

УДК 581.19

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ БИОСИНТЕЗА МЕЧЕНЫХ C^{13} -СОЕДИНЕНИЙ

Л. Н. ЦОГЛИН, А. В. ЕВСТРАТОВ, В. Е. СЕМЕНЕНКО

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР

При изучении сложных природных соединений методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса нередко возникает потребность в меченых препаратах. Наиболее простым и дешевым способом получения таких соединений является их биосинтез с помощью одноклеточных фотосинтезирующих организмов.

В работе описывается установка для производства соединений, меченых по C^{13} , с помощью *Chlorella* sp. K. В установке применен замкнутый контур снабжения суспензии микроводорослей углекислотой, что обеспечило минимальные потери $C^{13}O_2$. Использование ксенонового источника света позволило получить высокую скорость биосинтеза.

Применение техники ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для биохимических исследований нередко требует получения меченых сложных природных соединений [1—4]. В частности, при изучении белков, антибиотиков, липидов, коферментов и других биологических соединений все более широко используется спектроскопия на ядрах C^{13} . Хотя развитие техники позволяет уже сейчас получать удовлетворительные спектры соединений с природным содержанием углерода C^{13} , в ряде случаев необходимо значительно большее содержание этого изотопа. Особенно важно иметь достаточно высокое содержание статистически распределенного изотопа для изучения конформационных состояний соединений, где только сочетание спектроскопии ЯМР на протонах и ядрах C^{13} позволяет прийти к однозначным выводам [5].

Единственным дешевым источником белков, липидов, нуклеиновых кислот и соединений других классов, содержащих статистически распределенную метку C^{13} , служит фотосинтез микроводорослей, выращенных на обогащенном C^{13} углекислом газе.

Главное требование при разработке установки для производства меченых C^{13} -соединений на основе фотосинтеза микроводорослей заключалось в обеспечении минимальных потерь дорогостоящей $C^{13}O_2$. С этой целью в установке была применена замкнутая система подачи смеси азота и углекислоты в суспензию (рис. 1), включающая в себя следующие узлы: культиватор 1, пеноотбойник 2, обратный холодильник 3, служащий для снижения влажности газовой смеси, выходящей из пеноотбойника, добавочную емкость 4, необходимую для создания в газовом контуре запасов $C^{13}O_2$, достаточных для длительной работы, воздуходувку 5, размещенную внутри добавочной емкости (что позволило снизить трудно выполнимые требования к герметичности воздуходувки), регулировочные краны 6, через которые часть газовой смеси ответвляется из контура в осушитель 7 и измерительную кювету оптикоакустического газоанализатора CO_2 8, показания которого регистрируются записывающим прибором 9. Кроме того, в установку входят баллоны с $C^{13}O_2$ 10, с азотом 11, манометр 12, емкость для питательной среды 13 и запорные вентили 14—16.

Во избежание попадания суспензии в газовый контур при остановке воздуходувки все элементы газовой системы располагаются выше уровня

жидкости в культиваторе. Коммуникации газового контура были выполнены из материалов, не пропускающих CO_2 .

Микроводоросли выращивали в культиваторе барботажного типа в виде плоской камеры (рис. 2), освещаемой ксеноновой лампой ДКСТВ-6000 [6]. В центральной полости 1 культиватора, имеющей толщину 10 мм, находится суспензия микроводорослей. Объем суспензии равен 1,6 л. Культиватор имеет штуцеры для ввода барботеров 3, для ввода

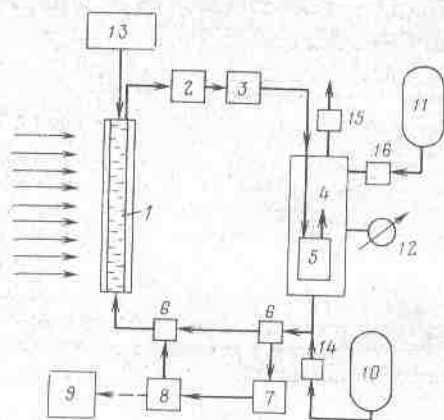


Рис. 1

Рис. 1. Схема установки для культивирования микроводорослей при производстве меченых C^{13} -соединений (описание в тексте)

Рис. 2. Термостатированный культиватор барботажного типа для выращивания микроводорослей (описание в тексте)

Рис. 3. Конструкция пеноотбойника (описание в тексте)

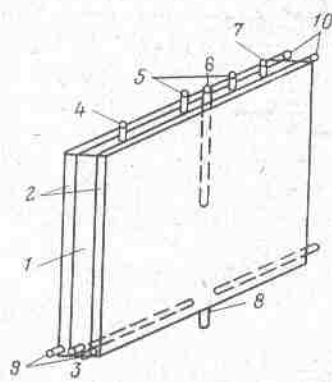


Рис. 2

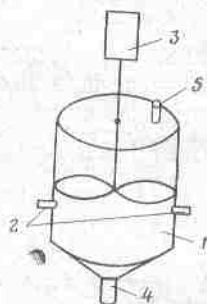


Рис. 3

контактного термометра 4, вывода из культиватора газовой смеси 5, крепления пеноотбойника и слива суспензии из пеноотбойника в культиватор 6, внесения питательной среды 7 и удаления «урожая» 8. Термостатирование суспензии осуществляется с помощью двух водных рубашек 2, подключаемых через входные 9 и выходные 10 штуцеры к ультра-термостату U-10. Насос ультра-термостата включается по сигналу контактного термометра, вводимого в суспензию. Ксеноновая лампа с отражателем обеспечивает на поверхности культиватора, имеющей размеры 320×500 мм, интенсивность света порядка $400-450 \text{ Вт/м}^2$ (ФАР).

