

3. Виестур У.Э., Кузнецов А.М., Савенков В.В. Системы ферментации. – Рига: Зинатне, 1986. – 174 с.
4. Гордеева Ю.Л., Ивашкин Ю.А., Гордеев Л.С. Алгоритмы расчета показателей процесса микробиологического синтеза в периодических условиях культивирования // Вестник Астрахан.гос.техн.ун-та. Сер: Управление, вычислительная техника и информатика. – 2011. – №2. – С.7-14.
5. Дворецкий С.И., Дворецкий Д.С., Муратова Е.И., Ермаков А.А. Компьютерное моделирование биотехнологических процессов и систем. Тамбов: Изд-во ТГТУ, 2005. – 80 с.
6. Плаксин Ю.М., Малахов Н.Н., Ларин В.А. Процессы и аппараты пищевых производств. – 2-е изд., переработано и дополнено. – М.: КолосС, 2007. – 760 с.

### **IMPROVING THE COMPETITIVENESS OF MODERN BIOTECHNOLOGY PRODUCTION BY DEVELOPING AND IMPLEMENTING OPTIMAL ALGORITHM FOR SELECTION OF FERMENTATION EQUIPMENT**

Gerasymenko V.O., Karlash J.V.

This article summarizes information about the problem of choosing the optimal fermentation equipment for achieving the necessary productivity of producing the product with minimum cost. To solve this problem, we developed and implemented in MathCad the algorithm of optimal choice of fermenters from different types.

As a global optimization criterion we selected  $F_{total}$ , which includes the cost of the used substrate, the cost of the used energy for mixing and aeration, and the the cost for equipment purchasing. As local criterion for the selection of equipment we selected the volumetric mass transfer coefficient of oxygen.

УДК 60

### **ОЧИСТКА ПОЛИСАХАРИДОВ НАЕМОФИЛУС ИНФЛУЕНЗАЕ ТИПА b C ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ**

Гергель М.В., 5 курс, факультет биотехнологии та экологического контроля

Научный руководитель: доцент Карлаш Ю.В.

Национальный университет пищевых технологий г. Киев

Бактерии вида *Haemophilus influenzae* представляют собой основную причину заболеваемости и смертности от пневмонии, менингита и сепсиса среди детей грудного и раннего возраста, особенно в развивающихся странах. Эта бактерия, которая может обитать в верхних дыхательных путях практически здорового человека и в отдельных случаях может привести к развитию патологического процесса. Вид бактерии *H. influenzae* подразделяется на шесть серотипов (a-f). Кроме того, существует много не типизируемых штаммов. Самым важным из серотипов является серотип b, называемый Hib.

Фактически все случаи заболевания менингитом, вызванным *H. influenzae*, связаны с Hib.

В процессе роста *H. influenzae* образует капсульную структуру, содержащую полисахариды. Капсульные антигены играют важную роль в вирулентности и иммуногенности бактерий. Структура капсульного полисахарида установлена как 3-В-D-рибофунарозил(1-1)-D-рибитол-5-фосфат. Такие полисахариды представляют собой эффективные вакцинные антигены [1, 2].

Традиционный способ получения очищенных полисахаридов включает в себя: культивирование микроорганизмов, их концентрирование центрифугированием, экстракцию капсульного полисахарида соевым раствором с полимерным детергентом – цетавлоном, спиртовое фракционирование. Затем полученный капсульный полисахарид конъюгируют с помощью сложных химических реакций с белком, в качестве которого используют столбнячный или дифтерийный анатоксины. Однако этот способ является сложным в исполнении, многоэтапным и требует применения сложных химических методов конъюгации с использованием токсичных реагентов, что делает этот способ опасным, и кроме этого, требует специфических методов контроля количества остатков применяемых реактивов и реагентов [3].

Одним из способов очистки полисахаридов *H. influenzae*, предложенный учеными из института Бразилии (Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil), является использование гидролитических ферментов и тангенциальной ультрафильтрации, которые в значительной степени уменьшают количество этанола при осаждении. Депротенинизация фенолом в этом случае была также заменена ферментативной обработкой и центрифугированием – ультрафильтрацией в присутствии катионных детергентов [4].

Цель данной работы – оценка эффективности очистки полисахаридов *H. influenzae* с использованием гидролитических ферментов и тангенциальной ультрафильтрации.

В процессе очистки стремятся получить продукт «с заданными показателями при максимальной прибыли и минимизации стоимости процесса». Для достижения этой цели рассматриваются различия между физико-химическими свойствами продукта, а также примеси, образующиеся при проведении культивирования.

Загрязняющими веществами при очистке полисахарида Hib-инфекции являются: белки, нуклеиновые кислоты, пигменты и другие полисахариды, например, полисахариды клеточной стенки или липополисахариды [3].

Из полученных результатов, которые представлены в табл.1, можно сделать вывод, что необходимый продукт (PRP) находится в малом количестве по сравнению с примесями (липополисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и т.д.), характеризующие относительную чистоту ( $RP_{XX} = \text{мг PRP} / \text{мг XX}$ , где XX - протеин (Prt), нуклеиновые кислоты (NA), липополисахариды (KDO)). Фактор очистки (PF) показывает, во сколько раз относительная чистота продукта

увеличивается по отношению к начальному состоянию ( $PF=RP_{step}/RP_{почат}$ ). Для оценки выделения липополисахаридов (LPS) введена величина KDO. Это число, показывающее количество 2-кето-3-дезоксоктоновой кислоты из которой состоит трисахарид (R-сердцевидная зона) всех LPS [4].

