

УДК 579.66.083.13

Культивирование гриба *Aspergillus terricola* в гетерогенной полимерной системе. Шведов Д.Н., Яковлев В.И., Сальникова Т.А., Павленко И.В., Рейфман Л.С., Егорова Т.В., Аравина Л.А., Ефимова Т.П. // Научное приборостроение. Методы и приборы биотехнологии. Л.: Наука, 1988, с.23.

Описана методика культивирования в водной двухфазной полимерной системе гриба *Aspergillus terricola* - пероцективного продуцента биологически активных веществ. Показано, что культивирование в ДВПС является эффективным методом воздействия на биосинтез микроорганизмами продуцентов. Лит. - 5 назв., ил. - 1.

Д.Н.Шведов, В.И.Яковлев (ЛТИ им.Ленсовета), Т.А.Сальникова, И.В.Павленко,
Л.С.Рейфман (НТО АН СССР), Т.В.Егорова, Л.А.Аравина, Т.П.Ефимова (ВНИТИАФ)

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ГРИБА *Aspergillus terricola* В ГЕТЕРОГЕННОЙ ПОЛИМЕРНОЙ СИСТЕМЕ

Одним из главных направлений биотехнологии является создание принципиально новых технологических процессов получения аминокислот, ферментов, витаминов, ан-

тибиотиков и других продуктов, а также их аппаратурного оформления. Перспективным в этом направлении является использование для культивирования продуцентов в двухфазных водных полимерных системах (ДВПС), состоящих из водорастворимых полимеров, чаще всего из полиэтиленгликоля (ПЭГ) – верхняя фаза и нижняя – декстрана (Д). Преимущества этого метода основываются на том, что микроорганизмы концентрируются в объеме одной фазы, а продукт их жизнедеятельности извлекается в другую. Постоянный отвод метаболитов из сферы их биосинтеза позволяет снять катаболитную репрессию целевым продуктом, добиться увеличения выхода и получения в определенной степени очищенного и сконцентрированного целевого продукта. Большим преимуществом этого метода является то, что он может быть реализован в мягких условиях – при физиологических значениях pH, ионной силы, температуры. Поверхностное натяжение между фазами достаточно низкое, фазообразующие полимеры оказывают стабилизирующее действие на структуру биогенных соединений [1].

В настоящее время метод распределения в ДВПС в основном используется для разделения, очистки и концентрирования различных биологических частиц и макромолекул [2].

Первые работы по культивированию микроорганизмов в ДВПС относятся к началу 60-х гг. Проводилось культивирование облигатных анаэробов *Clostridium tetani* и *Bacillus anthracis* [3]. За счет постоянного отвода образующегося в процессе ферментации токсина удалось снять катаболитную репрессию и стимулировать культуру к сверхсинтезу. Процесс проводили как в периодическом, так и в непрерывном режиме культивирования.

Следующий этап в работах по биосинтезу ДВПС связан с проведением культивирования *Clostridium acetobutylicum* в системе Д-ПЭГ [4]. При этом удалось сократить время, за которое достигался максимум выхода целевого продукта – бутанола и увеличить концентрацию бутанола.

В настоящее время в Швеции ведутся работы по проведению процесса культивирования в ДВПС дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [5]. При этом проводится комплексная переработка субстрата целлюлозы. Вместе с дрожжами в ДВПС добавляют эндо- и экзоглюконазы и β -глюкозидазу. В результате удалось добиться снятия катаболитной репрессии целлюлозой и целевым продуктом – этанолом и стимулировать сверхсинтез спирта дрожжами.

В настоящее время в промышленности большинство продуцентов биологически активных веществ представлено мицелиальными культурами, в основном грибами. В связи с этим встал вопрос о возможности использования метода культивирования в ДВПС по отношению к мицелиальным культурам.

В качестве объекта исследования в нашей работе был использован штамм *Aspergillus terricola* Н-20 – продуцент препарата протеолитического действия – терриметина [6]. Было изучено распределение мицелия *Aspergillus terricola* конечного продукта – террилитина с целью выбора подходящей системы для культивирования гриба в ДВПС.

Единственным фактором, на который мы можем эффективно воздействовать и который может оказать существенное влияние на характер распределения мицелия между фазами в процессе культивирования, являются сами фазообразующие полимеры, поскольку другие факторы, такие как pH, концентрация ионов в процессе культивирования меняются в очень широком диапазоне, к тому же часто имеют дело с комплексными средами, состав которых до конца не определен.

