

Reverse-Spin® технология перемешивания — Инновационный принцип выращивания микроорганизмов



Авторы:

В. Банковский, И. Банковский, П. Банковский,
Ю. Исакова, И. Дьячкова, А. Шарипо, А. Дишлерс,
Р. Розенштейн, В. Сарычев, С. Дьяченко,
В. Макаренко, У. Балодис.

В данной статье представлены теоретические и экспериментальные исследования возможностей выращивания микроорганизмов с применением технологии Reverse-Spin (RST). Реверс-Спиннер — это термостатирующее устройство с очень низким уровнем энергопотребления, где реализован инновационный тип перемешивания, при котором жидкость (клетки в жидкой среде) перемешивается за счет вращения пробирки вокруг своей оси, благодаря чему происходит высокоэффективное смешивание вихревого типа (Vortex type mixing).

Настоящая работа является первой попыткой отобразить экспериментальные результаты динамики роста клеток, полученные путем перемешивания образцов по принципу RST в одноразовых пластиковых пробирках типа Falcon. Условия роста оптимизированы для разных видов микроорганизмов (условный анаэроб *E.coli* BL21, выраженный аэробный микроорганизм *Thermophilus* sp. и анаэробная бактерия *Lactobacillus acidophilus*). Рассматриваются научные и прикладные положительные аспекты применения RS-реакторов с одноразовыми пробирками, а также определяется их потенциальная ниша в различных отраслях биотехнологии.

Одной из ключевых областей биоинженерной науки являются принципы перемешивания растворов. Область перемешивания не ограничивается биореакторами, перемешивание также является важной частью при исследовании биохимических и молекулярных биологических процессов. Технология неинвазивного перемешивания предусматривает разные способы взбалтывания пробирок, как показано в Табл. 1.

Отсутствие перемешивающих элементов внутри реактора дает возможность применять Реверс-Спиннер в качестве перемешивающего спектрофотометра (спектроскопия клеток), который измеряет оптическую плотность образца в реакторе в режиме реального времени.

Программное обеспечение позволяет задать оптимальные параметры для ферментации, также оно обеспечивает регистрацию и запись всех параметров (скорость перемешивания, температура процесса, оптическая плотность, концентрация клеток, скорость роста и т.д.).



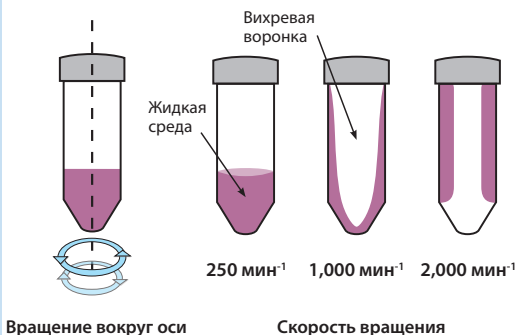
Таблица 1. Сравнение неинвазивных методов перемешивания

#	Рисунок	Тип движения	Инструмент	Макс. V
1		Орбитальное		0,1–5 л
2		Колебательное		1–100 л
3		Круговое вращение с оборотом пробирки вокруг своей оси		1–50 мл
4		Возвратно-поступательное («движение руки»)		1–50 мл
5		Вихревое (Вортекс)		1–50мл
6		Реверсивное вращение (Reverse-Spin)		1–2000 мл

Инициация перемешивания вихревого типа (VTM) и глубина вихревой воронки зависят от 1) угловой скорости RS-реактора; 2) времени, прошедшего с момента инициации вращения RS-реактора; 3) вязкости среды; 4) температуры. Данные параметры также определяют угловую скорость вращения вихревого слоя (vortex layer — VL) и длительность переходного состояния от потенциального вихря (irrotational vortex — IRV), для которого угловая скорость слоя VL пропорциональна радиусу, до вращающегося вихря, для которого угловая скорость слоя VL та же, а сам слой VL выглядит как монолитная вихревая воронка. Общие правила регулирования процессов смешивания за счет типа вихря можно выразить следующим образом: чем больше времени прошло с момента образования вихря, тем более выражен переход от вихря IRV к вихрю RV (Rotational Vortex). Понятие перемешивания за счет реверсивного вращения базируется на данных предположениях

