

p. 6.1
715

715

ISSN 0868-4081

0868-4146

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI
TOIMETISED

**ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО
ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**

**TRANSACTIONS OF TALLINN
TECHNICAL UNIVERSITY**

**ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ФЕРМЕНТОВ**

TALLINN 1990

715

ALUSTATUD 1937

**TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI
TOIMETISED**

**TRANSACTIONS OF TALLINN
TECHNICAL UNIVERSITY**

**ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО
ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**

██████████ УДК 577.15:66.097.3

**ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ФЕРМЕНТОВ**

Биотехнология У

Под общей редакцией А.И. Кёстнера

TALLINN 1990



ТАЛЛИННСКИЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
Труды ТТУ № 715

ПОЛУЧЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ
Биотехнология У

На русском языке

Редактор Н. Никитина

Техн. редактор В. Ранник

Сборник утвержден коллегией Трудов ТТУ 03.05.90

Подписано к печати 20.12.1990

Формат 80x90/16

Печ. л. 5,5 + 0,25 приложение

Уч.-изд. л. 4,43

Тираж 300

Зак. № 890

Цена 2 руб. 40 коп.

Таллиннский технический университет,
200108 Таллинн, Академия геэ, 1

Ротапринт ТТУ, 200006 Таллинн, ул. Коскла, 2/9



Таллиннский технический университет, 1990

НОВЫЙ ТЕРМОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ
 α - И β -ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

Для определения циклодекстринов (ЦД) в растворах применяются различные методы. Для определения концентрации индивидуальных соединений или контроля их чистоты могут быть применены поляриметрия [1] и методы, основывающиеся на изменении оптических свойств хромо- и флуорогенных веществ в результате комплексообразования [2]. Для анализа смесей, содержащих несколько ЦД, самым эффективным оказался метод жидкостной хроматографии [3-5].

Одновременное количественное определение α - и β -ЦД имеет важное значение при исследовании оптимизации процесса ферментативного синтеза ЦД из крахмала. В определенных условиях некоторые ферменты образуют преимущественно α - и β -ЦД и только малые количества γ -ЦД. К таким ферментам относятся также ферменты, продуцируемые различными штаммами *Bacillus macerans* [6].

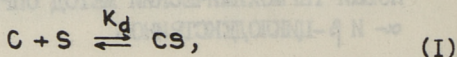
В настоящей статье описывается новый аналитический метод определения α - и β -ЦД, основывающийся на измерении тепловых эффектов образования молекулярных комплексов ЦД с двумя различными субстратами - бензойной кислотой и 5-метилрезорцином (1,3-диокси, 5-метилбензолом). Применение проточной системы со смешиванием микрокалориметра позволяет использовать этот метод для полуавтоматического исследования динамики образования ЦД в реакционных смесях синтеза ЦД.

Теоретическая часть

Циклодекстрины (С) могут в растворах образовать молекулярные комплексы, инклюзионные соединения с различны-

ми веществами, субстратами (S). В большинстве случаев, в частности, для α - и β -ЦД, молекулярные комплексы образуются в молярном соотношении 1:1. Такие комплексы являются весьма стабильными, имеющими обычно значения констант диссоциации 0,001-0,1 М, образование комплексов связано со значительным экзотермическим эффектом (около 5-50 кДж/моль).

Реакцию комплексообразования как равновесную можно представить в общей форме



где константа диссоциации K_d выражается следующим образом

$$K_d = \frac{[C][S]}{[CS]} = \frac{([C]_0 - [CS]) \cdot ([S]_0 - [CS])}{[CS]}. \quad (2)$$

В этом уравнении $[C]_0$ и $[S]_0$ представляют собой начальные (суммарные) концентрации веществ C и S в растворе.

Следовательно, если известно значение константы диссоциации K_d , легко может быть рассчитана концентрация комплекса CS в растворе, так как в отношении $[CS]$ ур. (2) представляет собой следующее квадратичное уравнение:

$$[CS]^2 - ([C]_0 + [S]_0 + K_d) \cdot [CS] + [C]_0 \cdot [S]_0 = 0. \quad (3)$$

Образование одного моля комплекса связано с выделением тепла Q , кДж/моль.

В основу термохимического определения концентрации двух ЦД в растворе лежит калориметрическое измерение выделения тепла (изменения энтальпии) в ходе комплексообразования ЦД по крайней мере с двумя различными по структуре субстратами, т.е. для одного анализа необходимо проводить два термохимических измерения.

По-видимому, разные типы микрокалориметров могут быть применены для этой цели. С точки зрения экономии времени предпочтение надо дать проточным калориметрам со смешиванием.

Принимаем, что раствор циклодекстринов дается по одному каналу в ячейку со смешиванием с объемной скоростью

q_1 , а раствор субстрата (или S_1 или S_2) по второму каналу со скоростью q_2 (мл/с), суммарная скорость q равна $q_1 + q_2$. Достижение стационарного состояния протекает быстро и после термического уравнивания системы можно измерять значение стационарного теплового потока. К примеру рассмотрим комплексообразование ЦД с первым субстратом (S_1). Если обозначать стационарные концентрации комплексов через $[\alpha - \text{ЦД} \cdot S_1]_{\text{ст}}$ и $[\beta - \text{ЦД} \cdot S_1]_{\text{ст}}$ (М или ммоль/мл), то в одну секунду образуется $q \cdot [\alpha - \text{ЦД} \cdot S_1]_{\text{ст}}$ и $q \cdot [\beta - \text{ЦД} \cdot S_1]_{\text{ст}}$ ммоль комплексов α -ЦД и β -ЦД соответственно. Следовательно, выделяемый стационарный тепловой поток N_1 (Вт) равен

$$N_1 = q \cdot ([\alpha - \text{ЦД} \cdot S_1]_{\text{ст}} \cdot Q_1 + [\beta - \text{ЦД} \cdot S_1]_{\text{ст}} \cdot Q_2), \quad (4)$$

где Q_1 и Q_2 - тепловые эффекты комплексообразования (кДж/моль или Дж/ммоль).

Аналогично получаем для второго калориметрического опыта, в котором анализируемый раствор смешивается с раствором второго субстрата (S_2):

$$N_2 = q \cdot ([\alpha - \text{ЦД} \cdot S_2]_{\text{ст}} \cdot Q_3 + [\beta - \text{ЦД} \cdot S_2]_{\text{ст}} \cdot Q_4). \quad (5)$$

В этом уравнении Q_3 и Q_4 являются тепловыми эффектами образования комплексов между α -ЦД и S_2 , β -ЦД и S_2 соответственно.

Имея в нашем распоряжении значения всех четырех констант диссоциации и четырех тепловых эффектов, легко рассчитать значения ожидаемых тепловых потоков в калориметрических опытах N_1 и N_2 . Решение обратной задачи - расчет исходных концентраций ЦД по измеренным значениям N_1 и N_2 является более сложным. Нами разработана и используется для этой цели специальная программа с применением метода нелинейной регрессии.

Необходимо отметить, что выбор субстратов имеет первостепенное значение. Только в том случае, когда они по своей склонности образовывать инклюзионные соединения сильно различаются, значения N_1 и N_2 содержат достаточно информации для того, чтобы рассчитать значения исходных концентраций ЦД с необходимой точностью.

Предварительно нами изучено комплексобразование циклодекстринов с различными субстратами с помощью термохимического метода, разработанного ранее [7], включая комплексы с бензойной кислотой [8] и 5-метилрезорцином. Характеристика комплексов α - и β -ЦД с названными субстратами представлена в таблице I.

Т а б л и ц а I

Значения констант диссоциации молекулярных комплексов и изменения термодинамических параметров в ходе комплексобразования в воде при 30 °С.

БК - бензойная кислота, 5-МР - 5-метилрезорцин

Система	Константа диссоциации, М	ΔH кДж/моль	ΔG кДж/моль	ΔS Дж/моль К
α -ЦД + БК	0,0017	-38,2	-16,1	-73
β -ЦД + БК	0,0028	-18,0	-14,8	-10
α -ЦД + 5-МР	0,065	-13,7	-6,9	-22
β -ЦД + 5-МР	0,011	-20,8	-11,4	-31

Найденные значения констант диссоциации и изменения энтальпии нами использованы в качестве исходных. Они подчинялись незначительному корригированию методом наименьших квадратов, чтобы получить подходящие для смешанных растворов двух ЦД эффективные значения. Компьютерная программа содержит следующие значения:

α -ЦД + бензойная кислота	$K_1=0,0017$ М	$Q_1=39,4$ кДж/моль
β -ЦД + бензойная кислота	$K_2=0,0028$ М	$Q_2=16,0$ кДж/моль
α -ЦД + 5-метилрезорцин	$K_3=0,065$ М	$Q_3=14,0$ кДж/моль
β -ЦД + 5-метилрезорцин	$K_4=0,011$ М	$Q_4=21,0$ кДж/моль

Материалы и методы

В качестве исходных веществ применялись высушенные при 100 °С препараты α - и β -циклодекстринов венгерской фирмы "Chinoïn", бензойная кислота Шосткинского завода химреактивов и 5-метилрезорцин (орцин) австрийской фирмы "Loba-Chemie". Все растворы приготавливались в дистиллированной воде. Термохимические измерения проведены при 30 °С.

Применялась проточная система теплопроводящего микрокалориметра LKB-2277 ("Bioactivity Monitor"). Растворы подавались в проточную ячейку со смешиванием при помощи двухканального перистальтического насоса LKB-2132.

Схема термохимического анализа циклодекстринов приведена на рис. 1.

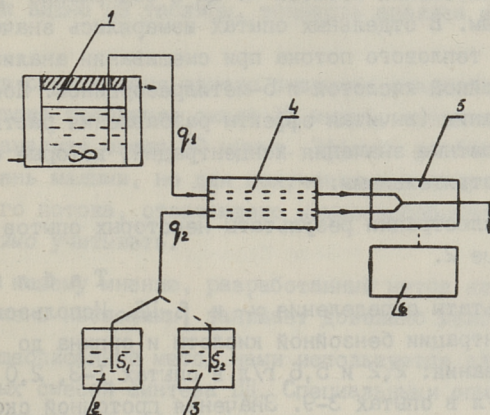


Рис. 1. Схема термохимического анализа циклодекстринов.

1 - сосуд или реактор с исследуемым раствором, 2 и 3 - сосуды с субстратами (бензойной кислотой и 5-метилрезорцином), 4 - двухканальный перистальтический насос, 5 - проточная ячейка со смешиванием, 6 - самопишущий потенциометр.

Анализируемая смесь ЦД (I) с помощью перистальтического насоса (4) с объемной скоростью q_1 по одному каналу поступает в проточную ячейку со смешиванием микрокалориметра (5). По второму каналу с объемной скоростью q_2 в ячейку подается раствор субстрата, или S_1 (бензойная кислота, или S_2 (5-метилрезорцин), из соответствующих сосудов (2) и (3). На микрокалориметре измеряется тепловой поток, сигналы которого передаются на самопишущий потенциометр (6).

Данные термохимического анализа обрабатываются на компьютере. Для этих целей создан пакет программ на языке Бейсик 2.

Результаты и обсуждение

Приготавливались растворы чистых α - и β -ЦД различной концентрации с применением молярных соотношений α -ЦД/ β -ЦД от 1:1 до 8:1. Такие растворы имитируют реакционную смесь ферментативного синтеза ЦД из крахмала, где обычно наблюдается значительный избыток α -ЦД и содержание γ -ЦД остается малым. В отдельных опытах измерялись значения наблюдаемого теплового потока при смешивании анализируемой смеси бензойной кислотой и 5-метилрезорцином. После их корригирования (вычитая эффекты разбавления растворов) нашли расчетные значения концентраций, которые сравнивались с действительными.

Для иллюстрации результаты некоторых опытов приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Результаты определения α - и β -ЦД. Используемые концентрации бензойной кислоты и орцина до смешивания: 2,2 и 5,6 г/л в опытах 1-3, 2,0 и 5,0 г/л в опытах 3-9. Значения проточной скорости $q_0 = 0,00566$, $q_1 = 0,0029$, $q_2 = 0,00276$ мл/с

Нр. опы- тов	Тепловой поток, мкВт		Концентрации, г/л		Относит. ошибка, %
	N_1	N_2	действ. определ.		
1	2	3	4	5	6
1	441	151	3,63	3,87	+6,6
			3,70	3,64	-1,6
2	302	100,5	2,37	2,58	+8,9
			2,41	2,37	-1,7
3	229,5	83	1,82	1,88	+3,3
			1,85	2,03	+9,7
4	736	207	8,19	7,74	-5,5
			4,78	4,83	+1,0
5	339	86,6	3,28	3,23	-1,5
			1,91	1,92	+0,5
6	174	43,5	1,64	1,62	-1,2
			0,957	0,949	-0,8
7	945	186	10,93	11,42	+4,5
			3,19	3,17	-0,6

1	2	3	4	5	6
8	436	79,1	4,37 1,27	4,56 1,32	+4,3 +3,9
9	255	35	2,62 0,381	2,70 0,384	+3,1 +0,8

Как видно из таблицы, точность анализа можно оценить на 5 %.

Для определения одного значения стационарного теплового потока требуется около 15 минут, следовательно, для одного анализа около 30 минут. Эффекты разбавления являются очень малыми, но для получения достоверных значений теплового потока, отвечающего комплексообразованию, их необходимо учитывать.

По нашему мнению, разработанный метод является удобным и очень несложным, занимает довольно мало времени.

Вышеописанный метод нами используется для анализа реакционных смесей синтеза ЦД. Специальными опытами показано, что сам тепловой эффект конверсии крахмала и декстринов в ЦД является ничтожным, и что линейные продукты гидролиза крахмала не склонны к комплексообразованию и не мешают анализу α - и β -ЦД.

Л и т е р а т у р а

1. Bergeron R.J., Channing M.A., Gibbey G., Pillor D.M. Disposition requirements for binding in aqueous solution of polar substrates in the cyclodextrin cavity // J. Am. Chem. Soc. 1977. Vol. 99. P. 5146-5151.

2. Mäkelä M., Korpela T., Laakso S. Colorimetric determination of β -cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of phenolphthalein // J. Biochem. Biophys. Meth. 1987. Vol. 14. P. 85-92.

3. Koizumi K., Ushimura T., Kuroyanagi T., Hizukuri S., Abe J.-I. Analyses of branched cyclodextrins by high-performance liquid and thin-layer chromatography // J. Chrom. 1986. Vol. 360. P. 397-406.

4. Cyclodextrins and their inclusion complexes / Ed.

J. Szejtli. Budapest, Akademiai Kiado. 1982. 296 p.

5. Zsádon B., Szilas M., Szejtli J., Seres G., Tüdös P. Chromatography of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrin on dextran gel columns // Stärke. 1978. Vol. 30. N 8. P. 276-279.

6. Вокк Р.А., Пейпман Э.М. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов IV. Биосинтез циклодекстрин-глюканотрансферазы различными штаммами *Bacillus macerans* // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1988. № 663. С. 58-65.

7. Simer E., Kurvits M., Köstner A. Thermochemical investigation of β -cyclodextrin complexes with benzoic acid and sodium benzoate // Thermochim. Acta. 1987. Vol. 116. P. 249-256.

8. Simer E., Kurvits M. Calorimetric study of benzoic acid - cyclodextrin inclusion complexes // Thermochim. Acta. 1989. Vol. 140. P. 161-168.

M. Kurvits, E. Siimer

Uus termokeemiline meetod α - ja β -tsüklo-
dekstriini määramiseks

Kokkuvõte

Tutvustatakse uut termokeemilist meetodit α - ja β -tsüklodekstriini määramiseks. Meetod põhineb tsüklodekstriinide ja kahe erineva substraadi kompleksimoodustumisel tekkinud soojusefektide mikrokaloremeetriilisel mõõtmisel. Substraadidena kasutatakse bensoehapet ja 5-metüülresortsini. Meetodi täpsus on 5 %. Meetod on lihtne ja mugav kasutada.

M. Kurvits, E. Siimer

A New Thermochemical Method of Determination
of α - and β -Cyclodextrins

Abstract

A thermochemical method of determining α - and β -cyclodextrins (CD) has been elaborated, based on the microcalorimetric measurement of heat effects due to formation of molecular complexes between CD and two substrates - benzoic acid and 5-methylresorcinol (orcinol). The accuracy of the method is about 5 per cent. The method is convenient and quite rapid.

УДК 579.083.13

Р.А. Вокк, Й. Штейнхардт

I. ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА *Bacillus macerans* И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

VI. Уточнение условий культивирования *B. macerans* - продуцента циклизующего фермента

Для проведения биокаталитических процессов в микробиологической промышленности часто прибегают к применению неочищенных ферментных препаратов в виде культуральной жидкости, отделенной от клеток и их обломков или частично очищенной путем обработки ее ацетоном, этанолом или другими белокосажающими агентами. Применяемая для ферментативного катализа реакции образования циклодекстринов (ЦД) из крахмала циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТ-аза, циклизующий фермент) (КФ.2.4.1.19) является продуктом микробиологического синтеза многих видов бацилл, таких как *B. circulans*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. ohbensis*, *B. subtilis* [1 - 4]. Для факультативного анаэроба *B. macerans* разработаны различные условия культивирования с целью увеличения выхода продуцируемой им ЦГТ-азы в культуральную жидкость, что объясняется широким ареалом применимости штаммов *B. macerans* в промышленных целях. В предыдущих наших сообщениях данной серии уже рассматривались вопросы подбора штаммов-продуцентов и способы выращивания продуцента ЦГТ-азы [5, 6], а также применения ЦГТ-азы для получения ЦД [7, 8]. В данной работе мы пытались дать некоторые уточнения и рекомендации в отношении роли источников углерода и азота, а также других факторов в среде выращивания бацилл с целью повышения активности циклизующего фермента в культуральной жидкости, применяемой без дополнительной очистки при производстве β -ЦД.

Материалы и методы

Для уточнения условий выращивания продуцента циклизующего фермента использовали культуру *V. macerans* ВКМВ-506, полученную из всесоюзной коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. С целью получения исходной культуры для инокулирования лиофилизованную культуру засеивали в обычную картофельную среду, содержащую мел для поддержания рН [9]. Мел для опытных сред стерилизовали отдельно и добавляли стерильно непосредственно перед посевом культуры. После третьего пассажа в указанной среде культуры использовали в опытах.

Забуференные питательные среды для исследования готовили с помощью следующих буферных смесей - 1,0 М NaOH + глицин, рН 8,55; 1,0 м трис-HCl, рН 7,0 и 1,0 М фосфатный буфер, рН 7,0. Буферные смеси добавляли в количестве до 10 мл на 100 мл среды, т.е. конечная концентрация буферов в экспериментальных средах составляла не более 0,1 М. В каждом конкретном случае даны значения конечной концентрации буфера к иллюстрациям.

В качестве источника углерода использовали мелко нарезанный или тертый картофель в количестве 15 % от среды, а также картофельный отвар, картофельный крахмал и глюкозу. В качестве дополнительного источника азота применяли сульфат аммония и мочевины в количестве не более 2 % от среды.

