Eg. 6.7
727

ISSN 0868-4081
0868-4146

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI

TOIMETISED

TRANSACTIONS OF TALLINN TECHNICAL UNIVERSITY

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

ПРИКЛАДНЫЕ
БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ
ПРОЦЕССЫ

TALLINN 1991

УДК 577.15:66.097.3

Ответственный редактор М. Миккал

Кафедра органической и биологической
химии 53 21 16
53 21 13

Эхитьяте теэ, 5
Таллинн EE0108
Эстония

© Таллиннский технический университет, 1991

ТТУ,1992,300,102
Руб. 14.10

Ep.6.7

727

ALUSTATUD 1937

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

TRANSACTIONS OF TALLINN TECHNICAL UNIVERSITY

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

G. Химия

ПРИКЛАДНЫЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Биотехнология VI

Под общей редакцией А.И. Кёстнера

TALLINN 1991

Содержание

I. А.И. Кёстнер, У. Клеве. Микрокалориметрическое исследование иммобилизованной инвертазы..... 3

2. A. Käärd, V. Kasche, E. Renken, G.Schietke. Dynamic fluorescence penicillin biosensor for on-line monitoring of benzylpenicillin hydrolysis. 30

3. Н. Холстинина, А. Кяэрд. Иммобилизация метаболически активных клеток. I Включение Pseudomonas putida в криогели поливинилового спирта.. 23

4. Т. Рандла, М. Креэн. Получение катионного производного крахмала..... 30

5. Е.Н. Арбатова, М.В. Реэбен. Изучение иммобилизованной при помощи моноклональных антител циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТ-азы) Bacillus macerans микрометод для определения ЦГТ-азной активности..... 40

6. К.Э. Паппель, Э.М. Пейпман. Иммобилизация циклодекстринглюканотрансферазы.... 49

7. Э. Пейпман, К. Ванаталу, М. Кирме. Биосинтез циклодекстринглюканотрансферазы при культивировании Bacillus macerans на различных питательных средах..... ... 58

8. А. Менерт. Получение комплекса эфирного масла тмина с бета-циклодекстрином методом экстрагирования..... 69

9. Г. Калбин. Получение ионотропных гелей карбоксиметилцеллюлозы.... 81

Eesti TA Raamatukogu
Tallinn

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 577.154.21.022:536.629.7

А.И. Кёстнер, У. Клеве *

МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ИНВЕРТАЗЫ

Микрокалориметрию можно считать универсальной методикой исследования биокаталитических реакций. В лаборатории биотехнологии ТТУ этим методом определены кинетические параметры действия некоторых гидролаз при глубокой конверсии субстратов [1, 2].

При переходе от исследования гомофазных систем к иммобилизованным биокатализаторам можно ожидать возникновения дополнительных технические трудностей при проведении реакций и интерпретации результатов. Преодоление этих трудностей обещает создать универсальный чувствительный метод для исследования кинетики действия мультиферментных иммобилизованных систем, в частности гетерофазных биокатализаторов на основе иммобилизованных метаболически активных клеток. Для достижения этой цели необходимо проработать условия проведения в микрокалориметре более простых биокаталитических реакций.

Целью настоящей работы было исследование простой гетерофазной биокаталитической реакции путем измерения теплового потока от колоночного реактора, помещенного в микрокалориметр. Объектом исследования выбрана инвертаза (КФ 3.2.1.26). Иммобилизация этого фермента хорошо изучена.

В нашей лаборатории разработаны методы получения активных и стабильных препаратов иммобилизованной инвертазы.

---

* ассистент Высшей технической школы г. Кётхен, Германия.
Работа выполнена во время стажировки в ТТУ.

Реакция гидролиза сахарозы связана с достаточно высоким тепловым эффектом ($\Delta H = 20$ кДж/М), что облегчает исследование системы калориметрическим способом. Разработка методов микрокалориметрического исследования гидролитических ферментов может быть основой для создания подобных систем с иммобилизованными оксидоредуктазами и метаболически активными клетками.

Материалы и методы

Эксперименты проведены с помощью микрокалориметра LKB 2277 при температуре 30 °С. Для исследований гетерофазных процессов построена микроколонка из нержавеющей стали с объемом 5 мл, которая помещается в измерительном канале микрокалориметра. Проток субстрата через колонку направлением снизу вверх обеспечивается перистальтическим насосом через трубки, помещенные в измерительный канал. Для уравновешивания температуры субстрата в подающий путь субстрата установлен дополнительный теплообменник (колонка с инертным наполнителем). Скорость подачи субстрата варьировали в пределах 2–20 мл/ч.

Субстратом служили растворы сахарозы в 0.05 и ацетатном буфере с pH 4.7. Использованы растворы с концентрацией 5–60 % по массе (0.15–2.1 мол).

Концентрацию восстанавливающих продуктов определяли окислением щелочным комплексом меди.

Иммобилизованная инвертаза представлена сотрудником кафедры Г.Г. Калбиным. Катализатор получен иммобилизацией высушенных дрожжевых клеток в ионотропном геле карбоксиметилцеллюлозы. Оригинальный метод иммобилизации разработан в сотрудничестве нашей лаборатории с Институтом микробиологии АН Латвии [3]. Катализатор имел активность 370–550 Е/г.

Результаты и обсуждение

На первом этапе экспериментальной работы исследовалось изменение измеряемого потока теплоты при изменении концентрации и скорости подачи субстрата. Как можно было

ожидать, для любого режима работы системы устанавливается стационарное состояние, при котором поток тепла от реактора постоянен. Этот стационарный уровень тепловыделения поддерживается в течение длительного времени без существенных колебаний. Измеряемый уровень теплового потока был на уровне 100–1100 мкВт, что можно считать весьма подходящей величиной для данного типа микрокалориметра. Однако в начале экспериментов и при переходе к новому режиму работы системы (увеличение концентрации или скорости подачи субстрата) практически всегда наблюдалось временное повышение теплового потока над уровнем последующего стационарного состояния. Длительность повышенного тепловыделения была в пределах 1–2 часов, максимум тепловыделения до 130 % от стационарного состояния (до 300 мкВт в абсолютной шкале). Приблизительный интеграл над стационарным тепловыделением был на уровне 100 мДж. Для оценки значимости такого количества теплоты целесообразно знать содержание активных центров инвертазы в исследуемой системе.

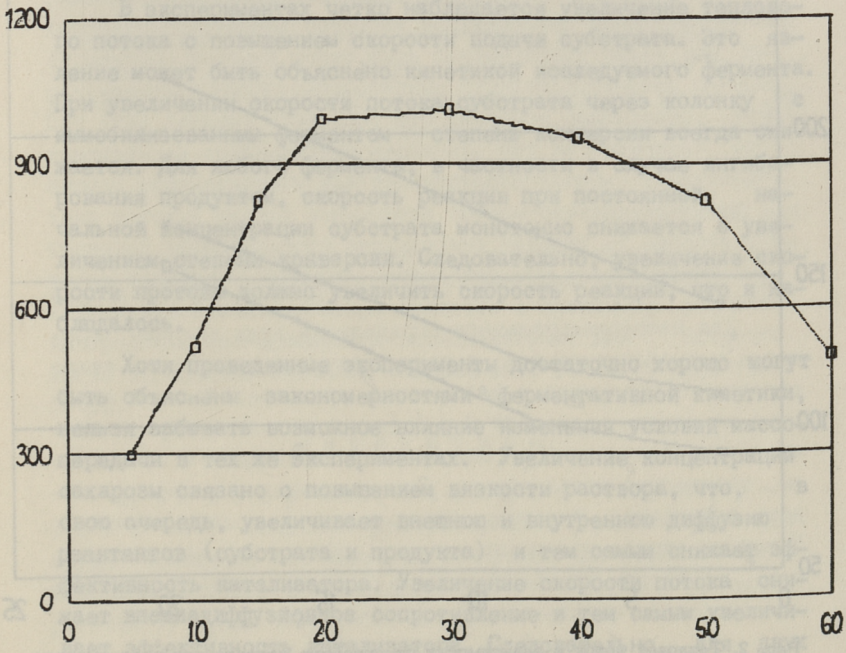


Рис. 1. Тепловой поток (мкВт) в зависимости от концентрации субстрата (% по массе).

Суммарная активность катализатора на уровне 500 Е соответствует количеству инвертазы около I мг, что в свою очередь должно соответствовать около 10^{-8} м активных центров. Следовательно, количество надстационарного тепловыделения находится на уровне 100 кДж/мол. Это значение слишком высоко для тепловыделения за счет дополнительного комплексообразования между субстратом и активным центром. В качестве альтернативных объяснений этого эффекта можно учитывать тепловыделение за счет адсорбции сахарозы на неактивной части катализатора (матрица клеток и носитель) или повышенную активность катализатора в предстационарных условиях. Для обоснованного объяснения наблюдаемого эффекта требовалось бы проведение соответствующих экспериментов. Решение этой задачи не вошло в программу нашей работы, и в дальнейших расчетах мы учитывали лишь стационарные состояния тепловыделения.

