

УДК 616.932:57.085(042)

С.А.Еремин, Ю.А.Алешина, А.В.Комиссаров, О.В.Громова, Ю.Г.Васин, А.К.Никифоров,
Л.Ф.Ливанова, О.А.Волох, О.А.Лобовикова, В.С.Бронникова

МЕТОДЫ И ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА (ОБЗОР)

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,
Российская Федерация

Представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам культивирования холерного вибриона. Даны сведения о следующих методах, применяемых в технологическом процессе его выращивания: периодическое культивирование, периодическое с подпиткой, отъемно-доливное выращивание микроорганизмов, ферментация с диализом, непрерывное культивирование. Рассмотрены их преимущества и недостатки. Проанализировано влияние таких параметров, как концентрация растворенного кислорода, содержание источника углеводного питания, рН среды, температура, концентрация и физиологическое состояние инокулята, продолжительность технологического процесса на рост этого микроорганизма и синтез его антигенов. Проведенный анализ данных литературы позволяет выбрать способ проведения процесса культивирования холерного вибриона и учесть влияние описанных в обзоре параметров при разработке технологии производства медицинских иммунобиологических препаратов для диагностики и профилактики холеры.

Ключевые слова: культивирование, *Vibrio cholerae*, антигены, технологические параметры.

S.A.Eremin, Yu.A.Aleshina, A.V.Komissarov, O.V.Gromova, Yu.G.Vasin, A.K.Nikiforov, L.F.Livanova,
O.A.Volokh, O.A.Lobovikova, V.S.Bronnikova

Methods and Technologies of Cholera Vibrio Cultivation (Scientific Review)

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Displayed is the review of domestic and foreign literature sources devoted to matters of cholera vibrio cultivation. Discussed is the information concerning the following methods utilized in the technological process of vibrio growth stimulation: batch cultivation, fed-batch, fermentation and dialysis, periodic and continuous cultivation. Analyzed is the impact of such parameters as dissolved oxygen concentration, count of carbon nutrition source, medium pH, temperature rate, concentration and physiological condition of inoculate, duration of technological process, affecting the growth of this microorganism and synthesis of its antigens. Consequently, literature data analysis has contributed to the selection of proper method for cholera vibrio cultivation and consideration of the factors mentioned above for the development of manufacture technology applied to the production of medical immunoglobulin preparations for diagnostics and prophylaxis of cholera.

Key words: cultivation, *Vibrio cholerae*, antigens, technological parameters.

Процесс культивирования лежит в основе каждого микробиологического производства, определяя его эффективность, качество продуктов микробного синтеза и целевого продукта. При разработке технологий производства вакцинных препаратов существенную роль играет выбор процесса культивирования, который сразу должен быть направлен на конечную цель и соответствовать будущим масштабам производства.

В связи с этим мы поставили перед собой задачу рассмотреть основные методы и технологии культивирования *Vibrio cholerae*, а также влияние различных параметров на рост этого микроорганизма и синтез антигенов.

Выращивание холерных вибрионов осуществляется на плотных и жидких питательных средах (ПС). При этом культивирование холерных вибрионов на плотных ПС с целью получения профилактических препаратов осуществлялось до начала 60-х годов XX в. в стеклянной посуде небольшой емко-

сти (матрацы, бутылки), что было сопряжено с большой затратой времени, материалов и т.д. На рубеже 60–70-х годов прошлого столетия была разработана технология выращивания холерных вибрионов в производственных целях на плотных ПС в аппаратах АКМ-Ш в условиях контролируемой аэрации [14, 24]. Было установлено, что оптимальным временем выращивания холерного вибриона при температуре 37 °С является 18 ч с периодическим аэрированием стерильным воздухом через каждые 1,5 ч в течение 15 мин в количестве 50 дм³ в 1 мин. Это позволило увеличить выход биомассы в 4 раза в сравнении с выращиванием на матрацах, при этом полученные вакцины соответствовали нормируемым требованиям. Практически в это же время разрабатывался способ глубинного метода выращивания холерных вибрионов периодическим методом [2], который в настоящее время нашел широкое применение при производстве вакцин.

Часто в процессах микробного культивирова-

ния применяют периодическое культивирование с подпиткой. При таком способе, кроме первичного внесения ПС, добавляют порциями или капельно вещества, стимулирующие или поддерживающие процесс культивирования. Модификацией этого метода является отъемно-доливное выращивание микроорганизмов, сущность которого заключается в том, что часть содержимого ферментера удаляется, а аналогичный объем ПС закачивается. Успешно в экспериментальных целях данный метод применялся при выращивании холерных вибрионов – продуцентов протективных антигенов (ПА) [18]. Авторами была разработана технология двухциклического культивирования штаммов холерного вибриона сероваров Инаба 35А3 и Огава М41 в ферментере. Процесс осуществляли путем отбора на втором часе культивирования 2 дм³ суспензии из первого ферментера, которую вводили в качестве инокулята во второй ферментер. Использовали ферментеры объемом 40 дм³. Культивирование в обоих ферментерах довели до начала фазы стационарного роста. Показано, что в первом и втором циклах не наблюдалось различия в выходе биомассы, не установлено различий в ультраструктуре вибрионов. Во втором цикле отмечено сокращение минимального времени генерации. Отсутствовала разница в антигенной и иммуногенной активностях, полученных из первого и второго циклов культивирования. Было отмечено, что удельная скорость роста биомассы в первом ферментере была ниже и устанавливалась позже, чем во втором. В диссертации Ю.Г.Васина установлено, что количество холерного токсина (ХТ) и О-антигена (О-АГ), а также биологическая активность ХТ остаются одинаковыми как для периодических культур, так и для каждого цикла отъемно-доливной культуры.