Принцип неинвазивного вихревого перемешивания

Распределение жидкой среды внутри вращающейся пробирки в зависимости от скорости вращения



Реверсивное вращение по сравнению с орбитальным перемешиванием

Симметричное распределение жидкой среды по сравнению с асимметричным

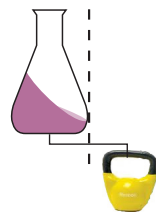
Реверсивное вращение



Характеристики:

- Вращающаяся емкость может иметь любой диаметр
- Авто-балансировка по центру емкости
- Просто
- Не расходуется дополнительная энергия на компенсирующую балансировку
- Самоочищение оптических кювет

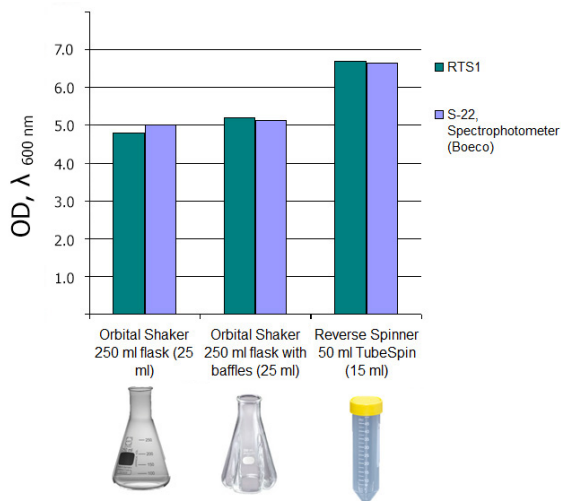
Орбитальное перемешивание



Характеристики:

- Пропорциональность диаметра кругового вращения и диаметра вращаемой емкости
- Принудительная автоматическая балансировка по принципу обруча
- Сложно
- Дополнительный расход энергии на компенсацию авто-балансировки

Рис. 1. Влияние разных способов аэрации для выращивания микроорганизма *E.coli* BL21



На Рис. 1 приводится сравнение биомасс ночных культур E.coli BL21, культивируемых в среде LB в конических колбах Эрленмейера (шейкер-инкубатор ES-20, BioSan), и в биореакторе типа Реверс-Спиннер **RTS-1**. Прирост биомассы выражен оптической плотностью (ОП), которая измерялась при длинах волн 600 нм и 850 нм. Скорость вращения в **RTS-1** составляла 2000 оборотов в минуту (мин⁻¹).

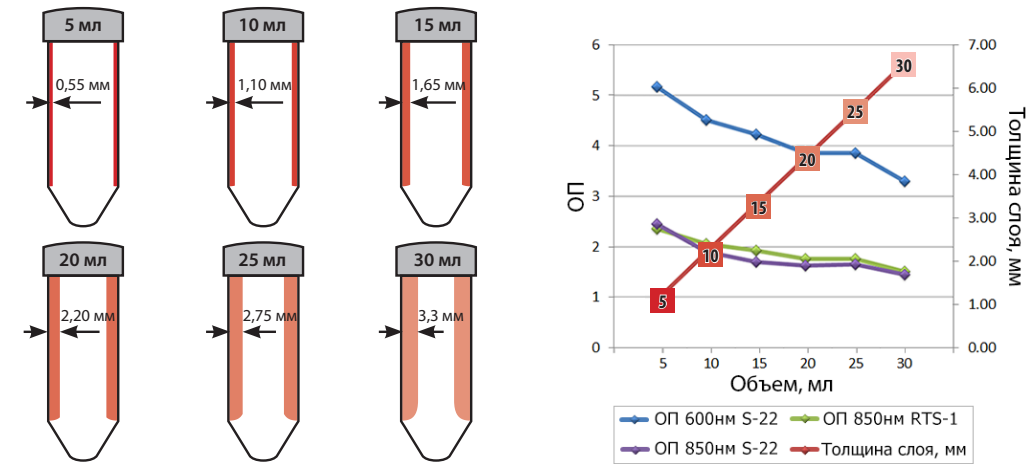
Экспериментальные данные говорят о том, что прирост биомассы, полученный с помощью технологии Reverse Spin, не ниже объема биомассы, полученного с помощью общепринятых способов культивации и, как в случае с культивацией в конических колбах Эрленмейера, зависит от объема среды в колбе при прочих одинаковых параметрах.

