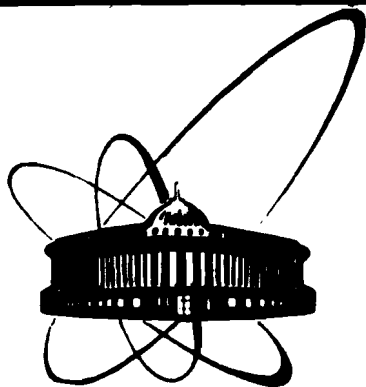


89-588



ОБЪЕДИНЕННЫЙ
ИНСТИТУТ
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ДУБНА

Б 43

18-89-588

И. А. Белушкина, Р. Ж. Манолов*, Е. Д. Воробьев,
А. М. Безбородов*

ИММОБИЛИЗАЦИЯ МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА
В МЕМБРАННОМ БИОРЕАКТОРЕ

Направлено в журнал "Folia microbiologica"

* Институт биохимии им. А. И. Баха АН СССР, Москва

1989

С развитием биотехнологии усиливается интерес к микроорганизмам - продуцентам внеклеточных ферментов. К их числу можно отнести внеклеточные рибонуклеазы, являющиеся традиционными объектами структурно-функциональных исследований, аналитическими инструментами в молекулярной биологии, а также основой создания лекарственных препаратов. Эффективность ферментативных процессов удастся значительно увеличить с помощью различных методов иммобилизации микробных клеток и ферментов /1-4/.

В данной работе предложен способ иммобилизации микромицетов в мембранном биореакторе с использованием ядерных мембран из полиэтилентерефталата (ПЭТФ) /5/. Культивирование микробных клеток в мембранном биореакторе имеет ряд преимуществ: во-первых, диффузионные ограничения могут быть сведены к минимуму; во-вторых, клетки микроорганизмов находятся в свободном, не связанном с каким-либо носителем состоянии, но в то же время в ограниченном пространстве (камере МБР), что позволяет осуществлять их многократное использование. При этом микробную популяцию, находящуюся в МБР, можно рассматривать как совокупность иммобилизованных клеток /6-8/.

Материалы и методы

Исследования проводились с мицелиальным грибом *Aspergillus clavatus* (штамм 2286/5) - продуцентом внеклеточной гуанилрибонуклеазы (Н.Ф.З.1.27.3). Посевным материалом служила культура, выращенная на агаровых косяках Чапека в течение 9-10 суток при 24-26°C. Для культивирования использовали модифицированную на основе среды Огато /9/ питательную среду следующего состава (г/л): глюкоза - 30, пептон - 5, KNO_3 - 2, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0,1, $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,5. Культивирование проводили в конических колбах емкостью 750 мл на круговой качалке с 220 об/мин при $25 \pm 1^\circ C$. В качестве инокулята для глубинного культивирования, иммобилизации в МБР и калибровки мембран по мицелию использовали отфильтрованную биомассу из 24+36-часовой культуры гриба, находящегося в экспоненциальной фазе роста. Для калибровки мембран по спорам использовали споровую суспензию концентрации $2+4 \cdot 10^6$ спор/мл.

Активность РНК-азы определяли модифицированным методом Анфинсена /10,11/, используя в качестве субстрата РНК (НПО "Бисоляр", Олайне), перекристаллизованную способом, описанным ранее /12/. За единицу

РНК-азной активности принимали количество фермента, вызывающего возрастание оптической плотности в реакционной смеси на единицу за 1 мин инкубации в описанных условиях.

Количество биомассы в МБР определяли методом высушивания мицелия в термостате при $40 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов (до постоянного веса) и взвешивания на весах.

Использованные ядерные мембраны имели толщину 10 мкм с практически цилиндрическими порами и пористостью, не превышающей 8%. Получают их как на ядерных реакторах, так и на ускорителях тяжелых ионов путем сквозного облучения тонких полимерных пленок быстрыми и достаточно тяжелыми заряженными частицами, т.е. осколками деления урана или ускоренными тяжелыми ионами соответственно, с последующей физико-химической обработкой облученных пленок для получения пор заданного размера [13-15].

Используемые ПЭТФ мембраны биологически инертны, химически стойки (при pH 2-12), выдерживают любые общепринятые методы тепловой и химической стерилизации. Разброс размеров пор составляет $2 \pm 5\%$.

