

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ КОМІТЕТ УКРАЇНИ
З МЕДИЧНОЇ ТА МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ім. Д. К. ЗАБОЛОТНОГО

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ

ЖУРНАЛ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ
ЗАСНОВАНИЙ У 1934 Р.
ВИХОДИТЬ ОДИН РАЗ У ДВА МІСЯЦІ

MIKROBIOLOGICHNY ZHURNAL

Том 57, № 3, травень — червень, 1995

КИЇВ

НАУКОВА ДУМКА

З М І С Т

Експериментальні праці

<i>Скрипаль І. Г., Онищенко А. М., Малиновська Л. П., Токовенко І. П., Гаврилко Л. О.</i> Деякі фенотипові ознаки молікутів як їх можливі філогенетичні маркери	3
<i>Волкогон В. В., Миняйло В. Г., Лемешко С. В., Онищенко Л. И.</i> Специфичность взаимодействия бактерий рода <i>Azospirillum</i> со злаковыми травами	9
<i>Сидоренко Л. П., Пашкевич Р. Е., Лугаускас А. Ю., Гермаш Л. П.</i> Микромицеты, развивающиеся на металлах в природных условиях	15
<i>Малашенко Ю. Р., Хайер Ю., Романовская В. А., Бергер У., Будкова Е. Н., Шагохина Э. С.</i> Синтез и окисление метана бактериями в гипергалинных озерах	24
<i>Коробкова Е. С., Панченко Л. П., Шаламай А. С., Скрипаль И. Г.</i> Способность олигодезоксирибонуклеотидов, комплементарных 3'-концевому участку 16S-рРНК молликутов, подавлять трансляцию на их рибосомах в системе <i>in vitro</i>	30
<i>Гудзь С. П., Гірна О. В., Гнатюш С. О.</i> Деякі особливості катаболізму вуглеводів і регуляції β-галактозидазної активності у лактозозасвоюючих дріжджів	37
<i>Коваленко О. Г., Баркалова А. О.</i> Одержання біологічно активних мананвмісних препаратів з дріжджів	41
<i>Лысенко А. М., Бугайцова Ж. А., Иванца В. А.</i> Уровень гомологии ДНК некоторых видов рода <i>Cytophaga</i>	48
<i>Денисов И. И., Каплиев В. И.</i> Получение и характеристика клонированных фагов <i>Pseudomonas pseudomallei</i>	53
<i>Кудрякова Т. А., Черепяхина И. Я., Алексеева Л. П., Македонова Л. Д., Евгеева Е. И., Дудкина О. В., Бурлакова О. С., Власов В. П., Гаврилов Б. В., Водопьянов С. О., Сорокин В. М.</i> Причины устойчивости холерных вибрионов к диагностическим фагам	56

<i>Щербатенко Г. С., Олещенко Л. Т.</i> Прояв високої стійкості до вірусу бронзово-сті томатів клітинних клонів та гібридів топону	65
<i>Думанский В.Д., Поводзинский В. Н., Карлаш Ю. В., Иваненко В.К., Селезнев А. В., Дыганков С. П., Кишко Я.Г.</i> Влияние гидродинамических условий на интерферонсинтезирующую активность спленоцитов свиней при получении а-интерферона	71
<i>Колтукова Н. В., Менджул М. И., Заболотная Г. М., Кошель М. И.</i> Подбор культур цианобактерий для доочистки сточных вод спиртово-дрожжевого производства	78

Огляди літератури

<i>Перепнихатка В. И., Полевода Б. В.</i> Генетические аспекты изучения бактерий <i>Pseudomonas syringae</i>	84
<i>Щетинина В. Н., Панченко Л. А., Волянский Ю. Л.</i> Структура и иммунологические свойства белков коронавируса	98

УДК 576.53.2:576.538

*В. Д. Думанский, В. Н. Поводзюнский, Ю. В. Карлаш,
В. К. Иваненко, А. В. Селезнев, С. П. Цыганков, Я. Г. Кишко*

*Ин-т микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев;
Киев. технол. ин-т шп. пром-сти МО Украины*

ВЛИЯНИЕ ГИДРОДИНАМИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ НА ИНТЕРФЕРОНСИНТЕЗИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ СПЛЕНОЦИТОВ СВИНЕЙ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ α -ИНТЕРФЕРОНА

Определены параметры физических составляющих процессов перемешивания и массообменные характеристики предложенного биореактора для суспензионного культивирования спленоцитов свиней. Исследовано влияние гидродинамических условий на жизнеспособность и интерферонсинтезирующую активность клеток при получении α -интерферона свиней. Методом парной корреляции проведен анализ связи процессов интерфероногенеза при суспензионном и стационарном биосинтезе.