Далее мы сконцентрировали свои усилия на разработке технологии правильной оценки концентрации клеток в режиме реального времени. Возможно, вам известно, что конечная концентрация клеток E. coli в среде LB значительно превосходит плотность ОП=1,0 при длине волны λ=600 нм, что требует остановки процесса роста клеток, соблюдения стерильности при отборе образцов и разбавления раствора. Вследствие этого процесс выращивания клеткок и контроля их концентрации очень сложен для выполнения. Проблема заключается в том, что турбидиметрические коэффициенты, в отличие от молярных коэффициентов поглощения, имеют нелинейные характеристики. Большой интерес представляет поведение световых волн во

звесах клеток высокой плотности (см. Рис. 5), а если плотность превышает 2 ОП при длине волны 600 нм, то измерить клеточную концентрацию непосредственно практически невозможно (если только не измерять рассеяние Рэлея).

Мы подошли к данной проблеме с другой стороны. Известно, что чем короче оптический путь, тем точнее можно измерить концентрацию клеток даже при высокой оптической плотности (до 10 ОП). С этой целью пробирки, содержащие различные объемы жидкой среды, подвергаются интенсивному вращению (2000 мин⁻¹) в результате образуется монослой жидкой среды, толщина которого прямо пропорциональна объему культуральной среды в пробирке (см. Рис. 2 далее). Ранее нам удалось достичь линейности данных при измерении клеточных концентраций, имеющих 1–10 ОП, при длине оптического пути 1 мм, вследствие чего в программу **RTS-1** были введены поправочные коэффициенты, что позволило проводить измерения концентрации клеток в широком диапазоне параметров. Алгоритм определения концентрации бактерий в режиме реального времени включает в себя образование монослоя через заданные промежутки времени и процесс измерения клеточной концентрации. Процесс занимает 5–10 секунд, а затем автоматически восстанавливаются параметры, необходимые для роста клеток. На графике показано, что оптимальным объемом культуральной среды для измерения клеточной концентрации в биореакторе является диапазон от 5 до 30 мл.

Рис. 2. Характер влияния объема жидкой среды на толщину ее слоя (мм) в течение цикла реверсивного вращения



№	V, мл	RTS-1, 850нм	ОП _{online}	RTS-1, Толщина слоя, мм	RTS-1, Оптический путь, мм	S-22, ОП _{off-line} 850нм, кювета 1 мм	S-22, ОП _{off-line} 600нм, кювета 1 мм	Урожай клеток, 600 нм
1	5		2,45	0,55	1,10	2,35	5,17	25,8
2	10		1,92	1,10	2,20	2,05	4,51	45,1
3	15		1,71	1,65	3,30	1,92	4,22	63,3
4	20		1,62	2,20	4,40	1,75	3,85	77,0
5	25		1,65	2,25	5,50	1,75	3,85	96,2
6	30		1,45	3,30	6,60	1,50	3,30	99,0

Полученные результаты указывают на то, что максимальная скорость деления клеток отмечается при частоте 1 реверсивное вращение в секунду (1 c^{-1}), при скорости 2000 об/мин. Увеличение пауз между реверсивными вращениями ведет к снижению скорости роста клеток, достигая 50% от максимального значения, когда частота RS = 30 с (см. Рис. 3).

Для более наглядного визуального представления результатов данные трех экспериментов с взаимозависимыми факторами представлены в виде трехмерного графика (см. Рис. 4). Отображение результатов экспериментов в трехмерном виде имеет дополнительное преимущество — полученные данные позволяют построить наглядную модель для анализа сложных взаимосвязанных процессов роста клеток, а также определить оптимальные воспроизводимые параметры, необходимые для получения клеточного материала.