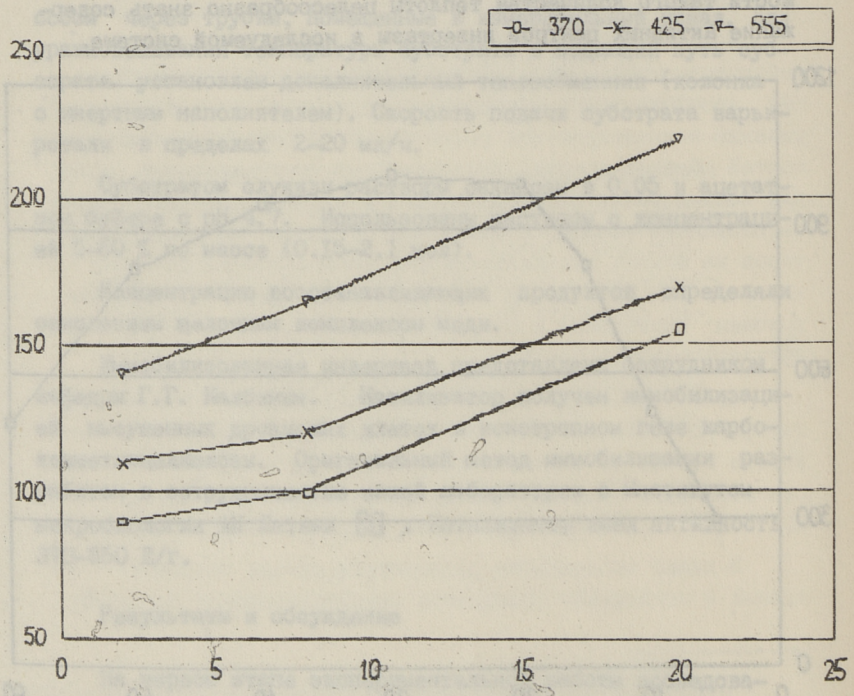


Рис. 2. Тепловой поток в зависимости от скорости протока при разных активностях катализатора.

Следующая серия опытов была поставлена с целью выявления интенсивности тепловыделения от концентрации субстрата. Соответствующие эксперименты были проведены с загрузкой 555 Е катализатора при скорости подачи субстрата 8 мл/в. Результаты приведены на рис. I.

Полученные данные показывают наличие максимума тепловыделения при концентрации субстрата 20–40 %. Эти данные хорошо соответствуют общим закономерностям действия инвертазы. Потом фермент ингибируется субстратом и продуктами, что приводит к снижению скорости реакции при повышенных концентрациях субстрата.

Для характеристики системы необходимо выяснить зависимость теплового потока от скорости подачи субстрата. Для этого были проведены эксперименты при концентрации субстрата 55 %, с использованием скорости подачи в пределах 2–20 мл/ч. Систему исследовали при трех разных загрузках инвертазы. Результаты экспериментов приведены на рис. 2.

В экспериментах четко наблюдается увеличение теплового потока с повышением скорости подачи субстрата. Это явление может быть объяснено кинетикой исследуемого фермента. При увеличении скорости потока субстрата через колонку с иммобилизованным ферментом степень конверсии всегда снижается. Для любого фермента, в частности в случае ингибирования продуктом, скорость реакции при постоянной начальной концентрации субстрата монотонно снижается с увеличением степени конверсии. Следовательно, увеличение скорости протока должно увеличить скорость реакции, что и наблюдалось.

Хотя проведенные эксперименты достаточно хорошо могут быть объяснены закономерностями ферментативной кинетики, нельзя забывать возможное влияние изменения условий массопередачи в тех же экспериментах. Увеличение концентрации сахарозы связано с повышением вязкости раствора, что, в свою очередь, увеличивает внешнюю и внутреннюю диффузию реактантов (субстрата и продукта) и тем самым снижает эффективность катализатора. Увеличение скорости потока снижает внешнедиффузионное сопротивление и тем самым увеличивает эффективность катализатора. Следовательно, для двух описанных серий опытов эффекты кинетики и массопередачи

имеют в принципе одинаковый эффект, который проявляется в изменении фактической активности биокатализатора. В первую очередь можно предполагать, что при этом не происходит изменения тепловой эффективности системы. В этом случае мы можем утверждать, что созданная экспериментальная система адекватно реагирует на изменение фактической (наблюдаемой) активности иммобилизованного биокатализатора.

Для количественной характеристики результатов исследуемой микрокалориметрической системы необходимо также исследовать ее тепловую эффективность.

Тепловая эффективность системы может быть вычислена как соотношение

$$\eta = N_C / N_R , \qquad (I)$$

где η – коэффициент тепловой эффективности,
N_C – тепловой поток, измеряемый калориметром,
N_R – тепловой поток от процессов в реакторе (главным образом химические реакции и адсорбция).

Коэффициент η может быть значительно ниже единицы за счет отвода части теплоты через соединяющие трубопроводы, а также отходящим раствором. Приблизительный тепловой баланс системы может быть описан

$$N_R = N_C + N_T + N_W , \qquad (2)$$

где дополнительно

N_T – тепловая мощность, отходящая через трубопроводы,
N_W – тепловая мощность, отводимая реакционным раствором.

Для экспериментального определения этих величин проведен ряд экспериментов, в ходе которых определялось также содержание продуктов в реакционном растворе. Из этой величины на основе известной ΔH для гидролиза сахарозы вычислялось значение N_R. Эксперименты проведены с изменением количества катализатора, концентрации и скорости подачи субстрата. Эксперименты проводились в двух вариантах. В первом случае применялся упакованный в мешочек катализатор, во втором случае в реактор была загружена неупакованная суспензия катализатора.

В первом случае концентрация катализатора равнялась 50 %, варьировали общую активность катализатора и ско-

рость протока. В этой серии экспериментов (всего 9 экспериментов) тепловая мощность была в пределах 90–120 мкВт, η была в пределах 0.09–0.14, среднее значение 0.15, квадратичное отклонение 0.020, корреляции между скоростями протока и η не наблюдалось. Во второй серии экспериментов загрузка 555 Е активности, скорость протока равнялась 9 мм/г. Концентрацию субстрата варьировали в пределах 5–40 %. Всего проведено 12 экспериментов. N_c была в пределах 300–1050 мкВт, коэффициент η в пределах 0.32–0.97, среднее 0.74, квадратичное отклонение 0.22.

Сравнение результатов этих серий доказывает значительную зависимость тепловой эффективности от способа заполнения реактора. Для достижения высоких значений η необходима однородная упаковка биокатализатора в реакторе. В этом случае достигаются вполне приемлемые значения η (свыше 0.9).

В итоге можно утверждать, что предложенный микрокалориметрический метод является достаточно чувствительным и воспроизводительным способом исследования иммобилизованных ферментов, который может быть рекомендован также для характеристики других гетерофазных биокаталитических реакций. При этом следует отметить, что тепловое равновесие устанавливается сравнительно медленно, что не позволяет этот способ рекомендовать для исследований систем, характеристика которых быстро изменяется во времени. Коэффициент тепловой эффективности значительно зависит от способа упаковки колонки. Поэтому необходимо при исследовании неизвестного биокатализатора провести в сравнимых условиях контрольные эксперименты с катализатором, для которого легко определить значение коэффициента тепловой эффективности.

Литература

1. Сиймер Э.Х., Паппель К.Э., Курвитс М.А. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение XI. Кинетика реакторов при ферментативном гидролизе лактозы в сыворотке молока и продуктах ее переработки // Труды ТТУ. 1988. № 663. С. 42–50.

2. Курвитс М.А., Сиймер Э.Х. Соединения включения β-циклодекстрина с бензиловым спиртом // Труды ТГУ. 1989. № 888. С. 73-78.

3. Заяв. № 4681869/13(021018). Приор. от 07.02.89. Кестнер А.И., Калбин Г.Г., Беккер М.Е., Блумбергс Я.Э., Лайвениекс М.Г., Лаукевиц Я.Я., Посметный Ю.Э., Данилевич А.Ф. Способ получения иммобилизованных пекарских дрожжей Saccharomyces cerevisiae.

A. Köstner, U. Klewe

Immobiliseeritud invertaasi mikrokalorimeetriline uurimine

Kokkuvõte

Mikrokalorimeetri LKB 7722 jaoks konstrueeriti mikrokolonn tööks seadme tundlikus tsoonis. Biokatalüsaatorina kasutati ionotroopsesse karboksümetüültselluloosi geeli immobiliseeritud pärmirakke. Katalüsaatori invertaasaktiivsus oli 370-550 U/g. Kalorimeetri poolt mõõdetav soojusvoog läbib enne statsionaarset faasi maksimumi, mille integreerimine annab täiendava soojusefekti umbes 100 mJ 1 g katalüsaatori kohta. Mikrokolonni mõõdetava soojusefekti kontsentratsioonisõltuvus on analoogiline invertaasi aktiivsuse vastava sõltuvusega. Mõõdetav soojusefekt kasvab substraadi läbivoolukiiruse kasvades. Mõõtesüsteemi soojuslik kasutegur sõltub katalüsaatori pakkimise viisist ja võib olla suurem kui 0,9. Kirjeldatud süsteemi võib soovitada keerukamate heterofaassete biokatalüütiliste protsesside uurimiseks.

A. Köstner, U. Klewe

Microcalorimetric Measurements of Immobilized Invertase

Abstract

A microcolumn for the operation in the active zone of the LKB 7722 microcalorimeter has been constructed. Yeast cells immobilized by means of the entrapment in ionotropic carboxymethyl cellulose gel with invertase activity 370-550 U/g have been investigated. The registered heat flow exhibits a maximum before reaching the stable stationary state. The integrated amount of this extra heat is about 100 mJ per a gram of the catalyst. The stationary heat flow depends on the substrate concentration in the same way as the corresponding invertase activity. The measured heat flow increases at the higher substrate flow rates. The heat yield when compared with the calculated thermal effect depends on the method of the catalyst loading and can exceed 0.9. The described microcalorimetric system may be recommended also for the investigation of the heterogeneous biocatalyst with complex activity.

