{O}_2$ 30%. Контроль параметров проводили через каждые 3 мин (рис. 1).

Все необходимые программы были написаны на языке BASIC.

Описание алгоритма автоматического управления

В алгоритме управления было предусмотрено: а) определение конца фазы периодического культивирования и начала фазы подпитки; б) определение удельной скорости роста (μ_p) во время фазы периодического культивирования, выбор μ для фазы культивирования с добавлением субстрата; в) управление скоростью подачи свежей среды.

Окончание фазы периодического культивирования определяли при выполнении следующих критериев:

1. Текущее время культивирования с момента засева ферментера более 5 ч.

2. Оптическая плотность (OD) культуры, определенная с помощью автоматического датчика АНКУМ-2, составляла $OD_{\text{АН}} > 0,1$.

3. Отсутствие подачи титранта во время трех последних циклов измерений.

4. Увеличение содержания O_2 в выходящем из ферментера газе во время двух последних циклов измерений.

5. Уменьшение содержания CO_2 в выходящем газе во время двух последних циклов измерений.

При выполнении всех приведенных условий, программа управления вычисляла μ_p по данным периодического культивирования.

Из массива измеренных значений $OD_{\text{АН}}$ отбрасывали первые 40 (120 мин культивирования) и последние 10 точек (30 мин культивирования) и методом наименьших квадратов вычисляли значение μ_p по кривой изменения $\ln(OD_{\text{АН}})$.

При выборе значения μ для фазы культивирования с подпиткой исходили из требований, чтобы остаточные концентрации субстратов (NH_4Cl и глюкоза), лимитирующих рост, были минимальными и близкими к нулю, т.е. чтобы бактерии утилизировали весь добавленный субстрат. Для этого необходимо, чтобы задаваемая на ЭВМ удельная скорость роста во время фазы с добавлением субстрата была $\mu < \mu_{\text{max}}$ (μ_{max} — максимальная удельная скорость роста на данной среде). Выбрав $\mu = 0,8\mu_p$, обеспечивается выполнение неравенства $\mu < \mu_p < \mu_{\text{max}}$

(лимитирование углеродом во время подпитки). Теперь можем записать

$$(dX/dt)_t = (d(xV(t))/dt)_t = Y_{XS}(dS/dt)_t = Y_{OD}c(dS/dt)_t, \quad (1)$$

где $(dX/dt)_t$ — прирост биомассы в момент t с начала ферментации; x — концентрация биомассы; $V(t)$ — объем ферментера в момент (t) ферментации; $(dS/dt)_t$ — скорость подачи лимитирующего рост субстрата; Y_{OD} — выход биомассы в пересчете на прирост оптической плотности культуры ($Y_{XS} = cY_{OD}$); c — коэффициент пропорциональности между концентрацией биомассы и оптической плотностью культуры, определенной с помощью датчика АНКУМ-2.

Поскольку

$$(dX/dt)_t = \mu x(t) V(t) = \mu OD_{АН}(t) cV(t), \quad (2)$$

то по формуле (1) и соотношению $\mu = 0,8\mu_p$ получим

$$(dS/dt)_t = (\mu OD_{АН}(t) V(t)) / Y_{OD} = (0,8\mu_p OD_{АН}(t) V(t)) / Y_{OD}. \quad (3)$$

Для определения значения Y_{OD} мы исходили из выражения

$$Y_{XS} = (X_e - X_0)(S_0 - S_e) = cV_0(OD_{АН_e} - OD_{АН_0}) / (S_0 - S_e), \quad (4)$$

где X_e и X_0 — бактериальная масса в ферментере соответственно в конце фазы периодического роста и в момент засева; $OD_{АН_e}$ и $OD_{АН_0}$ — оптическая плотность культуры соответственно в конце фазы периодического роста и после засева в ферментер, S_e и S_0 — общее количество глюкозы соответственно в конце фазы периодического роста и в момент засева в ферментер; V_0 — объем культуры после засева, мл.

Критерии определения момента конца фазы периодического роста выбраны так, чтобы выполнить условие $S_e = 0$. Тогда

$$Y_{OD} = Y_{XS}/c = (OD_{АН_e} - OD_{АН_0}) V_0 / S_0. \quad (5)$$

Значение Y_{OD} было использовано для расчета $(dS/dt)_t$ по формуле (5). Так как в формуле (5) константа c отсутствует, ее значение нами не определялось.