Ключевые слова: спленоциты, культивирование, α -интерферон, биореактор

Известно, что из совокупности взаимосвязанных факторов, оказывающих влияние на эффективность процесса биосинтеза, важное место занимают гидродинамические и массообменные характеристики среды обитания клеток-продуцентов. Из используемых в настоящее время способов культивирования клеток млекопитающих [1, 7, 9] перспективным и наиболее эффективным представляется суспензионный. Однако в связи с созданием условий, обеспечивающих монодисперсное состояние клеток при суспензионном культивировании, необходимо определение требуемой интенсивности массообмена и времени гомогенизации, параметры которых должны отвечать физиологическим условиям жизнедеятельности клеток.

Цель настоящих исследований состояла в определении гидродинамических характеристик и интенсивности массопередачи кислорода в предложенной конструкции биореактора [13], а также влияния гидродинамических условий на жизнеспособность и интерферонсинтезирующую активность спленоцитов свиней при получении α -интерферона.

© В. Д. Думанский, В. Н. Поводзюнский, Ю. В. Карлаш, В. К. Иваненко, А. В. Селезнев, С. П. Цыганков, Я. Г. Кишко, 1995

Материал и методы. Получение спленоцитов свиней — продуцентов α -интерферона (α -ИФН), прайминг и индукцию осуществляли согласно описанной методике [12]. При биосинтезе использовали среду 199 «М» с добавлением 1 % сыворотки КРС, пенициллина и стрептомицина по 100 ед/мл. Жизнеспособность клеток определяли методом исключения красителя живыми клетками при окраске 0,1 %-ным раствором трипанового синего в изотоническом растворе NaCl. Подсчет окрашенных и неокрашенных клеток проводили в гемоцитометре по стандартной методике [4].

Антивирусную активность препарата оценивали с помощью титрования на культуре клеток СПЭВ в микроплатах фирмы Linbro против 100 ТЦД₅₀ вируса везикулярного стоматита по методике Grossberg с соавт. [15].

Суспензионное культивирование осуществляли в вибрационном биореакторе емкостью 1,8 л в течение 18 ч при температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, частоте перемешивания $f=0,1-3,0$ Гц и амплитуде $a=6-10$ мм. Оксигенацию обеспечивали поверхностной аэрацией с удельным расходом воздуха 0,20—0,05 л/л·мин.

Стационарное культивирование проводили в 0,5-литровых флаконах при коэффициенте заполнения 0,5; остальные параметры были такими же, как и при суспензионном культивировании.

Для определения основных гидродинамических характеристик разработанной конструкции биореактора по интенсивности перемешивания использовали параметры характерных времен перемешивания. Данные были получены при снятии кривых отклика системы на импульсное возмущение путем измерения концентрации водородных ионов в системе с последующей регистрацией кривой отклика по ранее описанным методикам [3, 11].

Полученные кривые отклика обрабатывали в координатах $Lp(1-\eta) - \tau$, на которых графическим методом определяли: время гомогенизации τ_η , время крупномасштабного переноса — $\tau_{кп}$, время микроперемешивания — $\tau_{мп}$, время релаксации процесса гомогенизации — τ_p и его технологическую эффективность β_η .

Время гомогенизации τ_η для выбранной степени однородности $\eta = 0,95$ определяли по формуле:

$$\tau_\eta = \tau_{кп} + \tau_{мп}, \quad (1)$$

где $\tau_{кп}$ — время крупномасштабного переноса, с; $\tau_{мп}$ — время микроперемешивания, с.

Так как $\tau_{мп}$ зависит от достигнутой η , τ_p определяли как тангенс угла наклона касательной при изменении натурального логарифма $(1-\eta)$ на порядок, что соответствует степени однородности $1-\eta = e^{-1} = 0,368$. Связь $\tau_{мп}$ и τ_p устанавливали из соотношения:

$$\tau_{мп} = -\tau_p \ln(1-\eta). \quad (2)$$

Технологическую эффективность процесса гомогенизации находили из уравнения:

$$\beta_\eta = \frac{\tau_{мп}}{\tau_{кп} + \tau_{мп}} = \frac{\tau_{мп}}{\tau_\eta}. \quad (3)$$

Массообменные характеристики биореакторов исследовали динамическим методом, определяя объемный коэффициент массопередачи кислорода в системе воздух — вода с использованием полярографического мембранного датчика парциального давления растворенного кислорода по известной методике [5].