П.Х.Ненковым и соавт. при исследовании процесса культивирования *V. cholerae* сероваров Инаба и Огава в ферментере с автоматическим контролем параметров [19] выявлено, что концентрация кислорода в ПС определяет скорость роста микроорганизмов, уровни утилизации глюкозы и выход биомассы холерных вибрионов. Проведенные исследования по выращиванию холерных вибрионов в ферментере объемом 40 дм³ в условиях лимита по кислороду и при рО₂ равным 50 % от исходного уровня насыщения ПС дали следующие результаты. При лимитации кислородом концентрация биомассы увеличивалась в течение 9 ч; удельная скорость достигала максимума на втором часу, когда устанавливалась короткая экспоненциальная фаза роста с временем генерации 33 мин; абсолютная скорость роста увеличивалась до третьего часа, а затем снижалась; концентрация микробных клеток в стационарной фазе роста составляла 33 млрд/мл. Насыщение ПС кислородом до 50 % дало следующие результаты: время генерации в экспоненциальной фазе уменьшалось до 20 мин; абсолютная скорость роста микроорганизмов увеличивалась до шестого часа; концентрация микробных клеток в стационарной фазе роста составляла 95 млрд/мл.

Одна из модификаций непрерывного способа

культивирования – ферментация с диализом. При данном методе происходит постоянная подача субстрата в биореактор через специальную мембрану. Процесс диализа снижает концентрацию продуктов метаболизма биомассы, отрицательно влияющих на рост клеток. Кроме того, в процессе диализа происходит определенное концентрирование ПС, а значит и биомассы. Данный метод апробировался при культивировании холерного вибриона [33]. Было показано, что продукция ХТ при данном способе выше в сравнении с ХТ, полученным глубинным способом.

Исследователями была показана возможность применения метода непрерывного культивирования холерных вибрионов с целью получения основных ПА [46]. Было показано, что использование данного метода позволяет получать стандартные препараты, биологическая активность которых не уступает препаратам, полученным при периодическом культивировании.

Оптимальные условия (температура, рН ПС, аэрация и т.д.) синтеза антигенов холерными вибрионами индивидуальны для каждого штамма-продуцента [1, 32]. Одним из первых исследователей, изучавшим влияние температуры культивирования штаммов *V. cholerae* на синтез антигенов, был G.P.Craig. Им было показано, что максимальная продукция ХТ при выращивании на пептонной воде штамма *V. cholerae* VC-12 происходит при температуре 29 °С [27]. D.J.Evans и S.H.Richardson подтвердили эти данные при выращивании холерных вибрионов с казаминовыми аминокислотами. При этом они констатировали, что для лучшего синтеза антигенов необходима высокая степень аэрации среды выращивания [32]. R.A.Finkelstein и соавт. определили ряд оптимальных параметров для культивирования штамма *V. cholerae* 569В Инаба на ПС из казаминных аминокислот. Ими было показано, что посевная доза должна составлять не менее 10⁵–10⁶ живых клеток на 1 мл среды; процесс выращивания целесообразно вести до начала стационарной фазы роста микроорганизма; массообменные характеристики ферментера должны быть на уровне 1,5–3,0 г кислорода на 1 дм³ среды в час [34–36]. Исследовано влияние на рост холерных вибрионов и синтез антигенов аэрации и перемешивания [34, 43, 46, 47]. Исследователями сделан вывод, что продукция антигенов во многом определяется степенью насыщения среды выращивания кислородом. В работе S.Nandi и соавт. [39] при анализе происхождения вариантов *V. cholerae* O1 биовара эльтор показано, что штаммы, выделенные до вспышки 1992 г., вызванной *V. cholerae* O139, продуцируют максимальное количество ХТ при 30 °С, а штаммы, выделенные после нее – при 37 °С.

В диссертации Т.Л.Захаровой установлено, что оптимальными условиями для экспрессии чужеродного адгезина CFA1 в клетках холерного вибриона являются культивирование на CFA-агаре в течение 24 ч при 37 °С и последующее выращивание в течение 18 ч при 37 °С в триптиказосоевом бульоне. В этих условиях адгезивная активность холерных ви-

брионов с плазмидой рсFA повышается в 8–30 раз.

В диссертации Т.В.Бугорковой было установлено, что при выращивании холерных вибрионов на мембраноагаре (представляющем собой казеиновый агар, покрытый стерильной целлофановой пленкой) накопление фактора сосудистой проницаемости происходило более интенсивно, чем при выращивании их на казеиновом агаре без мембраны, при этом изменение температур культивирования с 30 °С до 37 °С не оказывало влияния на синтез антигена. Культивирование штамма *V. cholerae* KM 138 O139 серогруппы с целью получения холерного O139 антигена проводили при 35 °С [22, 25].

L.T.Callahan и соавт. [28, 29] проводили исследования по культивированию штамма *V. cholerae* 569В Инаба в комплексной ПС из аминокислот. Культуру выращивали 24 ч при 33 °С, синтез ХТ начинался с 16 ч, когда значение рН превышало 7,0. Величина рН изменялась в течение 12 ч от 7,5 до 6,7, к 24 ч поднималась до 8,2. Глюкоза полностью утилизировалась к 16 часу выращивания. Авторами был сделан вывод, что основным недостатком внесения глюкозы в полном количестве в ПС является резкое уменьшение уровня рН в результате накопления продуктов ее окисления. Данный недостаток может быть устранен добавлением щелочи, при этом поддержание рН на уровне 7,6 ведет к стимулированию роста биомассы и накопления антигенов.

Культивирование штаммов *V. cholerae* KM 200 и KM 197 классического биовара серовара Огава с целью получения ХТ и токсин-корегулируемых пилей адгезии проводили при температуре 30 °С [20, 21].