Опытные культуры выращивали в колбах емкостью 250 мл, содержащих по 100 мл питательной среды, без аэрации и перемешивания. В некоторых опытах использовали медицинскую нестерильную вату, добавленную перед стерилизацией в питательные среды в количестве 0,5 г на 100 мл среды.

Пробы в количестве 3-4 мл извлекали в стерильных условиях каждые 24 часа и подвергали анализу на содержание белка по Лоури [10], содержание ЦД по Викмону [11], на амилазную активность по методу Фувы [12] и на активность ЦГТ-азы с помощью модифицированного нами метода Кестнера с соавторами [13]. Так как разработанный на кафедре органической и биохимии ТГУ метод определения активности фермента ЦГТ-азы не позволял одновременно определять

до 16 различных проб в нескольких повторностях, в данной работе использовали т.н. экспресс-метод определения активности ЦТ-азы. Указанный экспресс-метод принципиально не отличается от основного метода определения активности циклизующего фермента по скорости образования продукта реакции - β -циклодекстрина. Отличительной чертой явилось использование одного временного интервала (5 минут) при инкубировании ферментсодержащей пробы с субстратом при рН исследуемого образца и окончание ферментативной реакции с помощью добавления в реакционную смесь рабочего раствора с рН 10,5, содержащего 15 мл $4 \cdot 10^{-2}$ М NaCO_3 , 2 мл спиртового раствора фенолфталеина $3,75 \cdot 10^{-3}$ М и 63 мл дист. воды. Ферментативную реакцию проводили при 45°C , т.е. при близкой к оптимальной температуре для ЦТ-азы, как показано ранее [14].

Для выяснения роли различных факторов при выращивании культуры микроорганизма-продуцента циклизующего фермента опыты ставили по плану полного факторного эксперимента [15].

Результаты и обсуждение

Характерные кривые динамики образования ЦД и ЦТ-азы, полученные нами при исследовании культуры *V. macerans* ВКМВ-506, приведены на рисунке 1. За первые 24-48 часов культивирования наблюдалось активное накопление в среде ЦД, что свидетельствует о некоторой начальной активности ЦТ-азы у культуры продуцента. По-видимому, использованные методики исследования не позволяли выявить индукцию ЦТ-азы в первые часы культивирования *V. macerans*. Значительное увеличение активности ЦТ-азы в культуральной жидкости отмечено в стационарной фазе роста культур и обычно достигает максимума к 6-8 дням культивирования. Высокая амилазная активность в среде наблюдалась только за первые 24-72 часа культивирования.

Уточнение количества инокулята. Для опытов засеивали 0,5 мл, 1 мл, 2 мл и 10 мл 24-часовой дважды инокулированной культуры *V. macerans* на 100 мл питательной среды (соответственно 0,5, 1, 2 и 10 %). Количество инокулята не отражалось на выходе биомассы в конце срока на-

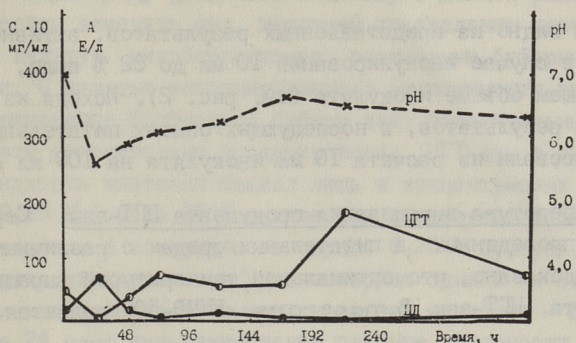


Рис. 1. Динамика образования ЦГТ-азы, содержания ЦД и изменения pH в культуральной жидкости *V. paserans* VKMB-506.

блюдения культур, о чем свидетельствовали как определение веса сухого остатка микроорганизмов, так и определение содержания белка в биомассе. Тем не менее, активность выделенной в культуральную жидкость ЦГТ-азы оставалась ниже в

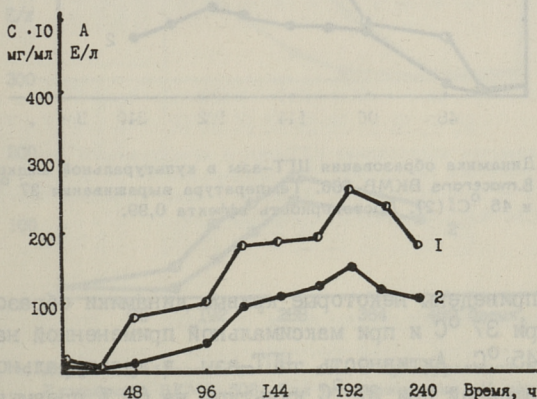


Рис. 2. Динамика образования ЦГТ-азы в культуральной жидкости *V. paserans* VKMB-506. Количество инокулята 10 % (1) и 2 % (2). Достоверность эффекта 0,99.

опытах с 0,5, 1 и 2 мл инокулята (достоверность различий 99 %). Результаты опытов приведены на рисунке 2.

Как видно из представленных результатов, активность ЦГТ-азы в случае инокулирования 10 мл до 62 % выше, чем при меньшем объеме инокулята (см. рис. 2). Исходя из полученных результатов, в последующих опытах питательные среды засеивали из расчета 10 мл инокулята на 100 мл среды.

Температура выращивания продуцента ЦГТ-азы. Серией опытов, проведенных в питательных средах с различным составом, доказано, что оптимальной температурой выращивания продуцента ЦГТ-азы *V. macerans* ВКМВ-506 является 37 °С.

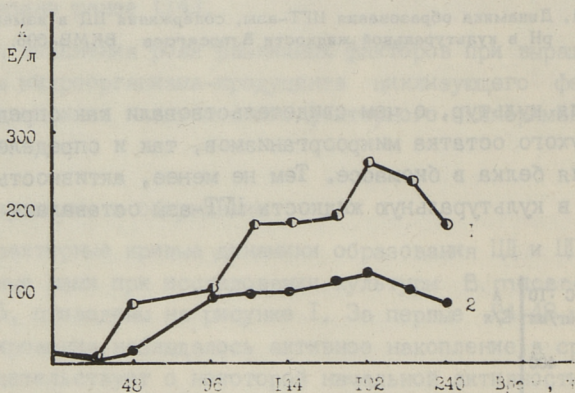


Рис. 3. Динамика образования ЦГТ-азы в культуральной жидкости *V. macerans* ВКМВ-506. Температура выращивания 37 °С (1) и 45 °С (2). Достоверность эффекта 0,99.

На рис. 3 приведены некоторые кривые динамики образования фермента при 37 °С и при максимальной примененной нами температуре 45 °С. Активность ЦГТ-азы в культуральной жидкости, выращенной при 37 °С культуры на 65 % превышала аналогичные значения активности фермента, полученные при 45 °С.

Поддерживание рН при культивировании *V. macerans*. С середины 30-х годов уже известен простой состав питательной среды для выращивания продуцента ЦГТ-азы с применением

мела для поддержания рН среды [9]. Так как в ходе жизнедеятельности клетки *B. macerans* активно выделяют в питательную среду различные кислоты, в данной работе мы попытались заменить мел, мешающий определению параметров роста культур микроорганизмов, различными буферными растворами. С помощью запланированного эксперимента выяснили, что применение фосфатного буфера дает положительные результаты относительно продуцирования ЦГТ-азы в культуральную жидкость клетками бацилл лишь в концентрациях буфера ниже 0,25 М (около 95 % активности циклизующего фермента по сравнению с контролем в случае 0,25 М буфера). Достигнутая активность не удовлетворяет однако из-за плохой стабильности фермента в культуральной жидкости – за следующие 24 часа культивирования падение активности ЦГТ-азы составляло 40 %. С другой стороны, более низкие концентрации буфера из-за меньшей буферной емкости не позволяли поддерживать рН среды около 7,0. Однако обнаруженная в опытах с 0,1 М фосфатным буфером активность ЦГТ-азы значительно не снижалась за 120 часов, как это показано на рисунке 4.

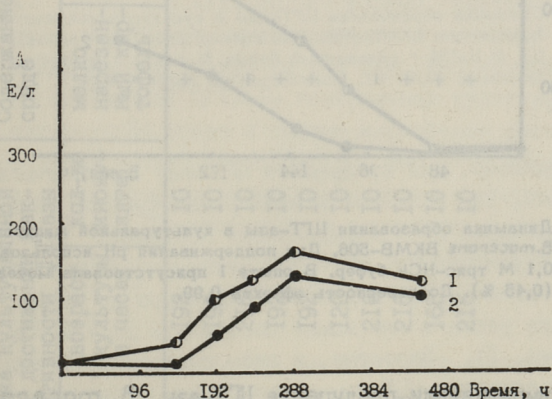


Рис. 4. Динамика образования ЦГТ-азы в культуральной жидкости *B. macerans* ВКМВ-506. Для поддержания рН использовали 0,1 М фосфатный буфер (1) или мел (2). В опыте 1 присутствовала вата. Достоверность эффекта 0,90.

Необходимо отметить, что фосфатный буфер в питательной среде для выращивания продуцента ЦГТ-азы реагирует с

ионами кальция, которые нужны для проявления активности фермента [16]. Поэтому на следующем этапе исследований мы выбрали трис-НСI буфер, который в концентрации 0,05 М и 0,1 М также не был достаточным для поддержания рН. Но тем не менее именно с помощью этой буферной системы к 8-10-му дню культивирования достигнуты максимальные значения активности циклизующего фермента - 250-315 Е/л, причем контрольные среды содержали ЦГТ-азу в пределах 170-240 Е/л (большая разница в контрольных значениях связана с применением ваты в количестве 0,5 г - активность фермента была тогда значительно выше) (см. таблицу I). Результаты определения динамики активности ЦГТ-азы в питательной среде, содержащей трис-буфер, приведены на рисунке 5.

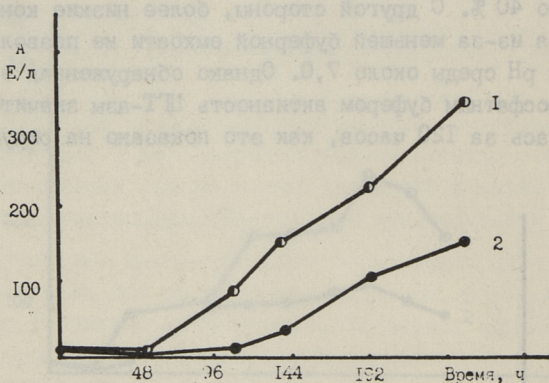


Рис. 5. Динамика образования ЦГТ-азы в культуральной жидкости *V. masegans* ВКМВ-506. Для поддержания рН использовали 0,1 М трис-НСI буфер. В опыте 1 присутствовала мочевины (0,45 %). Достоверность эффекта 0,99.

При выращивании продуцента ЦГТ-азы *V. masegans* в щелочной среде (рН среды регулировали с помощью 1,0 М NaOH-глицинового буфера) лишь в одном случае, в присутствии дополнительного источника азота - мочевины, отмечена удовлетворительная активность фермента - 165 Е/л (см. рис. 6). Необходимо отметить и то обстоятельство, что при выращивании культуры *V. masegans* в среде с рН выше 7,2 в

Т а б л и ц а I

Активность ЦТ-азы в культурах бацилл, выращенных при различных условиях

№ опыта	Характеристика культуральной жидкости при достижении максимальной активности ЦТ-азы				Содержание различных компонентов в питательной среде							
	A _{макс} , Е/л	pH	возраст культуры в часах	кол-во инокулята	мелко нарезанный картофель	тертый картофель	мел	трис-НСI буфер	сульфат аммония	моче-вина	вата	биотин
1	162	7,12	192	10	+	-	+	-	-	-	-	-
2	217	7,99	192	10	+	-	+	-	+(2%)	-	-	-
3	240	6,31	216	10	+	-	+	-	-	-	+	-
4	263	7,76	192	10	+	-	+	-	-	-	-	-
5	274	7,59	192	10	+	-	+	-	-	-	+	-
6	275	6,90	120	10	-	+	+	-	+(1%)	-	-	+
7	303	6,80	216	10	-	+	+	-	+(1%)	-	-	-
8	315	6,28	216	10	+	-	-	+	-	+	+	-
9	325	7,15	168	10	+	-	+	-	-	+	+	-
10	350	7,14	216	10	+	-	+	-	-	+	+	-

течение всего периода культивирования клетки бацилл измеряемых количеств ЦТ-азы не продуцировали. Отмечено также не накопление ЦД в большей концентрации по сравнению с контролем (соответственно выше 3,0 мг/мл и 1,2-2,2 мг/мл), причем высокое содержание ЦД в культуральной жидкости наблюдалось вплоть до 5-6-го дня культивирования.

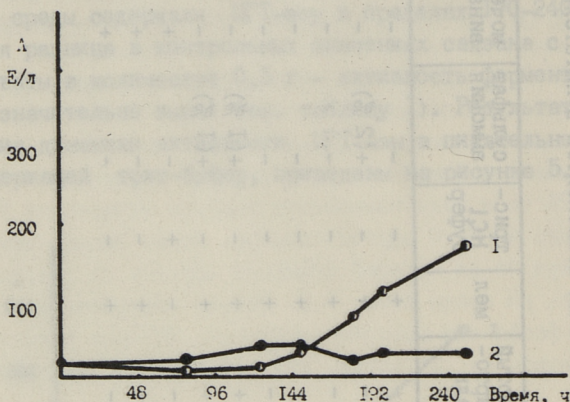


Рис. 6. Динамика образования ЦТ-азы в культуральной жидкости *V. macerans* ВКМВ-506. Для поддержания рН использовали 0,1 М NaOH + глициновый буфер. В опыте 1 присутствовала мочеви́на (0,45 %). Достоверность эффекта 0,99.

По-видимому, для продуцента ЦТ-азы *V. macerans* ВКМВ-506 как мел, так и низкие концентрации буферов необходимы для поддержания рН в определенных пределах. Оказалось, что для продуцирования ЦТ-азы культурой *V. macerans* характерно изначальное падение рН культуры до конца логарифмического роста и оно может составлять до 1,3-2,0 единиц (см. рис. 1). Вероятно, в этом периоде синтезируется и первое количество ЦТ-азы, которое нам обнаружить почти не удавалось. Отсутствие какого-либо агента для поддержания рН может приводить к значениям рН культуры 3,8-4,5 и клетки переходят к споруляции. Наступающее в стационарной фазе роста увеличение рН культуры совпадает с повышенным синтезом ЦТ-азы.

Источники углерода для выращивания продуцента ЦТ-азы.

Так как предварительные опыты по изучению различных источников углерода показали, что для продуцирования ЦТ-азы клетками *B. macerans* необходим крахмалсодержащий компонент, в настоящей работе исследовали действие мелконарезанного и тертого картофеля, картофельного отвара и картофельного крахмала, а также глюкозы как добавочного компонента к основной среде на синтез фермента. Опыты с крахмалом не дали положительного эффекта, также не стимулировало синтез ЦТ-азы добавление к среде глюкозы в количестве до 2 %. Вероятно, при выращивании бактерий на крахмалсодержащей среде имеет место глюкозный эффект, когда биосинтез фермента репрессируется глюкозой. Можно предположить, что подробную катаболитную репрессию вызывают и другие легкометаболизируемые источники углерода.

Высокие активности ЦТ-азы были обнаружены в культурах, выращенных на средах, содержащих картофель. Если на средах с мелко нарезанным картофелем с добавлением 1 % сульфата аммония в качестве дополнительного источника азота активность ЦТ-азы в культуральной жидкости *B. macerans* была 150 Е/л, то с тертым картофелем в тех же условиях выращенные культуры давали значения активности циклизующего фермента до 264 Е/л. Необходимо отметить, что активность ЦТ-азы контрольной культуры была в случае питательной среды с тертым картофелем достигнута через 96 часов культивирования (см. рис. 7). Значительно ниже оказалась ферментативная активность в опытах с картофельным отваром. По-видимому, в картофеле содержится определенный фактор, ответственный за индукцию синтеза ЦТ-азы в клетках *B. macerans*, о чем сообщили и ранее [17, 18].

Нужно обратить внимание на некоторую сложность приготовления питательных сред с тертым картофелем, так как их подготовка к стерилизации по сравнению с мелко нарезанным картофелем требует больше времени.

Дополнительные источники азота. Действие сульфата аммония оказалось положительным - стимулирующим синтез ЦТ-азы в концентрации до 2 % от питательной среды. Такой источник азота является экономически оправданной заменой до-

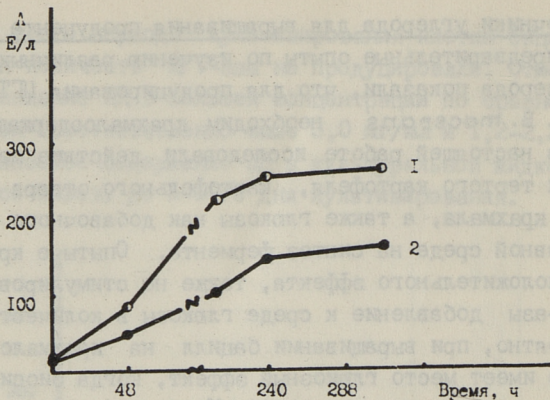


Рис. 7. Динамика образования ЦГТ-азы в культуральной жидкости *V. paspali* ВКМВ-506, выращенной на среде с тертым картофелем (15 %, опыт 1) или с мелко нарезанным картофелем (15 %, опыт 2) в присутствии мела (1,5 %), сульфата аммония (2 %) и ваты (0,5 г/100 мл среды). Достоверность эффекта 0,99.

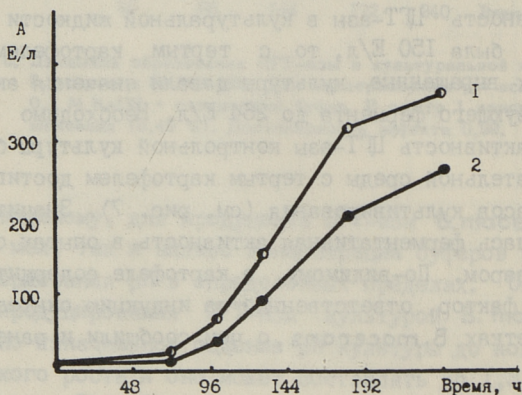


Рис. 8. Динамика образования ЦГТ-азы в культуральной жидкости *V. paspali* ВКМВ-506 в присутствии ваты (0,5 г/100 мл среды). В опыте 1 присутствовала мочевиная (0,45 %). Достоверность эффекта 0,99.

рогостоящих органических азотсодержащих компонентов, как пептон, дрожжевой гидролизат и др. и представляет собой от-

личительный признак при выращивании бацилл-продуцентов ЦТ-азы по сравнению с условиями культивирования алкалофильных штаммов. Японские авторы сообщили об отсутствии положительного эффекта неорганических источников азота, а также мочевины на продуцирование ЦТ-азы культурой *Bacillus* sp. [19].