В настоящей работе было изучено восемь систем, состоящих из неионных полимеров, и четыре – содержащих электролиты. Результаты распределения мицелия в

различных ДВПС представлены в табл.1. В каждую из систем вносили по 0,2-0,3 мл

Таблица 1

Распределение мицелия гриба *Aspergillus terricola* в ДВПС

Состав водной двухфазной системы					Цитрат натрия, %	Соотношение объемов верхней и нижней фаз	Общий объем системы, мл	Наличие мицелия в фазе	
Д500, %	ПЭГ		%	%				верхней	нижней
	мол.м	%							
7,2	1500	7,0	-	-	-	-	5	+	-
7,8	2000	6,1	-	-	-	-	5	+	-
7,8	6000	4,9	-	-	-	1	4	+	-
7,8	6000	4,9	-	-	0,25	1	4	+	-
7,8	6000	4,9	-	-	1,25	1	4	+	-
8,1	12000	4,4	-	-	-	-	5	-	+
10,6	2000	6,2	-	-	-	1,5	5,6	-	+
10,0	35000	5,1	-	-	-	-	5	-	+
-	6000	11,0	12,0	-	-	1	5	-	+
-	6000	11,0	-	7,3	-	0,6	5	-	+
-	1500	19,0	12,0	-	-	1	4	+	-
-	1500	19,5	-	9,3	-	1,1	4	+	-

культуральной жидкости, что составляло 5-7 % от общего объема. Использовали мицелий разного возраста, который центрифугировали в градиенте плотности сахарозы. Была показана его однородность, так как около 90 % всего мицелия, независимо от возраста, находилось в зоне одной плотности. Изоплотностное центрифугирование мицелия показало, что он имел плотность более $1,16 \cdot 10^3$ кг/м³. Это исключало распределение мицелия в ДВПС в зависимости от его плотности, так как плотность нижней фазы составляла около $1,06+1,08$, а верхней - $1,01+1,02$ кг/м³, а мицелий в любом случае должен был бы оседать на дно пробирки, а этого никогда не происходило.

Распределение мицелия и протеаз в ДВПС проводили в следующей последовательности. Первоначально, исходя из фазовой диаграммы, выбирали конечные концентрации полимеров в ДВПС. Затем на дистиллированной воде готовили концентрированные растворы этих полимеров. В работе были использованы 15 % раствор декстрана (Д500), среднечисленная молекулярная масса 500 тысяч, фирма *Loba Fienchemie* (Швеция) и 20 % растворы полиэтиленгликолей со среднечисленными молекулярными массами 1500, 2000, 4000, 6000, 12000, 20000, 35000, фирма *Merck-Schuchardt* (ФРГ).

Для создания ДВПС в пенициллиновый флакон емкостью 8 мл вносили пипетками расчетные количества концентрированных растворов полимеров и других составных частей системы. Последовательность внесения ингредиентов для получения системы следующая: декстран, раствор соли (если необходимо), дистиллированная вода, раствор ПЭГ. Общий объем системы составлял 5 мл. Затем флакон несколько раз переворачивали и добавляли раствор фермента, нативного раствора или культуральной жидкости, закрывали пробкой, тщательно перемешивали и оставляли в холодильной камере (-4 °С) для разделения на 10-15 ч.

Отбор проб проводили при помощи шприца сначала из нижней, а затем из верхней фазы, избегая их перемешивания.

Протеолитическую активность определяли методом Купитца в модификации Ласковского [7]. Наличие мицелия определяли как визуально, так и микроскопически.

Как показали многочисленные эксперименты с различными ДВПС, при внесении в систему небольших количеств мицелия наблюдалась общая картина расслоения. Сразу после перемешивания мицелия с фазообразующими полимерами он однородно располагался во всем объеме системы. Затем, после образования поверхности раздела фаз, мицелий распределялся в объеме одной из фаз (в зависимости от состава системы), оставляя другую фазу системы чистой. В последующем, при отстаивании, мицелий концентрировался у границы раздела и далее происходило лишь его уплотнение. Если объем внесенного в систему мицелия превышал 40 % объема последней, он располагался исключительно в нижней фазе ДВПС независимо от полимерного состава. Следует отметить, что характер распределения мицелия не зависел от его возраста.

В настоящей работе было изучено распределение в различных ДВПС протеолитического препарата террилитина, продуцентом которого является *Aspergillus terricola*. Для оценки распределения фермента между фазами системы использовали коэффициент распределения K_p , который рассматривали как отношение количества единиц протеолитической активности верхней фазы к нижней. Использовали препарат террилина производства ПО "Мосмедпрепараты" и нативные растворы, полученные на разные сроки культивирования гриба в колбах [6].