В патенте США [44] описаны рекомбинантные штаммы *V. cholerae* VCUSM1 (O139 серогруппы) и VCUSM4 (O1 серогруппы биовара эльтор) и вакцина на их основе. Авторами показано, что культивирование данных штаммов холерных вибрионов с целью получения О-АГ целесообразно осуществлять при температуре 37 °С. В исследованиях по получению авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор и оценки их способности к продукции O1 антигена сероваров Инаба или Огава, обеспечивающих формирование антибактериального иммунитета, культивирование штаммов холерного вибриона осуществляли при 37 °С с использованием жидкой и агаризованной ПС [23].

В работе В.Л.Куликовой и соавт. [15] была изучена зависимость основных биологических свойств культур холерных вибрионов 569В Инаба, выращенных при глубинном культивировании от времени выращивания и качества посевного материала. При анализе закономерностей развития холерного вибриона ими было установлено, что при увеличении количества засеваемых микробов сокращается продолжительность генерации, стадии развития микробной популяции быстрее сменяют друг друга. Применение для засева реактора аэрированной культуры позволило сократить продолжительность выращивания, а также увеличить концентрацию холерных вибрионов и содержание в культуральной жидкости ХТ и О-АГ.

Максимум продукции антигенов наблюдался при переходе микробной культуры в стационарную фазу роста, удлинение сроков культивирования не приводило к увеличению концентрации холерных вибрионов и продукции О-АГ, а содержание ХТ уменьшалось. Кроме того, авторами был сделан вывод о необходимости сохранения оптимума рН и температуры при производственном культивировании для стимулирования образования антигенов.

В работе А.Б.Мазрухо и соавт. [17], при определении оптимальных условий продукции ряда факторов патогенности холерных вибрионов штаммов *V. cholerae* O1 569В Инаба, *V. cholerae* биовара эльтор P-5879, *V. cholerae* биовара эльтор P-14863 и *V. cholerae* биовара эльтор P-14873 и *V. cholerae* O139 серовара MO145 было исследовано влияние различных температур и уровня аэрации на продукцию ХТ. При изучении влияния температур выявлено, что продукция ХТ наблюдалась в интервале от 29 до 37 °С, при этом оптимумом является 33 °С. Изучение влияния «теплого шока» (культивирование в течение 2 ч при температуре 43 °С с последующим снижением до 32 °С) показало, что уровень продукции ХТ не возрастал. Также исследователями было обнаружено, что увеличение уровня аэрирования приводит к повышению продукции ХТ.

При глубинном культивировании холерного вибриона значительное количество антигенов спонтанно освобождается в окружающую среду [42], что было использовано при разработке технологий их выращивания.

Исследователями был разработан режим глубинного культивирования холерных вибрионов с добавлением 0,2–0,3 % глюкозы и раствора аммиака в качестве регуляторов оптимальных значений рН, а также изучено влияние уровня аэрации культуральной жидкости на биологические свойства глубинных культур. Проведенные исследования показали, что увеличение степени аэрации измеряемого косвенным методом (по окислению сульфита кислородом) воздуха с 54–60 мг/л/мин до 90–130 мг/л/мин приводит к увеличению интенсивности роста холерных вибрионов и продукции ХТ и О-АГ. Также ими было доказано, что процесс культивирования необходимо вести не более 9–10 ч, после чего наблюдается снижение продукции антигенов [16].

Исследования, проведенные в 70-х годах прошлого столетия в Швейцарии (Swiss Serum and Vaccine Institute, Berne, Switzerland), обнаружили возможность получения ХТ при культивировании *V. cholerae* 569 Инаба в ферментере вместимостью 10 дм³. Ими были использованы следующие технологические параметры: посевная доза – 10⁷ м.к./л; скорость вращения мешалки – 550 rpm; аэрация воздухом – 1,0 дм³ воздуха на 1,0 дм³ ПС в минуту; температура проведения процесса – 30 °С; время проведения процесса – 17 ч [30].

Имеются сведения о режимах культивирования *V. cholerae* 569 Инаба, отработанных южнокорейскими учеными, с целью получения ХТ. Ими было

выявлено, что для большей продукции ХТ целесообразно проводить выращивание холерного вибриона при температуре 32 °С, при автоматическом поддержании уровня рН 7,8 с помощью добавления корректирующих растворов: 10 % NH₄OH или 10 % HCl. Также ими было установлено, что снижение или увеличение температуры культивирования ухудшает синтез ХТ, а его максимальная продукция наблюдается при 35 % насыщении культуральной жидкости кислородом. Оптимальное время культивирования составляет 12 ч [37].

В результате проведения исследований по определению оптимальных условий выращивания штамма *V. cholerae* биовара эльтор КМ 234 в колбах Эрленмейера на термостатируемой качалке, при которых происходит наибольшая продукция ХТ, установлено, что эффективный биосинтез ХТ наблюдался при выращивании на казеиновом бульоне (рН 7,6) при 30 °С и времени культивирования – 8 ч [6].

Шведскими учеными были разработаны прогностические модели для роста биомассы, потребления глюкозы и выделения ацетата в ходе роста *V. cholerae* в культуре с периодической подпиткой глюкозой. Данные модели успешно были использованы для контроля за биомассой, глюкозой и ацетатом при помощи многопараметрического анализатора, работающего в режиме он-лайн, для регулирования скорости роста *V. cholerae*, накопления ХТ за счет корректировки скорости подачи глюкозы [38].

Многие исследователи считают, что максимум накопления ПА, синтезируемых *V. cholerae*, в ходе периодического глубинного культивирования происходит при переходе роста микроорганизмов из экспоненциальной в стационарную фазу роста [40, 41, 50].