Максимально достижимую скорость массопередачи кислорода при равновесной концентрации C_p , не превышающей 4—6 мкг/мл, определяли по формуле:

$$Q_{bc} = dC/dt = Kl_a(C_p - C) - r_{O_2} \cdot T, \quad (4)$$

где $Q_{\text{вс}}$ — скорость массопередачи, мкг/мл·с; Kl_a — объемный коэффициент массопередачи, с⁻¹; C_p — равновесная концентрация насыщения среды кислородом, мкг/мл; C — фактическая концентрация кислорода, с которой встречаются клетки, или концентрация на стороне потребителя, мкг/мл; r_{O_2} — удельная потребность клеток (кл.) в кислороде, мкг $O_2/10^6$ кл.·с; T — количество клеток, 10^6 кл./мл. Величину удельной поверхности контакта фаз «а» рассчитывали по формуле:

$$a = F/V, \quad (5)$$

где F — площадь свободной поверхности среды в биореакторе, м²; V — рабочий объем биореактора, м³.

Для установления степени корреляции процессов интерфероногенеза при суспензионном и стационарном культивировании использовали программу обработки данных методом парной корреляции [6].

В каждой серии параллельных опытов среднее арифметическое значение вычисляли по формуле:

$$y_j = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k y_{ji}, \quad (6)$$

где j — номер серии; k — число параллельных опытов, проведенных при равных условиях.

Величину дисперсии вычисляли по формуле:

$$S_j^2 = \frac{1}{k-1} \sum_{i=1}^k (y_{ji} - y_j)^2. \quad (7)$$

Для количественной оценки линейной корреляции использован коэффициент парной корреляции R_{xy} , который рассчитывали по формуле:

$$R_{xy} = \frac{S_1 S_5 - S_2 S_3}{\sqrt{[S_1 S_4 - S_2^2][S_1 S_6 - S_3^2]}},$$

где

$$S_1 = N, \quad S_2 = \sum_{i=1}^n X_i, \quad S_3 = \sum_{i=1}^n Y_i, \quad S_4 = \sum_{i=1}^n X_i^2. \quad (8)$$

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке [2].

Результаты и их обсуждение. Исследования гидродинамических характеристик вибрационного биореактора проводили с целью определения наиболее эффективного режима его работы при суспензионном культивировании клеточных культур. Технологическую эффективность и характерные времена перемешивания определяли в диапазоне частот колебаний от 0,5 до 2,0 Гц.

Анализ полученных данных (рис. 1) свидетельствует о наличии неустойчивого гидродинамического режима в диапазоне частот 0,5—1,0 Гц. Дальнейшее повышение частоты колебаний приводит к стабилизации гидродинамики в биореакторе, что подтверждается соответствующими значениями характерных времен перемешивания и коэффициентов технологической эффективности. Полученные данные служат подтверждением того, что основным лимитирующим фактором биосинтеза является перенос на микроуровне и для его интенсификации требуется увеличение подводимой энергии на микроперемешивание.

Одним из возможных лимитирующих факторов биосинтеза является обеспечение клеточной суспензии растворенным кислородом. В связи с этим определяли расчетное и экспериментальное значение скорости ($Q_{\text{вс}}$) и объемного коэффициента (Kl_a) массопередачи кислорода. Так как транспорт кислорода в среду осуществляется только за счет поверхностной аэрации, величина удельной поверхности контакта газ—жидкость для исследованного биореактора составила $14,36 \text{ м}^2/\text{м}^3$.

Значение коэффициента массоотдачи в жидкости Kl для данных условий практически не зависит от интенсивности перемешивания, и для биореактора с механическим перемешиванием его значение, согласно публикуемым данным [8], равно $2,5 \cdot 10^{-5}$ м/с. Расчетные значения Kl_a и Q_{vc} для исследуемого биореактора составляют $(3,5 \times 10^{-4})$ с $^{-1}$ и $2,1 \cdot 10^{-3}$ мкг/(мл·с) соответственно.