Мочевину применяли в опытах в различных вариациях в концентрации до 0,45 % от питательной среды. На рисунке 8 представлены результаты, отражающие максимально достигнутые нами значения активности ЦТ-азы в культуральной жидкости бацилл - до 350 Е/л. Среда культивирования содержала кроме мелко нарезанного картофеля, мела и мочевины вату. Как видно из рисунка, активность ЦТ-азы превышала значение активности в контрольной культуре на 45 %. На основании проведенных опытов с мочевиной нужно отметить, что для получения стабильной активности ЦТ-азы в культуральной жидкости бацилл этот компонент необходим.

Биотин хотя и стимулировал как рост, так и синтез ЦТ-азы в культуральную жидкость, но активность фермента в опытах с биотином значительно уступала максимальной достигнутой нами активности циклизующего фермента в опытах с мочевиной.

Несомненно, для оптимизации условий культивирования микроорганизмов необходимо провести целый ряд экспериментов по методу дробного факторного эксперимента, являющегося весьма трудоемким процессом при уточнении как концентраций всех компонентов питательной среды, так и физико-химических условий культивирования.

Преимуществом метода полного факторного эксперимента как первой стадии при оптимизации можно отметить получение исходной информации для составления достаточно эффективных питательных сред не только по отдельным факторам, но и по их взаимозависимости в тех концентрационных пределах, которые были выбраны для опытов.

Как видно из таблицы I, путем уточнения факторов для выращивания бацилл-продуцентов ЦТ-азы удалось повысить активность фермента в культуральной жидкости около 2 раз, что значительно сокращает затраты на синтез ЦД при промышленном производстве.

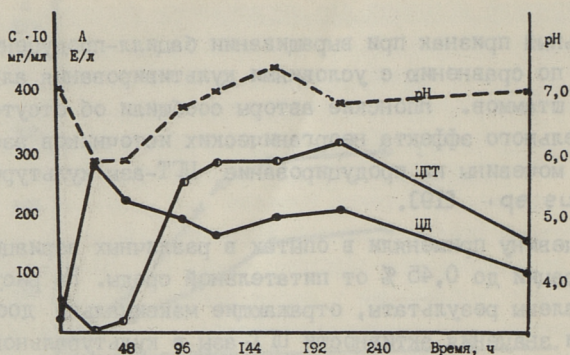


Рис. 9. Динамика образования ЦГТ-азы, содержания ЦД и изменения pH в культуральной жидкости *B. macerans* ВКМВ-506, выращенной при 37 °С без аэрации и перемешивания в питательной среде следующего состава: 15 % тертого картофеля, 1 % сульфата аммония, 1,5 % мела в водопроводной воде.

Суммируя полученные экспериментальные результаты по различным факторам, влияющим на синтез ЦГТ-азы клетками *B. macerans* ВКМВ-506, нами проведены контрольные опыты с питательными средами, составленными на основании математической обработки данных. На рисунке 9 приведена динамика активности ЦГТ-азы, содержания ЦД и изменения pH культуральной жидкости бацилл в течение длительного периода культивирования - 12 дней.

Как видно из рисунка, значительная активность ЦГТ-азы появилась в среде уже через 72 часа культивирования (176 Е/л), а далее была на достаточно высоком уровне в течение следующих 196 часов. Максимальная активность ЦГТ-азы была обнаружена в культуральной жидкости за 216 часов культивирования - 303 Е/л. Остается невыясненной причина столь высокого содержания ЦД в культуральной жидкости до конца срока наблюдения.

Л и т е р а т у р а

1. K i t a h a t a S., O k a d a S. Comparison of action of cyclodextrin glucosyltransferase from *Bacillus megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus* and *B. macerans* // *J. Jap. Soc. Starch Sci.* 1982. Vol. 29, N 1. P. 13-18.

2. Y a g i T., S a t o M., I s h i k u r a T. Comparative studies of CGTases from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those CGTases // *J. Jap. Soc. Starch Sci.* 1986. Vol. 33, N 2. P. 144-151.

3. K i t a h a t a S., O k a d a S. Action of cyclodextrin glucosyltransferase from *Bacillus megaterium* strain N 5 on starch // *Agr. Biol. Chem.* 1974. Vol. 38, N 12. P. 2413-2417.

4. К а т о Т., Н о р и к о с х и К. Cloning and expression of the *Bacillus subtilis* N 313 γ -cyclodextrin forming CGTase gene in *Escherichia coli* // *Agr. Biol. Chem.* 1986. Vol. 50, N 11. P. 2161-2162.

5. П а л ь м Т.Б., В о к к Р.А., П е й п м а н Э.М., К ё с т н е р А.И. Изучение динамики биосинтеза глюкозотрансферазного комплекса *Bacillus macerans* // *Тр. Таллинск. политехн. ин-та.* 1987. № 633. С. 41-48.

6. В о к к Р.А., П е й п м а н Э.М. Биосинтез циклодекстринглюкозотрансферазы различными штаммами *Bacillus macerans* // *Тр. Таллинск. политехн. ин-та.* 1988. № 663. С. 58-65.

7. К р о с и н г В.А. Предварительная обработка крахмала как сырья для синтеза циклодекстринов // *Тр. Таллинск. политехн. ин-та.* 1987. № 633. С. 35-40.

8. В о к к Р.А., П е й п м а н Э.М., К р о с и н г В.А. Применение ферментного препарата циклодекстринглюкозотрансферазы для получения β -циклодекстрина // *Тр. Таллинск. политехн. ин-та.* 1988. № 663. С. 66-75.

9. T i l d e n E.B., H u d s o n C.S. Conversion of starch to crystalline dextrins by the action of a new type of amylase separated from cultures of *Aerobacillus*

macerans // J. Am. Chem. Soc. 1939. Vol. 61. P. 2900-2902.

10. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193, N 2. P. 265-275.

11. Vikmon M. Rapid and simple spectrophotometric method for determination of microamounts of cyclodextrins // J. Int. Symp. on Cyclodextrins. Budapest. 1981. P.69-74.

12. F u w a H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate // J. Biochem. 1954. Vol. 41, N 5. P. 583-603.

13. Кёстнер А.И., Вокк Р.А., Паппель К.Э., Пейпман Э.М. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикл. биохим. и микробиол. 1989. Т. 25. № 3. С. 425-430.

14. Паппель К.Э., Вокк Р.А. Выделение и основные свойства циклодекстринглюканотрансферазы // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1987. № 633. С. 76-82.

15. Егоров Н.С. Метаболизм микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ. 1986. 256 с.

16. B e n d e r H. Cyclodextrin-glycanotransferase von *Klebsiella pneumonia*. 1. Synthese, Reinigung und Eigenschaften des Enzym von *K. pneumonia* M 5 al. // Arch. Mikrobiol. 1977. Vol. 3. P. 271-182.

17. L a n e A.G., P i r t S.J. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by *Bacillus macerans* in batch cultures // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1971. Vol. 21, N 11. P. 330-334.

18. L a n e A.G., P i r t S.J. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by batch and chemostat culture of *Bacillus macerans* in chemically defined medium // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1973. Vol. 23, N 10. P. 309-321.

19. N a k a m u r a N., H o r i k o s h i K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. // Agr. Biol. Chem. 1976. Vol. 40, N 4. P. 753-757.

R. Vokk, J. Steighardt

Bacillus macerans'i fermentkompleksi iseloomustus
ja selle kasutamine tsüklodekstriinide saamiseks VI

Tsükliseeriva fermendi produtsendi B. macerans'i
kultiveerimistingimuste täpsustamine

Kokkuvõte

Uuriti nii batsillide kasvuks vajalike lämmastiku- ja süsinikuallikatena kasutatud keemiliste lisandite (ammooniumsulfaat, karbamiid, glükoos, biotiin) toimet kui ka kultiveerimise erinevaid füüsikalisi parameetreid eesmärgiga tõsta B. macerans'i CGTaasi produktsiooni. Esitatakse hinnang erinevate füüsikalise-keemiliste kasvufaktorite efektiivsuse kohta. Katseandmete põhjal esitatakse parandatud söötme koostis.

R. Vokk, J. Steighardt

Characterization and Application of Enzyme Complex
from Bacillus macerans for Obtaining Cyclodextrins VI

Specification of Growth Conditions for Cyclizing
Enzyme Producing Bacillus macerans Strain

Abstract

Several chemical additional compounds like ammonium sulphate, urea, glucose, biotin that had served as carbon or nitrogen sources for bacilli, as well as different physical parametres of cultivation were investigated in order to enhance CGTase production by B. macerans. Estimation of the efficiency of the above mentioned factors is presented. On the basis of the data of these experiments an improved medium content is suggested.

Э. Пейпман, К. Ванаталу

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА *Bacillus macerans* и ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

УП. Изучение роста *Bacillus macerans* и биосинтеза ЦТ-азы

Введение

ЦТ-аза - циклодекстринглюканотрансфераза (КФ.2.4.1.19; ЦТ-аза) - способна из крахмала или аналогичных субстратов образовывать как циклические декстрины, так и перестраивать линейную структуру мальтодекстринов без циклизации.

В изучение биосинтеза ЦТ-азы *Bacillus macerans* вложили свой вклад многие ученые [1-6]. Тем не менее есть некоторые аспекты, не находящие отражения в вышеприведенных работах. Цель нашей работы - выяснить закономерности синтеза ЦТ-азы при культивации *B. macerans* и найти объяснения на некоторые интересные аспекты, например, изменение рН при культивации, связь между ростом культуры, потреблением субстрата, выделением продуктов метаболизма и синтезом фермента и др.

Материалы и методы

В работе использовалась культура *B. macerans* штамм ВКМ В506. Культура сохранялась в питательной среде с ломтиками картофеля. Опыты проводились на среде Лайн-Пирта [3], содержащего в качестве источника углерода растворимый крахмал 2 % и мальтозу 0,5 %, в ферментаторе "Ultoferm-Biotec" (рабочий объем 3 л) с аэрацией и перемешиванием

150 об/мин, рН поддерживалась с титрантами (2N NaOH и 2N H₂SO₄) на уровне 7,0.

Из свежих проб измеряли сухой вес биомассы, оптическую плотность при 540 нм и считали число клеток на "Coulter-Counter". Центрифугированную культуральную жидкость (ЦЖ) замораживали и анализировали через несколько дней. Из части ЦЖ осаждали с этанолом олигосахариды и подвергали анализу с помощью ВЭЖХ (колонка НРХ 87Н, скорость элюции 0,6 мл/мин; элюент: 0,009 N H₂SO₄, поглощение при 206 нм + рефрактометр). Общее количество углеводов в ЦЖ измеряли антроновым реактивом [6]. Редуцирующие углеводы измеряли комплексометрически [7]. Количество ионов аммония измерялось по методу Несслера. Общий белок - по методу Лоури [8]. ЦТ-азная активность измерялась с помощью фенолфталеинового метода [9], амилазную активность по методу Матзузавы [10]. Выращивание продолжалось трое суток. Опыты были проведены в лаборатории молекулярной биологии Института хим. и биол. физики АН Эстонии.

Результаты и обсуждение

Результаты представлены на рисунках I - 7. Рост культуры (рис. I) можно разделить на следующие фазы:

- 0-8 ч. - фаза первого активного роста,
- 8 - 10 ч. - фаза переключения,
- 10-24 ч. - фаза второго активного роста,
- 24-55 ч. - стационарная фаза,
- 55-70 ч. - фаза отмирания и споруляции.

На первой фазе предполагается рост на мальтозе (рис. 2). Сухой вес биомассы достигает 0,6 г/л и число клеток $2 \cdot 10^8 \text{ мл}^{-1}$. В среде проявляется амилазная активность (рис. 3), которая сопровождает рост культуры. На 8-10 ч. рост переключается на другой субстрат - на крахмал. Под действием амилазы крахмал расщепляется и в среде повышается концентрация редуцирующих сахаров. В это же время начинается потребление источника азота и потребление щелочного титранта (рис. 5). С 10 до 24 ч. происходит второй активный рост на продуктах гидролиза крахмала. Интенсивно повышается расход

кислорода и выделение углекислого газа (рис. 6). Начинается секреция кислотных продуктов метаболизма (рис. 7). Главным продуктом является ацетат, концентрация которого к 55 часу достигает 30 мкмоль/мл. Синтезируемые пируват и фор-

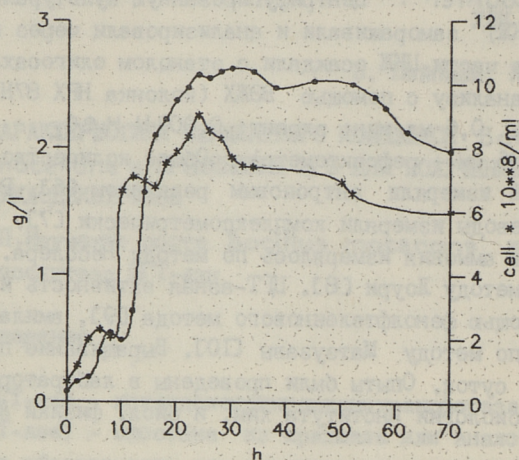


Рис. 1. Кривая роста:

* сухой вес биомассы, г/л,
o число клеток/мл.

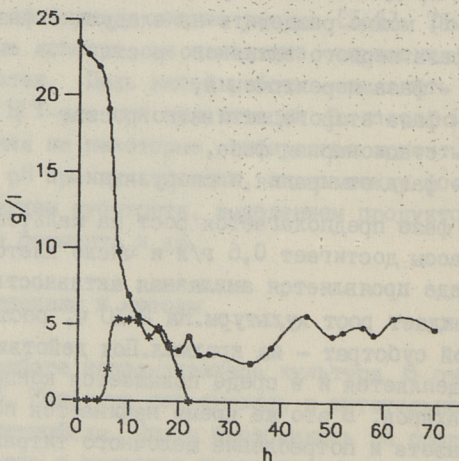


Рис. 2. Потребление углеродного субстрата:

o общие углеводы, г/л,
* редуцирующие сахара, г/л.

миат потребляются к концу опыта, но лактат остается в среде. К 24 часу достигается стационарная фаза. Выход сухого веса биомассы 2,3 г/л. Первичные источники углерода и азота потреблены; субстратами являются продукты метаболизма. Начинается споруляция и выход ЦГТ-азной активности

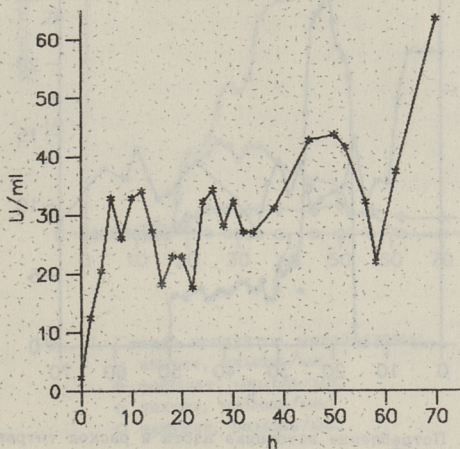


Рис. 3. Синтез амилазы.

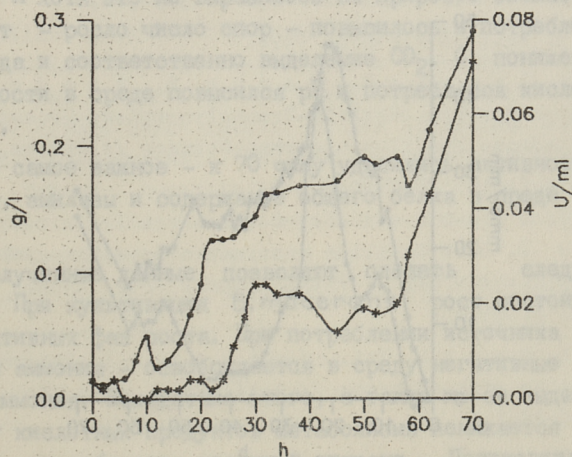


Рис. 4. Синтез ЦГТ-азы и белка:
* активность ЦГТ-азы, Е/мл,
о белок, г/л.

в среду (рис. 4). Но конец стационарной фазы нельзя считать концом опытов. Выяснилось, что с 55 часов, когда в среде потреблены почти все источники, стал потребляться



Рис. 5. Потребление источника азота и расход титранта:
 о NH_4 , г/л,
 * титрант, ммоль (2N NaOH).

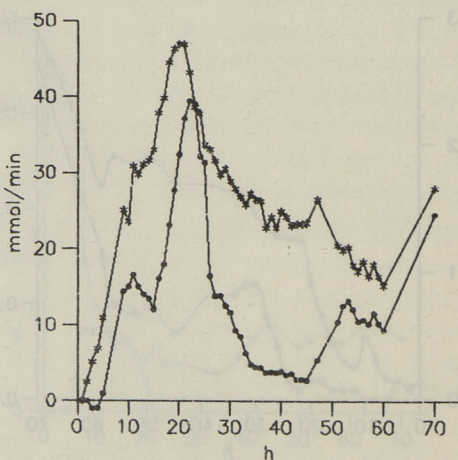


Рис. 6. Скорость потребления кислорода и выделения CO_2 :
 * O_2 , ммоль/мин,
 о CO_2 , ммоль/мин.

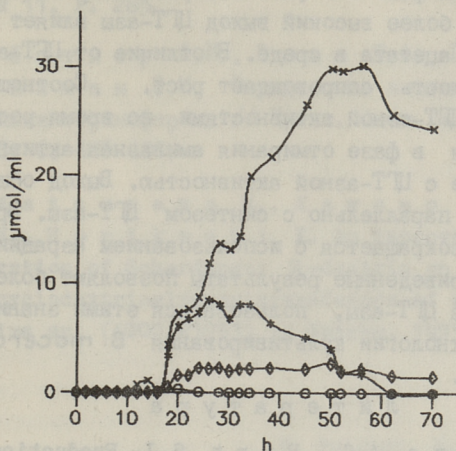


Рис. 7. Синтез продуктов метаболизма:

- x ацетат, мкмоль/мл,
- * формиат, мкмоль/мл,
- ◇ лактат, мкмоль/мл,
- пируват, мкмоль/мл.

ацетат. И хотя это не выразилось на приросте биомассы, а наоборот – росло число спор – повысилось и потребление кислорода и соответственно выделение CO_2 . С понижением кислотности в среде повысился рН и потреблялся кислотный титрант.

Но самое важное – к 70 часу удвоились активности ЦГТ-азы, амилазы и содержание общего белка в среде (рис. 3, 4).

Полученные данные позволяют сделать следующие выводы. При культивации *V. macerans* рост состоит из двух активных фаз роста. При потреблении источника азота – ионов аммония – освобождаются в среду негативные ионы солей аммония. Вследствие этого, а также из-за выделения в среду кислотных продуктов метаболизма понижается рН среды и потребляется щелочный титрант. Подтвердилось, что ЦГТ-аза синтезируется в среду после расщепления крахмала и потребления редуцирующих сахаров, двухступенно

в стационарной фазе и в фазе отмирания параллельно со споруляцией. На более высокий выход ЦГТ-азы влияет уменьшение концентрации ацетата в среде. В отличие от ЦГТ-азы амилазную активность сопровождает рост. Соотношение между амилазной и ЦГТ-азной активностями во время роста не одинаковое, хотя в фазе отмирания амилазная активность повышается вместе с ЦГТ-азной активностью. Выход общего белка в среду идет параллельно с синтезом ЦГТ-азы. Время синтеза ЦГТ-азы сокращается с использованием аэрации и перемешиванием. Приведенные результаты позволяют более подробно понять синтез ЦГТ-азы, пользоваться этими знаниями при выработке технологии культивирования *B. macerans* и синтеза ЦГТ-азы.