Имеются сведения о разработке процесса культивирования холерных вибрионов с подпиткой глюкозой. Исследователи доказали, что ее добавление в культуральную жидкость целесообразно осуществлять при переходе роста микроорганизмов в экспоненциальную фазу, а профиль ее подачи зависит от концентрации растворенного кислорода [26, 31]. В ряде работ установлено, что избыточное добавление глюкозы в культуральную жидкость в ходе периодического глубинного культивирования холерных вибрионов приводит к закислению, уменьшению скорости роста микроорганизмов и, соответственно, уменьшению накопления антигенов [31, 45, 48, 49].

Имеются сведения о конструировании штаммов *V. cholerae* с повышенной продукцией одновременно трех основных ПА – ХТ, токсин-корректируемых пилей адгезии и О1 антигена и определении оптимальных условий их глубинного культивирования [5, 11–13]. В работе С.П.Задновой и соавт. [11] проведено изучение продукции основных факторов патогенности и иммуногенности различными штаммами *V. cholerae* при их культивировании в термостатированной качалке при 37 °С в Г-образных пробирках, содержащих 3 мл питательного бульона LB (рН 6,8). В качестве продуцента О1 антигена серовара Инаба был использован штамм *V. cholerae* 2415 классического биовара, имею-

щий также высокий уровень биосинтеза ХТ I типа и токсин-корректируемых пилей адгезии (ТКПА). Для получения О1 антигена серовара Огава, а также ХТ I типа и ТКПА использовали штамм классического биовара *V. cholerae* 2416. Продуцентом В-субъединицы ХТ служил авирулентный штамм *V. cholerae* КМ 93, относящийся к не О1/не О139 серогруппе, для выделения ХТ II типа был взят штамм *V. cholerae* КМ 234 эльтор биовара серовара Огава. В качестве продуцентов О139 антигена взяты штаммы *V. cholerae* О139 серогруппы – авирулентный природный КМ 230 и вирулентные бескапсульные КМ 137 и КМ 138. Для каждого штамма определено оптимальное время, необходимое для достижения начала стационарного развития популяции. В результате установлено, что штаммы *V. cholerae* 2415 и КМ 206 следует культивировать до 10 ч, тогда как *V. cholerae* КМ 93 и КМ 234 – 8 ч, *V. cholerae* КМ 138, КМ 137 и КМ 230 – 9 ч, поскольку увеличение срока культивирования последних до 10 ч приводит к лизису культуры.

В работе О.А.Волох и соавт. представлены основные биокинетические показатели роста при масштабированном культивировании в ферментере штаммов *V. cholerae* КМ 206 и 2415 О1 серогруппы классического биовара; *V. cholerae* КМ137 О139 серогруппы; *V. cholerae* КМ234 О1 серогруппы биовара эльтор; *V. cholerae* КМ 93 не О1/не О139 серогруппы, являющихся продуцентами основных ПА (О1 и О139 антигенов, ХТ I и II типов, В-субъединицы ХТ II типа, ТКПА) при глубинном культивировании. Для каждого штамма определены оптимальные условия (ПС, рН, время культивирования, использование дополнительного источника углеводов) для максимальной продукции ПА в условиях производства, что позволит использовать их для изготовления более эффективных вакцинных препаратов, а также для получения в очищенном виде основных ПА *V. cholerae* с целью создания диагностических препаратов. Температура культивирования для штаммов КМ 137 и КМ 234 составляла 37 °С, остальные штаммы выращивали при 30 °С. Культивирование штаммов О1 серогруппы классического биовара серовара Огава *V. cholerae* КМ 206 и Инаба *V. cholerae* 2415 показало, что при выращивании в LB бульоне они активно синтезируют все антигены (О-АГ, ХТ и ТКПА), при этом установлено, что оптимальным значением рН ПС являются значения 7,2–7,8, время культивирования – 12 ч, при удлинении времени выращивания начинается лизис клеток, а добавление дополнительных источников углерода в ходе выращивания данных штаммов дает возможность продлевать экспоненциальную фазу роста. Глубинное культивирование штамма-продуцента О139 антигена *V. cholerae* КМ137 на бульоне LB (рН 7,5±0,1) показало, что оптимальное время выращивания данного штамма составляло 11–12 ч. Дробная подача глюкозы (40 %) при переходе микробной популяции в экспоненциальную фазу роста позволила увеличить удельную скорость роста и сократить время генерации. При оптимизации условий выращивания штамма КМ 93 для высокого выхода биомассы и продукции в среду

выращивания В-субъединицы ХТ установлено, что культивирование данного штамма целесообразно проводить в казеиновом бульоне с 1 % пептоном (рН 7,6) отъемно-доливным способом (методом фазовых культур), позволяющим получать больший объем биомассы за короткий промежуток времени. При культивировании штамма-продуцента ХТ II типа *V. cholerae* KM 234 было показано, что интенсификация газообмена и массообмена приводит к постепенному и полному потреблению питательных веществ из среды и, соответственно, более продуктивному росту биомассы и синтезу антигена. Авторами сделан вывод, что для высокой продукции основных ПА холерного вибриона штаммами-продуцентами при масштабированном культивировании необходимо использовать богатые ПС, контролируя рН среды и время культивирования, а также дополнительные источники углерода [5].

Коллективом авторов [10] разработан промышленный способ раздельного получения холерогена-анатоксина и О-АГ холерного вибриона. Холерный вибрион выращивали в условиях глубинного культивирования в реакторе с 250 дм³ бульона из ферментативного перевара казеина или мяса, с аэрацией и автоматической подкормкой глюкозой. В первые четыре часа роста температуру поддерживали на уровне 37 °С, а затем в течение 5–7 ч снижали до 34–35 °С для сохранения в культуральной жидкости термолabileного холерогена. В начале стационарной фазы роста (10–11 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 70–100 млрд в 1 мл, остается постоянной 2–3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6 % формалина. Авторами было показано, что закономерности роста у штаммов были сходными, логарифмическая фаза составляла в среднем 4–5 ч, через 10–11 ч наступал стационарный период роста. Основные иммуногены появлялись в культуральной жидкости в начале логарифмической фазы роста (5–6 ч), количество их увеличивалось к концу выращивания.