Для определения $V(t)$ мы использовали формулу

$$V(t) = V_0 - [(t/60)V_p + V_t(t) + V_s(t)], \quad (6)$$

где t — время ферментации, мин; $V_t(t)$ — объем добавленного с начала ферментации титранта, мл; $V_s(t)$ — объем раствора, лимитирующего рост глюкозы, добавленного с начала ферментации, мл; V_p — объем образцов культуральной жидкости в режиме оффлайн, мл. Пробы отбирали в каждый час ферментации ($(t/60)$ — целая часть $T/60$).

Во время фазы культивирования мы учитывали, что

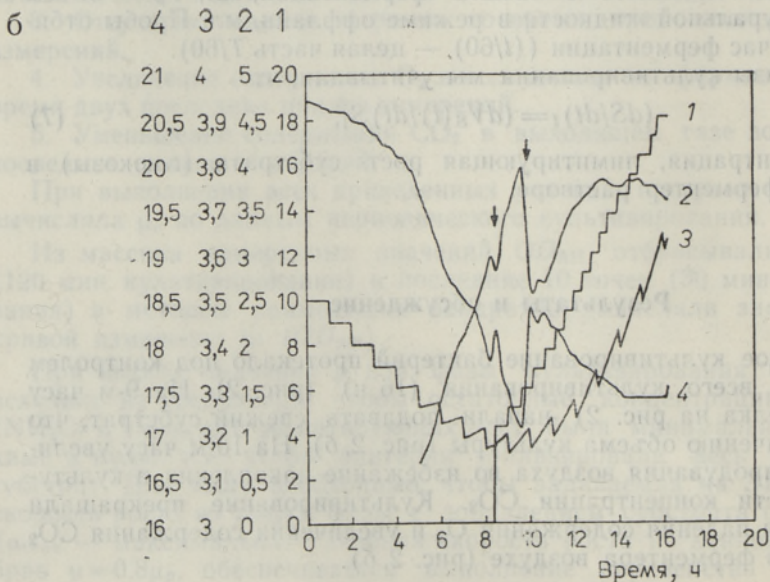
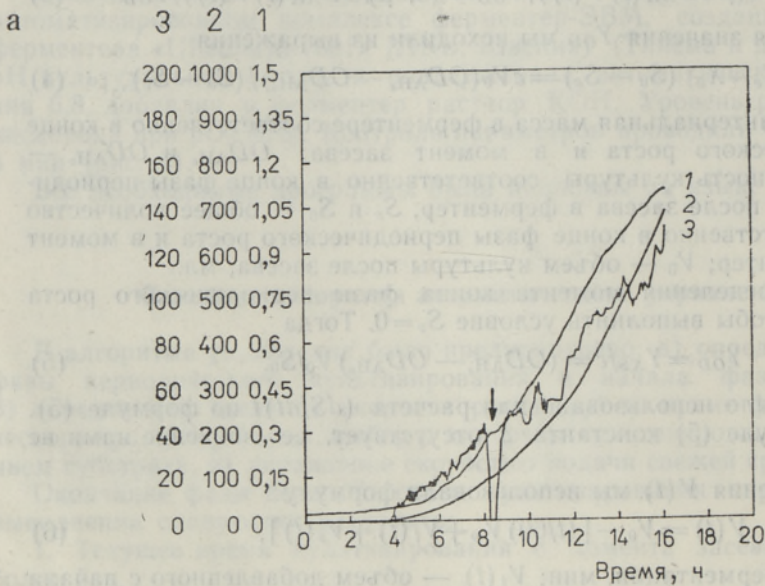
$$(dS/dt)_t = (dV_s(t)/dt) S_1, \quad (7)$$

где S_1 — концентрация, лимитирующая рост субстрата (глюкозы) в подаваемом в ферментер растворе.

Результаты и обсуждение

Периодическое культивирование бактерий протекало под контролем ЭВМ в течение всего культивирования (16 ч) (рис. 2). На 9-м часу опыта (см. стрелка на рис. 2) начали подавать свежий субстрат, что привело к увеличению объема культуры (рис. 2, б). На 10-м часу увеличили скорость продувания воздуха во избежание накопления в культуральной жидкости концентрации CO_2 . Культивирование прекращали после окончания падения содержания O_2 и увеличения содержания CO_2 в выходящем из ферментера воздухе (рис. 2, б).