Л и т е р а т у р а

1. Lane A.G., Pirt S.J. Production of cyclodextrin-glycosyltransferase by *Bacillus macerans* in batch cultures // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1971. Vol. 21, N 11. P. 330-334.
2. Lane A.G., Pirt S.J. Production of cyclodextrin-glycosyltransferase by batch and chemostat culture of *Bacillus macerans* in chemically defined medium // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1973. Vol. 23. P. 309-321.
3. Pat. GB 2361878. 1972.
4. Laszlo E., Banky B., Sejtli J. Vergleich der Cyclodextrin-Transglycosylase-Erzeugung bei verschiedenen *Bacillus macerans*-Stämmen // Stärke. 1980. Vol. 32, N 1. S. 27-29.
5. Hrabova H., Gottvaldova M., Kucera J. Růst *Bacillus macerans* a produkce cyclodextrin-glycosyltransferasy // Potravinářski Vedy. Praha. 1988. Vol. 6, N 2. P. 81-85.
6. Scott T.A., Melvin E.H. Determination of dextran with anthrone // Anal. Chem. 1953. Vol. 25, N 11. P. 1656-1661.
7. Tegge G., Nierle W. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierenden Zucker in Stärkehydrolysaten // Stärke. 1965. Vol. 17, N 4. S. 107-110.

8. Lowrey D.H. et. al. // J. Biol. Chem. 1953. Vol. 25, N 11. P. 265.

9. Кёстнер А.И., Вокк Р.А., Паппель К.Э., Пейпман Э.М. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикл. биох. и микроб. 1989. Т. 25. № 3. С. 425-430.

10. Matzuzawa M., Kawano M., Nakamura N., Horikoshi K. An improved method for the preparation of Schardinger β -dextrin on an industrial scale by cyclodextringlycosyltransferase of an alkalophilic Bacillus sp. (ATCC 21783) // Stärke. 1975. N 12. S. 410-413.

E. Peipman, K. Vanatalu

Bacillus macerans'i fermentkompleksi iseloomustus ja selle kasutamine tsüklodekstriinide saamiseks VII

Bacillus macerans'i kasv ja tsüklodekstringlükano-transferaasi süntees

Kokkuvõte

Bacillus macerans'i kasvatati perioodilise kultuurina fermentaatoris mineraalsöötmele (Lane & Pirt), substraadiks 2 % lahustuvat tärklist ja 0,5 % maltoosi. Logaritmiline kasv (0 - 24 t) toimus kahes faasis. CGTaas ja amülaas sünteesiti keskkonda kaheastmeliselt: amülaas - esimeses aktiivses kasvufaasis, CGTaas - logaritmilise kasvufaasi lõpus ja statsionaarses faasis; teist korda sünteesiti mõlemaid ensüüme paralleelselt sporulatsiooniga.

Metabolismiprodukte (peamiselt atsetaati) sünteesiti keskkonda pärast redutseerivate suhkrute tarbimist teises aktiivses kasvufaasis ning tarbiti 55 tunni möödudes, millega kaasnes pH tõus ja hingamiskiiruse järsk lang. Samaaegselt toimus CGTaasi süntees keskkonda.

Characterization and Application of Enzyme Complex
from Bacillus macerans for Obtaining Cyclodextrins VII

The Growth of Bacillus macerans and the Production
of Cyclodextrin Glucanotransferase

Abstract

Bacillus macerans was grown as a batch culture in the fermenter in a defined mineral medium (Lane & Pirt). The growth substrates were starch (2 %) and maltose (0,5 %). The logarithmic growth (0 - 24 h) had two phases. The cyclodextrin glucanotransferase (CGT) activity appeared on the 24th h of growth after depletion of the reducing sugars in the medium and the second increase of CGT activity was on the 55th h parallel to the sporulation of cells. Amylase is synthesized mainly during the first stage of active growth and also after the 55th hour. The ratio of amylase and CGT activities varied during the cultivation. The production of metabolic by-products (mainly acetate) started after the reducing sugars were utilized and they served as substrates during the rise of metabolic activity (increase of respiration rate) after the 55th h of growth. It was shown that the first start of CGT synthesis coincides with the stop of titration and steep decrease of respiration rate.

ОЧИСТКА ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ МЕТОДОМ
СОРБЦИИ НА КРАХМАЛЕ

Для выделения и очистки циклодекстринглюканотрансферазы (ЦТ-азы) из различных источников наряду с осаждением органическими сольвентами, сульфатом аммония и ионообменной хроматографией все больше применяется метод сорбции на крахмале. Сорбция фермента проводится как на немодифицированном крахмале [1, 2], так и на его различных модификациях [3, 4]. Эффективность процесса повышается в присутствии $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ [1, 5] или этанола [2]. Десорбция фермента проводится дистиллированной водой в интервале температур от 10 до 50 °С [2, 3], раствором мальтозы [5] и хлористого натрия [5], или раствором сульфата аммония [1, 4]. Сорбция фермента на крахмале применяется как на первых стадиях очистки [2, 5], так и на последних [1].

Целью настоящей работы являлись изучение возможностей очистки вышеописанным методом ЦТ-азы из культуральной жидкости *V. masepans* ВКМВ-506 и характеристика полученного препарата.

Материалы и методы

Работа проводилась с культуральной жидкостью *V. masepans* ВКМВ-506, полученной при выращивании на питательной среде, содержащей мелко нарезанный картофель [10].

ЦТ-азная активность фермента определялась по начальной скорости синтеза β -циклодекстрина из растворимого крахмала. Концентрация циклодекстрина определялась по снижению оптической плотности раствора фенолфталеина, образующего с ним комплекс [6].

Амиллазная активность ферментных препаратов определялась по начальной скорости гидролиза 1% раствора крахмала при pH среды 6,5. Содержание образовавшихся редуцирующих веществ определялось йодометрическим методом [7].

Концентрация белка в ферментных растворах определялась спектрофотометрически при 280 нм на спектрофотометре VSU-2P.

Культуральная жидкость отделялась от биомассы центрифугированием на центрифуге Janetzki K-24 при 7000 об/мин.

Адсорбция фермента на крахмале осуществлялась при pH среды от 6,5 до 8,5 и при температуре ниже 4 °С. Крахмал добавляли к раствору фермента при непрерывном перемешивании механической мешалкой. Сорбент отделяли от раствора центрифугированием при 3000 об/мин и промывали дистиллированной водой или 10% раствором этанола. Десорбция ЦГТ-азы проводилась трехкратной обработкой препарата в течение 20 минут дистиллированной водой при комнатной температуре или 0,1 М раствором мальтозы в 0,05 М фосфатном буфере с pH - 7,5 при 50 °С.

Дезинтегрирование крахмала проводилось на лабораторной дезинтеграторной установке типа IA22 при скоростях вращения роторов от 6000 до 14000 об/мин в НПО "Дезинтегратор".

Синтез циклодекстринов из растворимого крахмала ($[5]_0 = 3\%$) осуществлялся в термостатируемом реакторе с механической мешалкой при 40 °С и pH 7,5. Реакция проводилась в присутствии комплексообразователя. В качестве последнего применялся толуол, при концентрации 0,5 % или этанол при концентрации 20 %. Ход реакции оценивали по концентрации β -циклодекстрина (β -ЦД) и редуцирующих веществ в реакционной смеси. Для этого из реактора в определенное время брали пробы, где содержание β -ЦД определяли с помощью фенолфталеина [6], а содержание редуцирующих сахаров комплексометрическим методом [8]. В некоторых опытах определялась также соотношение α - и β -ЦД с использованием гель-фильтрации на колонке Toyoparl HW-40-F: общий объем колонки - 64,5 мл, элюент - 0,02 % раствор NaN_3 в H_2O , скорость элюирования 0,4 мл/мин, объем пробы = 1 мл содержание циклодекстрина в исследуемой пробе 1-5 мг. Детек-

тирование проводилось с помощью рефрактометра фирмы Du Pont-Company. Концентрация циклодекстрина вычислялась по величине площади пика на хроматограмме.

Результаты и обсуждение

Прежде всего изучали сорбцию фермента на разных крахмалах в присутствии и в отсутствии этанола. Применение этанола [9], позволяет повысить селективность сорбции ЦТ-азы по сравнению с другими белками. Кроме того, он легко отделяется после сорбции.

Сравнение сорбции ЦТ-азы на картофельном и кукурузном крахмале показало, что наивысшая степень очистки фермента достигается в случае применения картофельного крахмала (таблица 1). При добавлении перед сорбцией 10 % этанола в исходный раствор удельная активность фермента повышается в два раза по сравнению с сорбцией на картофельном крахмале при отсутствии органического растворителя. Выход ЦТ-азной активности повышается в 3 раза (табл. 1, опыт 1, 2). Дальнейшее повышение концентрации этанола в растворе до 30 % не увеличивает эффективности очистки и, в те же время, уменьшает выход активности. Исходя из этого, дальнейшие опыты по сорбции фермента проведены на картофельном крахмале в присутствии 10 % этанола.

Исследование очистки ЦТ-азы сорбцией на крахмале при разных pH показало (рис. 1), что при увеличении значения pH исходной жидкости от 6,0 до 7,7 степень очистки фермента повышается почти в 3 раза, но несколько уменьшается выход активности при десорбции.

Можно предполагать, что увеличение pH уменьшает неспецифическую сорбцию белков на крахмале.

Исследование влияния температуры десорбции на эффективность процесса показало, что повышение температуры от 20 до 50 °C ускоряет процесс десорбции и увеличивает выход активности фермента. Сравнение эффективности применения разных десорбирующих элементов при этой температуре показало (табл. 2), что элюция раствором мальтозы увеличивает выход активности лишь на 7,5 %. Добавление хлористого натрия увеличивает удельную активность десорбированного белка, но уменьшает выход активности.

Т а б л и ц а I

Сорбция ЦГТ-азы на крахмале в присутствии этанола и без него

Крахмал	Исходный раствор		Адсорбировалось		Десорбировалось		Коэфф. хх очистки
	А, Е/мл	А _{уд} , Е/мг	А, %	белок, %	А ^х , %	белок ^х , %	
1. Картофельный крахмал	7,7	0,024	96,1	24,9	12,8	2,50	4,3
2. Картофельный крахмал + этанол	7,7	0,024	96,1	9,91	40,8	3,51	8,1
3. Кукурузный крахмал этанол	7,7	0,024	95,0	8,41	38,5	4,21	6,5

х выход активности и белка в процентах от исходного уровня

хх повышение удельной активности, кратность

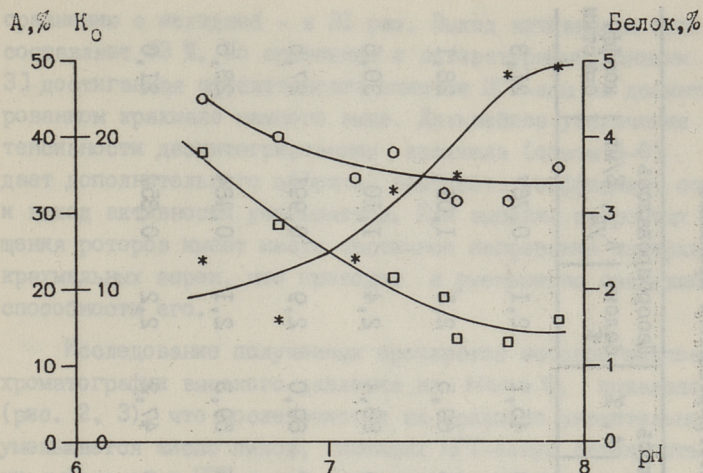


Рис. 1. Очистка ЦГТ-азы на крахмале при разных рН:
 ○ - выход активности при десорбции от исходной, %;
 □ - выход белка при десорбции от исходной, %;
 * - коэффициент очистки.

Т а б л и ц а 2

Десорбция ЦГТ-азы различными элюентами

Элюент	Десорбат	
	А, %	А _{уд} , Е/мг
1. 0,05 М фосфатный буфер рН 7,5	40,0	0,38
2. 0,1 М раствор мальтозы в том же буфере	47,5	0,39
3. 0,4 М раствор в том же буфере	27,8	0,49
4. 0,1 М раствор мальтозы с 0,4 М NaCl в том же буфере	33,7	0,55

Активация и увеличение поверхности крахмала путем дезинтегрирования его дает возможность еще повысить эффективность очистки фермента (табл. 3). Предварительная обработка крахмала в дезинтеграторе при скорости вращения роторов 8000 об/мин и скорости дозировки 1,7 кг/ч повышает выход активности десорбции ЦГТ-азы на 38 % (опыт 1 и 3). Степень очистки фермента увеличивается в 1,4 раза, а по

Т а б л и ц а 3

Очистка культуральной жидкости В. т.ас. на дезинтегрированном крахмале

Крахмал	Исходный раствор		Адсорбировалось		Десорбировалось		коэфф. очистки		
	кол-во А, мл	А, Е/мл	А, %	белок, %	белок, А, %	А, Е/мг			
1. Нативный	72	0,120	0,036	81,0	7,58	45,1	2,1	0,767	21,3
2. Дезинтегрированный при 6000 об/мин	72	0,120	0,036	92,6	3,66	69,5	2,5	1,01	28,1
3. Дезинтегрированный при 8000 об/мин	72	0,120	0,036	88,8	2,55	83,4	2,4	1,10	30,6
4. Дезинтегрированный при 10 000 об/мин	72	0,120	0,036	89,4	2,97	89,0	2,9	0,991	27,5
5. Дезинтегрированный при 12 000 об/мин	79	0,100	0,017	61,4	6,76	59,3	2,1	0,484	28,5
6. Дезинтегрированный при 14 000 об/мин	79	0,100	0,017	48,7	16,50	47,2	2,2	0,357	21,0

сравнению с исходной - в 31 раз. Выход активности при этом составляет 83 %. По сравнению с литературными данными [2, 3] достигаемая эффективность очистки ЦГТ-азы на дезинтегрированном крахмале намного выше. Дальнейшее увеличение интенсивности дезинтегрирования крахмала (опыты 4-6) не дает дополнительного эффекта, наоборот, коэффициент очистки и выход активности уменьшается. При высоких скоростях вращения роторов имеет место частичное нагревание поверхности крахмальных зерен, что приводит к уменьшению связывающей способности его.

Исследование полученных препаратов методом жидкостной хроматографии высокого давления на Mono Q, показало (рис. 2, 3), что после очистки на крахмале значительно уменьшается число пиков, имеющих ЦГТ-азную активность. Пики амилазной и ЦГТ-азной активностей очищенного препарата совпадают, соотношение амилазной и циклодекстринглюканотрансферазной активностей в ходе очистки уменьшается более чем в 5 раз, т.е. во столько же повышается доброкачественность препарата.

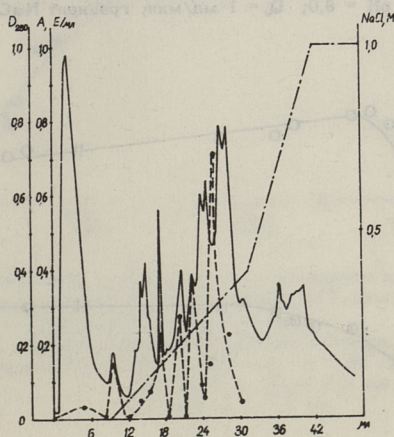


Рис. 2. ЖХВД культуральной жидкости *V. macerans* на Mono Q:

— оптическая плотность при $\lambda = 280$ нм,

--- ЦГТ-азная активность, E/мл,

— — — концентрация NaCl, M.

Условия опыта: колонка 0,5 x 5 см; $V_0 = 2$ мл;

0,02 M ТРИС-НСl буфер, pH = 8,0; $Q = 1$ мл/мин;

градиент NaCl 0→1M.

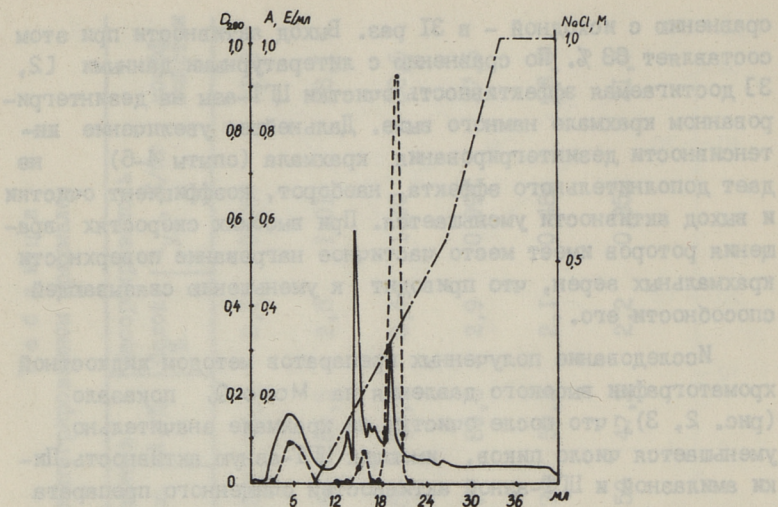


Рис. 3. ЖХВД очищенной на крахмале ЦГТ-азы *V. macerans* на Mono Q:

— оптическая плотность при $\lambda = 280$ нм;

- - - ЦГТ-азная активность, Е/мл;

- · - · - концентрация NaCl, М;

Условия опыта: колонка 0,5 x 5 см; $V_0 = 2$ мл; 0,02 М ТРИС-НСl буфер, pH = 8,0; $Q = 1$ мл/мин; градиент NaCl 0→1М.

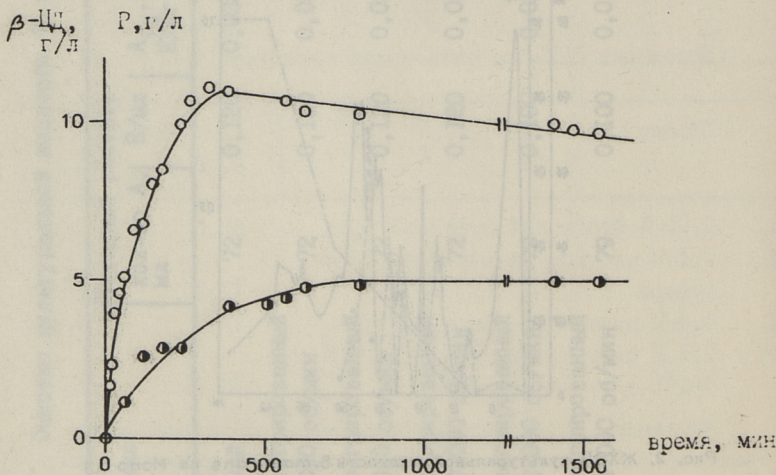


Рис. 4. Синтез циклодекстринов из растворимого крахмала неочищенным препаратом ЦГТ-азы:

○ - концентрация β -ЦД, г/л;

● - концентрация редуцирующих веществ, г/л.