При разработке способа получения очищенного холерного О-АГ в качестве продуцентов этого ПА использовали штаммы О1 серогруппы М41 Огава и 569В Инаба, а также О139 серогруппы. Холерные вибрионы выращивали при температуре 34–37 °С в реакторе на ПС из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования с подкормкой глюкозой и аммиаком. В стационарной фазе роста (10–11 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 70–80 млрд в 1 мл, оставалась постоянной в течение 3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6–0,2 % формалина [7].

При конструировании оральной химической вакцины для специфической профилактики холеры, вызванной эпидемически значимыми штаммами НАГ вибрионов О139 серогруппы использовали штаммы холерного вибриона О139 серогруппы [8]. Холерный вибрион О139 серогруппы выращивали при температуре 37 °С в реакторе на ПС из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования с подкормкой глюкозой и аммиаком. В ста-

ционарной фазе роста (10–11 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 70–80 млрд в 1 мл, оставалась постоянной в течение 3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6–0,2 % формалина. Коллективом авторов была изучена динамика накопления антигенов штамма О139 серовара при глубинном культивировании культуры в условиях производства. Полученные данные показали, что условия выращивания штаммов О1 серовара, разработанные ранее для производства холерной вакцины, обеспечивают не только накопление необходимых антигенов при культивировании штамма О139 серовара, но и способствуют значительно (в 3–4 раза) большему выходу в среду биомассы, растворимого О-АГ и экзоферментов [9].

При разработке способа производства вакцины для профилактики холеры в качестве продуцента О-АГ Огава использовали штамм холерного вибриона *V. cholerae* М41 Огава [3]. Холерный вибрион выращивали при 37 °С в реакторе с 250 дм³ бульона из ферментативного перевара казеина или Хоттингера в условиях глубинного культивирования с подкормкой глюкозой и аммиаком. В стационарной фазе роста (10–12 ч выращивания), когда концентрация микробных тел, достигнув 80–110 млрд в 1 мл, оставалась постоянной в течение 3 ч, выращивание прекращали добавлением 0,6 % формалина.

Авторским коллективом сконструирована ПС на основе фибрина и произведена ее апробация для выращивания холерных вибрионов [4]. При культивировании *V. cholerae* М-41 серовара Огава в ферментере объемом 0,5 м³ в условиях аэрации и подкормки раствором глюкозы – на ПС из гидролизата фибрина (37 °С, в течение 10 ч) получено биомассы 158·10⁹ м.к./мл, соответственно на ПС из гидролизата казеина – 111,4·10⁹ м.к./мл. Титры О-АГ, полученного на предлагаемой ПС, в два раза превышали титры О-АГ, полученного на контрольной ПС.

Таким образом, при анализе данных литературы по основным методам и технологиям культивирования холерного вибриона, а также влияния различных параметров на рост этого микроорганизма и синтез антигенов установлено следующее:

- основным методом культивирования холерных вибрионов для получения вакцинных препаратов является периодическое с подпиткой углеводным источником питания, как правило глюкозой;

- недостаток растворенного кислорода в среде и избыточное добавление глюкозы в культуральную жидкость в ходе периодического глубинного культивирования холерных вибрионов приводит к закислению, уменьшению скорости роста микроорганизмов и накопления антигенов;

- культивирование необходимо вести при определенном оптимальном значении рН среды, корректируя его в ходе процесса, как правило, изменением скорости подачи глюкозы или добавлением химического реактива, имеющего щелочное значение рН;

- существенное влияние на процесс культивирования оказывает концентрация инокулята и его физи-

ологическое состояние;

- на синтез антигенов влияет температура проведения процесса;