Зависимость скорости роста от времени, представленная на графике, составлена по данным, полученным при процессе ферментации, который длился 20 часов. Измерения оптической плотности производились с интервалом 10 минут. Оптическая плотность определялась по монослою растущих клеток, который формировался из выращиваемой среды в результате вихря (как описано в надписи к Рис. 3). При расчете длины оптического пути для вращающейся пробирки принят во внимание объем культуральной среды, что позволяет рассчитывать оптическую плотность в стандартных единицах, знакомых биотехнологам ($\lambda=600 \text{ нм}$, оптический путь: 10 мм). Классическое двухмерное представление данных о зависимости роста клеток от времени, которое составляется по окончании или в процессе клеточного роста, когда измерения оптической плотности проводились с интервалом 1–4 часа, не дает такой возможности.

Рис. 3. Влияние частоты реверсивного вращения на динамику и скорость роста ($\Delta OD(\lambda=850 \text{ нм})/\Delta t$) по отношению к времени ферментации (ч). Описание эксперимента: Применялось устройство регистрации роста клеток в режиме реального времени — RTS-1 со светодиодом с длиной волны 850 нм; объем среды Лурия-Бертани в пробирке Falcon емкостью 50 мл составляет приблизительно 15 мл; частота реверсивного вращения (RSF) 1, 2, 4, 8, 16, 30 c^{-1} ; частота измерений (MF) составляет приблизительно 10 мин^{-1} ; скорость вращения реактора 2000 об/мин; температура 37°C; диаметр пор фильтра (для аэрации) = 0,25 мкм.

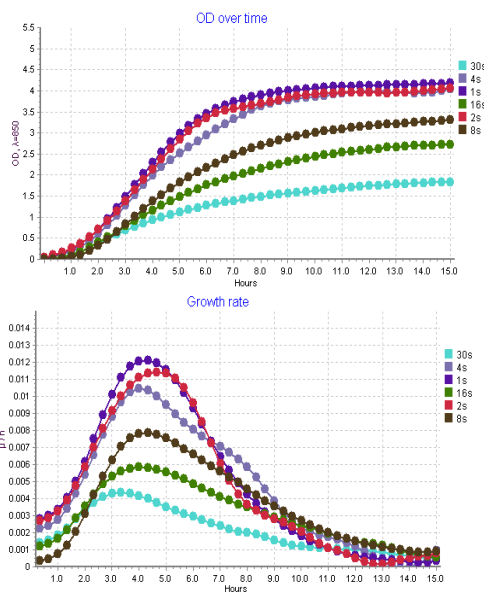
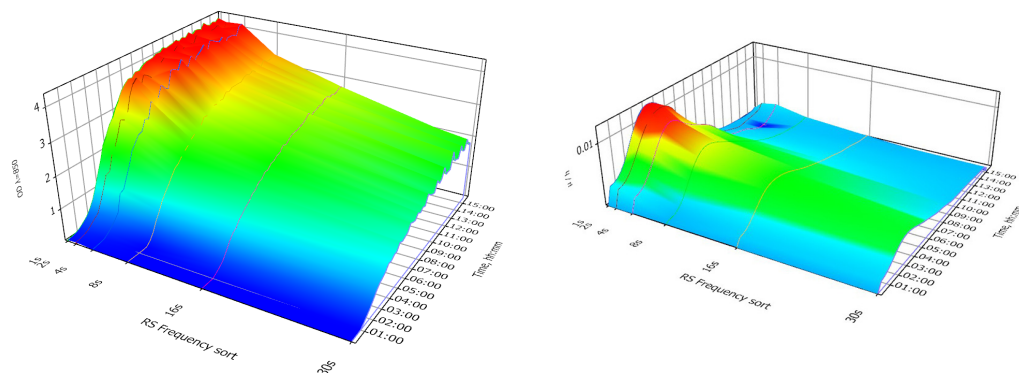
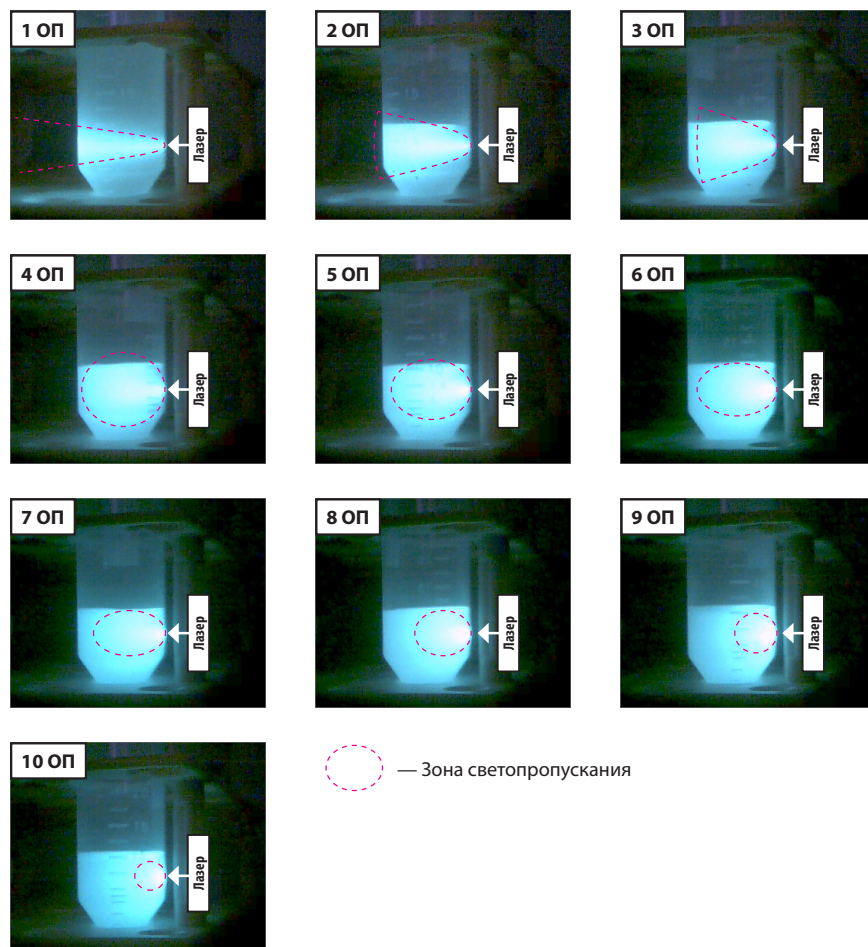