Условия опыта $[S]_0 = 33,3$ г/л; $t = 40^\circ$, pH = 7,5;

$V_0 = 0,03$ л, $[E]_0 = 7$ Е на г крахмала, толуол - 1,5 мл.

Сравнение эффективности синтеза циклодекстринов из растворимого крахмала ($[S]_0 = 33,3$ г/л) неочищенным и очищенным на крахмале препаратом ЦТ-азы показало, что при синтезе β -ЦД неочищенным препаратом достигается степень конверсии субстрата в среднем 32,4% (рис. 4), т.е. содержание β -ЦД в реакционной смеси 10,8 г/л, а при синтезе очищенным ферментом - 48,2%, содержание β -ЦД - 16,0 г/л (рис. 5). Картина кривых прироста редуцирующих веществ в реакционной смеси похожа на картину кривых образования β -ЦД. Синтез β -ЦД в присутствии этанола не отличается от синтеза его в присутствии толуола.

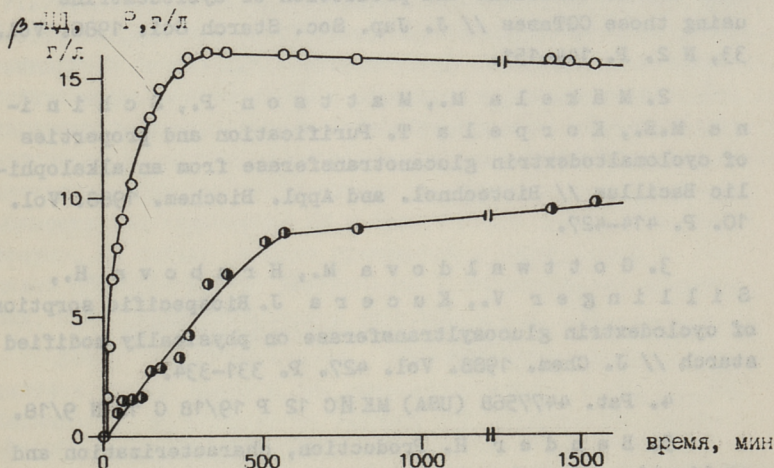


Рис. 5. Синтез циклодекстринов из растворимого крахмала очищенным на крахмале препаратом ЦТ-азы:

○ - концентрация β -ЦД, г/л,

● - концентрация редуцирующих веществ, г/л.

Условия опыта: $[S]_0 = 33,3$ г/л, $t = 40^\circ$, $pH = 7,5$;

$V_0 = 0,03$ л, $[E]_0 = 7$ Е на г крахмала, толуол - 1,5 мл.

Анализ реакционных смесей методом гельфильтрации на Тоургар! НВ-40 показал, что в присутствии комплексообразователей (толуол, этанол) при $pH 7,5$ преимущественно синтезируется β -ЦД.

При этом применение очищенных препаратов ЦГТ-азы ускоряет синтез β -ЦД: соотношение β -ЦД к α -ЦД повышается от 1,3 до 2,4.

Таким образом, путем очистки на крахмале получен высокоочищенный препарат ЦГТ-азы из культуральной жидкости *B. macerans* ВКМВ-506, позволяющий значительно повысить синтез β -ЦД.

Л и т е р а т у р а

1. Yagi Y., Sato M., Ishikura T. Comparative studies of CGTase from *B. obhensis*, *B. macerans* and *B. circulans* and production of cyclodextrins using those CGTases // J. Jap. Soc. Starch Sci. 1986. Vol. 33, N 2. P. 144-151.
2. Mäkelä M., Mattson P., Schinina M.E., Korpela T. Purification and properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from an alkalophilic *Bacillus* // Biotechnol. and Appl. Biochem. 1988. Vol. 10. P. 414-427.
3. Gottwaldova M., Hrabova H., Sillinger V., Kusera J. Biospecific sorption of cyclodextrin glucosyltransferase on physically modified starch // J. Chem. 1988. Vol. 427. P. 331-334.
4. Pat. 4477568 (USA) МКИС 12 P 19/18 C 12 N 9/18.
5. Bender H. Production, characterization and application of cyclodextrins // Adv. Biotechnol. Proc. 1986. Vol. 66. P. 31-71.
6. Кёстнер А.И., Вокк Р.А., Паппель К.Э., Пейпман Э.М. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Приклад. биохим. и микробиол. 1989. Т. XXV. С. 425-430.
7. Marciniak G.P., Kula M.R. Verdieichende Untersuchung der Methoden zur Bestimmung der Aktivität bakterieller alpha-Amylasen // Stärke. 1982. Vol. 34. Nr. 12. P. 422-430.
8. Tegge G., Nierle W. Eine neue Methode

zur Bestimmung reduzierenden Zucker in Stärkehydrolysa-
ten // Stärke. 1965. Nr. 4. P. 107-110.

9. Pat. 388 738 (USA) МКИС 07 G 7/02.

10. Вокк Р.А., Пейпман Э.М., Кросинг
В.А. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus ma-
cerans* и применение его при получении циклодекстринов.
У. Применение ферментного препарата циклодекстринглюкано-
трансферазы для получения β -циклодекстрина //Тр. Таллинск.
политехн. ин-та. 1988. № 663. С. 66-75.

Tsüklodekstriinglükanotransferaasi puhastamine
sorptsiooni teel tärglisel

Kokkuvõte

Uuriti B. macerans BKMB 506 poolt produtseeritud tsüklodekstriinglükanotransferaasi puhastamisvõimalusi kartulitärklisel. Leiti, et etanooli lisamine lähtekultuurlahusesse tõstab ensüümi aktiivsusaagist sorptsioonil üle kolme korra ja eriaktiivsust kaks korda. Desorptsioon 50 °C juures suurendas veelgi protsessi efektiivsust. Sorptsioonil eelnevalt desintegreeritud tärglisel saavutati 30-kordne ensüümi eriaktiivsuse tõus, kusjuures aktiivsusaagis ületas 80 %. Ilmnes, et puhastamise tagajärjel väheneb amülaasse ja CGTaasse aktiivsuse suhe, mis võimaldab tõsta preparaate kvaliteeti tsüklodekstriinide sünteesil.

K. Pappel, E. Peipman

Purification of Cyclodextringlucanotferase
by Sorption on Starch

Abstract

Purification of cyclodextringlucanotferase produced by BKMB 506 by sorption on potato starch has been studied. It has been shown that ethanol additions to cultural fluid increased enzyme activity more than three times and specific activity of preparation as much as two times. Desorption at 50 °C enlarges efficiency of the process considerably. Using desintegrated starch, specific activity of enzyme preparation increased as much as thirty times and the output of activity was more than 80 per cent. As a result of purification the ratio of amylase and cyclodextringlucanotferase activity decreased enabling to improve the quality of enzyme for the cyclodextrins synthesis.

Е.Н. Арбатова, Т.А. Халлинг, М.В. Резбен

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К
ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЕ *Vac. macerans*

Фермент циклодекстринглюканотрансфераза (ЦГТ-аза, КФ 2.4.1.19) обладает способностью превращать линейные цепи крахмала в циклические. Только таким ферментативным путем получают циклические олигосахариды – циклодекстрины (ЦД), характеризующиеся способностью образовывать комплексы включения со многими неорганическими и органическими веществами. Комплексообразование представляет широкие возможности для применения ЦД в практических целях. Как известно, ЦД сейчас находят применение в медицинской и пищевой промышленности, как добавка в косметических средствах, при циклодекстриновом катализе и т.д. [1].

Штамм *Vac. macerans* ВКМВ-506 применяли для синтеза, в том числе и для технологического, β -ЦД [2, 3]. Технология, разработанная учеными ТТУ внедрена на предприятии "Биоэстрон".

Поликлональные и моноклональные антитела (МКА), полученные к ЦГТ-азе, могут быть применены для детектирования малых количеств фермента, в том числе и ферментативно неактивного, в сложных смесях и для возможной специфической иммобилизации фермента на твердый носитель. МКА также позволяют исследовать структуру молекулы ЦГТ-азы.

Целью данной работы было получить и охарактеризовать МКА к ЦГТ-азе *Vac. macerans*.

Материалы и методы

Штамм *Vac. macerans* ВКМВ-506, с культуральной жидкостью которого проводилась работа, был получен из Всесоюзной коллекции микроорганизмов Института биохимии и фи-

зиологии микроорганизмов АН СССР. Лиофилизированную культуру микроорганизмов использовали для засева в питательную среду с 15%-ным натертым картофелем. Условия культивирования описаны в [3, 4]. Очистка ЦТТ-азы проводилась по следующей схеме:

культуральная жидкость
V. macerans ВКМБ-506

↓
осаждение сульфатом
аммония

↓
ионообменная хроматография на ДЭАЭ целлюлозе

↓
эксклюзионная хроматография на сефадексе
G-100

↓
быстрая жидкостная хроматография белков (FPLC) на колонке Mono-Q

Из 10 литров культуральной жидкости *V. macerans* ВКМБ-506 выделили 3 мг гомогенного по данным электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)

в буферной системе Лэммли [5] препарата ЦТТ-азы (см. рис. I). В качестве стандартов для электрофореза использовали набор белков с известными молекулярными массами фирмы Pharmacia (Швеция): фосфорилаза в - 94 К, бычий сывороточный альбумин - 67 К, овалбумин - 43 К, карбоангидраза - 30 К, ингибитор трипсина из соевых бобов - 20,1 К, α -лактальбумин - 14,4 К. Удельная активность препарата ЦТТ-азы 5 ед/мг белка (50 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, 37 °С, 1% растворимого крахмала как субстрата).

Для получения антител к ЦТТ-азе мышам линии BALB/c вводили 50 мкг очищенного препарата ЦТТ-азы, смешанного с равным объемом полного адьюванта Фрейнда внутривенно.

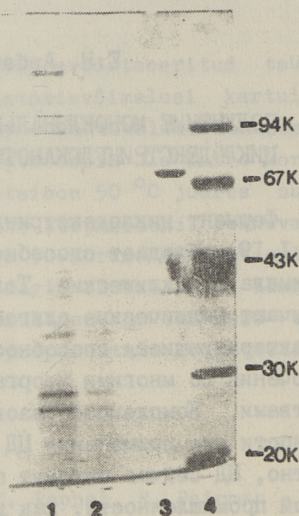


Рис. 1. Электрофорез очищенного препарата ЦТТ-азы и культуральной жидкости *V. macerans* в ПААГ в присутствии ДСН.

1 - культуральная жидкость *V. macerans* (40 мкл), 2 - то же (10 мкл), 3 - очищенный препарат ЦТТ-азы (2 мкг), 4 - стандарты фирмы Pharmacia.

Инъекцию повторяли с трехнедельным интервалом (при повторной инъекции 25 мкг антигена вводили с адьювантом Фрейнда). Через 4 недели после второй инъекции проводили последнюю иммунизацию. Мышам вводили внутривенно 50 мкг антигена в ЗТР (0,02 М трис-НСI буфере рН 7,5, содержащем 0,15 М NaCl). После удаления селезенки у мышей отбирали кровь, содержащую поликлональные антитела. Кровь центрифугировали 10 мин при 800 об/мин для осаждения эритроцитов. Титр полученной сыворотки был 10^{-5} . Гибридомы, секретирующие МКА, получали путем слияния 5×10^7 клеток селезенки мышей линии BALB/c, иммунизированных ЦГТ-азой, с 3×10^7 клетками миеломы линии РА1, используя среду DMEM фирмы "Sigma" (США), содержащую 10%-ную фетальную эмбриональную сыворотку и ГАТ (гипоксантин, аминоптерин и тимидин).

Положительные клоны идентифицировали спустя 2-3 недели после гибридизации при помощи непрямого метода ELISA. Клетки гибридом, продуцирующие антитела к ЦГТ-азе, клонировали путем лимитирующих разведений. Для наработки МКА в больших количествах $5-10 \times 10^6$ клеток гибридом (в 0,5 мл ЗТР) вводили внутривенно мышам линии BALB/c, предварительно сенсibilизированных внутривенной инъекцией 1 мл минерального масла пристана фирмы "Aldrich" (Бельгия) и через 8-12 суток с мышей собирали асцитную жидкость, определяя МКА к ЦГТ-азе непрямым методом ELISA. Аликвоты асцитных жидкостей с МКА к ЦГТ-азе хранили при -20°C . Все положительные клоны, пока не подвергнутые дальнейшим исследованиям, хранили в жидком азоте.

МКА из асцитных жидкостей выделили путем двукратного осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ). Антитела из асцитных жидкостей, освобожденные от клеток с помощью центрифугирования при 3500 об/мин в течение 30 мин, разбавляли в 5 раз ЗТР и осаждали, добавляя к супернатанту равный объем 20%-ного водного раствора ПЭГ 6000 фирмы "Merck" (ФРГ). После 30 мин инкубации при 4°C , МКА осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 30 мин, супернатант отбрасывали, а осадок растворяли и диализовали против ЗФР (0,01 М фосфатного буфера, содержащего 0,15 М NaCl) при 4°C .

Конъюгаты МКА с пероксидазой готовили по периодатному методу [6]. Для конъюгирования антител использовали пер-

оксидазу из хрена (ПХ) производства НПО "Биохимреактив" (Олайне, СССР).

Для проведения иммуноферментного анализа (ELISA) использовали платы из поливинилхлорида Titertek фирмы "Flow Laboratories" (Великобритания).

В непрямом методе ELISA антиген (100 мкл на лунку) в концентрации 5 мкг/мл вносили в лунки плат в 0,05 М бикарбонатном буфере, pH 9,6. Инкубировали в течение ночи при 4 °С. Раствор антигена выливали и трижды промывали лунки ЗФР, содержащим 0,05 % детергента Tween 20 (ЗФР-Т). Затем вносили в лунки по 200 мкл 1%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина (БСА) фирмы "Sigma" (США) в ЗФР для блокировки неспецифической сорбции антигенов и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После отмывки плат в лунки вносили по 100 мкл последовательных разведений антител в ЗФР, содержащем 0,3 % БСА и 0,05 % Tween 20 (ЗФР-АТ). После инкубации плат в течение 2 ч при 37 °С раствор антител выливали, платы промывали пять раз ЗФР-Т и в лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата в разведении 1:1000 в ЗФР-АТ.

В работе использовали конъюгаты фирмы "Sigma" (США) — конъюгат кроличьих противомышинных антител с пероксидазой. Платы инкубировали 1 ч при 37 °С, промывали, как описано выше, и в лунки вносили 100 мкл субстрата. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин (ОФД) и 0,01 % H_2O_2 в 0,05 М лимонной кислоте, pH 5,0. Оптическую плотность гидролизованного субстрата измеряли в идентичных интервалах времени (от 15 до 30 мин) на автоматическом фотометре Titertek Multiscan MC. Оптическая плотность измерялась при длине волны 450 нм.

В прямом методе ELISA теста антиген сорбировали на поверхности лунок так же, как и в непрямом ELISA тесте. После промывки лунок в ЗФР-Т проводили блокирование с 1%-ным БСА, затем еще раз промывали и вносили в лунки конъюгат ПХ. Инкубировали 1 ч при 37 °С, затем лунки отмывали, добавляли субстрат пероксидазы и измеряли оптическую плотность как описано выше.

В сэндвич методе ELISA на первой стадии сорбции МКА к ЦТ-азе в концентрации 10 мкг/мл вносили в лунки

плат (100 мкл на лунку) в 0,05 М бикарбонатном буфере, pH 9,6. Платы инкубировали в течение ночи при 4 °С. После блокировки и отмывки плат (см. выше) в лунки вносили по 100 мкл тестируемого раствора в ЗФР-АТ и инкубировали 2 ч при 37 °С. Растворы, содержащие антиген в различных концентрациях (от 0,5 до 5,0 мкг/мл), готовили путем последовательных разведений в ЗФР-АТ. После инкубации раствор антигена выливали и платы промывали 5 раз ЗФР-Т. Затем в лунки вносили по 100 мкл МКА-ПХ конъюгата в разведении 1:500 в ЗФР-АТ (концентрация ПХ- конъюгата 3 мкг/мл).

Платы инкубировали 2 ч при 37 °С, промывали, в лунки вносили субстрат пероксидазы и через 15-30 минут измеряли оптическую плотность на вышеуказанном фотометре.

Для иммуноблотинга ЦТ-азы с МКА электрофоретический анализ антигена проводили в ДСН-ПААГ в буферной системе Laemmli. Разделяющий гель содержал 10%-ный акриламид. После окончания электрофореза белки переносили с геля на нитроцеллюлозную мембрану типа BA 85 ("Schleicher and Schuell", ФРГ) в 0,025 М фосфатном буфере, pH 6,5 [7]. По окончании трансферации белков (1 ч при 5 В/см) нитроцеллюлозную мембрану отмывали 5 раз в ЗТР, инкубировали с 3%-ным БСА в ЗТР в течение 1 ч при комнатной температуре и отмывали 5 раз в ЗТР. Затем нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с антителами, меченными ПХ (разведение 1:500), в ЗТР-АТ (ЗТР, содержащий 1 % БСА и 0,05 % детергента Tween 20) в течение 2 ч при 37 °С, отмывали 5 раз в ЗТР. Затем нитроцеллюлозную мембрану погружали в субстрат пероксидазы (0,25 мг/мл 4-хлоро-1-нафтола фирмы "Sigma" (США) и 0,03 % H₂O₂ в ЗТР). Окраска развивалась в течение 10-20 минут при комнатной температуре в темноте.

Результаты и обсуждение

Гибридомы, секретирующие антитела к ЦТ-азе *Vas. masegans*, получили в результате слияния миеломы РА1 с клетками селезенки иммунных мышей BALB/c. Отбор и тестирование положительных гибридом и их клонов проводили непрямым методом ELISA. В результате было получено 15 положительных клонов, из которых титр среды выше чем 10⁻³ имели клоны, условно обозначенные как 4D3, 5B1, 1B2, 5B4 и 8H10. Клон

5В1 был субклонирован (при этом у всех субклонов титр остался по-прежнему высоким). Два субклона 5В1 использовались для получения антител в больших количествах, для чего инъецировали ими внутрибрюшинно двух мышей линии BALB/c и собрали их асцитную жидкость.

Степень чистоты МКА 5В1 из асцитной жидкости после двукратного осаждения ПЭГ-ом составляла примерно 90 % (см. рис. 2). Полученные МКА исследовались в непрямом ELISA тесте при концентрации антигена 5 мкг/мл. Было установлено, что МКА 5В1 имели титр 10^{-6} . Это свидетельствует, что МКА 5В1 имеет высокую аффинность к молекуле ЦГТ-азы *Vas. masegans*.

Как известно ЦГТ-аза из *Vas. masegans* представляет собой димер [8]. Поэтому можно ожидать, что можно детектировать эту ЦГТ-азу методом сэндвич

ELISA, используя одно и то же МКА как на дне лунки, так и в виде конъюгата. И действительно метод сэндвич ELISA только с одним МКА 5В1 дает

положительный результат, позволяя детектировать ЦГТ-азу в концентрации 1 мкг/мл. Такая скромная чувствительность, по-видимому, указывает на то, что эпитопы в димере близко расположены друг к другу и есть пространственные препятствия при одновременном узнавании их двумя антителами.

