
ЭМПИРИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К МЕМБРАННОМУ РАЗДЕЛЕНИЮ ЖИДКИХ СМЕСЕЙ

Н.П. Перепечкина, А.В. Сиротинский

НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова РАМН,
ОАО «Биомед» им. Мечникова, Москва

При использовании мембранного разделения были улучшены показатели специфической активности дифтерийного и столбнячного анатоксинов. Уникальный выбор пары мембран для двухступенчатой ультрафильтрации лейкоцитарного экстракта позволил получить из него почти гомогенный активный продукт. Использование одного калибранта и в смеси его с другими калибрантами давали различные величины его коэффициента задержания. Показана неравноценность разделяющей способности мембран с одинаковым номинальным пределом исключения.

Ключевые слова: хроматографический анализ пермеатов, «функциональное» калибрование, «гомологичные» мембраны, дифтерийный анатоксин, столбнячный анатоксин, лейкоцитарный экстракт.

By means of membrane separation the indexes of specific activity of diphtheria and tetanus toxoids were improved. The unique choice of a pair of membranes for a two-step ultrafiltration process of a leukocyte extract allowed to obtain from it an almost homogenous product. By using one calibrant and its mixture with other ones the different coefficients of retention were received as a result. It was shown inequality of separation qualities of the membranes with identical nominal coefficients of retention.

Keywords: chromatographic analysis of permeates, “functional” calibration, “homologous” membranes, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, leukocyte extract.

Мембранные методы разделения нашли широкое применение в различных областях технологии сравнительно недавно (с 60–70 гг. XX века), тем не менее, они существенно ускорили развитие процессов газоразделения [1], совершенствование процессов очистки воды [2]. В этих областях мембранная технология не отстает от других по уровню математического и компьютерного обеспечения.

Описано много теоретических обоснований и математических расчетов процессов мембранного разделения биологических жидких смесей [3–6], но реальное их осуществление до сих пор практически не достигнуто. Такие различия объясняются свойствами разделяемых объектов и, прежде всего, недостаточным объемом информации об этих свойствах. Так, при разделении биологических смесей чаще всего приходится иметь дело с поликомпонентными системами, физико-химические характеристики которых неизвестны и малодоступны для измерения. Часто и состав разделяемой смеси не может быть определен.

Сам процесс разделения биологических смесей в большей степени, чем другие, осложнен концентрационной поляризацией. Поэтому в работах последних лет [7] большое внимание уделяется образованию забивающего слоя и его активной роли в процессе разделения.

Указанные сложности, тем не менее, не помешали интенсивному развитию и применению мембранного разделения биологических смесей. При разработке процессов разделения существенную роль до сих пор играет эмпирический подход. Воспроизводимость процесса во многом зависит от стереотипности его проведения по всем возможным параметрам: марка мембраны, тип установки, условия – трансмембранное давление, скорость надмембранного потока и пр. Для более эффективного масштабирования могут быть полезны пилотные установки.

В настоящей работе приведены примеры успешного разделения продуктов биологического синтеза: дифтерийного анатоксина, столбнячного анатоксина, лейкоцитарного экстракта. Обсуждается также «функциональное» калиб-

рование как предварительный этап мембранного разделения биологических смесей.

Материалы и методы

Дифтерийный анатоксин – обезвреженный формалином дифтерийный токсин – жидкий продукт культивирования дифтерийной палочки на среде Лингуда (см. ниже), очищенный методом кислотно-солевого осаждения [8].

Среда Лингуда – триптический перевар говяжьего мясного бульона, содержащий компоненты ниже 10 KDa.

Столбнячный анатоксин – обезвреженный формалином столбнячный токсин – жидкий продукт культивирования столбнячной палочки на среде гидролизата казеина, очищенный методом кислотно-солевого осаждения [8].

Условный «референс» – лейкоцитарный экстракт, полученный после многократного замораживания и оттаивания в воде лейкоцитов миндалин человека с последующим осветлением на центрифуге при 20000g и микрофильтрацией на мембране GSWP (0,2 мкм) (Millipore, USA).

«Рабочий» лейкоцитарный экстракт из лейкоцитов крови человека, полученный по той же методике.

