

Enzymatyczne membrany chitozanowe do biosyntezy kwasu L-asparaginowego

Zofia Modrzejewska¹

Aleksander Chmiel²

Bogusław Sobierajski²

Danuta Płatak²

Władysław Kamiński¹

¹Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska
Politechnika Łódzka

Łódź

²Samodzielna Pracownia Biosyntezy Środków Leczniczych
Akademia Medyczna

Łódź

1. Wstęp

Techniki membranowe znajdują coraz szersze zastosowanie w biotechnologii [1-3]. Obok głównego przeznaczenia do celów filtracyjnych proponowane są również membrany enzymatyczne zawierające w swojej strukturze unieruchomione biokatalizatory. Membrany takie mają zarówno aktywność katalityczną jak i właściwości separacyjne. Biokatalizatorami są najczęściej wyizolowane enzymy, ale od szeregu lat obserwuje się wzrost zainteresowania immobilizacją komórek do wykorzystania aktywności zawartych w nich enzymów.

Unieruchomienie biokatalizatorów w układach membranowych możliwe jest na drodze wiązania chemicznego bądź fizycznego z membraną, względnie przez zamknięcie ich w przestrzeni ograniczonej membranami [4-6]. Związanie biokatalizatora z membraną można uzyskać na drodze:

- adsorpcji na powierzchni membrany,
- kowalencyjnego wiązania z nośnikiem polimerowym,
- zamknięcia wewnątrz porowatej struktury membrany.

Adsorpcja enzymu na powierzchni membrany jest metodą prostą i taną, jednak często następuje proces desorpcji, który prowadzi do obniżenia aktywności katalitycznej membrany. W przypadku unieruchomienia biokatalizatora przez jego wiązania kowalencyjne z membraną w trakcie procesu immobilizacji obserwuje się znaczny spadek aktywności enzymu podczas tego pro-

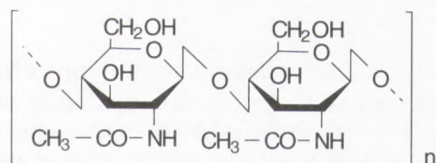
cesu. Unieruchamianie biokatalizatora w strukturze membrany można prowadzić przez wypełnienie nim makroporowatej struktury gotowej membrany lub przez formowanie membrany z wyjściowego roztworu lub zawiesiny zawierającego enzym lub komórki. W tym przypadku występują często istotne ograniczenia wynikające z drastycznych warunków formowania membran, np. niekorzystnego pH, stosowania toksycznych rozpuszczalników lub wysokiej temperatury. Dobór odpowiednich surowców i warunków może jednak dać pozytywne rezultaty [7,8]; zagadnienie to jest również przedmiotem tej pracy.

Membrany zawierające komórki, względnie ich części (membrany enzymatyczne) można formować z: a) polimerów syntetycznych, np. z polietylenu, polipropylenu, poliamidu, polisulfonu, poliakrylonitrylu, polichlorku winylu, polialkoholu winylowego oraz b) polimerów pochodzenia naturalnego, np. octanu celulozy i c) chemicznie modyfikowalnych, np. poliamidu alifatycznego, (po wprowadzeniu słabo zasadowych grup jonowych w celu nadania właściwości hydrofilowych), a także z d) polimerów aktywowanych plazmowo [9]. Również membrany ciekłe mogą być dobrymi nośnikami biokatalizatorów [4].

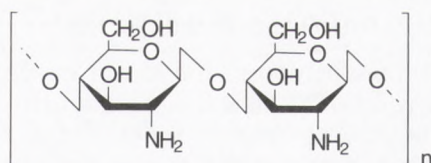
Wśród przykładów zastosowania enzymatycznej techniki membranowej można wymienić m.in. użycie membrany poliamidowej z immobilizowaną lipazą do otrzymania enancjomerycznych estrów drugorzędowego butanolu [4]. Przez chemiczną modyfikację membrany nylonowej, w wyniku której powstały na niej grupy anionowymienne wytworzono membrany enzymatyczne z immobilizowaną aminoacylazą i zastosowano do selektywnej konwersji N-acetylo-L-waliny z jej mieszaniny racemicznej do L-waliny [10]. Kompozytowe membrany polisulfonowe i polipropylenowe z amidazą penicylanową zastosowano do wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego z penicyliny [11]. Znane jest również użycie do tego procesu dializacyjnych membran kapilarnych z amidazą penicylanową [12].