Экспериментальные значения объемного коэффициента массопередачи Kl_a (рис. 2) удовлетворительно коррелируют с расчетными. Одна-

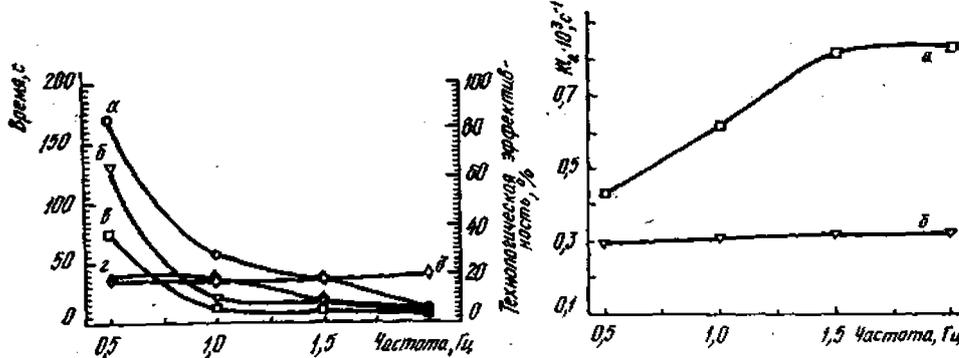


Рис. 1. Гидродинамические характеристики вибрационного биореактора: а — время гомогенизации; б — время микроперемешивания; в — время макроперемешивания; з — время релаксации; д — технологическая эффективность гомогенизации.

Рис. 2. Значения объемного коэффициента массопередачи Kl_a : а — система культивирования с аэрирующим диском; б — система культивирования без аэрирующего диска.

ко определенные на их основе значения скорости массопередачи кислорода Q_{vc} могут быть недостаточными для условий суспензионного культивирования спленоцитарных клеток, так как поверхность контакта фаз, определяемая величиной свободной поверхности жидкости, практически не обновляется и весьма ограничена [16]. Для интенсификации скорости массопередачи кислорода использовали поверхностный дисковый аэратор, установленный на границе раздела фаз. Полученные при этом экспериментальные значения Kl_a закономерно возрастают при увеличении частоты колебаний. Скорость массопередачи Q_{vc} для данной системы составила $(2,4-5,1) \cdot 10^{-3}$ мкг/(мл·с).

Для эффективного биосинтеза α -ИФН необходимым условием является сохранение максимально возможного количества жизнеспособных клеток-продуцентов, участвующих в процессе интерфероногенеза. Это условие может быть достигнуто за счет необходимой интенсивности массообменных и гидродинамических процессов переноса кислорода и компонентов питательной среды, что позволит исключить околоклеточную гипоксию, лимитирование по субстрату и агломерацию клеток, наблюдаемые при стационарном культивировании. Однако перемешивание и, как следствие, различные уровни гидродинамических и массообменных процессов могут оказывать на клетки как благоприятное, так и пагубное влияние [10].

В связи с отсутствием в настоящее время корректных методик определения предельных значений срезающих усилий и сдвиговых деформаций культуральной жидкости, оказывающих разрушающее и травмирующее воздействие на клетки, были проведены экспериментальные исследования влияния гидродинамических условий на жизнеспособность клеток-продуцентов при частоте колебаний 0,5, 1,5 и 2,0 Гц. Результаты исследований (рис. 3) указывают на то, что жизнеспособность спленоцитов свиней в процессе интерфероногенеза в условиях суспензионного культивирования выше, чем при стационарном культивировании. Резкое снижение количества жизнеспособных клеток в течение первых трех часов при суспензионном биосинтезе и в течение 6 часов — в стационарных условиях объясняется прикреплением к стенкам биореактора содержащихся в клеточной суспензии макрофагов, ко-

торые обладают максимальной адгезивностью [4]. Согласно данным литературы [17, 18], наибольшая интенсивность прироста α -ИНФ наблюдается в первые 6—8 часов культивирования, а титр интерферона находится в прямой зависимости от концентрации клеток [14]. Эти положения нашли подтверждение в результатах наших экспериментальных исследований.

Интерферонсинтезирующую активность спленоцитов при биосинтезе изучали в предложенной конструкции биореактора при частоте