Было обнаружено, что в системе на основе Д и ПЭГ 6000 K_p террилитина был равен 1,03. Добавление $NaCl$ вызывало при низких концентрациях $NaCl$ снижение K_p до 0,56 и повышение его до 1,16 при увеличении концентрации соли. Следует отметить, что полученные результаты аналогичны известным литературным данным по изменению K_p в ДВПС для ряда белков в зависимости от концентрации в среде различных ионов [1]. Увеличение молекулярной массы ПЭГ с 6000 до 12000 снижало K_p террилина с 1,03 до 0,48.

На основании полученных результатов по распределению отдельно мицелия и фермента в ДВПС, для изучения культивирования были выбраны системы на основе Д и ПЭГ 6000 и ПЭГ 12000. В данных системах мицелий располагался соответственно в верхней и нижней фазах. Коэффициент распределения протеазы в этих двух системах 1,03 и 0,48 соответственно. Соотношение объемов фаз составляло 1:1 и наиболее отвечало проведению эксперимента, так как уменьшение объема мицелийсодержащей фазы приводило к росту мицелия в объеме обеих фаз, а увеличение объема этой фазы снижало эффективность воздействия ДВПС на биосинтез фермента (уменьшение количества отводимого продукта).

В системе Д-ПЭГ 6000 при соотношении объемов фаз 1:1 и при $K_p = 1,03$ из объема фазы, где находился мицелий, извлекалось около 50 % образующейся протеазы. В системе же Д-ПЭГ 12000 ($K_p = 0,48$) в верхнюю фазу отводилось лишь около 33 % протеазы. Следует отметить, что если мицелий в системе Д-ПЭГ 6000 переходил бы в нижнюю фазу, то при увеличении его количества эффект влияния ДВПС остался бы прежним, так как $K_p = 1$.

В системах, содержащих ПЭГ с молекулярной массой более 12000 или менее 6000, еще меньшее количество фермента будет извлекаться при биосинтезе в другую фазу. В этих случаях фермент будет стремиться к фазе, где находится мицелий.

Культивирование гриба *Aspergillus terricola* в ДВПС производилось следующим образом. В колбы на 750 мл приливали расчетное количество концентрированных раство-

ров полимеров и водопроводную воду, общий объем полученной ДВПС составлял 100 мл. Затем проводилась стерилизация системы автоклавированием при $7 \cdot 10^4$ Па в течение 30 мин. Вегетативный посевной материал, выращенный на комплексной среде 30 б в течение 24 ч, в объеме 50 мл приливали к 100 мл ДВПС.

В работе были поставлены несколько серий опытов по культивированию.

Серии I, II – создавались системы из 7 % Д и ПЭГ с различной молекулярной массой, а именно – I – ПЭГ 6000, 4,5 %; II – ПЭГ 12000, 3 %.

Серии III, IV – культивирование проводилось в присутствии полимеров, но раствор оставался гомогенным, так как их концентрации ниже, чем необходимо для образования ДВПС, концентрации полимеров в III серии – Д 4 %, ПЭГ 6000 3 %; IV – Д 3 %, ПЭГ 12000, 2 %.

Серии V, VI – контрольные, в V – посевной материал вносили в воду, в VI – в регламентную среду.

Во всех сериях было поставлено по 4 опыта, полный объем системы составлял 150 мл. Ежедневно отбирали по 10 мл пробы из каждой колбы и анализировали на pH, биомассу, протеолитическую активность. Следует отметить, что в I и II сериях мицелий гриба рос только в объеме одной из фаз.

Полученные данные по культивированию в ДВПС представлены в табл.2. Особого

Таблица 2

Динамика роста и продуктивности мицелия при культивировании гриба

Aspergillus terricola в ДВПС

№ серии	Система	Удельная активность, ПЕ/мл					Продуктивность, ПЕ/мг				
		Сроки культивирования, ч									
		24	48	72	96	120	24	48	72	96	120
I	Фазовая Д-ПЭГ 6000	8,0	10,6	11,8	11,9	8,0	3,6	3,9	6,2	6,4	5,3
II	Фазовая Д-ПЭГ 12000	8,0	13,4	11,9	8,9	13,5	3,2	3,8	4,4	3,3	5,6
III	Нефазовая Д-ПЭГ 6000	7,3	12,7	12,2	9,0	13,6	-	2,2	3,6	2,6	3,9
IV	Нефазовая Д-ПЭГ 12000	7,7	11,7	11,2	11,3	14,7	-	2,4	2,3	3,2	4,4
V	H ₂ O	8,0	10,2	10,4	11,8	12,0	-	2,2	3,6	4,4	8,0
VI	Регламентная среда	7,1	14,7	19,4	22,0	22,6	-	2,3	3,4	5,9	6,3