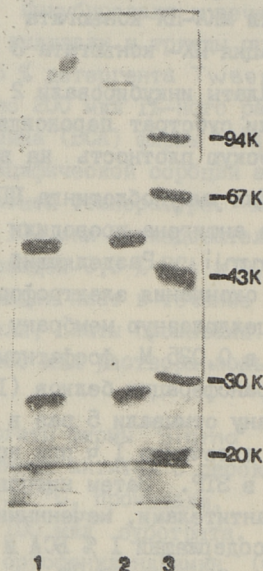


Рис. 2. Электрофорез очищенных из асцитной жидкости МКА к ЦГТ-азе в ПААГ в присутствии ДСН. 1,2 - МКА 5В1, 3 - стандарты фирмы Pharmacia.

Для выяснения вопроса о том, взаимодействуют ли исследуемые МКА с денатурированным ферментом, был проведен иммуноблотинг. Клоны 5В1 и 4D3 хорошо взаимодействовали с денатурированной ЦГТ-азой, в отличие от клонов 1В2 и 5В4 (см. рис. 3).

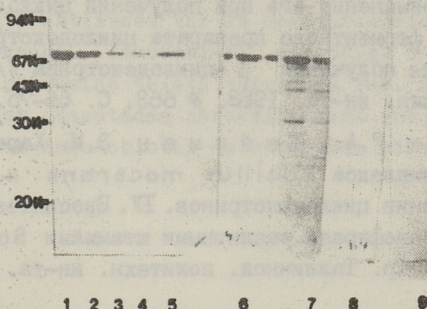


Рис. 3. Детектирование ЦГТ-азы *B. macerans* антителами методом иммуноблоттинга.
 1,6-9 - 2 мкг ЦГТ-азы, 2 - 1 мкг ЦГТ-азы, 3 - 0,1 мкг ЦГТ-азы,
 4 - культуральная жидкость *B. macerans* (10 мкл), 5 - то же
 (40 мкл), 1-5 - МКА 5В1, 6 - МКА 4D3, 7 - мышьяная полисыворotka,
 8 - МКА 1В2, 9 - МКА 5В4.

Метод иммуноблоттинга с МКА 5В1 обладает отличной чувствительностью, на блоттинге можно детектировать меньше 0,1 мкг чистого фермента, фермент можно обнаружить в 10 мкл культуральной жидкости *Bac. macerans*. Как видно из рис. 3, дорожка 4 и 5, у МКА 5В1 отсутствует перекрестная реакция с другими белками культуральной жидкости *Bac. macerans*. МКА 5В1 обнаруживает и множество продуктов протеолиза на иммуноблоттинге (см. полосы ниже основной полосы на рис. 3, дорожка 1), а МКА 4D3 не узнает. Можно предположить, что линейный эпитоп, который узнается МКА 5В1, находится в центральной части молекулы ЦГТ-азы, а эпитоп, который узнается МКА 4D3 находится в концевой части аминокислотной последовательности.

Таким образом, можно сказать, что по имеющимся у нас данным нами впервые получены и охарактеризованы моноклональные антитела к ЦГТ-азе *Bac. macerans*.

Л и т е р а т у р а

1. Е г о р о в Н.С., К е с т н е р А.И., В о к к Р.А. История исследования циклодекстринов, свойства и области их применения // ВИНТИ. Серия микробиология. 1988. Т. 20. Ч. I. С. 4-52.
2. В о к к Р.А., П е й п м а н Э.М., К р о с и н г В.А. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов. У. Применение ферментного препарата циклодекстринглюканотрансферазы для получения β -циклодекстрина // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1988. № 663. С. 66-75.
3. В о к к Р.А., П е й п м а н Э.М. Характеристика ферментного комплекса *Bacillus macerans* и применение его при получении циклодекстринов. LV. Биосинтез циклодекстринглюканотрансферазы различными штаммами *Bacillus macerans* // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1988. № 663. С. 58-65.
4. П а л ь м Т.Б., В о к к Р.А., П е й п м а н Э.М., К е с т н е р А.И. Изучение динамики биосинтеза глюканотрансферазного комплекса *Bacillus macerans* // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1987. 633. С. 41-48.
5. L a e m m l i U.K. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4 // Nature. 1970. Vol. 227. P. 680-685.
6. W i l s o n M.B., N a k a n e P.K. Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Ed. Knapp W., Holubar K., Wick G., Elsevier. North Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York. 1978. P. 215-244.
7. B i t t n e r M., K u p f e r e r P., M o r r i s C.F. Elektroforetic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzylloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets // Anal. Biochem. 1980. Vol. 102, N 2. P. 459-471.
8. К о б а у а ш и S., К а и н у м а К., S u z u k i S. // Carbohydrate Res. 1978. Vol. 61. P. 229-238.

J. Arbatova, T. Halling, M. Reeben

Monoklonaalsed antikehad Bac. macerans'i tsüklo-
dekstriinglükanotransferaasi vastu

Kokkuvõte

On saadud monoklonaalsed antikehad (MKA) Bac. macerans'i tsüklodekstriinglükanotransferaasi (CGTaasi) vastu. MKA 5B1 tunneb ära nii natiivset kui ka denatureeritud valku ja on kõrge afiinsusega. Immunoblotti meetodiga on näidatud ristreaktsiooni puudumine teiste valkudega Bac. macerans'i kultuurvedelikust. Kasutades peroksidaasiga konjugeeritud antikeha 5B1, saab immunoblotti detekteerida vähem kui 0,1 µg fermenti.

J. Arbatova, T. Halling, M. Reeben

Monoclonal Antibodies to Cyclodextrin Glycosyltrans-
ferase of Bac. macerans

Abstract

Monoclonal antibodies (mAb) have been produced against cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) of Bac. macerans. mAb 5B1 has high affinity and recognizes native and denatured forms of enzyme. There is no cross-reaction with other proteins of Bac. macerans culture medium as shown by immunoblot. Using peroxidase conjugated mAb 5B1 we can detect less than 0.1 µg CGTase by immunoblot.

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ТМИНА И
ЛАВРОВОГО ЛИСТА С БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ

Для приготовления комплексов бета-циклодекстрина (β -ЦД) с вкусовыми и ароматными веществами обычно исходят из эфирного масла или эссенции. Выделение эфирного масла из растительного материала происходит перегонкой с водяным паром, экстракцией или каким-нибудь другим энергоемким и трудоемким способом. В то же время известно, что молекула β -ЦД образует комплекс с подходящей молекулой гостя и в газовой фазе. Основываясь на этом, Сейтли предлагает способ [1] для очистки воздуха от вредных паров растворителя, которые абсорбируют насыщенным раствором β -ЦД.

При учете летучести вкусовых и ароматных веществ этот способ мог бы оказаться полезным для включения их в комплекс с β -ЦД. Если эфирные масла перевести в газовую фазу из растительного материала и абсорбировать их раствором β -ЦД, отпадает необходимость применения дорогостоящих эфирных масел для получения соответствующих комплексов.

Целью данного исследования была разработка условий получения комплексов лаврового и тминного масел с β -ЦД, исходя непосредственно из соответствующего растительного материала, а также количественная характеристика полученных комплексов.

Материалы и методы

В работе использовались β -ЦД, предоставленный нам подсобным предприятием "Биоэстрон" колхоза Куусалу, листья лавра благородного (*Laurus nobilis* L.), упакованные в Хобском лавровом комбинате и плоды тмина (*Carum carvi* L.), выращенные в Эстонии в 1988 г.

Для непосредственного комплексообразования лаврового и тминного эфирных масел с β -ЦД использовали аппаратуру, приведенную на рис. 1.

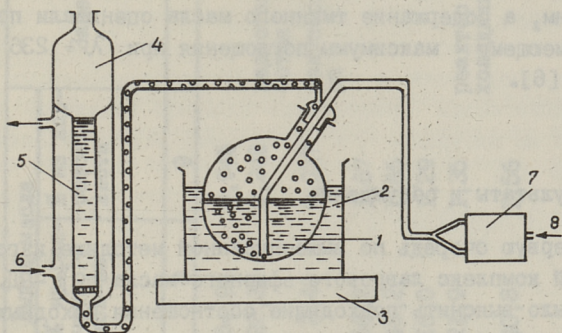


Рис. 1. Прибор для получения комплексов спейс с β -ЦД прямым способом:

1 - суспензия измельченного растительного сырья в дистиллированной воде; 2 - водяная баня; 3 - подогреватель; 4 - реактор; 5 - раствор β -ЦД; 6 - вода из термостата; 7 - воздушный насос; 8 - воздух.

Комплексообразование имело место в специальном термостатированном при 50°C барботажном реакторе (4), снабженном дном из пористого материала. В нижнюю цилиндрическую часть реактора ввели 37,5 мл раствора β -ЦД (5) в воде или в смеси этанол-вода (1:3). В круглодонной колбе (1) в 150 мл воды суспендировали определенное количество измельченного растворительного материала и колбу подогревали на кипящей водяной бане (2). Образующие пары, содержащие эфирное масло, направляли в реактор с помощью воздушного насоса (7).

Через определенные промежутки времени из реактора брали пробы для определения содержания эфирного масла в растворе. К концу опыта раствор из реактора выливали и твердый комплекс выкристаллизовывали по методу, описанному Сейтли и др. [2]. Содержание эфирных масел в лавровом листе и тмине определяли методом Гинзберга [4].

Содержание эфирного масла в комплексах определяли описанным ранее спектрофотометрическим способом [3], используя спектрофотометры "Specord UV-Vis" и "VSU-2P" (Carl Zeiss, Jena). При этом, в случае лаврового масла использовался характерный лимонену максимум поглощения при $\lambda = 273$ нм, а содержание тминного масла оценивали по карвону, имеющему максимумы поглощения при $\lambda = 236$ и $\lambda = 320$ нм [6].

Результаты и обсуждение

В первую очередь по вышеописанной методике изготавливали жидкий комплекс лаврового эфирного масла с β -ЦД. Целью опытов было выяснить подходящие соотношения исходных веществ и необходимую продолжительность процесса. Результаты представлены в таблице I. В первых двух опытах в качестве растворителя β -ЦД использовали дистиллированную воду, но из-за низкой растворимости β -ЦД в воде (1,48 г/100 мл при 20 °С) в таком случае можно использовать очень слабые растворы и это неблагоприятно влияет на выход масла. В остальных опытах (3-8) β -ЦД растворяли в смеси этанол-вода (1:3), которая даже при комнатной температуре обеспечивает растворимость β -ЦД до 5 г/100 мл. Но результаты опыта № 3, проведенного при концентрации β -ЦД 3,98 г/100 мл, показали, что образующийся комплекс при таких условиях в ходе процесса выпадает в осадок и закупоривает дно реактора. Поэтому при изучении динамики процесса работу продолжали слабыми растворами β -ЦД в смеси этанол-вода (1:3).

При приготовлении комплексов β -ЦД с эфирными маслами по классическому раствор-раствор методу подходящим считают весовое соотношение эфирного масла и β -ЦД 1:10 [2].

Близкого к этому значению соотношения исходных веществ добивались и в данных опытах. Но так как фактическое содержание эфирного масла в лавровом листе перед началом экспериментов было неизвестно, то в опытах 3-5 (см. табл. I) исходили из приведенных в литературе данных, по которым содержание масла в лавровом листе 0,5-0,6 % [5]. Выходы масла в опытах 4-5 оказались побольше этого значения, 1,67

Получение жидкого комплекса лаврового масла с β -Щ

№ опыта	Исходные вещества				Время, мин		Выход масла			Замечания
	кол-во лаврового листа, г	кол-во эф. масла (по расче-ту), мг	концент-рация β -Щ, г/100 мл	всего опыта	для дости-жения макс. содер-жания масла	мг	% из рас-четного кол-ва	% из лав-рового листа		
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1,4021	15,6	0,758	80	50	13,25	84,94	0,945		
2	1,4028	15,6	0,756	120	60	3,48	22,30	0,248	недостаточный бар-отаж	
3	25,0	277,5	3,976	120	60	6,65	2,40	0,027	закупорка реакто-ра	
4	8,9751	99,6	1,48	120	60	149,6	150,2	1,67		
5	8,9866	99,8	1,35	180	60	147,9	148,2	1,65		
6	4,4647	49,6	1,36	180	150	57,53	116,0	1,29		
7	4,5002	50,0	1,35	185	100	60,94	121,9	1,35	реактор с обратным холодильником	
8	4,5013	50,0	1,35	180	80	70,41	140,8	1,56		

и 1,65 % соответственно. Методом Гинзберга определяли действительное содержание масла в листьях, которое составляло I,II %.

Учитывая неоднородность химического состава растительного материала (лаврового листа), полученные в опытах 4-5 выходы эфирного масла можно считать истинными и в то же время доказательством о том, что при использованных условиях достигается практически 100%-ное выделение эфирного масла из материала и в то же время его улавливание в растворе β -ЦД.

Опыты 6-8 проводились с оптимальным соотношением эфирное масло - β -ЦД.

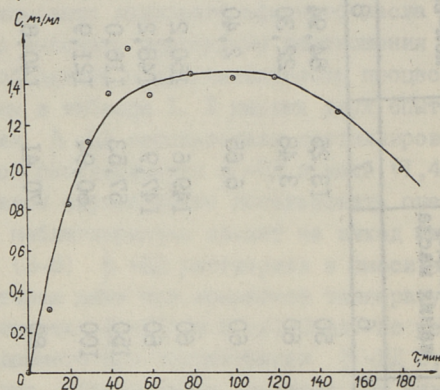


Рис. 2. Зависимость образования жидкого комплекса лаврового масла с β -ЦД от времени.

Продолжительность экспериментов варьировалась от 80 до 185 минут. Время достижения максимального содержания масла в реакторе колеблется от 50 до 150 минут (см. табл. I). На основе многочисленных экспериментов оптимальной продолжительностью эксперимента можно считать 60-100 минут. Динамику накопления эфирного масла в реакторе иллюстрирует рис. 2.

Уменьшение концентрации масла при увеличении времени эксперимента обусловлено разбавлением реакционной смеси конденсационной водой и показывает, что все эфирное масло из растительного сырья уже извлечено.

Стоит отметить необходимость интенсивного барботажа реакционной смеси. Недостаточным барботажем можно объяснить неудовлетворительный результат опыта 2.

Целесообразным оказывалось охлаждение реактора сверху с помощью обратного холодильника (опыты 7 и 8). Видимо, выход масла увеличивается из-за уменьшения потерь испарения ароматных веществ.

С целью получения твердого комплекса лаврового масла с β -ЦД проводили выкристаллизацию полученного при оптимальных условиях жидкого комплекса. Результаты приведены в таблице 2. В опытах 1 и 2 выходы как твердого продукта самого, так и масла в нем низкие. В эксперименте 1 в реакторе содержалось 65,77 % от находившегося в материале масла, но в комплексе нашлось его лишь 2,36 %. Остальное масло осталось в маточном растворе. Выход твердого продукта из исходных веществ только 2,79 %. Причиной этого, очевидно, недостаточная для кристаллизации концентрация комплекса.

В следующих экспериментах повысили концентрацию β -ЦД в реакторе и соответственно повысились и выходы твердого продукта, а также масла в нем (опыты 3, 4). Максимально допустимой концентрацией β -ЦД оказалось 3,26 г/100 мл, при которой из исходных веществ получили 63,49 % твердого продукта, содержащего 11,51 % масла. Из расчетного количества масла в продукте содержалось 80,73 % и в маточном растворе осталось лишь 16,13 %.

Выходы масла в отношении взятого для эксперимента количества лаврового листа оказались близкими к определенному по методу Гинзберга содержанию масла (I, II %).

Результаты показывают, что данный метод позволяет практически полностью выделять эфирное масло из растительного материала и до 80 % из него включить в твердый комплекс с β -ЦД. Достижимый при этом выход твердого продукта превышает 60 % в отношении исходных веществ.

Описанная выше методика использовалась также при получении комплекса β -ЦД и тминного масла. При этом исходили из условий опыта, выработанных для получения жидких комплексов лаврового масла. Результаты этой серии опытов

Т а б л и ц а 2

Получение твердого комплекса лаврового масла с β -ЦД

Исходные вещества		Комплекс			Распределение эфирного масла, %			Выход эфирного масла	
концентрация β -ЦД, г/100 мл	всего исходных веществ, г	масса, г	выход от исходн. веществ, %	содержание масла, %	в комп-л ксе	в маточном растворе	из расчетного количества, %	из лаврового листа, %	
I	2	3	4	5	6	7	8	9	
1,30	0,5797	0,0162	2,79	14,66	2,36	65,77	80,87	0,90	
2,0	0,8203	0,0651	7,94	11,32	9,20	146,8	156,00	1,73	
2,78	1,1306	0,4192	37,08	7,93	33,07	63,05	96,12	1,07	
3,26	1,3257	0,8417	63,49	11,51	80,73	16,13	96,92	1,08	

приведены в таблице 3. При этих экспериментах реактор не был снабжен обратным холодильником. Характерной для этой серии опытов является очень высокая доза эфирного масла в отношении β -ЦД. Это объясняется тем, что при проведении экспериментов отсутствовали данные о фактическом содержании масла в используемом материале и при планировании опытов исходили из литературных данных. Так как действительное содержание эфирного масла в данной партии тмина оказалось 5,1%-ным, проводились опыты с заметным избытком эфирного масла. Но внимания заслуживают высокие содержания эфирного масла в полученных комплексах. Мы предполагаем, что значительная часть масла может оказаться адсорбированной к β -ЦД. Ответить на этот вопрос можно после исследования стабильности полученных комплексов.

Динамика процесса образования жидкого комплекса β -ЦД с эфирным маслом тмина приведена на рис. 3. Максимальное содержание масла в реакторе достигается к 90-й минуте опыта.

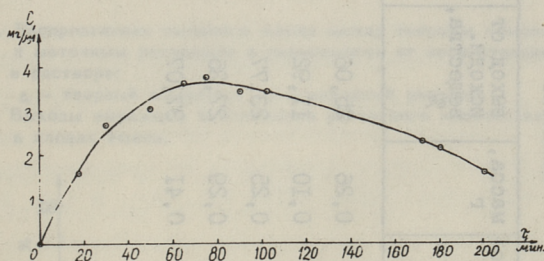


Рис. 3. Зависимость образования жидкого комплекса тминного масла с β -ЦД от времени.

С целью уточнения условий получения комплекса β -ЦД и тминного масла проводили серию опытов с варьированием концентрации β -ЦД в реакторе от 1,5 до 3,9 г/100 мл и с охлаждением реактора. Содержание эфирного масла в использованной партии тмина было 2,03 %. Весовое соотношение масла и β -ЦД составляло 0,04–0,05. Результаты опытов приведены на рисунках 4 и 5.