Praktyczne realizacje procesów biochemicznych w reaktorach z membranami enzymatycznymi są jednak nieliczne. Najczęściej za pomocą membran enzymatycznych prowadzono procesy inwersji sacharozy [13], otrzymywania fruktozy [14] oraz hydrolizy kazeiny [15], laktozy [16], pektyn [17] i mocznika [18].

Interesującym polimerem do wytwarzania membran enzymatycznych jest pochodna chityny — chitozan [19-20]. Chityna (wzór 1) jest naturalnym polimerem zbudowanym z reszt N-acetylo-D-glukozoaminy połączonych wiązaniami glikozydowymi β -1,4, otrzymywanym ze skorupiaków. W wyniku deacetylacji chityny przez hydrolizę wiązania amidowego powstaje chitozan (wzór 2) — produkt mający reaktywną grupę aminową i lepszą rozpuszczalność. Chitozan wykazuje zdolność do zatrzymywania w swojej masie znacznych ilości substancji obcych. Wprowadzone związki łączą się z poliaminocukrem poprzez tworzenie z nim wiązań wodorowych, jonowych lub koordynacyjnych, zlokalizowanych na grupach wodorotlenowych i aminowych i w ten sposób powstają układy wieloskładnikowe, w których chitozan pełni rolę nośnika. Fakt ten wykorzystano do sporządzenia chitozanowych membran enzymatycznych.

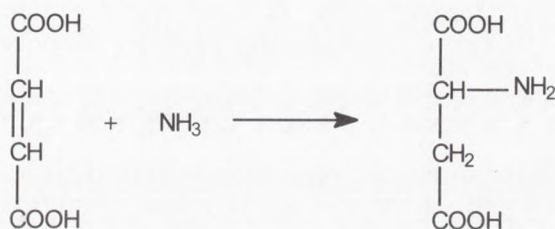


(1) chityna
polimer (1,4-β) 2-N-acetyloglukozaminy



(2) chitozan
polimer (1,4-β) glukozaminy

W przedstawionych badaniach poszukiwano takiego sposobu wytwarzania chitozanowych membran enzymatycznych, który nie powodowałby inaktywacji enzymu w czasie formowania membrany. Głównym problemem był dobór środka żelującego. Zbadano możliwość żelowania roztworu chitozanowego przez zastosowanie dwóch środków, tj. wodorotlenku sodu i *orto*-fosforanu sodowego. Modelowym enzymem, którego aktywność badano była amoniako-liaza asparaginianowa (EC 4.3.1.1.) tzw. aspartaza, która prowadzi przekształcenie kwasu fumarowego i amoniaku do kwasu asparaginowego zgodnie z reakcją:



2. Materiały i metody

2.1. Drobnoustrój

Źródłem enzymu były „permeabilizowane” żywe lub martwe komórki mutantu *E. coli* B-715 wytworzonego w Samodzielnej Pracowni Biosyntezy Środków Lecznicych AM w Łodzi. Szczep przechowywano w postaci zamrożonej i uaktywniano w hodowli na podłożu o składzie (g/l): ekstrakt drożdżowy 20,0; fumaran amonu 5,0; kwas fumarowy 11,4; KH₂PO₄ 2,0; MgSO₄ × 7H₂O 0,5; pH 7,2. Namnożone komórki „permeabilizowano” przez ich 24-godzinna inkubację w temperaturze 37°C w roztworze fumaranu amonowego o stężeniu 50 g/l, zawierającym dodatek 0,5 ml/l 1% wodnego roztworu Triton 100 oraz 0,25 g/l MgSO₄ × 7H₂O. W tym czasie następuje częściowa autoliza komórek i dezintegracja błony komórkowej, co zwiększa jej przepuszczalność dla substratu i produktu [21].

2.2. Nośnik do immobilizacji

Do wytwarzania membran enzymatycznych zastosowano niskolepki chitozan produkcji Morskiego Instytutu Rybackiego w Gdyni o następującej charakterystyce: średnia masa cząsteczkowa 2×10^5 D, wskaźnik wtórnego pęcznienia WRV = 137,4, stopień deacetylacji 84,5%, azot 7,2%, popiół 0,08%.