При барботажном методе подачи CO_2 часть суспензии захватывается выходящей газовой смесью и выносится из культиватора. Для предотвращения потерь биомассы служит пеноотбойник, конструкция которого представлена на рис. 3.

Газовая смесь из культиватора через штуцеры 2 поступает под крыльчатку пеноотбойника. Крыльчатка приводится во вращение двигателем 3.

Суспензия возвращается в культиватор через штуцер 4, соединенный со сливной трубкой. Трубка погружена в суспензию примерно до середины высоты культиватора. Отделенная от суспензии газовая смесь выходит из пеноотбойника через штуцер 5. Пеноотбойник имеет следующие размеры: диаметр — 80 мм, высота вместе с конусной частью — 100 мм.

Для биосинтеза меченых соединений были применены одноклеточные водоросли *Chlorella* sp. K. Выращивание проводили на среде Тамия с нитратным азотом. После стерилизации установки в среду вносили инокулят, причем плотность засева не превышала 0,1—0,15 г/л. Такую низкую плотность выбирали из соображения минимального разбавления образующихся в процессе фотосинтеза $C^{13}O_2$ -соединений биомассой засева, выращенного на обычной углекислоте. Последующие засева производили культурой, полученной на $C^{13}O_2$, и для увеличения скорости биосинтеза начальную плотность выбирали 1,5 г/л. После засева газовый контур продували азотом, для чего при работающей воздуходувке открывали вентили 15 и 16 (рис. 1) и в добавочную емкость поступал азот из баллона. Затем выключали воздуходувку и закрывали вентили 15 и 16. В системе устанавливалось давление, равное атмосферному. Углекислоту подавали в систему через вентиль 14, ориентировочное количество подаваемой углекислоты определяли по возникающему избыточному давлению, отмечаемому манометром 12. Заполнение велось так, чтобы в системе образовалась 5—7%-ная смесь $C^{13}O_2$. После включения воздуходувки точное значение концентрации углекислоты определялось по показаниям газоанализатора. О скорости роста и утилизации углекислоты также можно было судить по записи показаний газоанализатора.

При снижении концентрации $C^{13}O_2$ до 0,05% производили повторное заполнение контура углекислотой, без предварительной продувки азотом. Избыточное давление в контуре при заполнении стравливали через вентиль 15. Потери углекислоты при этом составляли не более 2—3 мг.

Процесс вели до тех пор, пока плотность суспензии в культиваторе не достигала значения 10—12 г/л (сухая масса). При культивировании на среде Тамий часть CO_2 связывается в среде в форме бикарбонатов, поэтому перед сливом «урожая» в культиватор добавляли 100—150 мл 0,1 N HCl. Выделяющуюся при этом углекислоту регистрировали газоанализатором. Добавление HCl вели порциями по 15—20 мл с интервалами, необходимыми для перемешивания выделившейся углекислоты в газовом контуре. После полной утилизации суспензией всей углекислоты производили разбавление культуры свежей питательной средой из емкости 13.

Перед новым циклом выращивания с целью удаления избытка выделившегося в результате фотосинтеза кислорода проводилась продувка газового контура азотом.

Производительность установки при описанном режиме выращивания составляла 15—20 г сухой биомассы в сутки. Суммарные потери $C^{13}O_2$ не превышали 0,5—1,0%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Putter I., Barreto A., Markley J. L., Jardetzky O. *Progr. Nat. Acad. Sci.* 64, 1396, 1969.
2. Katz F. F., Crespi H. L. *Science*, 151, 1187, 1966.
3. Цоглин Л. Н., Семенов В. Е., Каюшин Л. П., Кутышенко В. П., Лазарева А. В., Окон М. С., Сибельдина Л. А., Чекулаева Л. Н. *Физиол. растений*, 20, 1204, 1973.
4. Лазарева А. В., Окон М. С., Кутышенко В. П., Цоглин Л. Н., Каюшин Л. П., Семенов В. Е., Сибельдина Л. А., Чекулаева Л. Н. *Физиол. растений*, 21, 359, 1974.
5. Bystrov V. F. *Progr. Nucl. Magnetic Resonance*, 10, 41, 1976.
6. Семенов В. Е., Владимиров М. Г., Цоглин Л. Н., Таутс М. И., Филипповский Ю. Н., Клячко-Гурвич Г. Л., Кузнецов Е. Д., Кованова Е. С., Райков Н. И. В сб.: Управляемый биосинтез, 75. «Наука», 1966.

Поступила в редакцию
3.II.1978