No 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED
TRANSACTIONS OF TALLINN TECHNICAL UNIVERSITY

UDC 577.15.082

A. Käärd, V. Kasche, E. Renken, G. Schietke

DYNAMIC FLUORESCENCE PENICILLIN BIOSENSOR FOR ON-LINE MONITORING OF BENZYLPENICILLIN HYDROLYSIS

Enzymatic hydrolysis of benzylpenicillin (BP) to 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and phenylacetic acid (PAA) with the help of penicillin amidase (PcA) is an important procedure for the production of semisynthetic penicillins. 6-APA is highly unstable in time and needs a method of rapid analysis. Alternatively HPLC or penicillin biosensors can be used for the same aim.

According to their mechanism of signal generation, biosensors may be classified as either integral or dynamic. In integral biosensors the analyte is converted quantitatively to a product, and the concentration of the latter is determined by a suitable sensor. In dynamic biosensors the analyte generates a concentration gradient in the immediate vicinity of the sensor. Only a small fraction of the compound in the sample is actually converted to the product, thus resulting a faster response as a rule. The spatial and/or temporal concentration gradient of the analyte or of one of its products is used as a measure of the unknown analyte concentration [1].

Signal generation in dynamic biosensors based on fluorescence is a two-step process. The formation of the gradient is a biochemical/physical process that depends on such dynamical properties as mass transfer, enzyme catalyzed reaction rates, and electrochemical modifications of the local environment of a molecule. It leads to a change of the optical properties (absorption cross-section, quantum-yield, fluorescence lifetime) of the fluorescent molecules [2-4]. In the second step this variation is converted to an electrical output signal. This process is

determined by the efficiency of interaction of the fluorescent molecules and the light field of excitation, but also by the geometry of light-collection, by the characteristics of the optics used, and by the limitations due to noise and dark current of the detector.

Recently several BP-biosensors with penicillin amidase have been described [1, 5]. Their application for the analysis of bioprocesses has only been studied for the production of BP in fermenters [6]. In the following the application of a fluorescence based pH-dependent fibre-optic penicillin flow biosensor for the control of the hydrolysis of benzylpenicillin is presented (see Fig. 1).

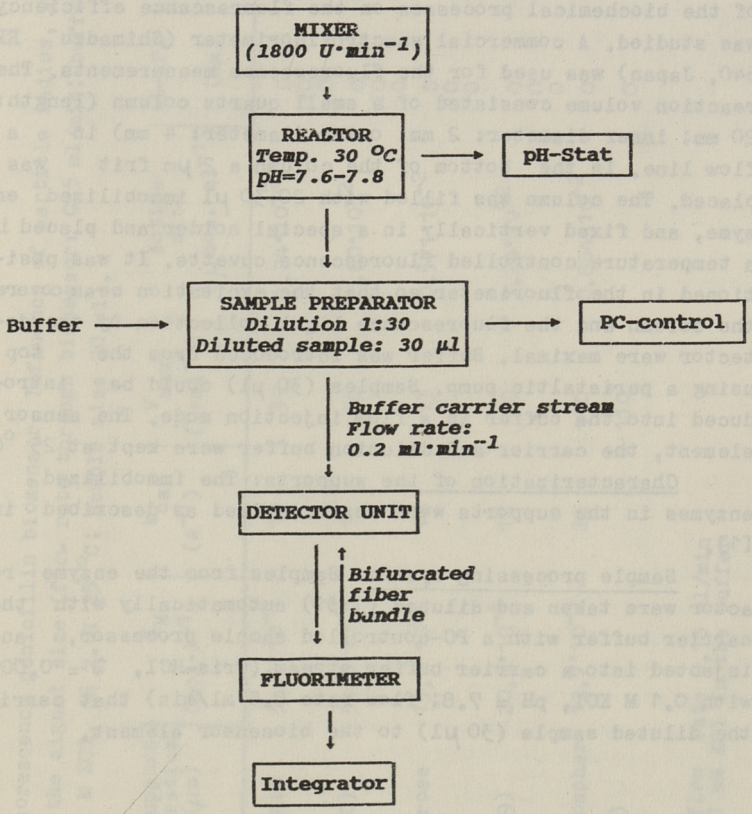


Fig. 1. Sample processing system.

Materials and methods

Materials: Purified PcA from E. coli ($PcA_{7.0}$) was immobilized to Eupergit C (Röhm) and to CNBr-activated Sepharose (Pharmacia-LKB, Sweden) [1]. The immobilization tc Lichrospher (E. Merck, Germany) was performed as described in [1]. Fluoresceinisothiocyanate isomer I (FITC) was obtained from Fluka, Germany, aminofluorescein isomer I (AF) from Aldrich, USA. There fluorochromes were bound directly to the immobilized enzyme (FITC) or to the support. BP, PAA and 6-APA were obtained from Sigma, USA.

Biosensor: In the present investigation the biosensor action was studied in bulk-optical form, and the influence of the biochemical processes on the fluorescence efficiency was studied. A commercial spectrofluorimeter (Shimadzu RF 540, Japan) was used for the fluorescence measurements. The reaction volume consisted of a small quartz column (length: 20 mm; inner diameter: 2 mm; outer diameter: 4 mm) in a flow line. In the bottom of the column a 2 μm frit was placed. The column was filled with 20-30 μl immobilized enzyme, and fixed vertically in a special holder and placed in a temperature controlled fluorescence cuvette. It was positioned in the fluorimeter so that the excitation beam covered the column and the fluorescence light collection by the detector were maximal. Buffer was introduced from the top using a peristaltic pump. Samples (30 μl) could be introduced into the buffer in a flow injection mode. The sensor element, the carrier and dilution buffer were kept at 25 °C.

Characterization of the supports: The immobilized enzymes in the supports were characterized as described in [1].

Sample processing system: Samples from the enzyme reactor were taken and diluted (1:30) automatically with the carrier buffer with a PC-controlled sample processor, and injected into a carrier buffer stream (Tris-HCl, $\mathfrak{I}$ = 0.001, with 0.1 M KCl, pH = 7.8; flow rate 0.5 ml/min) that carried the diluted sample (30 μl) to the biosensor element.

Table 1

Fluorescence penicillin biosensor. Influence of particle radius, v_{max} and product inhibition on the signal size (flow rate through biosensor: 0.5 ml/min; buffer; Tris-HCl [J=0.001], 0.1 M KCl, pH 7.0; 25 °C; sample size 20 µl).

Support (radius) (µm)	K_M ($mol \cdot l^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	V_{max} ($U \cdot ml^{-1}$)	Active site ($\mu mol \cdot ml^{-1}$)	6-APA (mM)	PAA (mM)	Signal size (% of initial fluorescence) penicillin G 10 mM	1 mM
Eupergit	$34.0 \cdot 10^{-5}$	10	39	$1.24 \cdot 10^{-2}$	0	0	33	7.4
					10	0	27	6.3
					0	10	24	4.7
(80)	$34.6 \cdot 10^{-5}$	11	65	$1.60 \cdot 10^{-2}$	0	0	45	8.6
					10	0	39	8.6
					0	10	36	6.0
Sepharose	$15.0 \cdot 10^{-5}$	16	13	$0.571 \cdot 10^{-2}$	0	0	51	19
					10	0	42	14
					0	10	46	15
(39)	$20.6 \cdot 10^{-5}$	18	60	$1.24 \cdot 10^{-2}$	0	0	85	33
					10	0	79	26
					0	10	81	28
Lichrospher*	$12.7 \cdot 10^{-5}$	28	110	$0.864 \cdot 10^{-2}$	0	0	6	1
(5)			110*		0	0	12	1

* flow rate 0.15 ml/min
** 1 mM KCl in the buffer

Results and discussion

Results of the study of the influence of immobilization method, particle size, V_{max}, active site and product inhibition on the fluorescence signal intensity of the biosensor are summarized in Table 1. Among the carriers Sepharose-PcA-FITC, PcA-Sepharose-AF, Eupergit-PcA-FITC, PcA - Eupergit-AF and Lichrospher-PcA-FITC the best signal generation was observed in the case of Sepharose and in the system, where the fluorochrome was coimmobilized with penicillinamidase PcA-Sepharose-AF. The observed signal (change of the fluorescence intensity) can be converted to a pH change by using Fig. 2. The concentration gradient formed can be estimated using Eq. (3).

$$\Delta pH = \frac{\Delta C}{\beta}; \quad \Delta C = \frac{2 \cdot R^2}{3 \cdot D \cdot Sh} \cdot \eta_s \cdot \frac{V_{max} \cdot P}{(K_m[1+Cp/Kp]+C_{s,b})} \cdot C_{s,b} \quad (3)$$

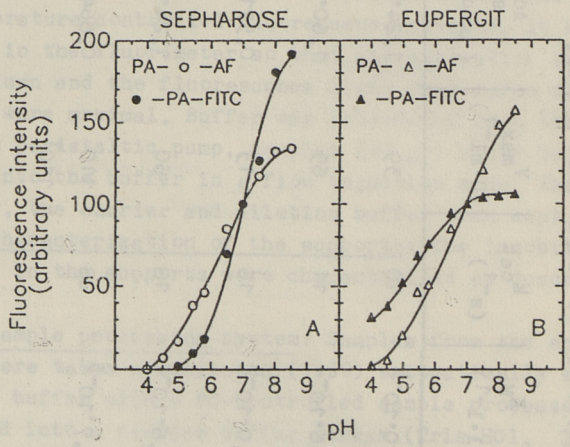


Fig. 2. pH response curve of different supports with different immobilization techniques of the fluorochrome. Buffers (I = 0.001, 0.1 M KCl) were pumped through the column with a flow rate of 0.5 ml/min, until reaching stationary signal.