2.3. Formowanie membran enzymatycznych

Membrany formowano metodą inwersji faz (na mokro) łącząc roztwór chitozanu (A) z zawiesiną komórek (B) w stosunku objętościowym 1:1. Roztwór (A) zawierał 6 g chitozanu w 94 ml 2% roztworu kwasu octowego. Zawiesina (B) zawierała 50 g mokrej biomasy w 42 ml roztworu fizjologicznego NaCl (0,9%). Zawiesinę końcową wylewano równą warstwą na płycie szklanej, za pomocą specjalnego urządzenia o wysokości szczeliny 0,8 mm. Następnie zanurzano płytę do wodnego roztworu czynnika żelującego: a) bezpośrednio po wylaniu zawiesiny lub b) po częściowym odparowaniu rozpuszczalnika (warunki podano w tab. 2). Po uformowaniu membrany przemywano ją pod bieżącą wodą i kondycjonowano w roztworze fizjologicznym soli w temperaturze pokojowej, co najmniej przez 24 h. Z arkuszy membran wykrawano krążki o średnicy 10 cm, odpowiadającej średnicy komory bioreaktora.

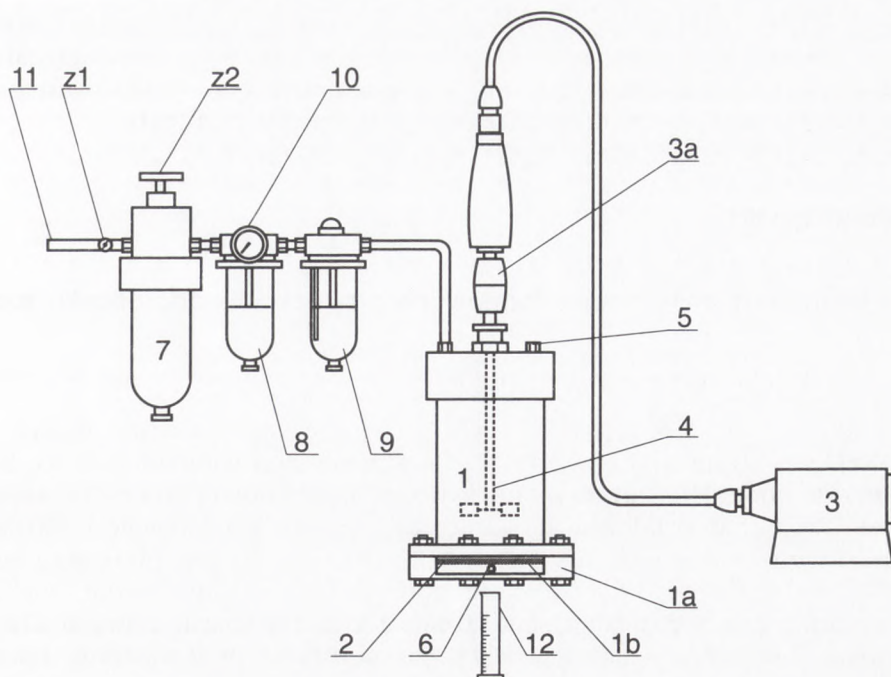
2.4. Biokonwersja fumaranu do kwasu asparaginowego

Do biokonwersji używano roztwory substratu (fumaran amonowy 150 g/l, $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0,25 g/l). Aktywność katalityczną membran oceniano na podstawie produkcji kwasu asparaginowego podczas kontaktu roztworu substratu z membraną. Prowadzono dwa typy doświadczeń — w układzie stacjonarnym i przepływowym (jednokierunkowym).

W pierwszym typie doświadczeń membrany umieszczano w kolbach stożkowych o pojemności 100 ml zawierających po 10 ml roztworu substratu i wytrząsano je przez 4 godziny w temperaturze 37°C. Stosowano wytrząsarkę z łaźnią wodną typu 357 firmy Elpan przy szybkości 120 i amplitudzie 8. Próby do analizy o objętości 1 ml pobierano co 1 h.

W celu porównania aktywności komórek immobilizowanych z aktywnością komórek przed immobilizacją; równolegle prowadzono próby, w których 5 g mokrej biomasy (tyle samo ile biomasy znajdowało się w 1 membranie) użyto do procesu prowadzonego w kolbach stożkowych.

W drugim typie doświadczeń membrany umieszczano w bioreaktorze (rys. 1). Badano transport wody przez membranę oraz przepuszczano w sposób ciągły roztwór substratu. Proces prowadzono pod różnym ciśnieniem transmembranowym, uzyskując przez to zróżnicowaną gęstość strumienia permeatu. Czynnikiem wytwarzającym ciśnienie było sprężone powietrze.



Rys. 1. Schemat bioreaktora z membraną enzymatyczną (opis w tekście).