По приведенному на рис. 4 распределению эфирного масла можно убедиться, что при увеличении концентрации β -ЦД

Получение комплексов тминного масла с β -ЩЦ

№ опыта	Исходные вещества		Комплекс				Распределение эф. масла, % от расчетного к-ва		Фактический выход эф. масла из тмина, %
	эф. масло (по рас-чету), мг	β -ЩЦ г/100 мл	соотно-шение масло β -ЩЦ мг/мг	масса, г	выход от исходн. вещества, %	сод. эф. масла, %	в комплек-се	в матричном растворе	
1	478,6	1,52	0,85	0,26	25,06	17,06	9,30	не определено	1,35
2	241,3	1,54	0,42	0,10	11,92	28,38	11,40	" "	1,79
3	477,3	1,52	0,85	0,25	23,77	26,09	13,53	" "	1,57
4	478,4	1,53	0,84	0,29	27,35	28,69	17,16	36,73	3,62
5	480,0	1,68	0,77	0,41	37,07	24,88	21,19	18,0	2,24

значительно увеличивается и количество включенного в комплекс масла. При концентрации β -ЦД 2,5–3,0 г/100 мл в составе твердого комплекса из раствора выделяется около 65 % эфирного масла, а при дальнейшем увеличении концентрации β -ЦД в реакторе этот показатель не увеличивается. В маточном растворе остается 1,5–3,6 % от всего количества масла.

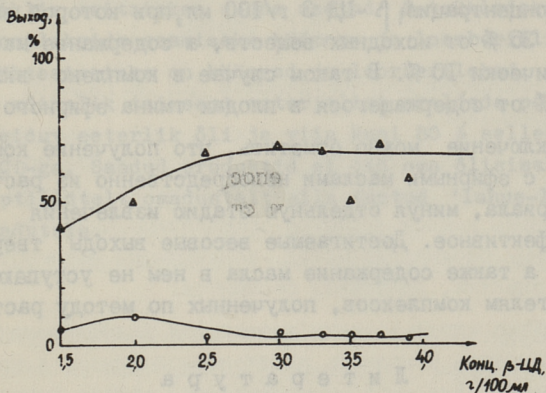


Рис. 4. Распределение тминного масла между твердым комплексом и маточным раствором в зависимости от концентрации β -ЦД в растворе:
 Δ – твердый комплекс; \circ – маточный раствор.
 Выходы выражены в отношении расчетного количества масла в плодах тмина.

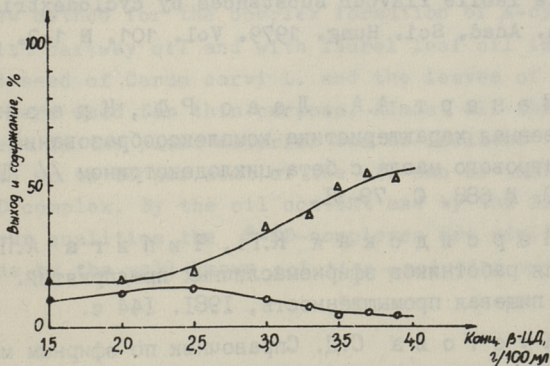


Рис. 5. Зависимость весового выхода твердого комплекса и содержания в нем эфирного масла от концентрации раствора β -ЦД:
 Δ – весовой выход твердого комплекса в отношении исходных веществ,
 \circ – содержание масла в твердом комплексе.

Данные, представленные на рис. 5, тоже показывают, что начиная с концентрации β -ЦД 3 г/100 мл значительно улучшаются условия кристаллизации комплекса - весовой выход комплекса заметно увеличивается. Но так как выделяющееся в виде комплекса количество эфирного масла не увеличивается (рис. 4), то получаются комплексы с меньшим содержанием масла. Таким образом, оптимальной в реакторе можно считать концентрацию β -ЦД 3 г/100 мл, при которой выход комплекса 35 % от исходных веществ, а содержание масла в нем практически 10 %. В таком случае в комплекс включено около 70 % от содержащегося в плодах тмина эфирного масла.

В заключение можно отметить, что получение комплексов β -ЦД с эфирными маслами непосредственно из растительного материала, минуя отдельную стадию извлечения масла, весьма эффективное. Достижимые весовые выходы твердого продукта, а также содержание масла в нем не уступают тем же показателям комплексов, полученных по методу раствор-раствор.

Л и т е р а т у р а

1. S z e j t l i J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. Budapest: Akadémiai Kiado. 1982. 296 p.

2. S z e j t l i J., S z e n t e L., B á n k y - E l ö d E. Molecular encapsulation of volatile, easily oxidizable labile flavour substances by cyclodextrins // Acta Chim. Acad. Sci. Hung. 1979. Vol. 104. N 1-2. P. 27-46.

3. М е н е р т А.А., Л а а с Р.Ф., К р е з н М.И. Количественная характеристика комплексообразования укропного и лаврового масла с бета-циклодекстрином // Труды ТТУ. 1989. № 688. С. 79-91.

4. П е р с и д с к а я К.Г., Ч и п и г а А.П. Справочник для работников эфирномасличных предприятий. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. 144 с.

5. К у с т о в а С.Д. Справочник по эфирным маслам. М.: Пищевая промышленность, 1978. 208 с.

6. Г о р я е в М., П л и в а И. Методы исследования эфирных масел. Алма-Ата: Изд-во АН Каз.ССР. 1962. 762 с.

Köömne- ja loorberiõli β -tsüklodekstriinikomplekside saamine

Kokkuvõte

Artiklis esitatakse uudne meetod β -tsüklodekstriini (β -CD) komplekside saamiseks köömne- ja loorberiõliga, kusjuures lähteaineteks on köömned ja loorberilehed. Antud meetodil on võimalik taimsest materjalist eraldada peaaegu kogu selles leiduv eeterlik õli ja viia kuni 80 % sellest ka kompleksis β -CD-ga. Saadud produktid ei jää oma õlisisalduselt ega organoleptiliselt omadustelt alla tuntud 'lahus-lahus'-meetodil saadutele.

A. Menert

Complex Formation of Caraway and Laurel Leaf Oils with β -cyclodextrin

abstract

A new method for the complex formation of β -cyclodextrin (β -CD) with caraway oil and with laurel leaf oil is proposed. The dried seed of *Carum carvi* L. and the leaves of *Laurus nobilis* L. were used for this purpose. Almost all the essential oil present in the plant material can be isolated by this method and up to 80 per cent of the oil can be included into the β -CD complex. By the oil content and by the fragrance and flavour qualities the β -CD-complexes are similar to those made by the well-known solution-solution method.

Е.А. Королева, Н.Р. Холстинина,
И.Р. Сараңд

ИММОБИЛИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ДЕГРАДАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

За последние годы широкое распространение получил новый вид биокатализаторов – иммобилизованные клетки (ИК). Иммобилизация клеток является эффективным путем получения гетерогенных биокатализаторов, исключающим дорогостоящие операции очистки, выделения ферментов.

В случае использования клеток как полиферментной системы необходимо сохранить их жизнеспособность в процессе иммобилизации. Для этого иммобилизация должна проходить в мягких для клеток условиях.

Основным и наиболее распространенным методом ИК с сохранением их жизнеспособности считается включение в гелевые системы. Включение в гели альгината кальция, агар-агара, каррагинана и др. не пригодно по различным причинам для крупномасштабных процессов.

Выбор носителей обуславливается их доступностью, стоимостью, химической нейтральностью, механическими свойствами. Наряду с известными методами включения (полимеризация акриловых мономеров, ионотропная гелификация полисахаридов) в последнее время интересные результаты получены с применением криогелей [1, 2].

Биологическая нейтральность, стабильность применяемых полимеров, отсутствие воздействия мономеров и инициаторов на клетку, стабильность гелей в широком диапазоне солевого состава обрабатываемого раствора, возможность повторного использования полимера можно считать важными преимуществами этого малоизученного метода. Поэтому была изучена возможность криогелификации поливинилового спирта (ПВС) для иммобилизации жизнеспособных клеток с целью

деградации ксенобиотиков. Дополнительно, как носители были применены гель полиакриламида и пористая керамика, которые также дают неплохие результаты при иммобилизации жизнеспособных клеток [3].

Объектом иммобилизации выбраны псевдомонады, обладающие способностью к расщеплению стойких синтетических органических соединений.

Использование бензойной кислоты происходит по β -кетoadипатному пути. Разложение идет через катехол, цис, цис-муконат, β -кетoadипат. Индуктором этого пути является цис, цис-муконат. Он образуется за счет небольшой конститутивной активности бензоатдиоксигеназы. В результате накопления индуктора начальные ферменты β -кетoadипатного пути активируются и происходит деградация бензойной кислоты. Ферменты данного пути кодируются хромосомными генами.

Создание биокаталитической системы на основе иммобилизованных жизнеспособных псевдомонад может быть применено для разложения ксенобиотических веществ в производственных отходах с целью решения обострившихся экологических проблем.

Материалы и методы

Биомасса

Штамм *Pseudomonas putida* PaW85, способный утилизировать бензойную кислоту, любезно предоставлен кафедрой генетики Тартуского государственного университета. Биомассу получали из Института химической и физической биологии АН ЭССР.

Клетки *Pseudomonas putida* выращивали в проточной культуре, используя систему ферментер-микрокомпьютер, позволяющую постоянно контролировать процесс культивирования. Контроль за параметрами культуры был двоякого рода: непосредственный, контролируемый ферментативной системой, и опосредованный, через данные анализа среды. Такие характеристики как температура, pH, pO_2 , скорость перемешивания, атмосферное давление, потребление титранта были получены непосредственно во время культивирования с помощью системы "Apple II + микрокомпьютер".

Средой для культивирования выбрана натриевая соль бензойной кислоты в растворе минеральных солей.

Оптимальная концентрация бензоата натрия 0,2 %. Начиная с 0,3 % наблюдается ингибирование роста клеток.

В начале культивирования клетки выращивали на среде, содержащей 0,2 % бензоата натрия при 28 °С, рН 6,8, рО₂ более 60 %. Рабочий объем ферментера 2,5 л. По достижении концентрации биомассы 0,4 г/л включено проточное культивирование со скоростью протока $D = 0,05 \text{ ч}^{-1}$. Концентрация бензоата натрия в подаваемой среде была 0,5 %. По достижении стабильного состояния через 70 часов стали медленно увеличивать скорость протока с ускорением $a = 0,015 \text{ ч}^{-2}$. Максимальная скорость протока была равна $0,7 \text{ ч}^{-1}$. После этого начинается вымывание культуры.

При медленном увеличении скорости протока ($a=0,015 \text{ ч}^{-2}$) остаточное количество бензоата натрия стало накапливаться в среде начиная с $D = 0,3 \text{ ч}^{-1}$.

В дальнейшем увеличение количества бензоата стало линейным и достигло 2,5 г/л при максимальной скорости $0,7 \text{ ч}^{-1}$. Промежуточных продуктов утилизации не обнаружено.

Во время культивирования ($a = 0,015 \text{ ч}^{-2}$) наблюдалось уменьшение экономического коэффициента потребления субстрата (Y_{xs}).

Однако с $D = 0,35 \text{ ч}^{-1}$ начинается увеличение (Y_{xe}) и свой максимум, равный 0,4 г/л он достигает при максимальной скорости роста. Аналогично ведет себя экономический коэффициент потребления кислорода. Достигнута наибольшая концентрация клеток культуры 1,82 г/л.

Для иммобилизации использовались лиофильно высушенные клетки. Активность нативных лиофильно высушенных клеток 9,0 Ед/г.

Реактивы и носители

Акриламид (АА), N,N'-метиленабисакриламид (МБА), аммоний надсерноокислый, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЭМЕД), Reanal; Венгрия. Поливиниловый спирт (ПВС) ТУ 6-0505-190-80, пемза, обработанная соляной кислотой, пористый оксид алюминия с диаметром пор 0,5-1,0 мкм. По-

следний носитель предоставил для работы проф. Леттел из Высшей инженерной школы Кетена, ГДР.

В работе использован толуол (чда) ГОСТ 4526-67, дополнительно осушенный.

Методы иммобилизации

1. Включение в полиакриламидный гель (ПААГ)

ПААГ - продукт сополимеризации акриламида и N,N' -метиленбисакриламида. Инициатором реакции является аммоний надсерноокислый, катализатором ТЕМЭД. Иммобилизация в ПААГ производилась по стандартной методике [4]. Полученный гель протирали через сито $d = 1,6$ мм. Гранулы промывали и фракционировали по размерам декантацией в 0,01 М натрий-фосфатном буфере.

2. Включение в гель поливинилового спирта (ПВС).

Криогель ПВС получили на установке криогелификации, изготовленной по схеме, предложенной институтом элемент-органической химии АН СССР, тов. Лозинским В.И.

Гранулы криогеля получают замораживанием при -20°C капель суспензии клеток в растворе ПВС. Полученные гранулы с $d = 2,0$ мм промывались 0,01 М натрий-фосфатным буфером.

3. Иммобилизация на пористую керамику.

Иммобилизация на пористую керамику проводилась адсорбцией следующим образом: через наполненную носителем колонку прогоняли суспензию клеток в натрийфосфатном буфере.

Циркуляция суспензии проводилась 3 часа при 12°C . Полученный препарат промывали буфером.

Все препараты биокатализаторов перед трансформациями инкубировали в растворе питательной среды при 30°C , pH 6,8, 24 часа.

Деструкция бензойной кислоты иммобилизованными клетками

Деструкция проводилась в барботажном реакторе с водяной рубашкой при интенсивной аэрации (рис. 1).

Объем реакционной среды составлял 100 мл. Субстратом служил раствор бензойной кислоты 5 мМ в 0,05 М фосфатном буфере рН 6,8. Температура 30 °С.

Бензойную кислоту в субстрате определяли спектрофотометрическим методом по собственному поглощению в ультрафиолетовой области при 230 нм против дистиллированной воды [4].

Ферментативная активность оценивалась по наклону линейного участка кинетической кривой. Одна единица активности соответствует превращению 1 мкМ субстрата в 1 минуту при 30 °С на 1 г абсолютно сухих клеток или катализатора соответственно. Количество клеток, содержащихся в препаратах биокатализаторов определяли по сумме нуклеиновых кислот [5].

Результаты и обсуждение

При включении клеток в ПААГ получены препараты с активностью 2,09 Ед/г катализатора или 6,62 Ед/г клеток (рис. 2). Степень сохранения активности 73,5 %. При иммобилизации в ПААГ важное значение имеют время контакта с мономерами и температура [3]. Это подтвердили и проведенные нами эксперименты с *Ps. putida*. При времени контакта 10 мин и температурах 14, 20 °С полученные катализаторы не проявляли активности по деградации бензойной кислоты.

Для увеличения механической прочности ПААГ было проведено армирование пористым оксидом алюминия. Получены активные препараты. Результаты требуют дополнительных исследований.

При включении клеток в криогель ПВС получен биокатализатор с активностью 0,47 Ед/г катализатора и 5,36 Ед/г клеток, степенью сохранения активности 59,5 % (рис. 3). Исходным материалом для получения геля была суспензия кле-

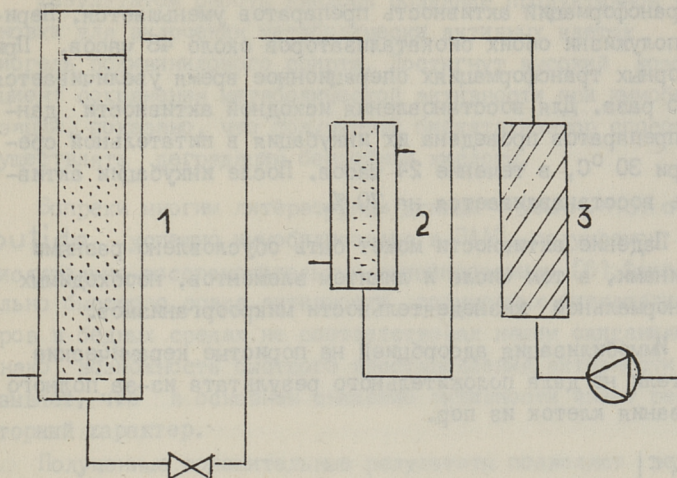


Рис. 1. Установка для деструкции бензойной кислоты иммобилизованными клетками:

- 1 - реактор; 2 - емкость для увлажнения воздуха;
3 - фильтр.

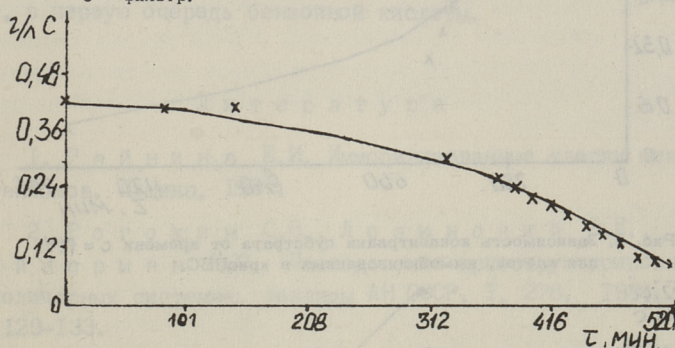


Рис. 2. Зависимость концентрации субстрата от времени $c = f(\tau)$ для клеток, иммобилизованных в ПААГ.

ток в 11 % растворе ПВС. Соотношение клеток к ПВС 1:10. Концентрация ПВС выбрана в предварительных опытах.

Для изучения способности клеток *Pseudomonas putida* в иммобилизованном состоянии осуществлять деградацию бензойной кислоты проводились повторные трансформации.

Проведены повторные периодические трансформации с каждым полученным препаратом (рис. 4). При увеличении чис-

ла трансформаций активность препаратов уменьшается. Период полужизни обоих биокатализаторов около 48 часов. При повторных трансформациях операционное время увеличивается в 1,5 раза. Для восстановления исходной активности данных препаратов проведена их инкубация в питательной среде при 30 °С, в течение 24 часов. После инкубации активность восстанавливается на 70 %.

Падение активности может быть обусловлено разными причинами, в том числе и лимитом элементов, необходимых для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов.

Иммобилизация адсорбцией на пористые керамические носители не дала положительного результата из-за полного вымывания клеток из пор.

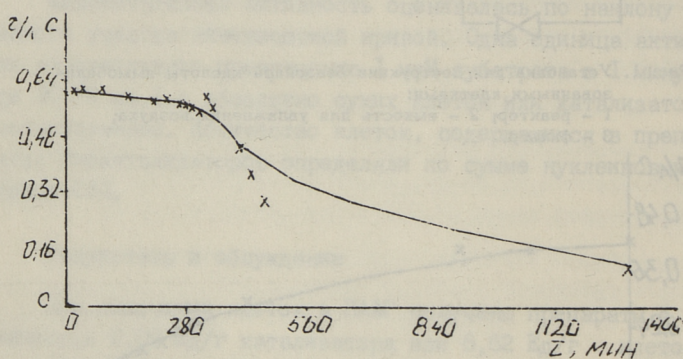


Рис. 3. Зависимость концентрации субстрата от времени $c = f(\tau)$ для клеток, иммобилизованных в криоПВС.