β = buffer capacity; R = particle radius (μm); D = diffusion coefficient of substrate or product ($m^2 \cdot s^{-1}$); Sh=Sherwood number; η_s = steady-state stationary effectiveness factor; $\bar{C}p$ = product concentration ($mol \cdot l^{-1}$); Kp = dissociation constant for the binding of the product to the enzyme ($mol \cdot l^{-1}$); P = particle porosity ($ml \cdot ml^{-1}$); V_{max} = biocatalyst density (U/ml).

For Eupergit as a support with a radius particles twice the signal expressed as pH change is practically independent of the amount of enzyme immobilized (if V_{max} value is > 30 U/ml). In this case the rate of mass transfer is the limiting step in the signal generation. For Eupergit and Sepharose systems similar pH changes were observed at V_{max} $\approx$ 60 U/ml (Fig. 3). It follows from Eq. (3) that the signal of Eupergit system is decreased due to the lower values of the steady state effectiveness factor η_s and diffusion coefficient of the product Dp, and due to the larger Km value determined for these biocatalysts. The low values of Dp also cause the observed Km increase in the response time (Fig. 3).

For the Lichrospher particles with V_{max} $\approx$ 110 U/ml the signal was found to be much lower as in the case of the other matrices. This is mainly due to the lower particle radius (~5 μm) (Eq. [3]). The signal observed here is the steady state signal (Fig. 4).

For the measurements of BP hydrolysis on an industrial scale sample processing system shown in Fig. 1 was built. The signal from the BP-biosensor as a function of the hydrolysis time is given in Fig. 5. The calibration curve given in Fig. 6 shows that the biosensor can be used for controlling the reaction up to 98-99 % hydrolytic conversion.

At this high degree of hydrolysis (and generally for all biosensors that measure substrate concentrations) product inhibition cannot be neglected. Taking this into account the biosensor system was calibrated with different solutions of BP and the products of the hydrolysis, 6-APA and PAA. These substances were used in the concentrations, found in the end of the hydrolysis process (5 mM BP + 295 mM 6-APA + 295 mM PAA).

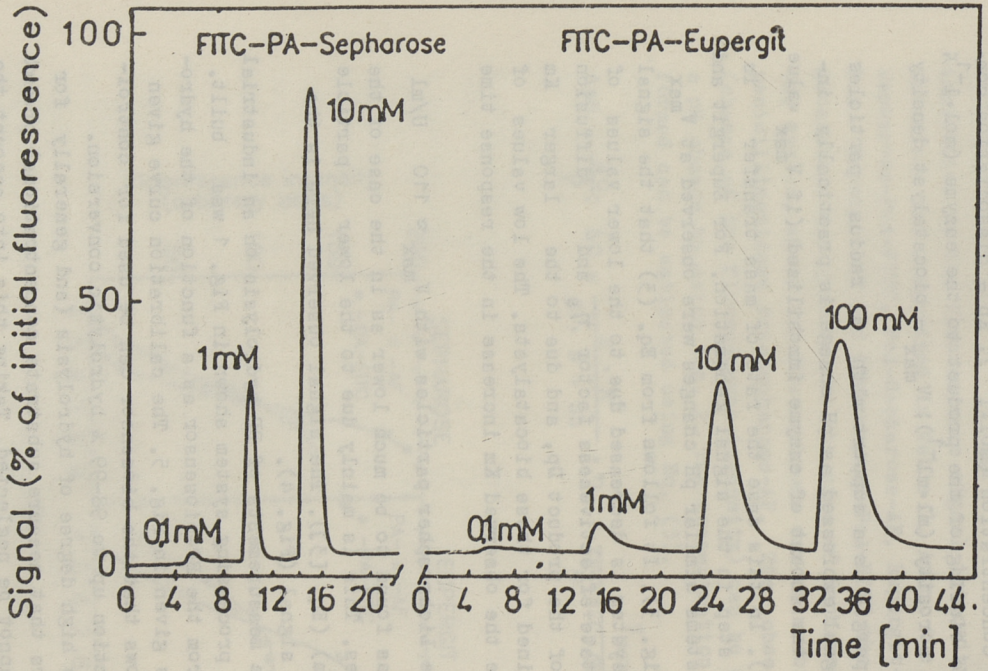


Fig. 3. Influence of the particle size on the signal: comparison between Pca-FITC-Sepharose (V_{max} = 60 U/ml) and PcA-FITC-Eupergit (V_{max} - 50 U/ml). Samples (20 µl) of different BP-concentrations were injected into the buffer stream (Tris-HCl, ℑ = 0.001, pH = =7.0 and 0.1 M KCl; flow rate 0.5 ml/min, 25 °C).

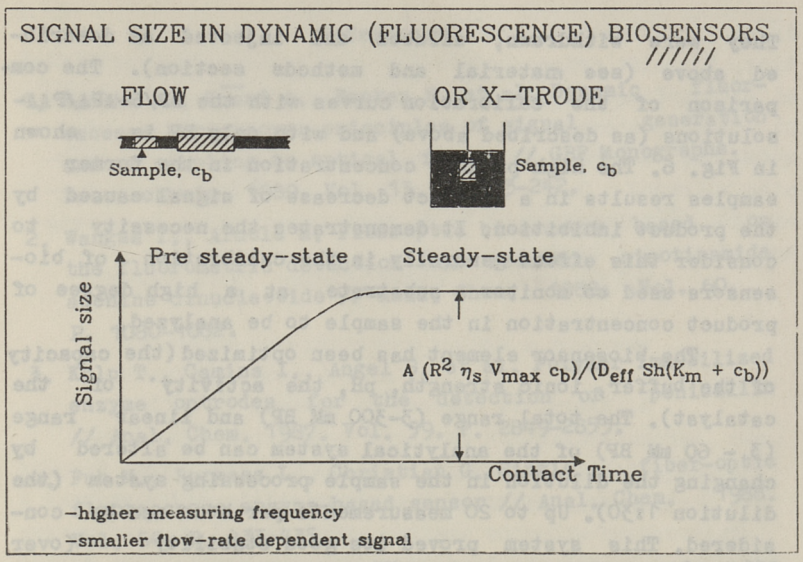


Fig. 4. Signal size in dynamic (fluorescence) biosensors.

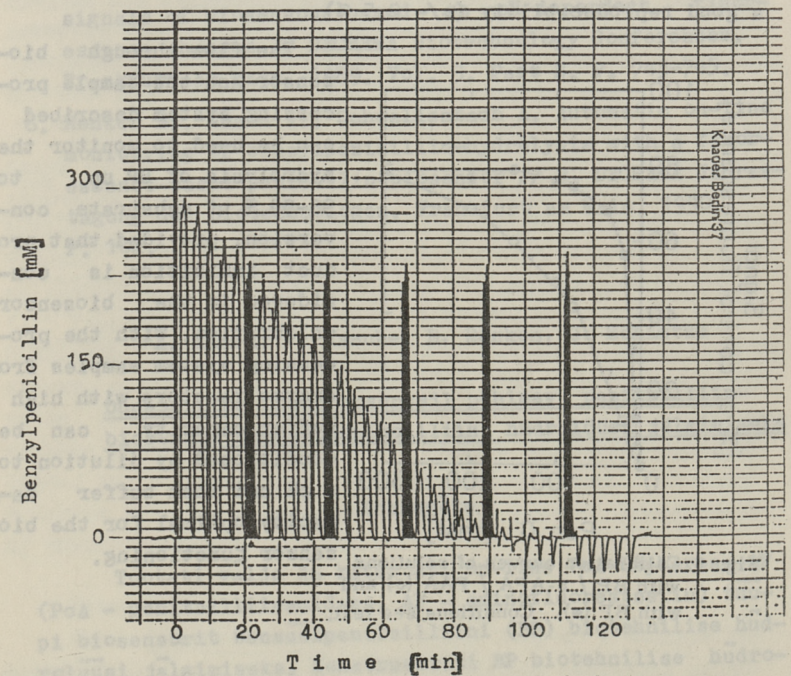


Fig. 5. Signals from samples taken from the hydrolysis process with the processing system and measured with the BP flow biosensor. (■) = calibration solution (80 mM BP + 220 mM 6-APA + 220 mM PAA).

They were withdrawn, diluted and injected as described above (see material and methods section). The comparison of the calibration curves with the BP/6-APA/PAA-solutions (as described above) and with only BP is shown in Fig. 6. The high product concentration in the former samples results in a distinct decrease of signal caused by the product inhibition. It demonstrates the necessity to consider this effect generally in the calibration of biosensors used to monitor a substrate at a high degree of product concentration in the sample to be analyzed.

The biosensor element has been optimized (the capacity of the buffer, ionic strength, pH, the activity of the catalyst). The total range (3-300 mM BP) and linear range (3 - 60 mM BP) of the analytical system can be altered by changing the dilution in the sample processing system (the dilution 1:30). Up to 20 measurements per hour can be considered. This system proved its good stability (over several months with a slight loss of activity >10 %) and a good reproducibility (+/- 2.5 %).

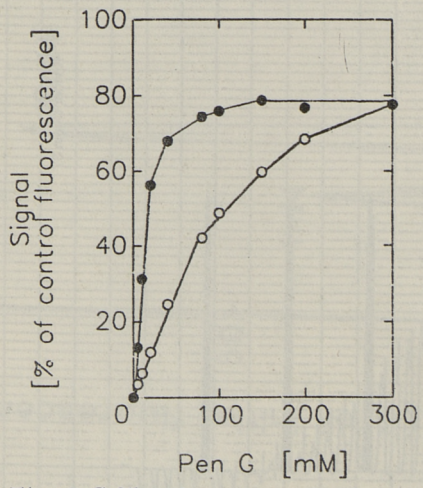


Fig. 6. Calibration curves of solutions with BP / 6-APA / PAA (o) and with BP (●). Conditions see text.