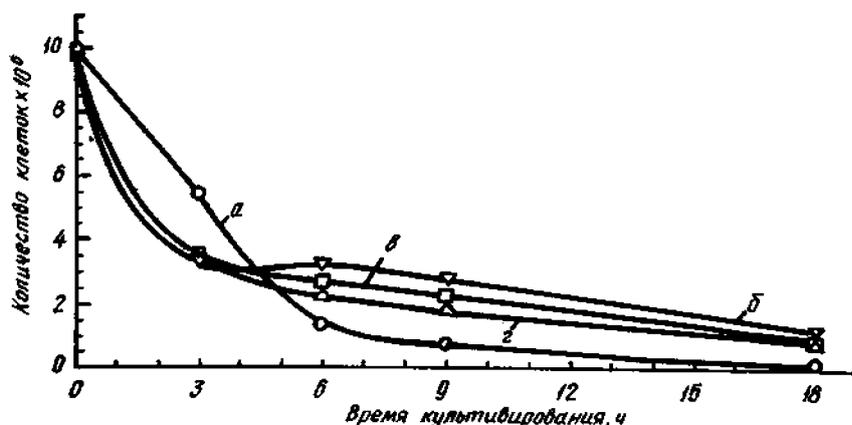


Рис. 3. Влияние гидродинамических условий биосинтеза α -интерферона на жизнеспособность лимфоидных клеток свиней: а — стационарные условия; б — культивирование при частоте 1,5 Гц; в — культивирование при частоте 2,0 Гц; г — культивирование при частоте 0,1 Гц.

перемешивания 1,5 гЦ, при которой достигали высоких массообменных и гидродинамических показателей, а также максимального количества жизнеспособных клеток, и в стационарных, традиционно используемых условиях (рис. 4). Суспензионное культивирование, обеспечивающее более высокую жизнеспособность клеток, положительно влияет на интерферонсинтезирующую способность спленоцитов свиней. Так, при суспензионном биосин-



Рис. 4. Продукция интерферона спленоцитами свиней в вибрационном биореакторе и стационарных условиях: а — активность ИФН в биореакторе, б — активность ИФН в стационарных условиях.

тезе получен препарат, обладающий антивирусной активностью, втрое превышающей активность препарата, полученного в стационарных условиях.

На основании результатов проведенных исследований нами была предпринята попытка определить с использованием метода парной корреляции основные различия между стационарным и суспензионным биосинтезом ИФН.

При сравнении антивирусной активности ИФН и жизнеспособности клеток в условиях стационарного и суспензионного культивирования выявлена практически полная идентичность коэффициентов парной корреляции указанных выше величин — $-0,957$ и $-0,984$ соответственно. Коэффициент корреляции антивирусной активности ИФН при суспензионном и стационарном биосинтезе составлял $0,996$. Полученные данные, на первый взгляд, свидетельствуют о полной идентичности процессов интерфероногенеза как в условиях суспензионного, так и в

умовлях стаціонарного культивування. Однак R_{xy} почасового прироста антивірусної активності інтерферона, отриманого при суспензійному і стаціонарному біосинтезі, був рівен 0,253. Аналогічний результат отримано при визначенні коефіцієнтів парної кореляції швидкості відмирання клітин в досліджуваних режимах культивування ($R_{xy}=0,269$). Вероятно, процеси біосинтезу інтерферона спленоцитами свиней при суспензійному культивуванні по своїй інтенсивності відрізняються від таких при стаціонарному. Далішні біохімічні і молекулярно-біологічні дослідження цих процесів дозволять більш детально відкрити причини виявленого нами феномена.

Таким образом, використання суспензійного культивування при отриманні α -ІФН свиней з практичної точки зору переважніше. Представлена конструкція біореактора дозволяє використовувати високі концентрації клітин-продуцентів, що беруть участь в біосинтезі. Завдяки можливості управління умовами обитання по гідродинамічним і масообмінним характеристикам можливо скоротити час біосинтезу, збільшити продуктивність клітин і, як наслідок, підвищити активність кінцевого продукту. Розроблена конструкція біореактора дозволяє виробити масштабований процес біосинтезу в промисловому виробництві.

*В. Д. Думанський, В. Н. Поводзинський, Ю. В. Карлаш,
В. К. Іваненко, О. В. Селезньов, С. П. Циганков, Я. Г. Кішко*

Ін-т мікробіології і вірусології НАН України, Київ;
Київ. технол. ін-т харч. пром-сті МО України

ВПЛИВ ГІДРОДИНАМІЧНИХ УМОВ НА ІНТЕРФЕРОНСИНТЕЗУЮЧУ АКТИВНІСТЬ СПЛЕНОЦИТІВ СВИНЕЙ ПРИ ОДЕРЖАННІ α -ІНТЕРФЕРОНУ

Резюме

Визначені параметри фізичних складових процесу перемішування і масообмінні характеристики запропонованого біореактора для суспензійного культивування спленоцитів свиней. Досліджено вплив гідродинамічних умов на життєздатність та інтерферонсинтезуючу активність клітин при одержанні α -інтерферону свиней. Методом парної кореляції проведено аналіз зв'язку процесів інтерфероногенезу при суспензійному і стаціонарному біосинтезі.