2.5. Analiza kwasu asparaginowego

Analizę produktu biosyntezy prowadzono metodą chromatografii cienkowarstwowej na płytkach DC-Alufolien Kieselgel 60 F 254, stosując — jako fazę rozwijającą — mieszaninę: woda-etanol (33:67). Plamy kwasu L-asparaginowego wywoływano odczynnikami ninhydrynowym w temperaturze 105°C. Ilościowe oznaczenie kwasu asparaginowego wykonywano przy użyciu automatycznego analizatora aminokwasów oraz metodą chromatografii cieczowej HPLC.

2.6. Aparatura

Bioreaktor (rys. 1) składa się ze zbiornika cylindrycznego (1) o pojemności 1 l wykonanego ze stali kwasoodpornej, w którego dnie znajduje się króciec wylotowy (6) odprowadzający permeat. W dnie zbiornika umieszczona jest siatka kwasoodporna (1b), stanowiąca mechaniczną podporę membrany enzymatycznej (2). Dno połączone jest z pozostałą częścią zbiornika za pomocą śrub. Zbiornik (1) zaopatrzony jest w mieszadło łopatkowe (4), wymuszające przepływ medium nad membraną. Mieszadło napędzane jest za pomocą silnika elektrycznego (3). Różnicę ciśnień, będących siłą napędową procesu uzyskuje się doprowadzając sprężone powietrze do zbiornika wyrów-

nawczego (7), a następnie przez dwa mniejsze zbiorniki stabilizujące ciśnienie (8,9) do zbiornika pomiarowego (1). W skład stanowiska doświadczalnego wchodzi również: manometr (10), który wskazuje wartość zredukowanego zaworem (z2) ciśnienia i cylinder (12) jako odbieralnik permeatu.

3. Wyniki badań

3.1. Membrany chitozanowe formowane przy użyciu wodorotlenku sodu

3.1.1. Wybór stężenia roztworu NaOH

W badaniach wstępnych jako czynnik żelujący zastosowano wodne roztwory NaOH o stężeniu 1, 2, 3 i 4%. Czas żelowania wynosił 2, 4, 6, 8 lub 10 min. Na podstawie analizy chromatograficznej stwierdzono, że stężenie NaOH do 2% i czas działania do 4 min nie powinny powodować inaktywacji enzymu. Przy wzroście stężenia roztworu NaOH powyżej 2%, po użyciu takich membran do procesu obserwowano zdecydowane zmniejszenie wielkości plam produktu, co świadczy o spadku ilości kwasu asparaginowego. Do dalszych badań wybrano stężenie NaOH 2%, ponieważ przy stężeniu niższym żel chitozanowy był mechanicznie mniej trwały. Czas żelowania ustalono na 4 min.

3.1.2. Wykorzystanie aldehydu glutarowego jako wspomagającego czynnika sieciującego

W próbach z zawiesiną komórek badanego szczepu *E. coli* sprawdzono wpływ różnego stężenia aldehydu glutarowego w zakresie od 0,2 do 8,0% na aktywność aspartazy. Produkcję kwasu asparaginowego zaobserwowano w próbach ze wszystkimi stężeniami aldehydu, jednakże tylko dla stężeń w przedziale 0,2 – 1,0% była ona zbliżona do produkcji w próbce bez dodatku aldehydu. Wspomagające sieciowanie membran po ich uformowaniu prowadzono zatem w 0,5% roztworze aldehydu glutarowego w ciągu 15 min.

Wpływu aldehydu glutarowego na aktywność życiową komórek nie badano, gdyż we wcześniejszych pracach stwierdzono, że komórki żywe i martwe nie różnią się aktywnością w zakresie biosyntezy kwasu asparaginowego.

3.1.3. Aktywność enzymatyczna membran

Badano dwa rodzaje membran. Membrany wytworzone z roztworu zawierającego polimer i biokatalizator zgodnie z opisem podanym w p. 2, których żelowanie prowadzono w 2% wodnym roztworze wodorotlenku sodu w ciągu 4 min (standard) oraz membrany, które po uformowaniu w sposób analogiczny jak membrany standardowe dodatkowo sieciowano w 0,5% roztworze aldehydu glutarowego w ciągu 15 min.

Badania wykonano w kolbach wytrząsanych zgodnie z opisem podanym w p. 2 (pierwszy typ doświadczeń). Wyniki prezentowane są w tabeli 1.