The flow through biosensor and the sample processing system described can be used to monitor the hydrolysis of BP up to 98-99 % of substrate conversion, provided that product inhibition is considered in the biosensor calibration. With the processing system samples from enzyme reactors with high buffer capacity can be conditioned by dilution to a pH and then buffer capacity optimal for the biosensor functioning.

References

1. Kasche V., Käärd A., Renken E. et al. Dynamic fluorescence biosensors: principles of signal generation and of coupling to optical fibers // GBF Monographs. Braunschweig. 1989. Vol. 13. P. 233-242.

2. Wangsa I., Arnold M. Fiberoptic biosensors based on the fluorometric detection of reduced nicotinamide adenine dinucleotide // Anal. Chem. 1988. Vol. 60. P. 1080-1082.

3. Kulp T., Camins I., Angel S. et al. Polymer immobilized enzyme optrodes for the detection of penicillin // Anal. Chem. 1987. Vol. 59. P. 2849-2853.

4. Fuh M., Burgess L., Christian G. Single fiber-optic fluorescence enzyme-based sensor // Anal. Chem. 1988. Vol. 60. P. 433-435.

5. Renken E., Kasche V., Käärd A. Optimization of the signals of biosensors based on pH-dependent fluorescence changes // DECHEMA Biotechnology Conferences. Frankfurt am Main. 1989. Vol. 3. Part B. P. 743-745.

6. Renken E., Käärd A., Schwellenbach A. Automatic on-line monitoring of benzylpenicillin-hydrolysis with a fluorescence-based penicillin-biosensor // 8. DECHEMA Jahrestagung der Biotechnologen. Frankfurt am Main. 1990. P. 102.

A. Käärd, V. Kasche, E. Renken, G. Schietke

Dünaamiline fluoresetsentsil põhinev penitsilliin-biosensor bensüülpenitsilliini hüdrolüüsi jälgimiseks

Kokkuvõte

Töötati välja ja katsetati on-line PcA-Sepharose-AF (PcA - penitsilliinamidaas, AF - aminofluorestseiin) tüüpi biosensorit bensüülpenitsilliini (BP) biotehnilise hüdrolüüsi jälgimiseks. Konstrueeriti BP biotehnilise hüdro-

luusi ja automaatse analüüsi süsteem, mis on juhitav arvutiga. Võrreldi erinevatele kandjatele seatud penitsilliini amidaasi preparaate. Sobivaim on PcA-Sepharose-AF tüüpi biosensorelement: BP kontsentratsiooni mõõtmise piirkond 0,1 - 10 mM, BP kontsentratsiooni lineaarse mõõtmise piirkond 0,1 - 2 mM, maksimaalne mõõtmiste arv tunnis 20, mõõtmiste täpsus ±2 %, biosensorelemendi kasutamisaeg vähemalt 2 kuud.

A. Käärd, V. Kasche, E. Renken, G. Schietke

Dynamic Fluorescence Penicillin Biosensor for On-line Monitoring of Benzylpenicillin Hydrolysis

Abstract

An on-line PcA-Sepharose-AF (PcA-penicillin amidase, AF-aminofluorescine) type biosensor for monitoring biotechnical hydrolysis of benzylpenicilline (BP) has been elaborated and tested. A computer-control system for BP biotechnical hydrolysis and automatic analysis has been designed. Penicilline amidase preparations immobilized to various supports have been compared. The most suitable is PcA-Sepharose-AF type biosensor element: BP concentration measurement range - 0.1 - 10 mM, linear range of BP concentration measurement - 0.1-2 mM, maximum number of measurements per hour - 20, measurement precision - ± 0.2 %, duration of using biosensor element - not less than 2 months.

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 577.151.042

Н. Холстинина, А. Кяэрд

ИММОБИЛИЗАЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КЛЕТОК

I. Включение Pseudomonas putida в криогели поливинилового спирта

Основным направлением развития биокаталитических технологий можно в настоящее время считать разработку систем, в которых применяются иммобилизованные метаболически активные клетки. Только такие системы способны осуществлять полный синтез органических соединений или полную деградацию вредных для окружающей среды органических отходов. Основой действия таких биокатализаторов нового направления является функционирование основных путей метаболизма в иммобилизованных клетках.

Основным и наиболее распространенным методом иммобилизации клеток с сохранением их жизнеспособности является включение в гелевые системы. Наряду с давно известными методами включения (полимеризация акриловых мономеров, ионотропная гелификация полисахаридов) в последнее время весьма интересные результаты получены с применением криогелей [1]. Химическая нейтральность и стабильность применяемых полимеров, отсутствие воздействия мономеров и инициаторов на клетки, стабильность гелей в широком диапазоне солевого состава обрабатываемого раствора, возможность повторного применения полимера – все это можно считать основными преимуществами этого сравнительно малоизученного метода. Поэтому основное внимание в проведенной работе уделено именно методу криогелификации.

Материалы и методы

Штамм Pseudomonas putida PaW 85 получен с кафедры генетики Тартуского университета. Метаболизм бензойной кисло-

ты этим штаммом происходит по β-кетоадипатному пути. Ферменты данного пути кодируются хромосомными генами.

Клетки Pseudomonas putida PaW 85 выращивали в проточной культуре, используя систему ферментер (LKB Ultraterm, Швеция) и микрокомпьютер (Apple II, США). Выращивание проведено в лаборатории молекулярной генетики ИХБФ (Института химической и биологической физики). Условия роста культуры Pseudomonas putida приведены в работе [2]. Концентрации биомассы равнялись 0,4 г/л с активностью нативных клеток около 9,0 Ед/г на бензойной кислоте.

Для получения криогеля использовали поливиниловый спирт (ПВС), ТУ 6-0505-190-80.

В работе использовали толуол (чда), декан (чда), нонан (чда), глутаровый альдегид (ч), бензойную кислоту (чда) фирмы Союзхимреактив, СССР.

Гранулы криогеля ПВС получали на установке криогелификации, которая изготовлена по схеме, предложенной ИНЭОС АН СССР. Установка состоит из двух пришлифованных стеклянных колонн с рубашкой длиной до I м и внутренним диаметром 45 мм. Внизу также на плоском шлифе крепится приемная колба объемом 0,8 л, имеющая рубашку для термостатирования. Колба имеет решетку для сбора гранул, имеется кран для слива органического растворителя из колонны. Охлаждение системы осуществляется криостатом (МК-70, ГДР) в охлажденном до минус I5-30 градусов органическом растворителе. Охлаждающей жидкостью служит этанол 96 %. Колонна заполняется несмешивающимся с водой органическим растворителем и над ее верхним открытым концом устанавливается капельный дозатор. Гранулы криогеля получают подачей капельным дозатором сверху колонны суспензии клеток микроорганизмов в растворе ПВС. По высоте колонны имеется градиент температуры, который зависит от скорости подачи этанола в охлаждающую рубашку. По мере седиментации капель суспензии "клетки -ПВС" в слое органического растворителя происходит замораживание капель с образованием гранул. Полученные гранулы собираются в приемной колбе.

Результаты и обсуждение

Как известно, процесс криоструктурирования зависит как от химической природы полимера и его концентрации в исходном растворе, так и от условий криогелификации (температура, продолжительность выдерживания в замороженном состоянии, скорость охлаждения и др.). Собственно гелеобразование происходит при размораживании гранул, сформованных в установке криогелификации, и от скорости размораживания зависит механическая прочность получаемых частиц.

Нами исследована зависимость механических свойств получаемых гранул с иммобилизованными клетками от: концентрации ПВС, от температуры замораживания, от времени выдержки в замороженном состоянии и от скорости размораживания. Механическая прочность гранул оценивалась органолептически (наощупь).

На основе проведенных исследований по изучению процесса образования криогелей ПВС мы разработали следующую методику иммобилизации клеток:

Готовили водный раствор ПВС, растворяя на водяной бане необходимое количество полимера для получения 16%-ного раствора. В работе использовали полимер со степенью дезацетилирования не менее 97 %, например, ПВС ТУ 6-0505-190-80, ГОСТ 10 779-78. Необходимую степень очистки полимера достигали переосаждением его в метаноле или этаноле. Раствор ПВС охлаждали до комнатной температуры и смешивали с клетками в соотношении 10:1 (по абсолютно сухим веществам). Полученную суспензию отфильтровывали через сито с отверстиями 1 мм.

Суспензию клеток в растворе поливинилового спирта подавали в слой органического растворителя и диспергировали с помощью вибрирующего капилляра. В отличие от систем, в которых формирование криогелей ПВС осуществляется в толуоле, нами в качестве органической несмешивающейся с водой фазы была использована смесь декан-нонан в соотношении 4:1. Удалось показать, что применение алифатических углеводородов вместо ароматических улучшает санитарно-гигиенические показатели процесса без ухудшения качества продукта.

По мере седиментации в органической фазе происходило замораживание гранул. В приемной колбе внизу колонны тем-

пература составляла минус 20 °С. Для образования механически прочных гранул криогеля необходимо провести следующие последовательные операции:

Выдержка в замороженном состоянии для структурирования кристаллов замороженной воды, которые обуславливают образование пространственной сетки получаемого криогеля.

Минимальное время выдержки гранул в замороженном состоянии 4 часа, оптимальное - 24...48 часов. Размораживание. Его скорость больше всего влияет на механическую прочность получаемых криогелей. Оптимальное значение скорости повышения температуры определено на уровне I,2 °С в час.

Полученные гранулы отделяли от растворителя, давали ему испариться, подсушивали гранулы на воздухе при комнатной температуре. Далее гранулы тщательно промывали 0,05 М раствором буферного раствора. На получение гранул криогеля в среднем затрачивали трое суток.