Мембраны:

полное волокно

(разработано ранее в ГП ВНИИПВ):

ВПУ-5ПА (предел исключения 5 KDa),

ВПУ-15ПА (предел исключения 15 KDa),

ВПУ-50ПА (предел исключения 50 KDa),

ВПУ-100ПА (предел исключения 100 KDa);

плоские мембраны:

УАМ-150 («Владипор», предел исключения 5 KDa),

УАМ-200 («Владипор», предел исключения 20 KDa),

УПМ-100 («Владипор», предел исключения 100 KDa),

SM 302 1466907E («Sartorius», BRD, предел исключения 100 KDa).

Калибренты:

лизоцим (ICN, England), цитохром С (Sigma, USA), бычий сывороточный альбумин (Pharm. LKB, Sweden).

Ультрафильтрацию на полном волокне проводили на простейшей лабораторной установке в режиме диафильтрации при постоянном объеме (насос XX8000230, Millipore, USA). Площадь модуля 0,005 м², линейная скорость 1 м/с. Для плоской мембраны использовали ячейку с циркулярным перемешиванием с диаметром мембраны 62 мм (Amicon Biosep. Millipore, USA). Рабочее давление 0,1–0,12 МПа.

Гель-хроматографию проводили на TSK геле Toyopearl (Toyo Soda, Japan) HW-60S и HW-40S с использованием комплекта для FPLC (Pharm. LKB, Sweden) на колонке 16/70, при скорости элюции 40 мл/ч.

Результаты

Использование мембранного разделения в производстве дифтерийного анатоксина позволило нам кондиционировать питательную среду таким образом, что продукция основного компонента повысилась на 20% [9]. Это было достигнуто одноступенчатой ультрафильтрацией на полном волокне ВПУ-50ПА (см. обсуждение).

С помощью диафильтрации дифтерийного анатоксина на полном волокне ВПУ-50ПА основной продукт (молекулярная масса около 68 KDa) был освобожден от низкомолекулярных примесей (рис. 1), что повысило регламентированное

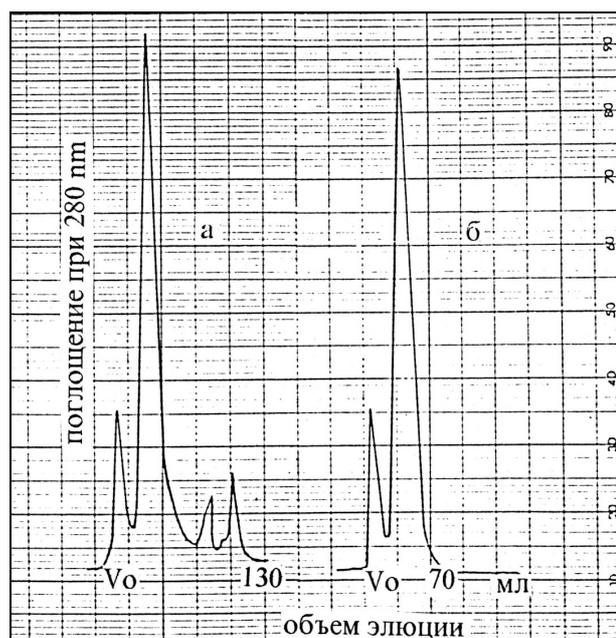


Рис. 1. Хроматограммы (HW-60S) исходного дифтерийного анатоксина (а) и после диафильтрации на полном волокне ВПУ-50ПА (б)

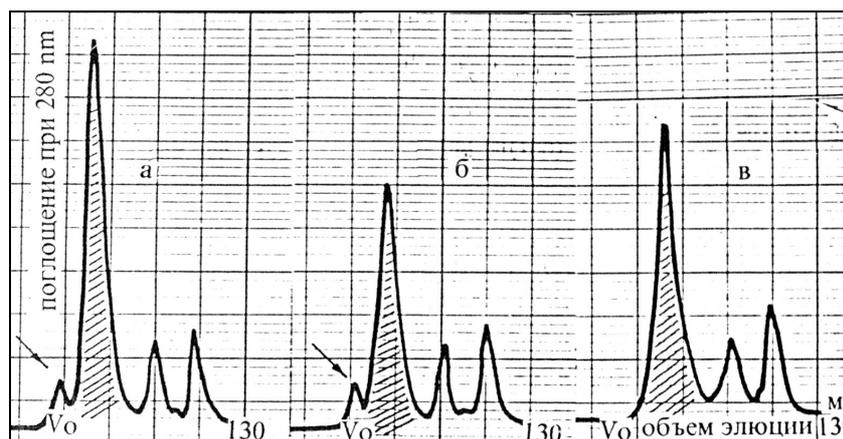


Рис. 2. Хроматограммы (HW-60S) пермеатов дифтерийного анатоксина после диафильтрации на мембранах с пределом исключения 100 KDa: а) SM 302 1466907E, б) УПМ-100, в) ВПУ-100ПА. Стрелкой обозначены компоненты выше 100 Kda