Конец фазы периодического культивирования был определен на ЭВМ согласно алгоритму управления по приведенным выше критериям, и как видно из рис. 2, определен правильно. Действительно, после 8-часового культивирования титрант больше не расходовался, скорость его употребления упала до нуля (рис. 2, а). В то же самое время наблюдали уменьшение содержания CO_2 и увеличение содержания O_2 в выходящем из ферментера воздухе (рис. 2, б). Поскольку при этом $t > 5$ ч и $OD_{\text{АН}} > 0,1$ (рис. 2, а), то были выполнены все условия для окончания фазы периодического культивирования. Далее ЭВМ вычисляла значения μ_p и Y_{OD} и стала подавать субстрат согласно формуле (3) с учетом выражения (7). Таким образом, скорость роста в интервале 2—7,5 ч составляла $\mu_p = 0,36 \text{ ч}^{-1}$ (рис. 2, в), расчетное значение μ во время фазы роста с подпиткой — $\mu = 0,8, \mu_p = 0,29 \text{ ч}^{-1}$.



В

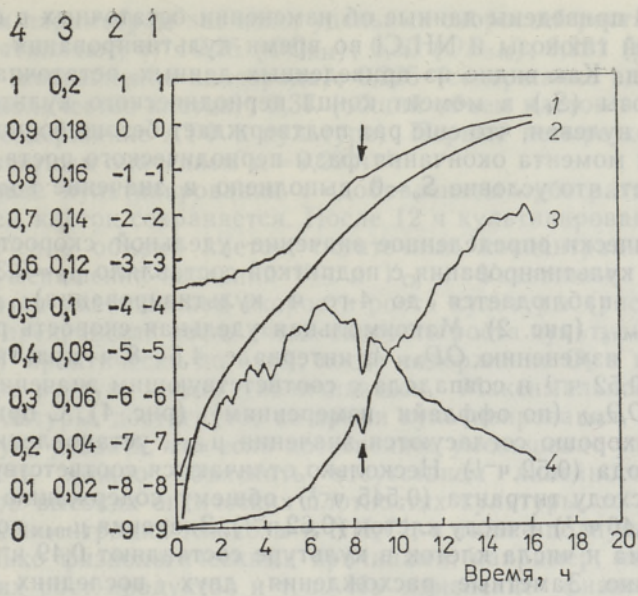


Рис. 2. Изменение непрерывно измеряемых параметров роста во время культивирования *E. coli* (стрелка показывает начало режима подпитки).
 а — оптическая плотность OD_{490} (1); общий расход титранта (2); скорость потребления титранта (3);
 б — скорость подачи глюкозы (1); изменение содержания CO_2 (2) и O_2 (4) в выходящем из ферментера воздухе, %; объем культуры, л (3);
 в — логарифм изменения OD_{490} (1) и потребления O_2 (2); скорость потребления кислорода, моль/ч (3); скорость роста во время культивирования, $1/ч$ (4).

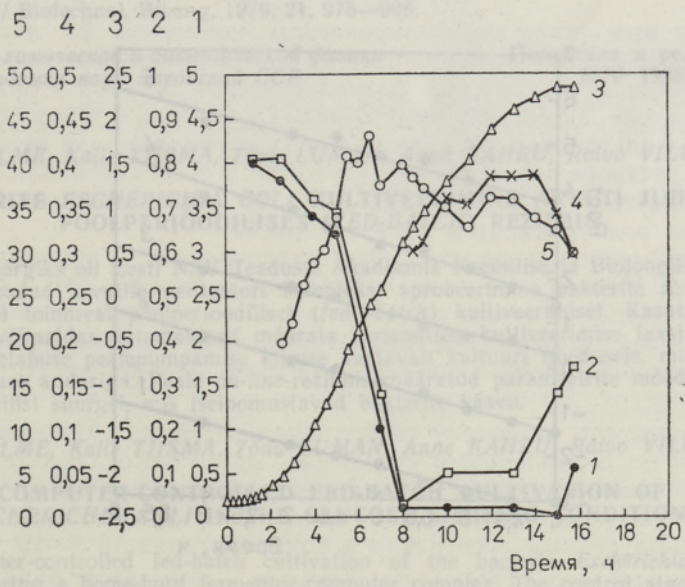


Рис. 3. Изменение остаточной концентрации глюкозы, г/л (1); NH_4Cl , г/л (2); $\ln(OD_{540})$ (3); Y_{XS} (4) и Y_{O_2} (5) во время культивирования. Y_{XS} и Y_{O_2} рассчитаны по изменяющимся во времени суммарному приросту биомассы и потреблению субстрата и O_2 с начала культивирования.