внимания заслуживает выявленный нами факт повышения продуктивности мицелия при его росте в фазовых ДВПС. При этом повышение продуктивности мицелия зависело исключительно только от создания фаз и наличия границы их раздела, а не присутствия полимеров, так как в нефазовых системах с полимерами (III, IV) продуктивность мицелия была на уровне контроля (VI).

На основании полученных результатов был рассчитан коэффициент, показывающий отношение продуктивности мицелия в ДВПС по сравнению с его ростом в нефазовых системах, представляющих собой гомогенные растворы полимеров (см. табл.3).

Из табл.3 следует, что создание ДВПС на основе Д-ПЭГ 6000 приводило к уве-

Таблица 3

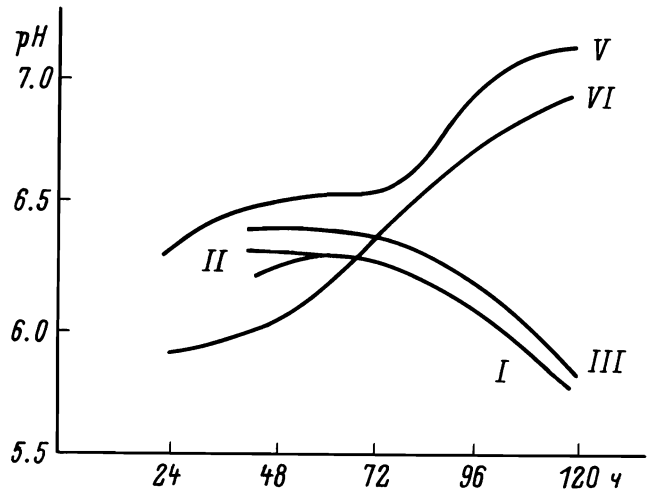
Коэффициент повышения продуктивности
в ДВПС

Отноше- ние про- дуктив- ности в сериях опытов (табл. 2)	Сроки культиви- рования, ч				Среднее значение коэффици- ента
	48'	72	96	120	
I/III	2,26	1,73	2,42	1,36	1,9 ± 0,5
II/IV	1,60	1,91	1,02	1,27	1,4 ± 0,4

личению продуктивности мицелия почти в два раза, это происходило при извлечении из нижней фазы, где рос гриб, около 50 % образующейся протеазы. В случае же перехода в верхнюю фазу, содержащую ПЭГ 12000, протеазы в количестве 33 %, возрастание продуктивности было лишь на 45 %.

Значительное влияние на биосинтетические способности культуры могло бы оказывать изменение pH в процессе культивирования. Из рисунка видно, что значение pH в среде с полимерами (I, II, III) при культивировании гриба резко снижалось (с 6,4 до 5,7), в то время как в контроле оно повышалось с 5,9 до 6,5. По-видимому, снижение pH в ДВПС приводило к уменьшению удельной протеолитической активности на 120 ч культивирования в ДВПС, в то время как в контроле активность продолжала возрастать (см. табл. 2). Следует отметить, что снижение pH в присутствии полимеров одной молекулярной массы как в фазовой, так и в нефазовой системах (I, III) не зависело от поверхности раздела фаз, а только от молекулярной массы ПЭГ.

Проведенные методические исследования позволяют сформулировать требования к аппаратуре для реализации прогрессов культивирования с постоянным отводом целевого продукта.



Динамика значений pH в процессе культивирования I-V серии опытов (см. табл. 2)

ЛИТЕРАТУРА

1. Альбертсон П.-А. Разделение клеточных частиц и макромолекул, - М.: Мир, 1974.
2. Mattiasson B., Ling K. // Kemia-Kemi, 1985, V.9, N3, p. 241-244.
3. Puziss M., Mecler C.-G. // Biotechnol. Bioeng. 1965, V.7, p. 355-366.
4. Mattiasson B. // Enzyme Eng., 1982, V.6, p. 153-154.
5. Nahu-Hagerdal B. // Biotechnol. Letters, 1981, V.3, N2, p. 53-58.
6. Успехи в области изучения и производства антибиотиков. Вып. УШ, 1980.
7. Lascowsky B. // Methods of Enzymology, 1958, V.2.