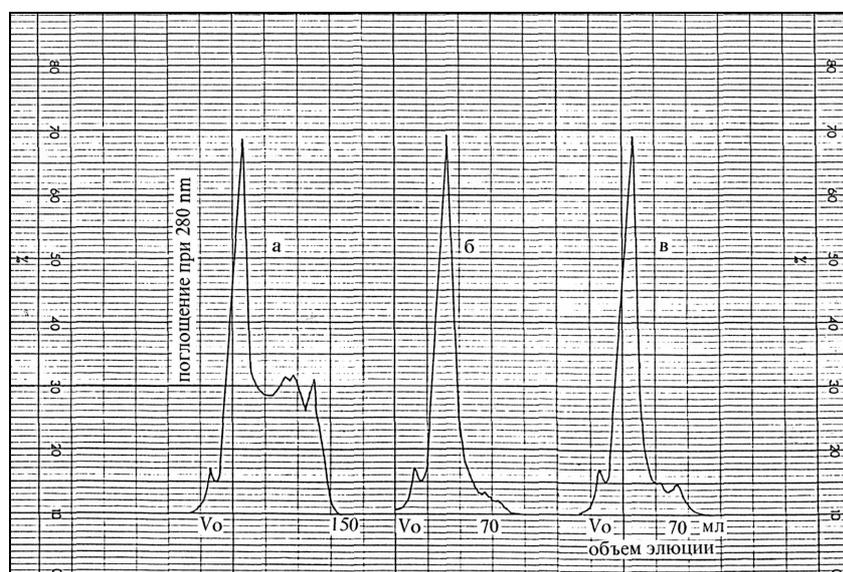


Рис. 3. Хроматограммы (HW-60S) исходного столбчатого анатоксина (а) и после диафильтрации на мембране УПМ-100 (б) и ВПУ-100ПА (в)

ванные показатели специфической активности в 1,2 раза, а иммуногенность возросла в 1,8 раза.

С целью освобождения дифтерийного концентрированного анатоксина (молекулярная масса 68 KDa) от высокомолекулярных примесей для сравнения были взяты три различные мембраны с одинаковым номинальным пределом исключения – 100 KDa: SM 3021466907E, УПМ-100, ВПУ-100ПА. С помощью первых двух мембран нам не удалось удалить высокомолекулярный компонент (выше 100 KDa), он частично проходил в пермеат; в то же время полое волокно ВПУ-100ПА его полностью задерживало (рис. 2). На всех трех испытанных мем-

бранах оказалось невозможным эффективно вывести в пермеат основной компонент (68 KDa). Наибольшим был выход этого компонента (17%) при максимально возможных объемах диафильтрации на ВПУ-100ПА.

Хроматограммы пермеатов дифтерийного анатоксина свидетельствуют о неравноценности разделяющей способности указанных мембран. Такая неравноценность проявилась и при ультрафильтрации столбчатого анатоксина (рис. 3): мембрана УПМ-100 при одинаковых объемах диафильтрации ($\times 5$) полнее освобождала столбчатый анатоксин от низкомолекулярных балластных примесей по сравнению с полым волокном ВПУ-100ПА. Однако при этом наблюдались небольшие потери основного компонента (150 KDa) за счет частичного выхода его в пермеат, что полностью исключалось при работе с полым волокном ВПУ-100ПА. Ультрафильтрация столбчатого анатоксина на этом волокне позволила повысить удельную специфическую активность в 1,4 раза.