На рис. 3 приведены данные об изменении остаточных в ферментере концентраций глюкозы и NH_4Cl во время культивирования, определенных оффлайн. Как видно из приведенных данных, остаточная концентрация глюкозы (S_e) в момент конца периодического культивирования практически нулевая, что еще раз подтверждает безошибочность ЭВМ в определении момента окончания фазы периодического роста. Этот факт подтверждает, что условие $S_e=0$ выполнено и значение Y_{OD} вычислено правильно.

Автоматически определенное значение удельной скорости роста во время фазы культивирования с подпиткой составляло $\mu_p=0,36 \text{ ч}^{-1}$ (лаг-фаза роста наблюдается до 4-го ч культивирования): $\mu_p < \mu_{\text{max}}$ и $\mu < 0,8 \mu_p < \mu_{\text{max}}$ (рис. 2). Максимальная удельная скорость роста, определенная по изменению $OD_{\text{АН}}$ в интервале 4,5—8 ч культивирования, составляла $0,52 \text{ ч}^{-1}$ и совпадала с соответствующим значением, определенным по OD_{540} (по оффлайн измерениям) (рис. 4). С приведенными значениями хорошо согласуются значения μ_{max} , установленные по расходу кислорода ($0,52 \text{ ч}^{-1}$). Несколько отличаются соответствующие значения по расходу титранта ($0,545 \text{ ч}^{-1}$), общему содержанию в ферментере АТФ ($0,46 \text{ ч}^{-1}$) и числу клеток ($0,62 \text{ ч}^{-1}$). Значения μ_{max} по изменению общего объема и числа клеток в культуре составляют $0,49 \text{ ч}^{-1}$ и $0,62 \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Заметные расхождения двух последних параметров обусловлены изменением среднего объема клеток в указанном интервале культивирования (4,5—8 ч). Как видно из рис. 4, разброс измерений маленький, μ_{max} во всех случаях $r > 0,97$. Полученные данные свидетельствуют о том, что во время периодического культивирования *E. coli*, строго говоря, рост культуры не сбалансирован, хотя целый ряд параметров изменяется в соответствии с совпадающими друг с другом скоростями (рис. 4).

Остаточная концентрация глюкозы поддерживается во время фазы роста с подпиткой на низком, близком к нулю ($0,02\text{--}0,1 \text{ г/л}$) уровне (рис. 3). Приведенные данные свидетельствуют о том, что в интервале 8,5—11 ч наблюдается рост, лимитированный глюкозой. Рассчитанные

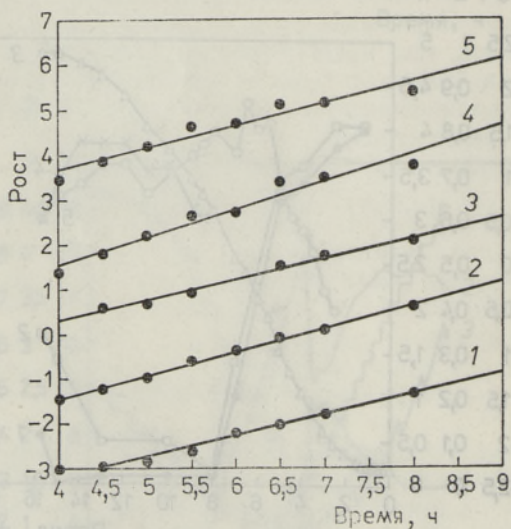


Рис. 4. Расчет μ_{max} в период культивирования 4,5—8 ч по изменению $OD_{\text{АН}}$ (1); OD_{540} (2); содержания АТФ (3); количества клеток (4) и объема клеток (5). Для наглядности представленных данных приведены величины \ln (число клеток) + 3 и \ln (объем клеток/мл) + 5.