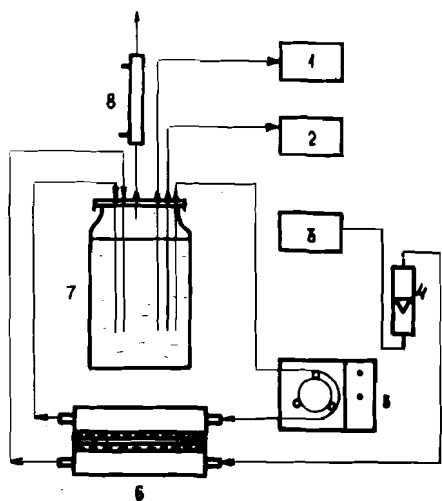


Рис. 1. Схема лабораторной установки для культивирования иммобилизованных клеток:
1 - pO_2 -метр; 2 - pH-метр;
3 - компрессор для воздуха;
4 - ротаметр; 5 - перистальтический насос; 6 - мембранный биореактор; 7 - резервуар с питательной средой;
8 - обратный холодильник.

Исследования были выполнены на лабораторной установке (рис. 1). Для проведения иммобилизации мицелиальную биомассу гриба помещали в камеру МБР высотой 3 мм, образуемую двумя мембранами с общей площадью рабочей поверхности 200 см^2 . Вдоль внешней стороны одной мембраны с помощью перистальтического насоса пропускали питательную среду, а вдоль внешней стороны второй - воздух, поступающий из компрессора и контролируемый посредством ротаметра.

Таким образом, мембраны обеспечивали диффузию питательных веществ и растворенного кислорода к клеткам, а также выход нативного раствора, содержащего продукт биосинтеза гриба - рибонуклеазу (РНК-азу).

Для выбора размеров пор мембраны, позволяющих достичь полной задержки мицелия и спор гриба в межмембранном пространстве, была проведена калибровка мембран по спорам и мицелию в диапазоне диаметров пор от 0,05 до 5 мкм. Размеры пор определяли методом "пузырька" [16], который несет информацию о самом узком месте канала, что существенно для оценки задерживающей способности мембраны [17].

Калибровку мембран по мицелию проводили следующим образом:

I. Инокулят *Aspergillus clavatus* проращивали в герметично запаиваемых пакетах из ядерных мембран с диаметрами пор от 0,02 до 5 мкм в течение 7 суток в колбах объемом 750 мл на круговых качалках при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$ со скоростью вращения 220 об/мин.

II. Споровую суспензию гриба высевали в чашки Петри на агар Чапека, сверху помещали ядерную ПЭТФ мембрану. Выращивание проводили 7 суток при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

III. Споровую суспензию высевали на ядерную мембрану, помещенную в чашки Петри на агар Чапека. Выращивание проводили также 7 суток при $25 \pm 1^\circ\text{C}$. При калибровке мембран по спорам споровую суспензию фильтровали сквозь ядерные ПЭТФ мембраны с диаметрами пор от 0,2 до 5 мкм. Контрольную фильтрацию вели сквозь мембрану с диаметром пор 0,02 мкм. В работе использовали фильтродержатели с диаметрами рабочей поверхности 25 мм - для исследуемой и 3 мм - для контрольной мембраны.

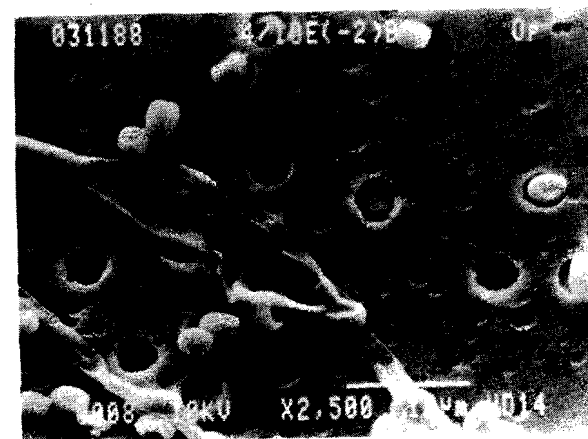


Рис. 2. Мицелий *Aspergillus clavatus*, проросший сквозь ядерную мембрану. Электронная фотография. Увеличение - 2500.