Установлено, что высушивание полученных гранул криогеля при комнатной температуре до постоянного веса с последующим набуханием в воде приводит к уменьшению размеров гранул и увеличению их механической прочности. Однако при этом, с увеличением времени высушивания, уменьшается метаболическая активность иммобилизованных клеток.

В качестве альтернативных способов получения иммобилизованных клеток были испытаны следующие методики иммобилизации:

Суспензирование жизнеспособных клеток в раствор поливинилового спирта с последующей криогелификацией. Дополнительная фиксация клеток иммобилизованных путем обработки 0,5 и I%-ным глутаровым альдегидом.

Установлено, что последующая инкубация в питательной среде увеличивает метаболическую активность иммобилизованных клеток.

Наилучшие результаты были получены при использовании суспензирования: активность иммобилизованных клеток, измеренная по потреблению бензойной кислоты, А=0,I04 Ед/г абс. сухого препарата и сохранение активности после иммобилизации 59,4 %. Дополнительная фиксация дала препарат, с А=0,088 и сохранением активности 52,3 %.

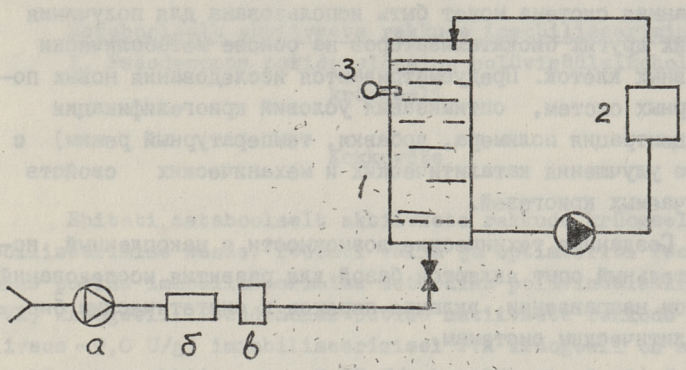


Рис. 1. Схема установки деструкции бензойной кислоты:
1 – термостатированный барботажный реактор,
а, б, в – системоподачи стерильного воздуха,
2 – проточный ультрафиолетовый детектор,
3 – кислородный электрод.

Деструкция бензойной кислоты иммобилизованными клетками Ps. putida проводилась в барботажном реакторе с водяной рубашкой при интенсивной аэрации (см. рис. I). Объем реактора составляет I литр. Субстратом является раствор бензойной кислоты 5 мМ в 0,005 М фосфатном буфере с pH 6.8. Система термостатировалась при 30 °С и работала в режиме периодических трансформаций. Время полужизни иммобилизованных клеток в этих условиях составило около 48 часов. При повторных трансформациях операционное время увеличивается в I,5 раза. Для восстановления исходной активности иммобилизованных клеток проведена инкубация препаратов в питательной среде при 30 °С в течение 24 часов. После инкубации активность восстанавливается приблизительно на 70 %.

Заключение

В результате проведенной работы создана продуктивная установка для включения метаболически активных клеток в криогель ПВС. Достигнут высокий коэффициент сохранения метаболической активности при иммобилизации и показано, что

полученный биокатализатор может осуществлять разложение бензойной кислоты. Есть все основания предполагать, что созданная система может быть использована для получения многих других биокатализаторов на основе метаболически активных клеток. Предусматриваются исследования новых полимерных систем, оптимизация условий криогелификации (концентрация полимера, добавки, температурный режим) с целью улучшения каталитических и механических свойств получаемых криогелей.

Созданные технические возможности и накопленный положительный опыт являются базой для развития исследований в этом направлении, включая переход к синтетическим биокаталитическим системам.

Литература

I. Рогожин С.В., Лозинский В.И., Вайнерман Е.С. и др. Нековалентное криоструктурирование в полимерных системах // Доклады АН СССР. 1984. Т. 278. № I. С. 129-133.

2. Королева Е.А., Холстинина Н.Р., Саранд И.Р. Иммобилизация микроорганизмов для деградации ксенобиотиков // Тр. Таллиннск. техн. ун-та. 1990. № 715. С. 70-78.

N. Holstinina, A. Käärd

Metaboolselt aktiivsete rakkude immobiliseerimine
I. Pseudomonas putida sidumine polüvinüülalkoholi krüogeeli

Kokkuvõte

Ehitati metaboolselt aktiivsete rakkude krüogeeli immobiliseerimise seade. Töötati välja ja optimeeriti Pseudomonas putida immobiliseerimise metoodika polüvinüülalkoholi (PVA) krüogeeli. Pseudomonas putida natiivsete rakkude (aktiivsus ~9,0 U/g) immobiliseerimisel PVA krüogeeli on saadud katalüsaator aktiivsusega 0,47 U/g katalüsaatori või 5,35 U/g rakkude kohta (rakkude ja PVA suhe 1:10) aktiivsuse säilitamisastmega 59,4 %.

N. Holstinina, A. Käärd

Immobilization of Metabolically Active Cells
I. Entrapment of Pseudomonas putida cells in the Cryogel of the Polyvinyl Alcohol

Abstract

The equipment for immobilization of metabolically active cells into cryogel has been constructed. By immobilization of living cells of Pseudomonas putida (activity ~9.0 U referred to benzoic acid/g of biomass) into cryogel of polyvinyl alcohol (PVA) the catalyst has been obtained with the activity of about 0.47 U per one gram of catalyst (5.35 U per one gram of cells).

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 664.28

Т. Рандла, М. Креэн

ПОЛУЧЕНИЕ КАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО КРАХМАЛА

Характерным направлением современной крахмало-паточной промышленности является выпуск многочисленных модификаторов крахмала, имеющих самые различные области применения [1]. Одним путем для расширения функциональных свойств крахмала как электронейтрального биополимера является его химическая модификация реагентами, которые содержат ионогенные группы. В результате этого образуются т.н. анионные и катионные крахмалы, свойства которых существенно отличаются от свойств нативных крахмалов [2–5]. Стоит отметить, что включение в молекулу крахмала даже незначительного количества модификатора вызывает существенные изменения в свойствах крахмала [2]. Главным потребителем катионных производных крахмала в настоящее время является бумажная промышленность [1, 2, 6], которую считают крупнейшим потребителем крахмало-продуктов вообще. Кроме этого катионные крахмалы нашли применение в качестве флокулирующих реагентов для анионных коллоидов, а также как суспендирующие и эмульгирующие вещества [3, 5].

Основная цель использования крахмала в бумажной промышленности заключается в увеличении прочности бумаги, покрытии поверхностного слоя мелкими частицами и увеличении звонкости [6]. Считают, что добавление крахмала в сырую бумажную массу способствует появлению связей между целлюлозными фибриллами, благодаря которым бумага приобретает прочность и хороший внешний вид. Ни один из крахмалов не является эффективным для всех сортов бумаги. Наиболее приемлемый вид крахмала определяется в основном конфигурацией целлюлозных волокон на поверхности бумаги. Для целлюлозного полотна, состоящего из крупных, слегка размолотых волокон, наиболее эффективным оказался катионирован-

ный кукурузный крахмал, являющийся специальным мостиком между волокнами. Имеются данные о том, что при I%-ной добавке катионированного и 3%-ной добавке нативного крахмала достигнуто сравнительное увеличение прочности бумаги [6].

Практически все известные нам способы получения катионного крахмала предусматривают применение в качестве модифицирующего реагента четвертичных аммониевых соединений [2, 3, 5]. По патентованному в Японии способу крахмал обрабатывают триметил или триэтиламином и эпихлоргидрином, взятыми в соотношении I,5:2:I [3]. Чаще всего [2, 5] для катионирования крахмала используют галогидрины общей формулы:

$$XCH_2-CH(OH)-(CH_2)_nNR_1R_2R_3X,$$

где X - Cl^- или Br^-

R_1, R_2, R_3 - алкил до C_4

$n = I \div 3$.

В качестве катализатора в реакционную смесь вводят NaOH [2] или в начале процесса NaOH/KOH, а потом окиси или гидроокиси кальция или магния [5]. С целью ускорения процесса модифицирования реакционную смесь можно подвергать действию высокочастотного излучения 2450 MHZ в течение 20 секунд [2]. В случае чисто химического процесса катионирование крахмала при 50 °C завершается в течение 8 часов [5]. Крахмал модифицируют в водной среде в клейстеризованном виде [2], а также в кристаллической форме в присутствии таких ингибиторов гелеобразования, как хлориды, сульфаты или карбонаты натрия или калия [5].

В ходе модернизации крахмалопаточной промышленности Эстонии планируется выпуск модифицированных крахмалов, в том числе и катионного производного картофельного крахмала, предназначенного для применения в бумажной промышленности. С учетом экологических аспектов обоснованным считают внедрение твердофазной технологии синтеза катионного крахмала, разработанной фирмой "Nivoba". Технология не опубликована и информация о проведении процесса далеко не полная.

Целью настоящей работы было выяснение влияния различных факторов на ход процесса катионирования крахмала и на качество полученного модификата.

Материалы и методы

Модифицированию подвергали картофельный крахмал пищевого качества. В качестве модифицирующего реагента использовали 3-хлор-2-гидроксипропилтриметиламмонийхлорид в виде 65%-ного водного раствора, выпускаемого фирмой "Servo" и известного под названием Servon XRK-65 (в дальнейшем сервон).

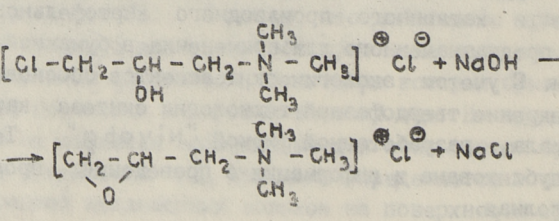
Катализатором процесса являлась гидроокись натрия.