Результаты очистки PRP от белков при ультрафильтрации на мембранах с порогом отсечения 100 кДа показали, что  $PF_{Prot}=3.7$  и  $RP_{Prot}=0.87$  (1 мг PRP на 1 мг белка). Малые молекулы из культуральной среды, соли и другие молекулы меньше, чем 100 кДа, легко могли пересекать мембрану. Очистка на этом этапе составила 75% (данный показатель является самым низким по сравнению с очисткой полисахаридов *Streptococcus pneumoniae* и *Neisseria meningitidis* от белков). При осаждении 30% раствором этанола очистка по отношению к белкам составляет  $PF_{Prт}=0,9$ . Второй шаг осаждения этанолом (80%), после ресуспендирования в воде, показал также небольшой уровень очистки  $PF_{Prт} = 3,2$ . Лучший результат был достигнут после ферментативного гидролиза (протеазами), где белки с молекулярной массой более 100 кДа гидролизуются и в результате малые пептиды отфильтровываются на мембранах с размером пор 100 кДа (2СТUF100):  $RP_{Prot} = 51,8$  и  $PF_{prot} = 20,1$  [4].

Таблица 1 – Результаты исследований

	PRP мг/л	%	Белок мг/л	PRP / Prot	$PF_{prot}$	NA мг/л	PRP/N А	$PF_{NA}$	KDO мг/л	PRP/ KDO
Фракц ия с PRP	1,969±6 ,4	100	8,352± 8,3	0,2	1,0	32105 ±7,3	0,1	1,0	68,5± 10,7	29
2СТU F 100	1,471±3 ,6	75 (75)	1,694± 15,5	0,9	3,7 (3,7)	3659± 20,1	0,4	6,6 (6,6)	57,8±3 ,8	25
EtOH 30%	1,379±3 ,8	70 (94)	1,706± 15,1	0,8	3,4 (0,9)	402±3 0,9	3,4	56,0 (8,5)	24,3±8 ,1	57
EtOH 80%	1,448±2 ,0	74 (105)	562± 7,8	2,6	10,9 (3,2)	173±2 5,9	8,4	136,2 (2,4)	7,1±10 ,7	188
2СТU F 100	1,334±2 ,5	68 (92)	26±0,7	51,8	219,8 (20,1)	2±7,1	579,9	9,457 (69,4)	0,4±8, 7	3,334

При очистке полисахарида от нуклеиновых кислот на первом этапе (1СТUF 100) было получено  $PF_{NA} = 6,6$ . Многие компоненты со спектром поглощения 260 нм были легко устранены ультрафильтрацией. При осаждении с этанолом 30% получили  $PF_{NA} = 8,5$ , что по сравнению с очисткой белков дало лучший результат. Высокая степень очистки от нуклеиновых кислот наблюдалась при обработке нуклеазами (бензоазамамы) – 2СТUF 100 кДа:  $RP_{NA} = 579.91$  и  $PF_{NA} = 69.4$ . Кроме этого ферменты гидролизуют остатки геномной ДНК, РНК и других олигонуклеотидов [4].

Относительно LPS, то при диафильтрации на мембранах с порогом отсечения 100 кДа не произошло значительной очистки – 16% против 80-90% при ликвидации нуклеиновых кислот с белками. При осаждении этанолом, LPS-агрегаты ведут себя как полисахариды. Поэтому очистка осуществляется в

присутствии детергента (DOC), который нарушает гидрофобные взаимодействия жирных кислот липидных частей и хелатобразователя (EDTA). Это позволяет уменьшить взаимодействие между агрегатами и отделить их с образованием низкомолекулярных мономеров [4].

В процессе очистки полисахарида Нib-инфекции на каждом шаге наблюдалось значительное снижение загрязняющих веществ. Однако высокий результат для трёх веществ (белки, нуклеиновые кислоты, липополисахариды) было получено при ферментативном гидролизе:  $PF_{Prot} = 16,6$ ,  $PF_{NA} = 70$  и KDO с устранением на 95% [4].

Из вышеизложенного можно сделать вывод, что разработанный процесс с применением гидролитических ферментов и тангенциальной ультрафильтрации значительно снижает количество этанола при осаждении, но полностью заменить его ферментативной обработкой/ультрафильтрацией не позволяет. При использовании только ферментативной обработки/ультрафильтрации данный продукт не достигал заданной степени очистки. Осаждение фенолом и ультрацентрифугирование были заменены ферментативной обработкой плюс ультрафильтрацией в присутствии хелатагента и детергента. Новый метод имеет преимущество в том, что не использовались токсичные и агрессивные растворители, кроме этого такой процесс значительно дешевле. Следует также отметить, что этот простой, эффективный и экологически чистый метод может быть легко расширен и развит [3,4].

#### Библиографический список

1. Апарин П. Г. Полисахаридные вакцины против бактериальных инфекций: Автореф. дис. на соискание ученой степени д-ра. мед. наук - Москва, 2004. - 53 с.
2. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Биотехнология иммунобиологическом препаратов. - М.: Изд. «Фармитэк», 2008. - 312 с.
3. Goncalves V. M., Takagi M., Carmo T.S. Simple and efficient method of bacterial polysaccharides purification for vaccines production using hydrolytic enzymes and tangential flow ultrafiltration // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2007. - 21. - P. 450-457.
4. Takagi M., Barbosa R. Purification of capsular polysaccharide produced by *Haemophilus influenzae* type b through a simple, efficient and suitable method for scale-up // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - 35. - P. 1217-1222.

#### **PURIFICATION OF POLYSACCHARIDE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE b USING HYDROLYTIC ENZYMES AND TANGENTIAL FLOW ULTRAFILTRATION**

Gergel M. V., Karlash Y. V.

*Haemophilus influenzae* type b is a Gram-negative bacterium that causes meningitis infections in infants less than five years old. The capsular polysaccharide of *H. influenzae* type b has been purified and conjugated to a protein to produce a very effective vaccine in children.