Мембраны после проращивания мицелия и фильтрации споровой суспензии просматривали на растровом микроскопе JSM-840 (фирмы JEOL, Япония) (рис. 2).

Результаты и обсуждение

Размеры пор ядерных мембран, используемых для иммобилизации культуры *Aspergillus clavatus* в МБР, выбирали, используя калибровочную зависимость, приведенную на рис. 3, и связывающую селек-

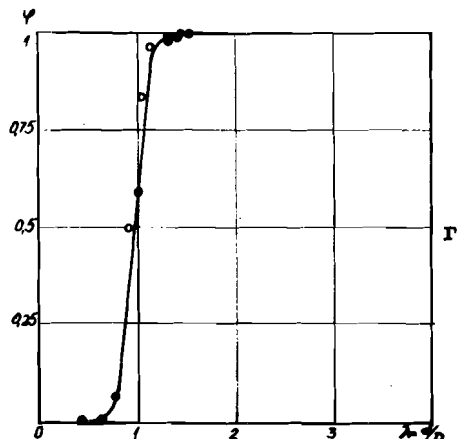


Рис. 3. Селективность ядерных мембран при проращивании мицелия и спор культуры *Aspergillus clavatus* при различной величине $\lambda = d/D$; ● - мицелий, ○ - споры.

достигать 0,6 мкм. Из зависимости видно, что полная задержка мицелия ядерными мембранами происходит при $D \leq 0,5$ мкм ($\lambda \geq 1,5$). Это объясняется эластичностью стенок прорастающих гифов.

Поэтому для иммобилизации культуры *Aspergillus clavatus* использовали ядерные мембраны, размеры пор которых не превышали 0,5 мкм.

Из калибровочной кривой следует также, что полная пропускная способность мицелия и спор гриба происходит при размерах пор мембраны $D_{пор} \geq 4$ мкм ($\lambda \leq 0,75$). На основании калибровки, приведенной на рис. 3, для иммобилизации были выбраны три типа мембран с $D_{пор} = 0,05$ мкм, 0,2 мкм и 0,4 мкм, пористостью 8% и толщиной 10 мкм. Для изучения поведения и характеристик мембран было осуществлено периодическое культивирование гриба в МБР. Эксперимент проводили в течение 7 суток со скоростью подачи питательной среды 3 л.ч^{-1} , воздуха 60 л.ч^{-1} . Динамика процесса

ности ядерных мембран

$\Psi = 1 - \frac{T_{\phi}}{T_{\psi}}$ (где T_{ψ} и T_{ϕ} - титр спор в исходном растворе и фильтрате либо процентное соотношение биомассы) с величиной $\lambda = d/D$ (где d - средний размер спор или минимальный диаметр гифов гриба, D - средний размер пор) $18-21$. Экспериментально построенная калибровочная зависимость одинаково хорошо описывает и селективность мембран в отношении спор, средний диаметр которых 3-4 мкм, и селективность мембран в отношении мицелия, размеры гифов которого 5-10 мкм, хотя минимальные размеры могут

биосинтеза РНК-азы с СК и ИК в МБР с применением мембран с различным $D_{пор}$ (таблица I) показана на рис. 4.

Таблица I

Синтез рибонуклеазы клетками *Aspergillus clavatus* при периодическом культивировании

Условия функционирования	Макс. суммарная продуктивность Е/г сухого мицелия	Сутки макс. активности
Свободные клетки	5900	5
ϕ 0,05 мкм	4300	6
ϕ 0,2 мкм	6500	6
ϕ 0,4 мкм	7900	5

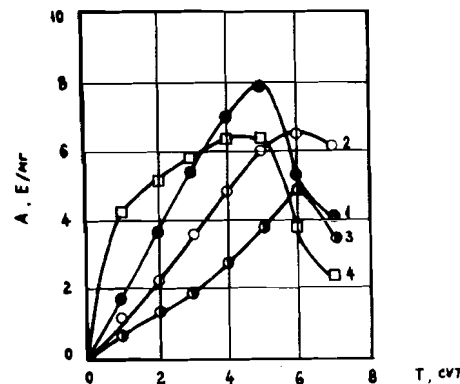


Рис. 4. Биосинтез рибонуклеазы при свободном культивировании клеток 4 (□) и иммобилизованных клеток в МБР с мембранами, имеющими диаметры пор - 0,4 мкм - 1 (●), 0,2 мкм - 2 (○) и 0,05 мкм - 3 (◊).