по различным параметрам значения удельных скоростей роста для этого интервала составляют, $ч^{-1}$: 0,25 ($OD_{АН}$); 0,30 (OD_{540}); 0,291 (расход титранта); 0,30 (потребление кислорода); 0,225 (содержание аденилатов); 0,35 (общее количество клеток); 0,37 (общий объем клеток в культуре), 0,20 (общее содержание АТФ в культуре). Первые четыре хорошо совпадают с расчетным значением $\mu=0,29 ч^{-1}$.

Итак, в фазе культивирования с добавлением субстрата (8—12 ч) средний объем клеток сохраняется. После 12 ч культивирования наблюдается увеличение объема клеток, остаточных концентраций NH_4Cl и глюкозы, и уменьшение значений Y_{XS} и Y_{O_2} . Указанные изменения сопровождаются уменьшением скорости роста культуры (рис. 3). Культивирование прекращали после спада скорости роста культуры (по изменению OD_{540}) практически до нуля, когда содержание O_2 в выходящем из ферментера воздухе стало увеличиваться. Максимальное значение плотности культуры, достигнутое во время культивирования, составляло 7,5 г/л. Следует указать, что если постепенное уменьшение управляемой скорости роста можно объяснить отсутствием линейности датчика АНКУМ-2 при высоких оптических плотностях культуры, то увеличение остаточных концентраций глюкозы и NH_4Cl , а также полную остановку роста — только физиологическими причинами, например, накоплением ингибирующих рост продуктов и т.п. На изменение физиологических свойств культуры указывает также уменьшение значений Y_{XS} и Y_{O_2} после 12 ч культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

- Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М., 1983, 144—166.
 Тийсма К., Паалме Т., Вилу Р. Комплекс ферментер-ЭВМ для управляемого культивирования микроорганизмов // Биотехнология, 1989 (в печати).
 Dunn, I. J., Shioya, S., Keller, R. Analysis of fed-batch microbial culture // Ann. N. Y. Acad. Sci., 1979, 326, 127—139.
 Kahru, A., Vilu, R. On characterization of the growth of *Escherichia coli* in batch culture // Arch. Microbiol., 1983, 135, 12—15.
 Pirt, S. J. Fed-batch culture of microbes // Ann. N. Y. Acad. Sci., 1979, 326, 119—125.
 Wang, H. Y., Cooney, C. L., Wang, D. I. C. Computer control of bakers' yeast production // Biotechnol. Bioeng., 1979, 21, 975—995.

Институт химической и биологической физики
 Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
 26/V 1988

Toomas PAALME, Kalle TIISMA, Tõnu LUMAN, Anne KAHRU, Raivo VILU

BAKTERITE *ESCHERICHIA COLI* KULTIVEERIMINE ARVUTI JUHITUD POOLPERIOODILISES (FED-BATCH) REŽIIMIS

Töö eesmärgiks oli Eesti NSV Teaduste Akadeemia Keemilise ja Bioloogilise Füüsika Instituudis loodud arvutifermentaatori kompleksi aprobeerimine bakterite *E. coli* automaatjuhtimisel toimulval poolperioodilisel (*fed-batch*) kultiveerimisel. Kasutatud juhtimisalgoritm võimaldas automaatselt määrata perioodilise kultiveerimise faasi lõpu ning värske söötmelohuse pealepumpamise kiiruse vastavalt kultuuri tihedusele, mida mõõdeti optilise tiheduse anduriga. Peale *on-line*-režiimis määratud parameetrite mõõdeti ka mitmeid biokeemilisi suurusid, mis iseloomustavad bakterite kasvu.

Toomas PAALME, Kalle TIISMA, Tõnu LUMAN, Anne KAHRU, Raivo VILU

COMPUTER-CONTROLLED FED-BATCH CULTIVATION OF *ESCHERICHIA COLI* IN THE GLUCOSE LIMITING CONDITIONS

Computer-controlled fed-batch cultivation of the bacteria *Escherichia coli* was carried out using a home-built fermentor-computer complex. The control algorithm used made it possible to automatically determine the end-point of batch phase of the cultivation and further growth of the bacteria in the glucose limiting conditions. The growth rate was controlled on the basis of the automatic measurement of the optical density of the culture. In addition to the *on-line* measured parameters different biochemical characteristics of growth were determined off-line during the cultivation.