TABELA 1

WYTWARZANIE KWASU ASPARAGINOWEGO PRZEZ KOMÓRKI *E. coli*
IMMOBILIZOWANE W MEMBRANACH CHITOZANOWYCH ŻELOWANYCH W WODOROTLENKU SODOWYM
ORAZ TYCH SAMYCH MEMBRAN DODATKOWO SIECIOWANYCH ALDEHYDEM GLUTAROWYM

Biokatalizator	Czas procesu (h)	Kwas asparaginowy (μmol/ml)	
		próba*	próba**
zawiesina komórek (kontrola)	1	188	854
	2	413	872
	3	520	891
	4	664	903
membrana standardowa bez sieciowania	1	24	31
	2	24	65
	3	28	91
	4	45	93
Membrana sieciowana	1	17	67
	2	31	122
	3	32	137
	4	38	161

* doświadczenie wykonane bezpośrednio po uformowaniu membran,

** doświadczenie wykonane z użyciem tych samych membran po 4 dobach przechowywania ich w roztworze fumaranu amonowego (podłoże aktywacyjne) w temperaturze +4°C.

W przeprowadzonych badaniach wykazano niską aktywność enzymu immobilizowanego w obydwu typach membran chitozanowych żelowanych w wodnym roztworze wodorotlenku sodu. Wyższą aktywność uzyskano w przypadku użycia membrany sieciowanej aldehydem glutarowym, ale wynosiła ona poniżej 18% aktywności uzyskanej w próbie kontrolnej. Dla membrany bez sieciowania aktywność była prawie dwukrotnie niższa.

3.2. Membrany chitozanowe formowane przy użyciu *orto*-fosforanu sodu

Z uwagi na niską aktywność aspartazy w komórkach unieruchomionych w membranach chitozanowych, żelowanych w wodnym roztworze wodorotlenku sodu, podjęto dalsze próby poszukiwania odczynnika, który byłby obojętny dla aktywności enzymu. Ponieważ chitozan ma w swojej strukturze wolne grupy aminowe, postanowiono użyć *orto*-fosforanu sodowego. Wcześniej w literaturze opisano wytwarzanie kuleczek chitozanowych przy użyciu *tri*-fosforanu sodowego [22].

Badania prowadzono przy użyciu membran chitozanowych żelowanych w 20% wodnym roztworze *orto*-fosforanu sodowego. Parametry wytwarzania membran (grubość, warunki odparowania rozpuszczalnika) dobrano pod ką-

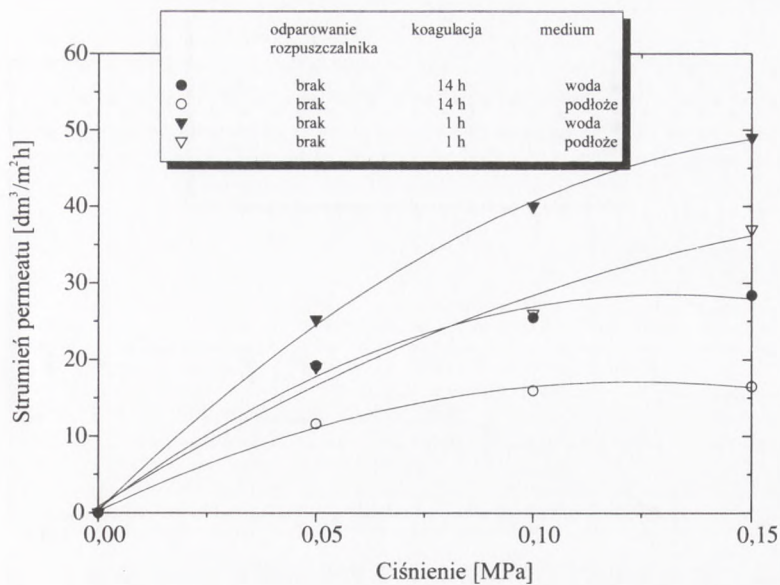
tem uzyskania możliwie wysokiego strumienia permeatu oraz maksymalnej konwersji kwasu fumarowego do kwasu asparaginowego. Charakterystykę transportową podano w postaci zależności strumienia permeatu wody oraz podłoża produkcyjnego od ciśnienia transmbranowego dla membran typu I — o wysokiej przepuszczalności i niskiej zdolności do biotransformacji (tab. 2, rys. 2) oraz dla membran typu II — o niskiej przepuszczalności i dużej zdolności do biotransformacji (tab. 2, rys. 4). Produkcję kwasu asparaginowego w membranach typu I i II przedstawiono na chromatogramach (rys. 3 i 5). Określono również przebieg procesu w czasie dla membrany typu II/3 (rys. 6 i 7). Efektywność procesu określano przez pomiar strumienia permeatu i stężenia kwasu asparaginowego w permeacie.