Максимальный уровень биосинтеза фермента в МБР с мембранами $D_{пор} = 0,4$ мкм был достигнут на 5 сутки и на 25% превышал таковой со свободными клетками в контроле. Применение мембран с $D_{пор} = 0,2$ мкм позволило достичь максимума РНК-азной активности на 6 сутки и он был сравним с активностью свободных клеток. Активность фермента при иммобилизации гриба в мембране $D_{пор} = 0,05$ мкм была значительно ниже (на 30%) от СК. Это можно объяснить концентрационной поляризацией, в большей степени сказывавшейся при $D_{пор} = 0,1$ мкм, а также вследствие образующегося на внешней стороне мембраны пристеночного пограничного слоя жидкости, являющегося по своим свойствам динамической ультрафильтрационной мембраной. Кроме того, это можно также связать с задерживающимися в межмембранном пространстве метаболитами, ингибирующими процесс биосинтеза.

На этой же установке было изучено влияние некоторых динамических и кинетических параметров на процесс биосинтеза при непрерывном куль-

Таблица 2

Синтез рибонуклеазы *Aspergillus clavatus*
при непрерывном культивировании

Условия функционирования	Суммарная продуктивность Е/г сухого мицелия Режим: 3/60 л/час	Время
Свободные клетки	5670	6 суток
Ø 0,2 мкм	17800	18 суток
Ø 0,4 мкм	20800	18 суток

тивировании с периодической заменой среды. Замену среды в резервуаре

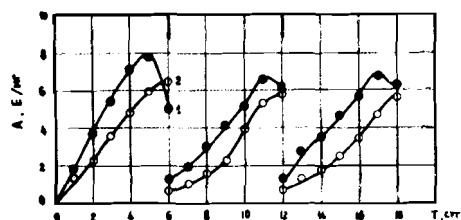


Рис. 5. Биосинтез рибонуклеазы при непрерывном культивировании иммобилизованных клеток в режиме подачи питательной среды 3 л.ч⁻¹, воздуха — 60 л.ч⁻¹ при диаметрах пор используемых в МБР мембран: 0,4 мкм — I (●), 0,2 мкм — II (○). Стрелками указано время замены среды.

120 ч заметно снижалась, что можно объяснить изменениями в биологическом состоянии гриба.

После замен среды иммобилизованные клетки не меняли характера поведения и продуцировали максимальное количество РНК-азы на 5 суток для $D_{пор} = 0,4$ мкм и 6-е — для $D_{пор} = 0,2$ мкм.

Иммобилизованные в МБР клетки сохраняли способность продуцировать РНК-азу, мембраны задерживали пророст клеток и обеспечивали нормальный доступ питательных веществ и кислорода к ним.

С каждым последующим циклом наблюдалось все более полное потребление субстрата, измеряемое редуцирующими сахарами (от 70 до 90%). Максимальное количество осуществленных циклов непрерывного культивирования — 4 (24 суток). Общая продуктивность иммобилизованной культуры при использовании мембран с $D_{пор} 0,4$ мкм превысила в 5 раз про-

дуцируемость свободных клеток и в 4,1 раз — при использовании мембран с $D_{пор} = 0,2$ мкм.

При попытке увеличить скорости потока питательной среды (до 7 л/ч) и воздуха (120 л/ч) с сохранением существующей схемы подачи питательных веществ и воздуха наблюдалась инактивация фермента, что вызвано, возможно, его механическим разрушением при выходе из биореактора. Применение ядерных ПЭТФ мембран обеспечивает свободный доступ питательных веществ и кислорода к клеткам культуры, а также задержку клеток и фрагментов в межмембранном пространстве. Осуществление процесса иммобилизации клеток мицелиальных грибов в мембранном биореакторе с использованием ядерных мембран позволяет увеличить сроки продуктивного функционирования клеток и избежать процедуры отделения биомассы от культуральной жидкости при смене питательной среды, что приводит к улучшению технологических характеристик процесса биосинтеза.

Авторы выражают глубокую благодарность Б.В.Мчедlishvili за полезные дискуссии, О.Л.Ореловичу за электронно-микроскопические исследования и В.В.Овчинникову за ряд критических замечаний.