Для фракционирования «рабочего» лейкоцитарного экстракта с целью получения из него активного продукта с молекулярной массой 6–8 KDa мы применили двухступенчатое мембранное разделение [10]: сначала – диафильтрация на полем волокне ВПУ-15ПА и затем пермеат был разделен на полем волокне ВПУ-5ПА (активный продукт – концентрат «ВПУ-5ПА»). Предварительно для выбора пары мембран «референс»-экстракт подвергли одноступенчатой ультрафильтрации на плоской мембране УАМ-150 и полых волокнах ВПУ-5ПА и ВПУ-15ПА («функциональное» калибрование, см. ниже). Гель-хроматографический анализ показал, что профили элюции по-

лученных пермеатов «ВПУ-5ПА» и «УАМ-150» (при одинаковом пределе исключения – 5 KDa) имели меньше внешнего сходства (рис. 4), чем профили элюции пермеатов «ВПУ-5ПА» и

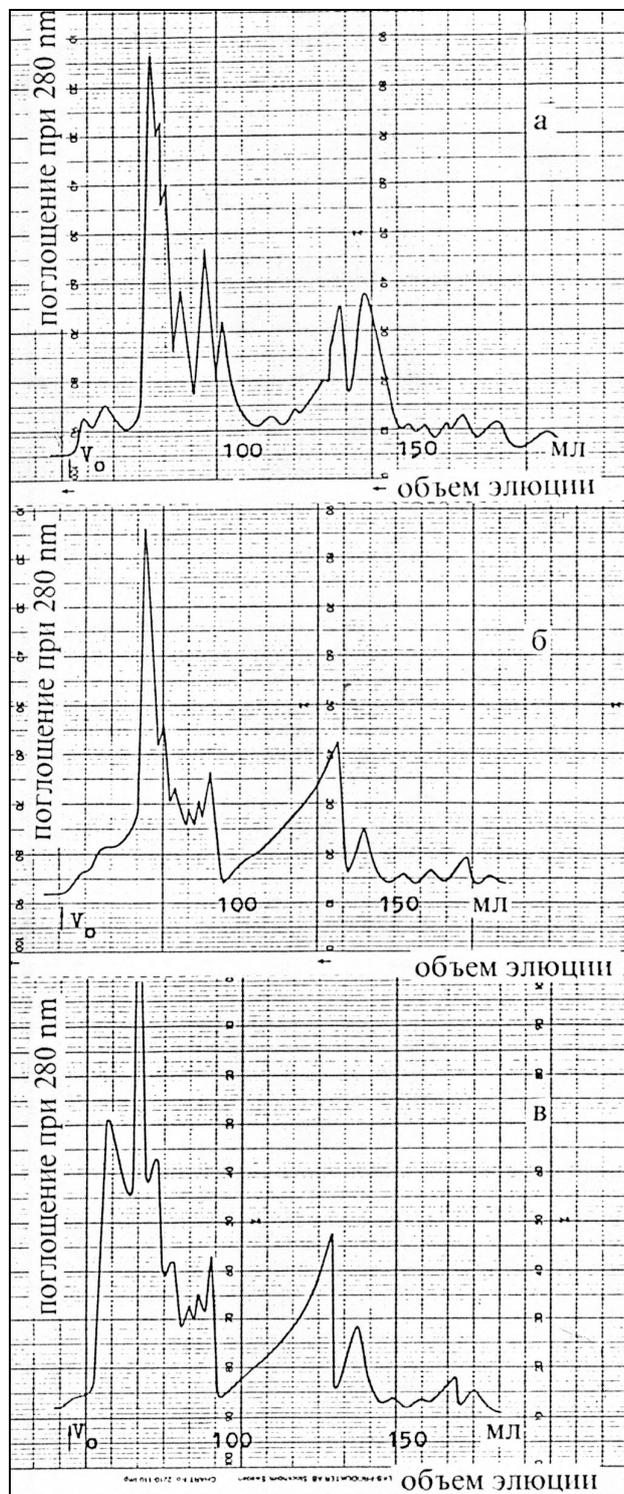


Рис. 4. Хроматограммы (HW-40S) пермеатов «референс» лейкоцитарного экстракта, полученные на мембране УАМ-150 и полых волокнах ВПУ-5ПА и ВПУ-15ПА [10]

«ВПУ-15ПА»: полые волокна ВПУ-5ПА и ВПУ-15ПА пропускали одни и те же фракции, кроме одной, более высокомолекулярной, в соответствии с различиями в номинальной селективности этих мембран (5 и 15 KDa). Обнаруженное подобие фракционного состава пермеатов, отражающее сходство макро- и микроstructures мембран, обозначило пару ВПУ-5ПА и ВПУ-15ПА, которая обеспечила успешное молекулярно-массовое разделение «рабочего» экстракта (рис. 5 и 6), т.е. получение практически гомогенного продукта [10] типа трансфер-фактора [11].