- максимальная продукция антигенов наблюдается при переходе растущей культуры из экспоненциальной в стационарную фазу роста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Адамов А.К., Наумшина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та; 1984: 328 с.
- Алтухов М.В., Никитин Г.А., Филлипов Н.Ф. Реакторная установка для культивирования микроорганизмов глубинным методом. *Пробл. особо опасных инф.* 1969; 2(6):192.
- Анисимов П.И., Адамов А.К., Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П. Способ производства вакцины для профилактики холеры. Патент 2080121 РФ, опубл. 27.05.1997. Бюл. № 15.
- Антонычева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.В., Шульгина И.В., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона. Патент 2425866 РФ, опубл. 10.08.2011. Бюл. № 22.
- Волох О.А., Шепелёв И.А., Заднова С.П., Крепостнова И.М., Еремин С.А. Изучение биокINETических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 1(95):52–5.
- Горяев А.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Конструирование штамма *Vibrio cholerae* биовара эльтор гиперпродуцента холерного токсина II типа и определение оптимальных условий для продукции этого белка. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 1(95):56–9.
- Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент 2143280 РФ, опубл. 27.12.1999. Бюл. № 36.
- Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Наумов А.В., Кузьмиченко И.А., Тараненко Т.М. Оральная химическая вакцина против холеры. Патент 2159128 РФ, опубл. 20.11.2000. Бюл. № 33.
- Наумов А.В., Джапаридзе М.Н., Громова О.В., Адамов А.К., Елисеев Ю.Ю., Космаенко О.М., Кузьмиченко И.А., Копырьзов В.Н., Заворотных В.И., Захарова Т.Л., Чеховская Г.В. Использование нового штамма *Vibrio cholerae* O139 в качестве продуцента энтеральной химической вакцины. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 2:52–5.
- Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Мелешенко М.В., Никитина Г.П. Способ получения пероральной химической вакцины. Патент 2076734 РФ, опубл. 10.04.1997. Бюл. № 13.
- Заднова С.П., Волох О.А., Крепостнова И.М., Щелканова Е.Ю., Ливанова Л.Ф., Захарова Т.Л., Шепелёв И.А., Еремин С.А., Смирнова Н.И. Изучение продукции основных факторов патогенности и иммуногенности различными штаммами *Vibrio cholerae* при их культивировании в производственных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 1(93):51–5.
- Заднова С.П., Еремин С.А., Авдеева Н.Г., Волох О.А. Изучение динамики роста штаммов *Vibrio cholerae*-продуцентов протективных антигенов в условиях глубинного культивирования и выделение токсин-регулируемых пилей адгезии. *Биотехнология.* 2004; 3:43–8.
- Захарова Т.Л., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Киреев М.Н., Смирнова Н.И. Использование рекомбинантных штаммов для одновременного получения нескольких очищенных основных протективных антигенов холерного вибриона. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 2(100):68–71.
- Куликова В.Л., Караева Л.Т. Сравнительное изучение свойств холерных вакцин, полученных с АКМ-III и матрацев. *Пробл. особо опасных инф.* 1969; 2(6):116–22.
- Куликова В.Л., Коваленко Н.М., Доброва Г.В., Копырьзов В.Н., Космачева Н.Л. Изучение оптимальных условий роста, формирования специфических антигенов и токсинообразования у культуры холерного вибриона при глубинном выращивании. *Пробл. особо опасных инф.* 1979; 1:65–6.
- Лавровская В.М., Чибрикова Е.В., Караева Л.Т., Пертова Л.С., Анохина С.В., Анисимова Т.И., Воронкина И.М., Джапаридзе М.Н., Дроздовская Ф.К., Кондрашкова Т.В., Павлова Л.П., Гуртовик А.И. Культивирование холерных вибрионов в условиях аэрации среды и изучение биологических свойств глубинных культур. *Пробл. особо опасных инф.* 1969; 3(37):179–83.
- Мазрухо А.Б., Михась Н.К., Монахова В.Е., Рожков К.К. Определение оптимальных условий продукции ряда факторов патогенности холерных вибрионов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2000; 1:21–4.
- Ненков П.Х., Страшимиров И.И., Поликар А.Ч. Двухциклическое культивирование холерных вибрионов в ферментере. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1986; 7:21–4.
- Ненков А.Х., Поликар А.Ч., Цакова А. Культивирование холерных вибрионов в ферментере с автоматическим контролем ряда параметров. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1982; 5:47–50.
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Топорков А.В., Челдышева Н.Б. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM 200 – продуцент холерного токсина и токсин-регулируемых пилей адгезии. Патент 2193598 РФ, опубл. 27.11.2002. Бюл. № 33.
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Топорков А.В. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* 2414 классического биовара серовара Огава – продуцент холерного токсина и токсинрегулируемых пилей адгезии. Патент 2169187 РФ, опубл. 20.06.2001. Бюл. № 17.
- Смирнова Н.И., Чеховская Г.В. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM 138 серогруппы O139 – продуцент холерного O139 антигена. Патент 2192463 РФ, опубл. 10.11.2002. Бюл. № 31.
- Стрельникова-Ааб Е.Н., Ливанова Л.Ф., Горяев А.А., Челдышева Н.Б., Смирнова Н.И. Авирулентные штаммы *Vibrio cholerae* O1 – продуценты протективного O1-антигена: получение и свойства. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 4(106):39–42.
- Филлипов А.Ф., Николаев Н.И., Шестеренко А.Ф., Караева Л.Т. Культивирование чумного микроба и холерного вибриона на агаре в аппаратах АКМ-III. *Пробл. особо опасных инф.* 1970; 1(11):158–63.
- Чеховская Г.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Бескапсульные мутанты *Vibrio cholerae* O139 серогруппы: получение, идентификация и использование для приготовления диагностической O139 антисыворотки. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2000; 1:34–7.
- Akesson M., Hagander P., Axelsson J.P. Probing control of fed-batch cultures: Analysis and tuning. *Control Engineering Practice.* 2001; 9(7):709–23.
- Craig G.P. Preparation of the vascular permeability factor of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5.
- Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence II. *Infect. Immun.* 1971; 7(5):611–8.
- Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence III. *Infect. Immun.* 1983; 7(4):567–72.
- Germanier R., Forer E., Varallyay S., Inderbitzin T.M. Preparation of a Purified Antigenic Cholera Toxoid. *Infect. Immun.* 1976; 13(6):1692–8.
- De Mary L., Andersson L., Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2004; 25(4):221–8.
- Evans D.J., Richardson S.H. In vitro production of cholera toxin and the vascular permeability factor by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1968; 96(1):126–30.
- Fedorka-Gray P.J. Production of cholera toxin-like toxin by vibriomimetic and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxicogenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.
- Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Pathogenesis of experimental cholera-preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinogen. *J. Exp. Med.* 1969; 130(1):185–203.
- Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Production of highly purified cholera toxin and cholera toxinogen. *J. Infect. Dis.* 1970; 121:63–72.
- Finkelstein R.A. Pathogenesis of experimental cholera: biologic activities of purified procholera toxin A. *J. Immunol.* 1966; 96(3):440–9.
- Jang H., Hyo S.K., Jeong A.K. Improved Purification Process for Cholera Toxin and its Application to the Quantification of Residual Toxin in Cholera Vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.
- Navratil M., Norberg A., Lembren L., Mandenius C.F. On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a *Vibrio cholerae* fed-batch cultivation. *J. Biotechnol.* 2005; 115(1):67–79.
- Nandi S., Maiti D., Saha A., Bhadra R.K. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTXphi array and its position in the genome. *Microbiology.* 2003; 149(1):89–97.
- Osek J., Lebens M., Holmgren J. Improved medium for largescale production of recombinant cholera toxin B subunit for vaccine purposes. *J. Microbiol. Methods.* 1995; 24:117–23.
- Panda A.K., Ghorpade A., Mukhopadhyay A. High cell density fermentation of recombinant *Vibrio cholerae* for production of B subunit of the *Escherichia coli* enterotoxin. *Biotechnol Bioeng.* 1995; 45:245–50.
- Pike P., Chandler C. Partial purification and properties of somatic antigen spontaneously released from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1975; 12(1):187–92.
- Richardson S.H. Factors influencing in vitro skin permeability factor production *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1969; 100(1):27–34.
- Ravichandran M., Ali S.A., Rashid N.H. *Vibrio cholerae* strains VCUSMI and VCUSM4, method of producing same, and vaccine derivatives thereof. Patent 7838016 US, Nov. 23, 2010. United