TABELA 2
WARUNKI WYTWARZANIA MEMBRAN PRZY UŻYCIU FOSFORANU SODOWEGO

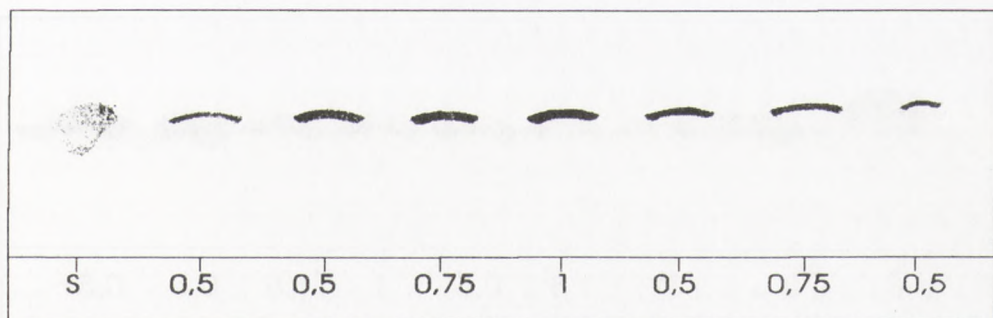
Typ membrany	Warunki formowania membran	
	odparowanie	żelowanie
I/1	brak	30 min, pH 12
I/2	brak	14 h, pH 9,5
I/3	brak	1 h, 30°C
II/1	5 h, 20°C	3 h, 30°C
II/2	5 h, 30°C	2 h, 30°C
II/3	4 h, 30°C	2 h, 30°C

W membranach charakteryzujących się wysoką przepuszczalnością (typu I) proces biotransformacji kwasu fumarowego w kwas asparaginowy zachodzi w niewielkim stopniu. Zagęszczenie struktury membran przez odparowanie rozpuszczalnika, bądź wydłużenie czasu żelowania (membrany typu II) zmniejsza strumień permeatu zarówno dla wody jak i podłoża produkcyjnego, lecz zwiększa się wydajność biotransformacji. Stężenie kwasu asparaginowego w permeacie określone metodą HPLC wynosi około 130 g/l. Wydajność biokonwersji kwasu fumarowego do kwasu asparaginowego osiąga zatem poziom bliski 100%.

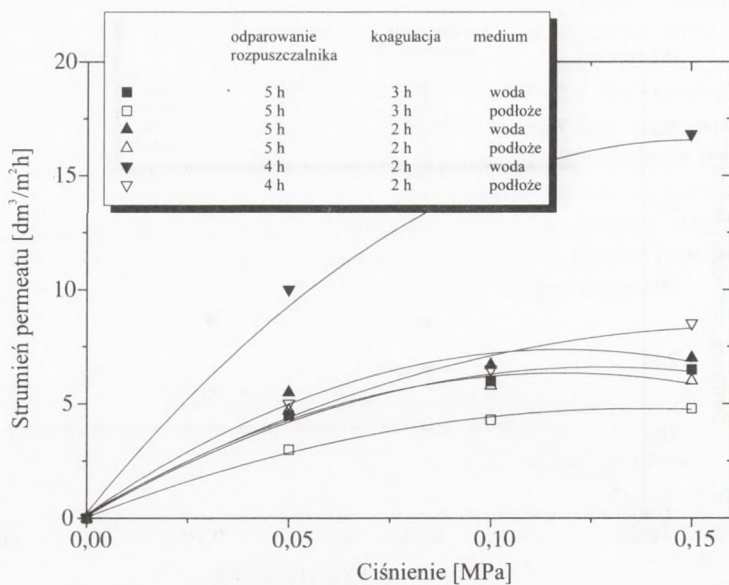
Podczas prowadzenia procesu ciągłego przy użyciu membrany typu II/3, przy ciśnieniu transmbranowym 0,05 MPa w ciągu pierwszych 2 godzin następuje spadek strumienia permeatu (z 6 dm³/m²h do 4 dm³/m²h), po czym stabilizuje się on i utrzymuje się praktycznie na nie zmienionym poziomie przez 14 h (rys. 6). W przypadku prowadzenia procesu przy ciśnieniu transmbranowym 0,1 MPa strumień permeatu w pierwszej godzinie wynosi 6,5 dm³/m²h, po czym spada i stabilizuje się po 4 h na poziomie 5,5 dm³/m²h. Stężenie kwasu asparaginowego w permeacie mierzone w kolejnych godzinach prowadzenia procesu nie zmienia się (rys. 7); oznaczone metodą HPLC wynosi około 130 g/l.