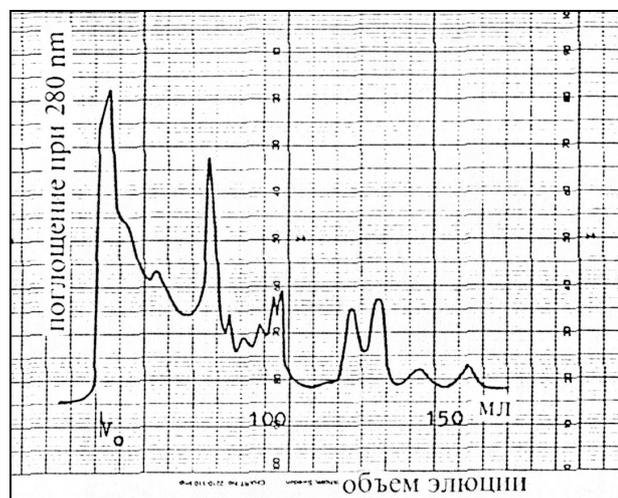


Рис. 5. Хроматограмма (HW-40S) исходного «рабочего» лейкоцитарного экстракта [10]

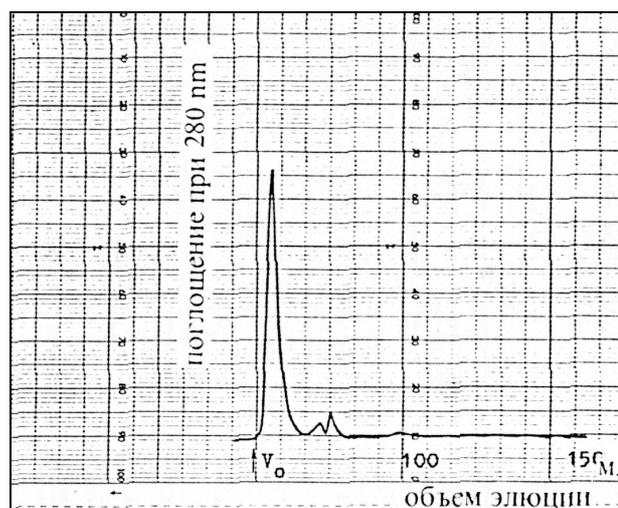


Рис. 6. Хроматограмма (HW-40S) продукта, полученного из «рабочего» лейкоцитарного экстракта двухступенчатым мембранным разделением на полых волокнах ВПУ-15ПА и ВПУ-5ПА [10]

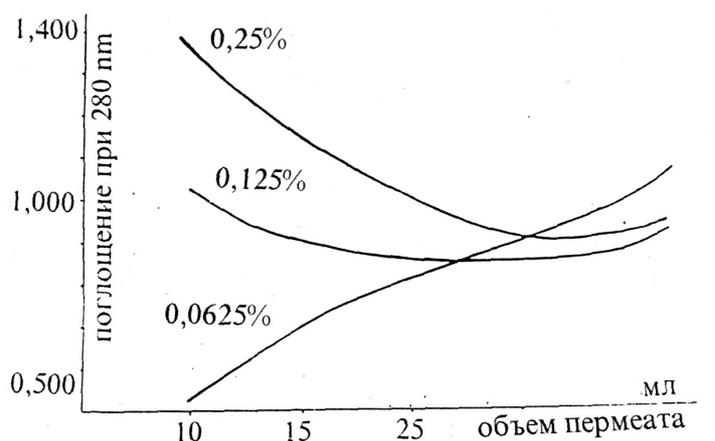


Рис. 7. Изменение концентрации лизоцима в пермеате (обозначена по поглощению при 280 нм) при различных его концентрациях в исходном растворе (0,25%, 0,125%, 0,0625%) по мере выхода пермеата

Такому эффективному молекулярно-массовому фракционированию лейкоцитарного экстракта способствовало упомянутое «функциональное» калибрование, т. е. сравнительный анализ пермеатов при разделении одного и того же продукта (условного «референс»-экстракта или дифтерийного анатоксина) на разных мембранах, что дает реальное представление о возможностях мембранного разделения в конкретных условиях. Важно отметить, что в описанных опытах с лейкоцитарным экстрактом предел исключения мембран был обозначен величинами, близкими к 100%. В информационных материалах фирм предел исключения чаще всего обозначается по 90%-ной величине задержания лимитирующего калибранта, что для успешного выбора пары мембран оказывается недостаточным.