В качестве стандартного образца использовали препарат катионированного картофельного крахмала, представленного фирмой "Nivoba".

Микрокристаллическая целлюлоза, выпускаемая фирмой "Lachema", использовалась для определения катионных свойств модифицированного крахмала.

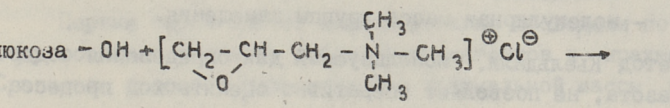
Реакцию модифицирования крахмала с сервоном проводили твердофазным методом двумя способами. Способ последовательного добавления реагентов заключался в следующем. К определенному количеству крахмала прибавляли взвешенное количество твердой гидроокиси натрия и массу тщательно перемешивали. Затем к массе по каплям прибавляли необходимое количество сервона и продолжали перемешивание. Реакционную смесь термостатировали при заданной температуре или выдерживали при комнатной температуре. Массу перемешивали непрерывно или периодически.

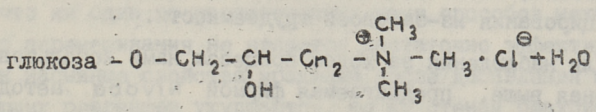
Способ одновременного добавления реагентов заключался в том, что вначале готовили смесь из определенного количества сервона и NaOH. При этом образуется реакционноспособное эпоксипроизводное сервона.



Вторая стадия процесса заключалась в модифицировании крахмала полученным производным сервона. Для этого состав-

ленную смесь маленькими порциями при интенсивном перемешивании прибавляли к крахмалу.





После тщательного перемешивания реакционный сосуд термостатировали при заданной температуре и время от времени его содержимое перемешивали.

Для достижения однородного распределения реагентов в массе крахмала использовали механическое перемешивание с помощью лабораторной шаровой мельницы, ротационной установки или лопастного смесителя, а также ручное перемешивание в фарфоровой ступке.

За ходом процесса модифицирования и качеством полученных препаратов судили по ряду качественных показателей, таких, как цвет, запах, консистенция, насыпные свойства, а также использовали метод, предлагаемый фирмой "Nivoba". Сущность метода заключается в том, что катионированный крахмал контактируют с микрокристаллической целлюлозой в водной среде в определенных соотношениях и затем суспензию фильтруют через сито 100 меш. Полученный фильтрат окрашивают йодом. Окраску и интенсивность цвета сравнивают со стандартным образцом. По степени модифицирования крахмала наблюдается переход окраски от синей к зеленой. В наших опытах стандартом считали цветовую реакцию, полученную с помощью катионного крахмала фирмы "Nivoba".

Количественную характеристику препаратам давали по степени замещения (СЗ). СЗ выражает число молей модифицирующей группы, связанной с одним молем глюкозы. СЗ определяли по содержанию азота в катионированном крахмале и вычисляли по формуле

$$СЗ = \frac{162 \cdot \%N}{1400 - 151{,}5 \cdot \%N},$$

где 162 - молекулярная масса остатка глюкозы,

% N - общее содержание азота, определенное методом Кьельдаля,

151,5 - молекулярная масса группы замещения.

Метод Кьельдаля, используемый для определения содержания азота, не позволяет оперативно оценить ход процесса модифицирования из-за своей трудоемкости.

Для наблюдения за ходом процесса нами использовалась описанная выше, предлагаемая фирмой "Nivoba" методика в модифицированном виде, позволяющая судить о степени замещения крахмала по оптической плотности окрашенного йодом раствора при длине волны 360 нм. Образец катионированного крахмала многократно промывали этиловым спиртом с целью удаления не прореагировавшего сервона и высушивали до постоянного веса. Из подготовленного образца готовили 1%-ную водную суспензию, к которой в равном объеме прибавляли 1%-ную водную суспензию микрокристаллической целлюлозы. После тщательного взбалтывания суспензию двухкратно фильтровали через сито 100 меш, добавляли 0,05 мл 0,1 н раствора йода на 10 мл фильтрата и измеряли оптическую плотность при 360 нм. По мере увеличения степени модификации крахмала наблюдалось уменьшение оптической плотности раствора.

Результаты и обсуждение

Результаты модифицирования крахмала определены, с одной стороны, выбором соотношения реагентов и, с другой стороны, условиями проведения процесса. Необходимые изменения в свойствах катионного крахмала наблюдаются уже при степени замещения 0,02-0,05. При этом вводимый в реакционную смесь модификатор практически стопроцентно реагирует с крахмалом [2, 5]. Исходя из этого в данной работе к крахмалу добавляли сервон в количестве 5,5 мл 65%-ного раствора на 100 г крахмала, которое соответствует молярному соотношению сервон:глюкоза = 0,03. Нами исследовалось влияния следующих факторов на процесс катионирования крахмала:

- перемешивание,
- концентрация катализатора и размер его частиц,

- порядок прибавления реагентов к крахмалу,
- температура реакции.

Первые серии опытов катионирования проводили по методу последовательного добавления реагентов к крахмалу. Сравнение способов перемешивания крахмальной массы показало, что ни один из рассмотренных нами способов механического перемешивания не является достаточно эффективным. Так как насыпные свойства крахмала после добавления модифицирующих реагентов ухудшаются, то по стенам реакционного сосуда образуется неподвижный слой материала и только небольшая часть из массы перемешивается. Степень замешивания полученных препаратов по цветной реакции с йодом оказалась низкой (синяя окраска). Тщательное ручное перемешивание массы в стадии последовательного добавления щелочи и сервона и периодическое перемешивание в ходе реакции в лабораторных условиях оказалось более эффективным. В производственных условиях для достижения однородности реакционной массы необходимо применение мешалки специальной конструкции.

Концентрацию NaOH варьировали в пределах 3,5:6,5 г/100 г крахмала. NaOH добавляли в крупногранулярной и порошковой форме и массу перемешивали вручную. При увеличении добавки щелочи свыше 4 г/100 г крахмала наблюдалась липкая консистенция, желтоватый цвет и неприятный специфический запах препаратов. При концентрации 3,5 г NaOH на 100 г крахмала чувствуется слабый запах и консистенция массы менее вязкая. Значение pH крахмальной массы при данной дозе щелочи было в пределах 10,5-11,0. Это значит, что обеспечена необходимая щелочность реакционной смеси. Изменение окраски по цветной реакции с йодом наблюдалось к шестому часу реакции. Дополнительное измельчение NaOH перед прибавлением к крахмалу не дало воспринимаемого эффекта.

Варьирование температуры реакции от 20 до 80 °С показало, что при 80 °С в реакционной смеси образуются устойчивые желтоватые гранулы, которые в ходе реакции не разлагаются. Можно предполагать локальную частичную клейстеризацию крахмальных зерен. Судя по визуальной цветной реакции модифицирования крахмала при этом практически не происходит. В пределах температуры от 20 до 50 °С

в органолептических параметрах препаратов, а также в скорости реакции по визуальной цветной реакции существенных различий не обнаружили. Процесс замещения протекает столь медленно, что изменение окраски при реакции с йодом наблюдается к шестому - седьмому часу реакции.

Опыты продолжались по методу одновременного прибавления реагентов к крахмалу. Судя по визуальным показателям консистенция реакционной смеси в начале процесса мало отличалась от того, что наблюдалось при последовательном добавлении реагентов, но через некоторое время масса приобретала более сухую консистенцию. При температуре 80 °С также отмечалось образование твердых частиц в массе крахмала. По цветной реакции с йодом при температурах 20–50 °С изменение окраски с синей на сине-зеленую наблюдалось уже со второго часа реакции.

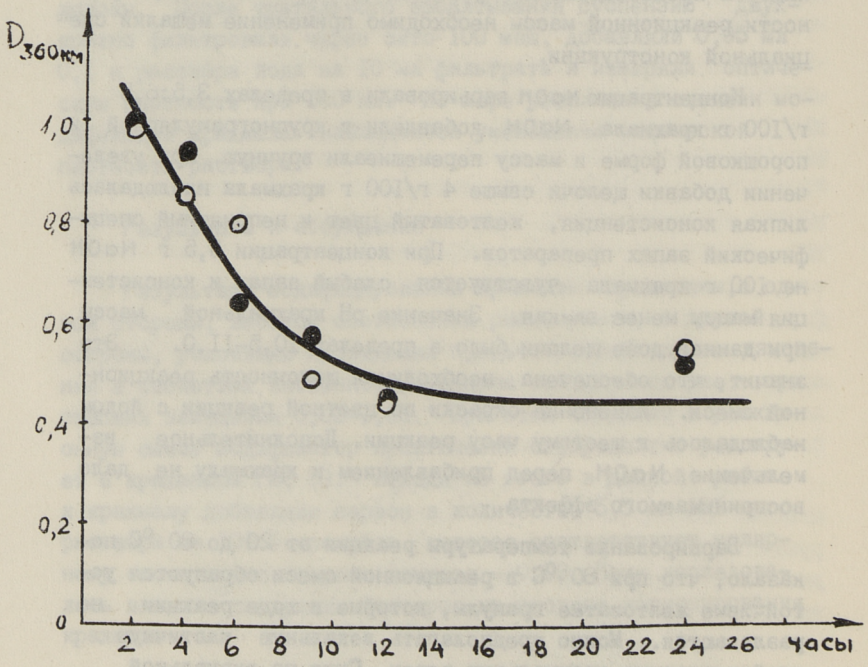


Рис. 1. Ход процесса катионирования крахмала при 20 °С (о) и 50 °С (•).