States Patent.

45. Riesenber D., Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999; 51:422–30.
 46. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Enterotoxin production by *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* grown in continuous culture with microbial cell recycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 46:704–9.
 47. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Production of cholerae toxin-like toxin by vibriomimicus and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.
 48. Sanchez J., Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:481–5.
 49. Suzuki H., Kishimoto M., Kamoshita T. On-line control of feeding of medium components to attain high cell density. *Bioprocess Eng.* 2000; 22:433–40.
 50. Walle M. van de, Fass R., Shiloach J. Production of cholera toxin subunit B by a mutant strain of *Vibrio cholerae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990; 33:389–94.

References

1. Adamov A.K., Naumshina M.S. [Cholera Vibrios]. Saratov: Saratov State University Publishing House; 1984. 328 p.
 2. Altukhov M.V., Nikitin G.A., Filipov N.F. [Reactor unit for submerged cultivation of microorganisms]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1969; 2(6):192.
 3. Anisimov P.I., Adamov A.K., Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P. [Method of cholera prevention vaccine production]. RF Patent 2080121, opubl. 27.05.1997. Byul. № 15.
 4. Antonycheva M.V., Nizhegorodtsev S.A., Eremin S.A., Alenkina T.V., Shul'gina I.V., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K. [Nutrient media for submerged cholera vibrio cultivation]. RF Patent 2425866.
 5. Volokh O.A., Shepelev I.A., Zadnova S.P., Krepostnova I.M., Eremin S.A. [A study of biokinetic peculiarities and optimization of the conditions for culturing *Vibrio cholerae* strains overproducing protective antigens suitable for use in the production]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 1(95):52–5.
 6. Goryaev A.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Touchkov I.V., Smirnova N.I. [Construction of an El Tor biovariant *Vibrio cholerae* strain capable of type II cholera toxin hyperproduction and determining the optimal conditions for the production of this protein]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 1(95):56–9.
 7. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method of production of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280.
 8. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Naumov A.V., Kuz'michenko I.A., Taranenko T.M. [Oral chemical vaccine against cholera]. RF Patent 2159128.
 9. Naumov A.V., Dzhaparidze M.N., Gromova O.V., Adamov A.K., Eliseev Yu.Yu., Kosmaenko O.M., Kuz'michenko I.A., Kopyzov V.N., Zavorotnykh V.L., Zakharova T.L., Chekhovskaya G.V. [Novel *Vibrio cholerae* O139 strain as a producer of enteric chemical vaccine]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 2:52–5.
 10. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Meleshchenko M.V., Nikitina G.P. [Method of manufacturing of peroral chemical vaccine]. RF Patent 2076734.
 11. Zadnova S.P., Volokh O.A., Krepostnova I.M., Shchelkanova E.Yu., Livanova L.F., Zakharova T.L., Shepelev I.A., Yereomin C.A., Smirnova N.I. [Studying the main pathogenicity and immunogenicity factors production by different *Vibrio cholerae* strains while cultured under the production conditions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 1(93):51–5.
 12. Zadnova S.P., Eremin S.A., Avdeeva N.G., Volokh O.A. [Studies of growth rates as regards *Vibrio cholerae* strains – producers of the protective antigens, under conditions of submerged cultivation. Isolation of toxin-coregulated pilus of adhesion]. *Biotechnologiya*, 2004; 3:43–8.
 13. Zakharova T.L., Zadnova S.P., Livanova L.F., Kireev M.N., Smirnova N.I. [Recombinant strains application for simultaneous preparation of several purified cholera vibrio antigen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 2(100):68–71.
 14. Kulikova V.L., Karaeva L.T. [Comparative study of cholera vaccine properties, obtained using AKM-III units and fillers]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1969; 2(6):116–22.
 15. Kulikova V.L., Kovalenko N.M., Dobrova G.V., Kopyzov V.N., Kosmacheva N.L. [Investigations of optimum growth conditions, specific antigen formation and toxin production base for cholera vibrio culture under submerged cultivation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1979; 1:65–6.
 16. Lavrovskaya V.M., Chibrikova E.V., Karaeva L.T., Pertova L.S., Anokhina S.V., Anisimova T.I., Voronkina I.M., Dzhaparidze M.N., Drozdovskaya F.K., Kondrashkova T.V., Pavlova L.P., Gurtovik A.I. [Cholera vibrio cultivation under conditions of media aeration, and investigations of biological properties of submerged cultures]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1969; 3(37):179–83.
 17. Mazrukho A.B., Mikhas' N.K., Monakhova V.E., Rozhkov K.K. [Identification of optimum conditions for pathogenicity factor production in cholera vibrio]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2000; 1:21–4.
 18. Nenkov P.Kh., Strashimirov I.I., Polikar A.Ch. [Two-cycle cholera vibrio cultivation in bioreactor]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1986; 7:21–4.
 19. Nenkov P.Kh., Polikar A.Ch., Tsakova A. [Cholera vibrio cultivation in bioreactor operated at automatic mode for a range of factors]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1982; 5:47–50.
 20. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Toporkov A.V., Cheldysheva N.B. [*Vibrio cholerae* strain KM 200 – producer of cholera toxin ad toxin coregulated pilus of adhesion]. RF Patent 2193598.
 21. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Toporkov A.V. [*Vibrio cholerae* 2414 bacteria strain, Classical biovar, Ogawa serotype – producer of cholera toxin and toxin coregulated pilus of adhesion]. RF Patent 2169187.