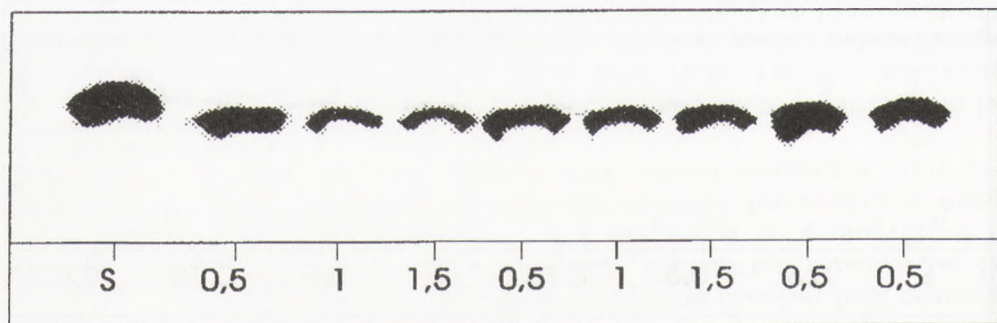
Rys. 2. Właściwości transportowe membran typu I.



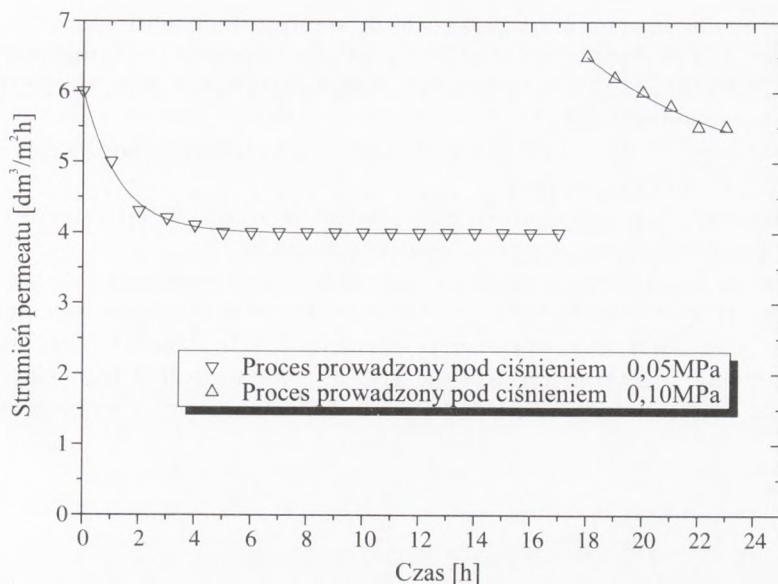
Rys. 3. Plamy kwasu asparaginowego w procesie biosyntezy z użyciem membran typu I/2. S — wzorec kwasu L-asparaginowego; liczby oznaczają ciśnienie transmembranowe wyrażone w atm.



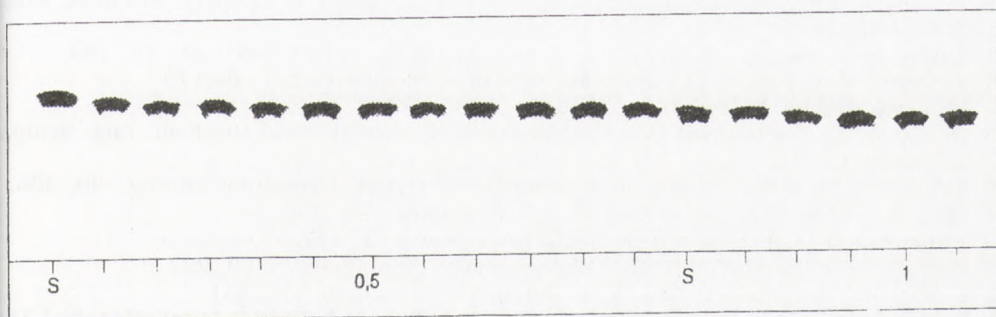
Rys. 4. Właściwości transportowe membran typu II.



Rys. 5. Plamy kwasu asparaginowego w procesie biosyntezy z użyciem membran typu 1/2. S — wzorec kwasu L-asparaginowego; liczby oznaczają ciśnienie transmembranowe wyrażone w atm.