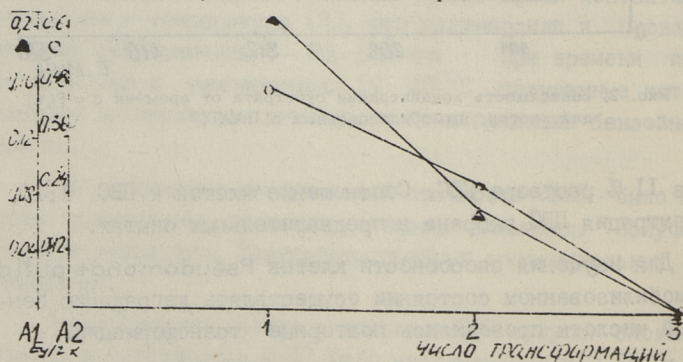


Рис. 4. Зависимость удельной активности катализатора от числа трансформаций:
1 - ПААГ, 2 - криоПВС.

Результатом работы явилось создание продуктивной установки для включения метаболически активных клеток в криогель поливинилового спирта. Достигнут высокий коэффициент сохранения метаболической активности при иммобилизации, показано, что полученный биокатализатор способен осуществлять деградацию бензойной кислоты.

Вопреки многим литературным данным *Pseudomonas putida* успешно иммобилизована в ПААГ, получаемом окислительно-восстановительным иницированием [6]. Факт довольно быстрого спада активности полученных биокатализаторов в бедных средах не соответствовал нашим ожиданиям. Однако возможность быстрого восстановления активности показывает, что в основном снижение активности имеет регуляторный характер.

Полученные положительные результаты позволяют рекомендовать биокатализатор на основе иммобилизованных в криогели клеток *Pseudomonas putida* для дальнейшей оптимизации и масштабирования для разложения ксенобиотиков, в первую очередь бензойной кислоты.

Л и т е р а т у р а

1. Райнина Е.И. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пущино, 1987.

2. Рогожин С.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С. Исследование криоструктурирования в полимерных системах. Доклады АН СССР. Т. 278. 1984. С. 129-133.

3. Иммобилизованные клетки и ферменты / Под ред. Вудворда. М.: Мир, 1988.

4. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высшая школа, 1974.

5. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958. Т. 23. Вып. 5.

6. Иммобилизованные ферменты / Под ред. И.В. Березина Т. I. МГУ, 1976.

E. Koroljova, N. Holstinina,
I. Sarand

Mikroorganismide immobiliseerimine ksenobiootikute
degradeerimiseks

Kokkuvõte

Uuriti *Pseudomonas putida* PaW 85 immobiliseerimisvõimalusi polüakrüülamiidgeeli (PAAG) ja polüvinüülalkoholi krüogeeli (PVA). Rakkude sidumisel PAAG-i saadi preparaadid aktiivsusega kuni 2,09 E/g, sidumisel krüogeeli - 0,47 E/g. Aktiivsusaagised olid vastavalt 73,5 ja 59,5 %.

Uuriti saadud preparaatide kasutamisevõimalusi bensoehappe degradeerimisel vesilahustes.

Y. Korolyova, N. Holstinina,
I. Sarand

Immobilization of Microorganisms for Degradation
of Xenobiotics

Abstract

Pseudomonas putida has been immobilized in polyacrylamide gel (PAG) and polyvinyl alcohol cryogel (PVA).

The preparations of immobilized microorganisms were obtained with activity 2.09 U/g for PAG and 0.47 U/g for PVA. The keeping activity was 73.5 % and 59.5 % accordingly.

The possibility of using this biocatalyst for destructions of benzoic acid in water solutions was investigated.

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
НА ПРОЦЕСС ИММОБИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК МАКА

Процесс иммобилизации несет ряд преимуществ для растительных клеток. Основное преимущество состоит в том, что значительно увеличивается жизнеспособность иммобилизованных растительных клеток, по сравнению со свободными клетками они остаются жизнеспособными вплоть до трех месяцев культивирования в суспензионной среде с периодической заменой среды [1]. Следующим этапом в нашей работе в этом направлении было изучить, как на процесс иммобилизации растительных клеток мака и метаболическую активность иммобилизованных клеток влияют некоторые физические факторы, в частности, низкоинтенсивное лазерное излучение.

Материалы и методы

Каллусную культуру клеток мака *Papaver somniferum* выращивали в 250 мл колбах, содержащих по 50 мл агаризованной среды. Состав основной питательной среды: минеральные вещества по Мурасиге-Скуга, тиамин - 0,1 мг/л, пиридоксин - 0,5 мг/л, никотиновая кислота - 0,5 мг/л, инозитол - 100 мг/л, гидролизат казеина - 1 г/л, 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) - 0,1 мг/л, кинетин - 0,1 мг/л, сахароза - 30 г/л, агар - 7 г/л, при pH = 5,7. Культуру пассировали 1 раз в 4 недели, выращивали при 26 °С в темноте.

В качестве носителя для иммобилизации использовали пенополиуретан марки ППУ ЭО-140 20-0,8 открытоячеистый со средним размером пор 0,8 мм. Частицы носителя получали разрезанием полотна пористого материала до одинакового веса (20 ± 1) мг. Количество связанной биомассы измеряли пос-

ле высушивания препаратов биокатализатора в течение 24 часов при 70 °С с вычитанием чистого веса частицы носителя. Коэффициент заполнения клеток вычисляли как отношение веса сухих клеток на частице носителя к весу исходной частицы носителя.

Были использованы стеклянные барботажные культиваторы двух типов: круглодонной колбы и сопло-конусные культиваторы объемом по 0,5 л, содержащие по 300 мл питательной среды. Аэрацию и перемешивание осуществляли подачей воздуха через ватный фильтр в количестве 0,4-0,7 л/л мин с помощью аквариумного микрокомпрессора МК-Л2.

Иммобилизация. Куски каллуса культуры *Papaver somniferum* в количестве 35-40 г/л по сырому весу стерильно переносили в чашку Петри, измельчали скальпелем, взвешивали и переносили в барботажный культиватор с предварительно проавтоклавируемыми пенополиуретановыми частицами носителя в количестве от 70 до 100. Куски носителя прорастали клеточной массой и могут рассматриваться как иммобилизованный биокатализатор. Через один месяц, а к этому времени свободные клетки гибнут или вымываются при смене питательной среды, биокатализатор помещали в продукционную среду (ПС), которая готовится на базе среды Мурасиге-Скуга и отличается по составу от полной среды тем, что из семи макроэлементов присутствуют только две ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и $CaCl_2$) в концентрации 6,6 раз превышающей обычную, нет белка и гормонов роста. Смену среды производили обычно раз в две недели, при этом забирали по 5-6 частиц носителя для анализа, из них 3 частицы - для анализа на метаболическую активность клеток и 2-3 частицы - для анализа на сухой вес биомассы.

Метаболическую активность клеток оценивали по появлению окраски клеток в растворе хлорида 2, 3, 5 - трифенилтетразолия вследствие его восстановления до красного формазона редуцирующими ферментами электрон-транспортной цепи митохондрий клетки [1].

Метаболическую активность представляли в относительных единицах приведенной оптической плотности с учетом разбавления спиртового экстракта.

Результаты и обсуждение

Действие света на культуру растительных клеток изучалось многими исследователями [2, 3]. На примере культуры *Cinchona ledgeriana* было показано, что клетки лучше растут на свету, а выход алкалоидов наибольший в темноте, в связи с этим авторы предлагают вести двухступенчатый процесс культивирования [3]. Мы выращивали иммобилизованные клетки в темноте с предварительным облучением инокулянта расфокусированным пучком низкоинтенсивного гелий-неонового лазера. В литературе известны факты стимулирующего действия низкоинтенсивного излучения. В частности, на культуре животных клеток было показано, что облучение клеток китайского хомячка в течение 30 секунд расфокусированным пучком мощностью 10–30 мВт приводит к увеличению числа колоний на 20–30 % [4]. Исходя из этого, мы также в течение 30 секунд при мощности излучения лазера в 25 мВт облучали размельченный инокулят растительных клеток в чашке Петри перед его введением в культиватор.

Влияние низкоинтенсивного излучения гелий-неонового лазера на связывание клеток с носителем и их метаболическую активность изучали на примере двух типов культиваторов: сопло-конусном и типа круглодонной колбы. Уже через 2 недели можно было визуально наблюдать, что после облучения число клеточных агрегатов, связанных с носителем, в 3–4 раза превосходит необлученный вариант.

Из таблицы I видно, что в условиях сопло-конусного культиватора через две недели культивирования метаболическая активность облученных иммобилизованных клеток в 4 раза выше активности необлученных иммобилизованных клеток. Такая высокая разница в метаболической активности облученных и контрольных клеток наблюдается только на первых этапах культивирования, она практически нивелируется уже к четвертой неделе культивирования в сопло-конусном культиваторе.

В условиях барботажного культиватора типа круглодонной колбы метаболическая активность контрольных необлученных клеток через 2 недели в два раза выше по сравнению с контрольными клетками в сопло-конусном культиваторе, а мета-

Т а б л и ц а 1

Основные характеристики облученных /L/ и
необлученных /K/ биокатализаторов

Тип культиватора	Время культивирования (нед)	Коэфф. заполнения	Метабол. активность	Удельная метабол. активность
Сопло-конусный	2 К		0,074	0,004
	4 К	1,0	2,807	0,140
	2 L		0,270	0,014
	2 L		0,260	0,013
	4 L	1,22	2,670	0,133
Круглодонная колба	2 К		0,150	0,008
	2 L		1,767	0,088
	4 L	1,29	6,780	0,339

болическая активность облученных иммобилизованных клеток в круглодонной колбе уже в 25 раз выше активности контрольных клеток в сопло-конусном культиваторе. Более высокую метаболическую активность клеток в условиях круглодонной колбы можно объяснить более мягким режимом перемешивания. Но даже при таком мягком режиме перемешивания уже со вторых-третьих суток роста в культиваторе необлученные клетки, особенно свободные неиммобилизованные, начинают темнеть и гибнут, в то время, как облученные клетки даже через две недели остаются все еще светлыми, жизнеспособными, причем не только связанные с носителем, но и свободные. Можно предположить, что низкоинтенсивный красный свет гелий-неонового лазера активизирует защитные процессы в клетках.

В таблице 2 представлены данные, в которых сравниваются основные параметры выращивания облученных биокатализаторов в культиваторах сопло-конусного типа и типа круглодонной колбы на более поздних сроках культивирования - более четырех недель. Было показано, что метаболическая активность облученных клеток в круглодонном культиваторе на протяжении семи недель культивирования в 1,5-2 раза выше метаболической активности клеток в сопло-конусном культиваторе. Коэффициент заполнения у облученных клеток достигает значения 2, 20, что в 1,5 раза превышает мак-

симальный коэффициент заполнения у необлученных контрольных клеток.

Т а б л и ц а 2

Основные характеристики облученных биокатализаторов

Время культ. (недель)	Питат. среда	Коэффициент заполнения		Метабол. акт-ть иммоб. клеток		К-во иммобил. биокат-ра (мг сух. веса)	
		кругл.	конус	кругл.	конус	кругл.	конус
2	ППС	-	-	1,77	0,26	-	-
3	ППС	1,29	1,22	6,78	2,67	-	1728
6	ПС	1,32	2,16	13,15	9,33	2002	2992
7	ПС	2,21	1,21	3,75	1,92	3256	1560
9	ПС	1,55	-	0,15	2,13	2201	-
10	ПС	-	-	0,55	-	-	-
11	ПС	3,23	-	-	-	4355	-
13	ПС	1,50	-	-	2,48	1980	-
18	ПС	1,75	-	-	-	2275	-
20	ПС	1,75	-	0,15	-	2205	-

Метаболическую активность клеток оценивали по появлению окраски клеток в присутствии ТТХ. Контрольные необлученные иммобилизованные клетки начинают восстанавливать ТТХ и окрашиваться в розовый цвет, переходящий в ярко-красный через 2-3 часа инкубации при комнатной температуре, облученные же иммобилизованные клетки начинают восстанавливать ТТХ и окрашиваться уже через 30 минут инкубации. Исходя из этих данных, можно предположить, что проницаемость облученных иммобилизованных клеток увеличивается. Этот факт приобретает важное значение для процесса получения продуктов вторичного метаболизма в суспензионной культуре облученных клеток.

Л и т е р а т у р а

И. Абдвахитова А.К. Оптимизация условий иммобилизации растительных клеток мака на пенополиуретановом носителе // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1989. № 688. С. 25-34.

2. M i s a w a M., S u z u k i T. Recent progress in plant cell culture research on the production of useful plant metabolites in Japan // Applied Biochemistry and Biotechnology. 1982. Vol. 7. P. 205-216.

3. H a r k e s P.A.A., K r i j b o l d e r L. et al. Influence of various media constituents on the growth of Cinchona ledgeriana tissue cultures and the production of alkaloids and anthraquinones therein // Plant Cell Tissue Organ Culture. 1985. Vol. 4. P. 199-214.

4. А б д в а х и т о в а А.К. Влияние излучения гелий-неонового лазера на клетки китайского хомячка, культивируемых in vitro. Автореферат диссертации. Москва, 1982.

Madala intensiivsusega laserikiirguse toime moonirakkude immobiliseerimisele

Kokkuvõte

Uuriti väheintensiivse laserikiirguse mõju moonirakkude immobiliseerimise käigule vahtpolüuretaanil. Ilmnes, et esimesel kultiveerimiskuul ületas kiiritatud rakkude metaboolne aktiivsus ja täitumistegur tunduvalt kiiritamata immobiliseeritud rakkude analoogseid parameetreid. Võrreldi kiiritatud biokatalüsaatorite kasvatamist ümara ja koonilise põhjaga kultivaatorites.

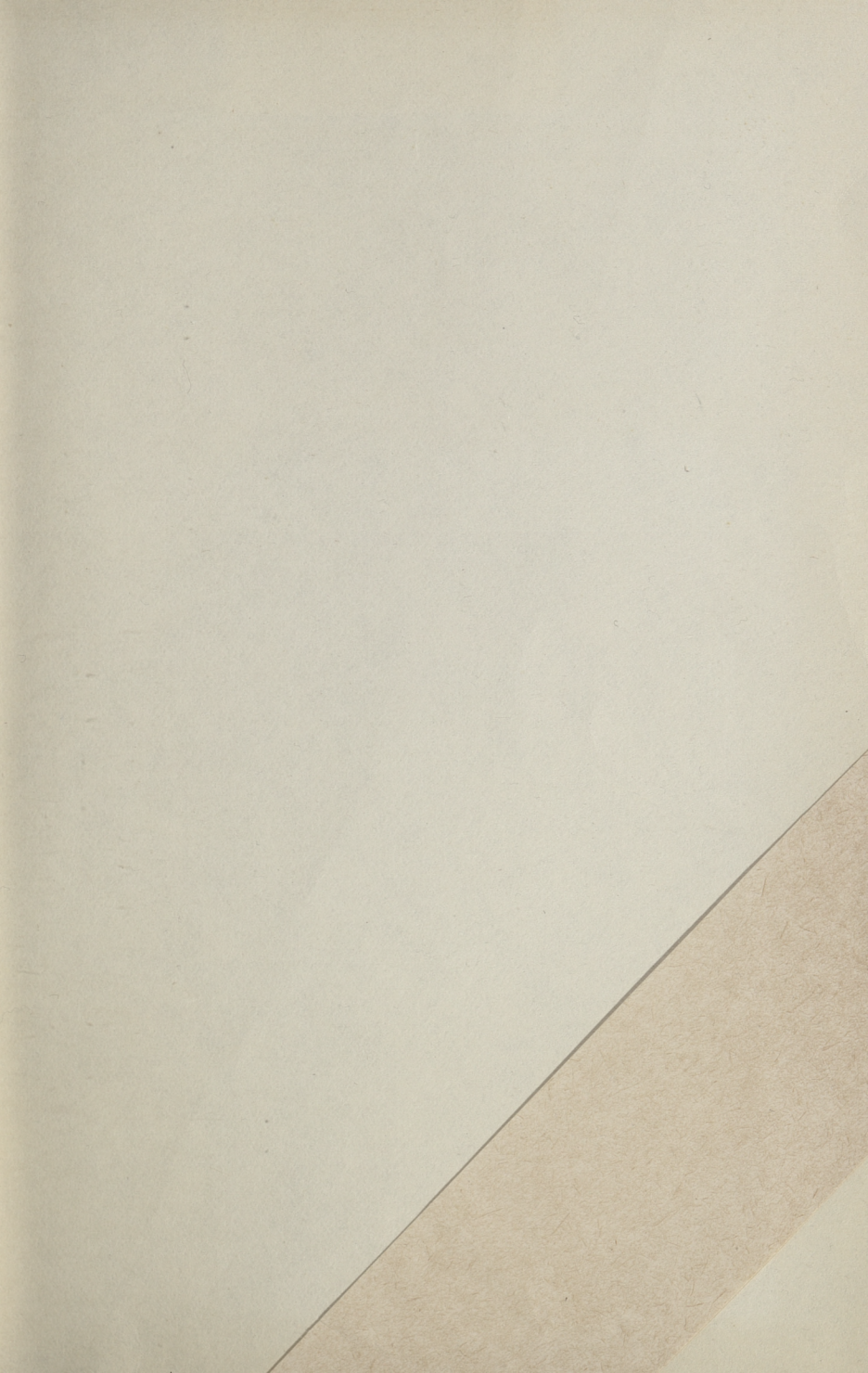
Effect of Low Energy Laser Irradiation on the Immobilisation of Poppy Plant Cell Tissue

Abstract

Immobilisation of poppy plant cells in porous polyurethane after low energy laser irradiation has been investigated. It has been shown that during the first month of cultivating metabolic activity and coefficient of the irradiated cells are considerably larger than analogous parameters of unirradiated immobilized cells. The parameters of cultivating irradiated biocatalysts in cultivators of two types - circle-down and nozzle-cone retorts - have been compared.

С о д е р ж а н и е

1.	М.А. Курвитс, Э.Х. Сиймер. Новый термохимический метод определения α - и β -циклодекстринов.....	3
2.	Р.А. Вокк, Й. Штейгхардт. Характеристика ферментного комплекса <i>V. fischeri</i> и применение его при получении циклодекстринов. VI	12
3.	Э. Пейпман, К. Ванаталу. Характеристика ферментного комплекса <i>V. fischeri</i> и применение его при получении циклодекстринов. VII.....	28
4.	К.Э. Паппель, Э.М. Пейпман. Очистка циклодекстринглюканотрансферазы методом сорбции на крахмале.....	37
5.	Е.Н. Арбатова, Т.А. Халлинг, М.В. Реэбен. Получение моноклональных антител к циклодекстринглюканотрансферазе <i>V. fischeri</i>	49
6.	А.А. Менерт. Получение комплексов эфирных масел тмина и лаврового листа с бета-циклодекстрином.....	58
7.	Е.А. Королева, Н.Р. Холстинина, И.Р. Саранд. Иммобилизация микроорганизмов для деградации ксенобиотиков...	70
8.	А.К. Абдвахитова. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на процесс иммобилизации растительных клеток мака.....	79



Цена 2 руб. 40 коп.

EESTI AKADEEMILINE RAAMATUKOGU



1 0200 00089729 2