Рис. 4. Влияние частоты реверсивного вращения на динамику и скорость роста по отношению к времени ферментации *E.coli* BL21 в трехмерной модели.



Информация для размышления: Поведение света в среде с различной плотностью

Рис. 5. Был проведен эксперимент по поведению света в среде с различной плотностью. Применялся зеленый лазер (535 нм) на культуре *Saccharomyces Cerevisiae* с различной оптической плотностью (ОП) в диапазоне от 1 до 10, с шагом 1 ОП.



Заключение

RTS-1 — инновационная технология выращивания микроорганизмов за счет реверсивного вращения пробирки, в основе которой лежит новый способ неинвазивного перемешивания культивируемой среды, продемонстрировала свою эффективность при выращивании аэробных микроорганизмов, а также при регистрации данных процесса клеточного роста.

Продемонстрирована высокая эффективность выращивания микроорганизмов *E. coli* в среде LB при высокой скорости вращения реактора (2000 об/мин).

С целью расширения диапазона измерений ОП были проведены исследования ближнего инфракрасного (near IR) спектра, которые показали, что длина волны 850 нм является достаточной для измерения повышенных клеточных концентраций.

Переход на другую длину волны (с общепринятых 600 нм на 850 нм) позволил значительно расширить диапазон линейных измерений ОП.

Кроме того, предлагается новая технология бесконтактных измерений биомассы при ферментации, в основе которой лежит образование тонкого слоя культивируемой среды, которая позволяет получить точные данные о концентрации бактерий во вращающемся реакторе.

Как результат, предлагаемая технология и биореактор **RTS-1** позволяют исключить процедуры отбора проб и разбавления раствора, что в особенности опасно при работе с вредоносными бактериями, патогенами или микроорганизмами, выживающими в крайне жестких условиях, как, например, вид *Thermophilus*. Результаты будут опубликованы в следующем выпуске журнала «BioSan Analytics».

bio