22. Smirnova N.I., Chekhovskaya G.V. [*Vibrio cholerae* KM 138 bacteria strain, O139 serotype – producer of cholera O139 antigen]. RF Patent 2192463.
 23. Strelnikova-Aab E.N., Livanova L.F., Goryaev A.A., Cheldysheva N.B., Smirnova N.I. [*Vibrio cholerae* O1 avirulent Ssrains – producers of protective O1 antigen: obtaining and peculiarities]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 4(106): 39–42.
 24. Filipov A.F., Nikolaev N.I., Shesterenko A.F., Karaeva L.T. [Plague microbe and cholera vibrio agar cultivation using AKM-III]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1970; 1(11):158–63.
 25. Chekhovskaya G.V., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I. [Non-capsular *Vibrio cholerae* mutants, O139 serotype: construction, identification and utilization for diagnostic O139 anti-serum preparation]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2000; 1:34–7.
 26. Akesson M., Hagander P., Axelsson J.P. Probing control of fed-batch cultures: Analysis and tuning. *Control Engineering Practice.* 2001; 9(7):709–23.
 27. Craig G.P. Preparation of the vascular permeability factor of *Vibrio cholera*. *J. Bacteriol.* 1966; 92(3):793–5.
 28. Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence II. *Infect. Immun.* 1971; 7(5):611–8.
 29. Callahan L.T., Richardson S.H. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence III. *Infect. Immun.* 1983; 7(4):567–72.
 30. Germanier R., Forer E., Varallyay S., Inderbitzin T.M. Preparation of a Purified Antigenic Cholera Toxin. *Infect. Immun.* 1976; 13(6):1692–8.
 31. De Mary L., Andersson L., Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2004; 25(4):221–8.
 32. Evans D.J., Richardson S.H. In vitro production of cholera toxin and the vascular permeability factor by *Vibrio cholera*. *J. Bacteriol.* 1968; 96(1):126–30.
 33. Fedorka-Gray P.J. Production of cholerae toxin-like toxin by vibriomimicus and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.
 34. Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Pathogenesis of experimental cholera-preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxin. *J. Exp. Med.* 1969; 130(1):185–203.
 35. Finkelstein R.A., LosPalluto J.J. Production of highly purified cholera toxin and cholera toxin. *J. Infect. Dis.* 1970; 121:63–72.
 36. Finkelstein R.A. Pathogenesis of experimental cholera: biologic activities of purified procholera toxin. *J. Immunol.* 1966; 96(3):440–9.
 37. Jang H., Hyo S.K., Jeong A.K. Improved Purification Process for Cholera Toxin and its Application to the Quantification of Residual Toxin in Cholera Vaccines. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 19(1):108–12.
 38. Navratil M., Norberg A., Lembren L., Mandenius C.F. On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a *Vibrio cholerae* fed-batch cultivation. *J. Biotechnol.* 2005; 115(1):67–79.
 39. Nandi S., Maiti D., Saha A., Bhadra R.K. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTXphi array and its position in the genome. *Microbiology*. 2003; 149(1):89–97.
 40. Osek J., Lebens M., Holmgren J. Improved medium for largescale production of recombinant cholera toxin B subunit for vaccine purposes. *J. Microbiol. Methods.* 1995; 24:117–23.
 41. Panda A.K., Ghorpade A., Mukhopadhyay A. High cell density fermentation of recombinant *Vibrio cholerae* for production of B subunit of the *Escherichia coli* enterotoxin. *Biotechnol Bioeng.* 1995; 45:245–50.
 42. Pike P., Chandler C. Patial purification and properties of somatic antigen spontaneously released from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1975; 12(1): 187–92.
 43. Richardson S.H. Factors influencing in vitro skin permeability factor production *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1969; 100(1):27–34.
 44. Ravichandran M., Ali S.A., Rashid N.H. *Vibrio cholerae* strains VCUSM1 and VCUSM4, method of producing same, and vaccine derivatives thereof. Patent 7838016 US, Nov. 23, 2010. United States Patent.
 45. Riesenber D., Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999; 51:422–30.
 46. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Enterotoxin production by *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* grown in continuous culture with microbial cell recycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 46:704–9.
 47. Spira W.M., Fedorka-Gray P.J. Production of cholerae toxin-like toxin by vibriomimicus and non-O1 *Vibrio cholerae*: Batch culture conditions for optimum yields and isolation of hypertoxigenic lincomycin resistant mutants. *Infect. Immun.* 1983; 42(2):501–9.
 48. Sanchez J., Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86:481–5.
 49. Suzuki H., Kishimoto M., Kamoshita T. On-line control of feeding of medium components to attain high cell density. *Bioprocess Eng.* 2000; 22:433–40.
 50. Walle M. van de, Fass R., Shiloach J. Production of cholera toxin subunit B by a mutant strain of *Vibrio cholerae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1990; 33:389–94.

Authors:

Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Komissarov A.V., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K., Livanova L.F., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Bronnikova V.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Еремин С.А., Алешина Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 05.04.13.