Литература

1. Immobilized cells and enzymes: a practical approach/ ed. Woodward J. Oxford: IRL Press Limited. 1985.
2. Scott C.D.—Microbiol. Technol. 1987, v.9, p.66.
3. Bihari V., Basu S.K.—J. Sci. and Ind. Rev., 1984, v.43, N 12, p. 679.
4. Ohlson S.—In: Dechema Monography, 1978, v.82, p.1.
5. Мчедlishvili Б.В., Флеров Г.Н.—Ж. Всес.хим.об-ва им. Д.И.Менделеева, 1987, т.XXXII, кн.6, с.641.
6. Lopez-Leiva M., Teagardh G.—In: Chem. Technol., 1983, v.35, p. 381.
7. O'Sullivan T.J., Epstein A.C., Korchin S.R., Beaton N.C.—Chem. Eng. Prog. 1984, p.80.
8. Т.Брок.—Мембранная фильтрация. Микр, 1987, с.68.
9. Безбородова С.И., Бородаева Л.И., Панкова Л.Н.—Микробиология, 1967, т.1, № 4, с.334.
10. Anfinsen C.B., Rodfied R.R., Choate W.L., Page J.T., Carroll W.R.—J. Biol. Chem., 1954, v.207, N 1, p.201.
11. Иванова Г.С., Валикайте Р.В., Безбородов А.М.—Микробиология, 1972, т.41, № 4, с.626.
12. Безбородов А.М., Иванова Г.С., Юрьева Л.И.—Прикладная биохимия и микробиология, 1967, т.3, № 1, с.30.

13. Price P.B., Walker R.M.-Phys. Rev. Lett., 1962, N 8, p. 217.
14. Fisher B.E., Spohr R.-Rev. Mod. Phys., 1983, v.55, N 4, p. 907.
15. Флеров Г.Н.-УФН, 1974, т.114, вып.2, с.361.
16. Ballew H.W.-Basic of Filtration and Separation. Nuclepore Corp., Pleasanton, California, 1978, 88 p.
17. Кузнецов В.И., Овчинников В.В., Селезнев В.Д., Акиншин В.Д. -Сообщение ОИЯИ 18-83-578, 1983, Дубна, 4 с.
18. Черкасов А.Н., Жемков В.П., Мchedlishvili Б.В., Самохина Г.Д., Булыгин А.Н., Третьякова С.П., Козлова Т.П., Потокин И.Л. -Коллоидный журнал, 1978, т.40, № 6, с.11557.
19. Гагарин Ю.Ф., Гусинский Г.М., Лемберг И.Х., Мchedlishvili Б.В. -Ж.Ф.Х., 1978, т.52, № 1, с.220.
20. Мchedlishvili Б.В. и др. - Тезисы докладов III Всесоюзной конференции по мембранным методам разделения смесей. Черкассы: НИИТХЭИМ, 1981, ч.1, с.191.

Рукопись поступила в издательский отдел
8 августа 1989 года.

Белушкина И.А. и др. 18-89-588
Иммобилизация мицелиального гриба
в мембранном биореакторе

Исследована возможность иммобилизации мицелиального гриба *Aspergillus clavatus* в мембранном биореакторе, содержащем ядерную мембрану. Проведено как периодическое, так и непрерывное, с периодической заменой питательной среды, культивирование. Показано, что иммобилизация клеток мицелиальных грибов в данном биореакторе позволяет увеличить сроки продуктивного функционирования клеток и избежать процедуры отделения биомассы от культуральной жидкости, что приводит к улучшению технологических характеристик процесса биосинтеза фермента.

Работа выполнена в Лаборатории ядерных реакций ОИЯИ.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1989

Перевод авторов

Belushkina I.A. et al. 18-89-588
The Immobilization of Cells
of Micelial Fungus in the Membrane Bioreactor

The possibility of the immobilization of the micelial fungus *Aspergillus clavatus* in the membrane bioreactor which contains the nuclear membrane is investigated. Both periodical and continuous cultivation with periodically repeated changes of the feed medium is carried out. The immobilization of cells of the micelial fungus in this bioreactor permits to increase the time of the productive functioning of the cells and avoids the procedure of a biomass separation from the cultural liquid. It improves the technological characteristics of the biosynthesis process.

The investigation has been performed at the Laboratory of Nuclear Reactions JINR.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна 1989