Rys. 6. Zmiany strumienia permeatu w czasie procesu z użyciem membrany typu II/3.



Rys. 7. Plamy kwasu asparaginowego w procesie biosyntezy z użyciem membran typu II/3. S — wzorec kwasu L-asparaginowego; liczby oznaczają ciśnienie transmembranowe wyrażone w atm.

4. Wnioski

Z przeprowadzonych badań wynikają następujące wnioski:

Możliwe jest wytworzenie chitozanowych membran z immobilizowanymi komórkami *Escherichia coli*, które posiadają aktywność w zakresie biosyntezy kwasu L-asparaginowego.

W membranach żelowanych za pomocą wodorotlenku sodowego następuje znaczna inaktywacja enzymu.

Czynnikiem żelującym, który nie powoduje inaktywacji enzymu w czasie formowania membrany jest *orto*-fosforan sodu.

Najwyższą produkcję kwasu asparaginowego obserwuje się w membranach typu II charakteryzujących się niskim strumieniem permeatu (przy ciśnieniu 0,05 MPa dla wody jest rzędu 5-10 dm³/m²h). Stężenie kwasu asparaginowego w permeacie wynosi 130 g/l, a zatem jest tego samego rzędu co stężenie kwasu asparaginowego produkowanego przez enzym natywny.

Literatura

1. Chmiel A., (1991), *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa, 315.
2. Hartmer W., (1985), *Trends in Biotechnol.*, 3, (6), 149.
3. Fukushima Y., Okamura K., Imai K., Motai H., (1988), *Biotechnol. Bioeng.*, 32, 584.
4. Ceynowa J., (1994), *Biotechnologia*, 1 (24), 64.
5. Diiori E., Catapano G., Rosevear A., (1984), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 34 B, 127.
6. Drioli E., Iorio G., Catapano G., de Rossa M., Gambacorta A., (1986), *J. Membrane Sci.*, 27, 253.
7. Freeman A., Drol Y., (1994), *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 1083.
8. Zhu J., Li Q., Dauguils J., Hsu C. C., Goosen M. F. A., (1993), *Biomat. Art. Cells & Immob. Biotech.*, (3), 391.
9. Imai K., Shiomi T., Uchida K., Miya M., (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, 25, 613.
10. Iborra J. L., Obon J. M., Manjon A., Canovas M., (1992), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 15, 22.
11. Tsikas D., Freimann-Kersebaum A., Busse M., Brunner G., (1991), *Biochem. Eng. Stuttgart*, 114.
12. Luther H., Hirsch S., Schuster E., Weber E., (1992), *Acta Biotechnol.*, 12, 133.
13. Kotzelski J., Staude E., Ulbricht M., (1991), *J. Membrane Sci.*, 64, 173.
14. Firma Norrinsho, Patent JP. J01005484 (1989).
15. Bream A. J., Yoshisato R. A., Carmichael G. R., (1987), *Ann. Biochem. Eng. Symp.*, 17 Meet., 11.
16. Bakken A. P., Hill C. G. Jr., Amundson C. H., (1992), *Biotechnol. Bioeng.*, 39, 408.
17. Manjon A., Iborra J., L., Lozano P., (1990), *Biotech.*, 90, 356.
18. Krajewska B., (1991), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 52, 157.
19. Babu P. S. R. Panda T., (1991), *Biotechnology Techniques*, 5, (3), 227.
20. Guther K., Simon H., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 441.
21. Umemura I., Takamatsu S., Sato T., Tosa T., Chibata I., (1984), *Appl. Microbiol. Technol.*, 20, 291.
22. Karsen G., Simon H., (1993), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 441.

Chitosan enzymatic membranes for L-aspartic acid biosynthesis

Summary

A new method for the formation of chitosan membranes containing active cells of *E. coli* mutant producing L-aspartic acid was developed. Trisodium *ortho*-phosphate as a gelation agent for the chitosan membrane formation was proposed. The highest productivity, with near 100% conversion of ammonium fumarate to L-aspartic acid; the membranes are characterized by a low permeate stream flow of 5-10 dm³/m²h at an overpressure of 0,05 MPa.

Key words:

chitosan membrane, *E. coli*, membrane bioreactor, aspartic acid.

Adres do korespondencji:

Zofia Modrzejewska, Wydział Inżynierii Procesowej i Ochrony Środowiska,
Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 173/175, 90-530 Łódź.