Ключові слова: спленоцити, культивування, α -інтерферон, біореактор

*V. D. Dumansky, V. N. Povodzinsky, Yu. V. Karlash,
V. K. Ivanenko, A. V. Seleznev, S. P. Tsygankov, Ya. G. Kishko*

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of
Sciences of Ukraine, Kiev; Kiev Technological Institute of
Food Industry, Ministry of Education of Ukraine

EFFECT OF HYDRODYNAMIC CONDITIONS ON INTERFERON- SYNTHESIZING ACTIVITY OF SPLENOCYTES IN PIGS DURING PRODUCTION OF α -INTERFERON

Summary

Parameters of physical constituents of the agitation process and mass-exchange characteristics of the suggested bioreactor for suspension cultivation of pig splenocytes are determined. The effect of hydrodynamic

conditions on viability and interferon-synthesizing activity of cells in production of α -interferon of pigs has been studied. The relation existing between interferonogenesis processes proceeding under suspension and under stationary biosynthesis has been analyzed by the pair correlation method.

Key words: splenocytes, cultivation, α -interferon, bioreactor.

The author's address: V. D. Dumansky,
Institute of Microbiology and Virology, 154, Zabolotny St., Kiev 252143, Kiev, Ukraine

1. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков.— М.: Мир, 1983.— 263 с.
2. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.— Л.: Медгиз, 1962.— 290 с.
3. Карлаш Ю. В., Лобода П. П., Стабников В. Н. Исследование гидродинамики и массопередачи в аппарате с вибрирующей насадкой при абсорбции кислорода // Пищевая промышленность: Респ. межвед. науч.-техн. сб.— Киев: Техніка, 1983.— С. 38—42.
4. Клаус Дж. Лимфоциты. Методы.— М.: Мир, 1990.— 393 с.
5. Перт Дж. С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток.— М.: Мир, 1978.— 331 с.
6. Саутин С. Н., Пунин А. Е. Мир компьютеров и химическая технология.— Л.: Химия, 1991.— 76 с.
7. Спир Р. Е., Адамс Г. Д., Гриффитс Дж. Б. и др. Биотехнология клеток животных.— М.: Агропромиздат, 1989.— 365 с.
8. Тарасов В. Н. Культуры клеток в вирусологии // Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. Вирусология.— 1990.— 19.— 256 с.
9. Фаустов В. С., Коровкин В. И., Попов В. Г. и др. Методы и аппаратура для культивирования клеток // Обзорная информация. Серия XI. Процессы и аппараты микробиологических производств.— М.: М-во мед. и микробиол. пром-сти СССР, 1986.— 52 с.
10. Фрешни Р. Культура животных клеток.— М.: Мир, 1989.— 333 с.
11. Черников А. В., Лобода П. П. Гидродинамические характеристики процесса перемешивания в эмалированных аппаратах с мешалками // Теплохимическая и теплообменная аппаратура: Сб. науч. трудов.— М.: НИИхиммаш, 1986.— С. 757—763.
12. А. с. 1645093 СССР. Способ получения интерферона / Кишко Я. Г., Спивак Н. Я., Иваненко В. К. и др.— ДСП.
13. А. с. 1773936 СССР, МКИ⁴ С 12 М 1/04. Аппарат для выращивания микроорганизмов или клеток / В. Д. Думанский, В. Н. Поводзинский, Ю. В. Карлаш и др.— Оpubл. 07.11.92, Бюл. № 41.
14. Cantell K., Hirvonen S., Kauppinen H.-L., Myllyla G. Production of interferon in human leukocytes from normal donors with the use of Sendef virus // Meth. Enzymol.— New York: Acad. press, 1981.— P. 29—35.
15. Grossberg S. E., Jameson P. M., Sedmak J. Assay of interferons // Interferons and their applications / Ed. P. Came, W. Carter.— Springer-Verlag, 1984.— P. 23—39.
16. Kättinger H. Principles of animal cell fermentation / Develop. biol. Standard.— 1987.— 66.— P. 195—209.
17. Strander H., Cantell K. Production of interferon by human leukocytes in vitro / Ann. med. exp. et biol. Fenn.— 1966.— 44.— P. 265—270.
18. Tovell D., Cantell K. Kinetics of interferon production in human leukocyte suspensions / J. Gen. Virol.— 1971.— 13.— P. 485—491.

Рецензент М. М. Гавриленко
Член редколлегии В. С. Підгорський

Одержано 07.10.93