Селективность $[R_L]$ мембраны УАМ-200 для лизоцима в смеси [лизоцим – бычий сывороточный альбумин]

Концентрация лизоцима, %	Концентрация бычьего сывороточного альбумина, %				
	0	0,5	0,25	0,125	0,0625
0,25	$0,75^{R_L}$	$0,94^{R_L}$	$0,94^{R_L}$	$0,94^{R_L}$	$0,91^{R_L}$
0,125	$0,70^{R_L}$	$0,94^{R_L}$	$0,94^{R_L}$	$0,93^{R_L}$	$0,89^{R_L}$
0,0625	$0,50^{R_L}$	–	–	–	–

R_L – коэффициент задержания лизоцима

Следует заметить, что результаты калибрования зависят от многих причин: концентрации калибрнтов, их сродства к мембране, свойств растворителя и пр. Наиболее информативными получаются данные при калибровании в условиях наименьшей концентрационной поляризации. В наших опытах анализа пермеата в процессе калибрования оказалось возможным приблизительно определить начало ее проявления. При фракционном определении концентрации калибрнта в пермеате в опытах сбора фракций на коллекторе оказалось (рис. 7), что при разных исходных концентрациях калибрнта динамика выхода его в пермеат

различна: при более высоких значениях количество калибрнта постепенно уменьшается, а при более низких исходных концентрациях, наоборот, повышается по мере выхода пермеата, затем выходит на плато. Эти различия, вероятно, определяются степенью концентрационной поляризации. При незначительном поляризационном слое повышение содержания калибрнта в концентрате обуславливает его рост и в пермеате в процессе концентрирования. Отклонение кривой вниз можно объяснить проявлением влияния поляризационного слоя.

Как и можно было предположить, на результат калибрования по определенному калибрнту может оказывать влияние присутствие других белков в смеси. Сравнительное определение селективности мембраны УАМ-200 для

лизоцима в составе бинарной смеси и в изолированном виде привело к различным результатам (таблица), т. е. во взятых концентрациях коэффициент задержания для лизоцима в присутствии других компонентов оказался выше, чем без них.

В смеси лизоцима и цитохрома С в концентрациях 0,0625% коэффициент задержания лизоцима был равен 0,65.

Обсуждение

Применение некоторых нетрадиционных методических приемов позволило нам добиться определенных успехов в мембранном разделении и, в частности, фракционировании сложных биологических смесей.

Так, «функциональное» калибрование мембран с помощью условного «референс»-препарата обеспечило эффективное фракционирование лейкоцитарного экстракта, что дало возможность получить практически гомогенный активный продукт, послуживший основой применяемого в настоящее время в лечебной практике препарата «Аффинолейкин» [12]. Фракционирование было достигнуто двуступенчатым мембранным разделением с применением пары «гомологичных» [10] мембран. «Гомологичными» мы назвали мембраны, изготовленные одним производителем по сходной технологии из идентичного материала и различающиеся только по пределу исключения. Эти мембраны в данном случае должны иметь достаточно близкие значения пределов исключения, при этом коэффициент задержания искомого продукта находится в интервале, отличающем одну мембрану данной пары от другой (в нашем случае 5 и 15 KDa). Важно отметить, что для более надежного выбора пределы исключения мембран должны иметь значения, близкие к 100%. Однако в коммерческой информации предел исключения чаще всего обозначается показателем задержания 90% лимитирующего калибратора, либо (реже) приводится ретенционная кривая, либо коэффициенты задержания отдельных калибраторов. Поэтому мы прибегли к т. н. «функциональному» калиброванию, что дает приближение непосредственно к условиям эксперимента.

Определение предела исключения связано с рядом сложностей, зависящих от условий экс-

перимента: состава буфера, рН среды, концентрации калибраторов, большей или меньшей концентрационной поляризации и пр. Практически очень удобен способ калибрования по гель-хроматографическому анализу пермеата, получаемого при ультрафильтрации смеси калибраторов [13, 14]. Как было отмечено нами (таблица), определение коэффициента задержания для компонента в бинарной смеси и в изолированном виде не дают идентичных результатов. Прибавление в смесь дополнительных калибраторов может увеличивать концентрационную поляризацию. Скорее всего, в таких случаях необходим маневр с исходными концентрациями калибраторов. Кроме того, здесь трудно исключить взаимодействие калибраторов между собой. В то же время указанный способ может дать дополнительную информацию при «функциональном» калибровании, т. к. физико-химические показатели калибраторов, как правило, известны. Все это значит, что данные калибрования приходится воспринимать как относительные. Пример разделения дифтерийного анатоксина на различных мембранах с одинаковым номинальным пределом исключения подтверждает эту относительность и полезность «функционального» калибрования.

Интересным представляется полученное нами кондиционирование питательной среды для приготовления дифтерийного токсина (исходного продукта для дифтерийной вакцины). Гель-хроматографический анализ не обнаружил разницы между исходной и кондиционированной средой. Содержание двухвалентного железа, регламентирующего выход целевого продукта, также осталось неизменным. Однако было обнаружено, что кондиционированная среда обладала большей железосвязывающей способностью [15]. Эти данные впервые описаны нами в работе [15].

В заключение хотелось бы обратить внимание производителей мембран на обозначение предела исключения ближе к 100% несмотря на принятую номенклатуру [16], а также на потребность в мембранах с близкими значениями

пределов исключения для двуступенчатого молекулярно-массового фракционирования биологических смесей.

Литература

1. *Koros W.J.* Gas separation materials and membranes: some observations and suggestions // *Euromembrane'95*. 1995. V. 1, p. 140–143.
2. *Futsealer H., van Daltsen H., Weijenberg D.* Recent developments in ultrafiltration systems for processes and potable water // *Euromembrane'99*. 1999. V. 1, p. 67–70.
3. *Bowen W.R., Mongruel A.* Modelling the crossflow ultrafiltration of colloid systems // *Euromembrane'95*. 1995. V. 1, p. 140–143.
4. *Otten Z.E.H., Timmer J.M.K., van der Horst H.C.* A flux transmission model for microfiltration of whey protein concentrate solutions // *Euromembrane'97*. 1997, p. 89–91.
5. *Черкасов А.Н., Пасечник В.А.* Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия. 1991, с. 174–189.
6. *Polotsky A.E., Cherkasov A.N.* The efficiency of ultrafiltration in separation processes // *Euromembrane'99*. 1999. V. 2, p. 250.
7. *Pontiè M., Chasseray X., Lainè J.M., Lemordant D.* Control fouling and cleaning procedures by streaming potential method // *Euromembrane'97*. 1997, p. 95–97.
8. *Бургасов П.Н.* Руководство по вакцинному и сыровоточному делу. М.: Медицина. 1978, с. 103–157.
9. *Якушевич Ю.Е., Илджев А.К., Сиротинский А.В.* Способ получения дифтерийного токсина. Патент РФ № 2058064 // БИ. 1996. № 10, с. 257.
10. *Perepechkin N.P., Perepechkin L.P.* Efficient molecular mass fractionation of leukocyte extract by membrane separation // *J. Membr. Sci.* 1999. V. 160, p. 1–6.
11. *Rozzo S.J., Kirkpatrick C.H.* Purification of transfer factors // *Mol. Immunol.* 1992. V. 20, No 2, p. 167–182.
12. *Мац А.Н., Перепечкина Н.П., Воейкова Е.С. и др.* Способ получения препарата «Аффинолейкин» для противоинойфекционной иммунотерапии. Патент РФ № 2076715 // БИ. 1997. № 10, с. 107.
13. *Черкасов А.Н., Пасечник В.А.* Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия. 1991, с. 40–48.
14. *Cherkasov A.N., Petrova V.N., Polotsky A.E.* The use calibration method for investigation of defective ultrafiltration membranes // *Euromembrane'99*. 1999. V. 2, p. 481.
15. *Сиротинский А.В., Перепечкина Н.П., Черепнина О.В.* Эффект мембранного разделения на железосвязывающую способность пептидо-аминокислотной смеси // *Крит. технол. Мембраны*. 1999. № 4, с. 33.
16. *Koops G.-H.* Nomenclature and symbols in membrane science and technology. Netherlands. 1995, p. 20.