С целью более подробного изучения динамики модифицирования крахмала с сервоном проводились опыты при температурах 20, 35 и 50 °С общей продолжительностью 24 часа. За ходом процесса катионирования крахмала наблюдали по изменению оптической плотности цветной реакции с йодом. Результаты представлены на рис. I. Опытные точки представляют среднее значение двух параллельных опытов.

Данные, приведенные на рис. I, показывают, что процесс модифицирования крахмала при рассматриваемых температурах завершается к десятому часу реакции. Достигаемое постоянное значение оптической плотности показывает, что достигнуто равновесное состояние, соответствующее максимальной степени замещения при данных условиях.

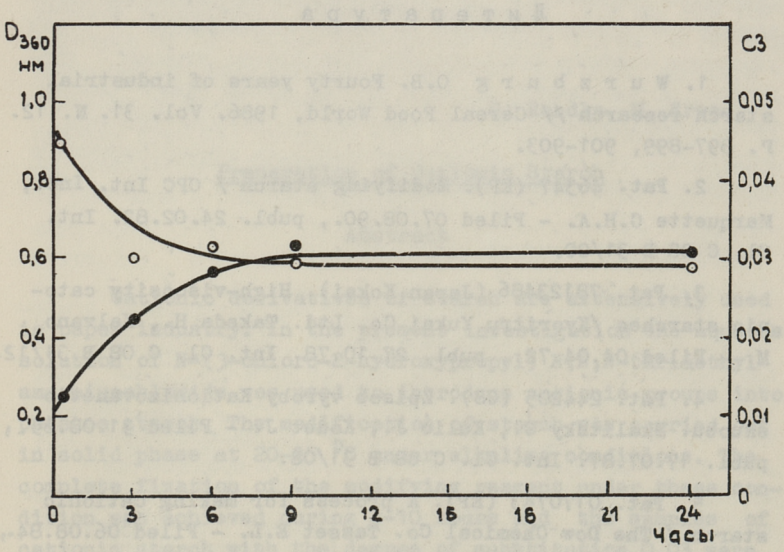


Рис. 2. Динамика процесса катионирования крахмала:
● – степень замещения (С 3) по содержанию азота,
○ – оптическая плотность йодного комплекса при 360 нм.

Данные, характеризующие одновременно ход реакции катионирования крахмала как по степени замещения, так и по

изменению оптической плотности цветной реакции с йодом, приведены на рис. 2. Видно, что в течение 8-10 часов при данных условиях опыта практически весь модифицированный реагент привязывается к крахмалу и достигается максимально возможное значение степени замещения - 0,03. Вполне адекватную картину о динамике процесса катионирования крахмала можно получать по изменению оптической плотности цветной реакции, которая позволяет более оперативно наблюдать за ходом процесса.

Таким образом, проведенные опыты показали, что при одновременном прибавлении сервона и щелочи к крахмалу реакция модифицирования значительно ускоряется и при температуре 20-50 °С завершается в течение 8-10 часов. При этом достигается практически 100%-ное привязывание модифицирующего реагента к крахмалу.

Литература

1. Wurzburg O.B. Fourty years of industrial starch research // Cereal Food World, 1986. Vol. 31. N. 12. P. 897-899, 901-903.

2. Pat. 46347 (EP). Modifying starch / CPC Int. Inc., Marquette G.H.A. - Filed 07.08.90., publ. 24.02.82. Int. Cl. C 08 B 31/00.

3. Pat. 78123486 (Japan Kokai). High-viscosity catonic starches /Kyoritru Yukai Co, Ltd. Takeda H., Kalvano M. - Filed 04.04.72., publ. 27.10.78. Int. Cl. C 08 B 31/12.

4. Pat. 244205 (CS). Zpisob vyroby Kationizovanetio skuobu. Skalitsky C., Kulic J., Kodet J. - Filed 31.08.85., publ. 17.07.87. Int. Cl. C 08 B 31/08.

5. Pat. 0170743 (EP). A process for making cationic starch / The Dow Chemical Co. Tasset E.L. - Filed 06.08.84., publ. 12.02.86. Int. Cl. C 08 B 31/12.

6. Химия и технология крахмала / Под ред. Р.Л. Уислера и Э.Ф. Пашаля. М.: Пищ.пром., 1975.

T. Randla, M. Kreen

Katioonse tärklise saamine

Kokkuvõte

Tärklise katioonseid derivaate rakendatakse laialdaselt paberitööstuses. Antud töös kasutati kartulitärklise modifitseerimiseks N-(3-kloro-2-hüdroksüpropüül) N,N,N-trimetüülammooniumkloriidi vesilahust. Protsess viidi läbi aluselises keskkonnas 20-50 °C juures tahkefaasilises süsteemis. Nimetatud tingimustel saavutati modifitseeriva reagendi täielik seostumine tärklisega 8-10 tunni jooksul. Katioonse tärklise proovid omasid astendusastet 0,03.

T. Randla, M. Kreen

Preparation of Cationic Starch

Abstract

Cationic derivatives of starch are extensively used in paper industry. In the present investigation the aqueous solution of N-(3-chloro-2-hydroxypropyl) N,N,N-thrimethylammoniumchloride was used to introduce cationic groups into potatoe starch. The modification of starch was carried out in solid phase at 20-25 °C under alkaline conditions. The complete fixation of the modifying reagent under these condition was achieved during 8-10 hours and the samples of cationic starch with the degree of substitution 0.03 were prepared.

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 578.851.86.579.083.13

Е.Н. Арбатова, М.В. Реэбен

ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПРИ ПОМОЩИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ (ЦГТ-азы) BACILLUS MACERANS

МИКРОМЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦГТ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Некоторые микроорганизмы способны синтезировать ЦГТ-азы, катализирующие превращение крахмала в циклические олиго-α-1,4-глюкозиды (циклодекстрины, ЦД) [1]. Благодаря способности ЦД к комплексообразованию ЦД имеют важное прикладное значение: ЦД можно использовать для улучшения свойств лекарственных препаратов, пищевых продуктов, косметических средств [2, 3]. Целью нашей работы была разработка метода получения ЦД при помощи ЦГТ-азы Bacillus macerans, иммобилизованной на иммуносорбенте и изучение свойств иммобилизованного фермента.

Материалы и методы

Иммобилизация ЦГТ-азы на BrCN-активированной агарозе при помощи моноклональных антител (МКА) 5BI. МКА 5BI были ковалентно присоединены к BrCN-агарозе. 3 мг МКА инкубировали в 3 мл 0,1 М $NaHCO_3$ буфера, pH 9,0, содержащего 0,5 М NaCl, с 2,6 г промытой дистиллированной водой BrCN-агарозы (полученной с малого предприятия Kemotex, Таллинн) в течение ночи при комнатной температуре. Свободные BrCN-группы блокировали 1 М раствором этаноламина, pH 8,5. В результате получили сорбент, 1 мл которого содержал около 1 мг МКА 5BI (ковалентно связалось 80 % МКА). Затем к 0,5 мл иммуносорбента добавили 50 мл культуральной жидкости B. macerans и инкубировали с легким встряхиванием в течение 1 ч при 4 °С. Иммуносорбент осаждали центрифугированием при 1000 g 5 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а иммуносорбент промывали 3 раза 0,02 М ТРИС-HCl буфером, pH 7,5, содержащим 0,15 М NaCl.

Ингибирование ферментативной активности ЦГТ-азы при ее связывании с поликлональными антителами (ПКА) и МКА. Последовательные разведения ПКА и МКА от 1:5 до 1:10000 в 50 мл 50 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, содержащего 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА), инкубировали в течение 1 ч в пробирках Eppendorf (1,5 мл) с 50 мкл раствора ЦГТ-азы, содержащего 50 нг фермента. Затем к каждой пробирке добавляли 0,4 мл субстрата (3,75 % раствора крахмала в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,5) и инкубировали реакционную смесь при 30 °С. Через 30 мин отбирали аликвоты из реакционной смеси, останавливали ферментативную реакцию и определяли активность ЦГТ-азы описанным ниже методом.

Микрометод определения ферментативной активности ЦГТ-азы. При определении активности ЦГТ-азы ферментативную реакцию проводили в пробирках Eppendorf (1,5 мл) при температуре 30 °С. Объем реакционной смеси 0,5 мл. К 100 мкл препарата ЦГТ-азы добавляли 400 мкл 3,75%-ного раствора крахмала в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,5. Для остановки реакции пробирки помещали на 5 минут в термостат на 95 °С. Из охлажденных пробирок отбирали по 100 мкл исследуемого раствора и помещали в лунки 96-луночных иммунологических плат Titertek фирмы "Flow laboratories" (Великобритания). В каждую лунку добавляли по 150 мкл рабочего раствора фенолфталеина. Через несколько минут измеряли оптическую плотность на фотометре Titertek Multiscan MC ("Flow Laboratories", Великобритания) при длине волны 540 нм. Рабочий реактив фенолфталеина: 0,03 мМ раствор фенолфталеина в 1,0 М боратном буфере, pH 11,6. Приготовляется непосредственно перед определением.

В некоторых случаях ферментативную реакцию проводили прямо в лунках иммунологических плат. Это еще более ускоряло и упрощало методику определения ферментативной активности. Реакцию останавливали добавлением 1,0 М боратного буфера, pH 11,6. Однако если pH проб различается, то прямо в лунках плат реакцию проводить нельзя, поскольку изменение pH влияет на цвет раствора фенолфталеина.

Количество ЦД определяли по ряду разбавлений β-ЦД (концентрация от 5 мкМ до 5 мМ ЦД в пробе) (см. рис. 1).

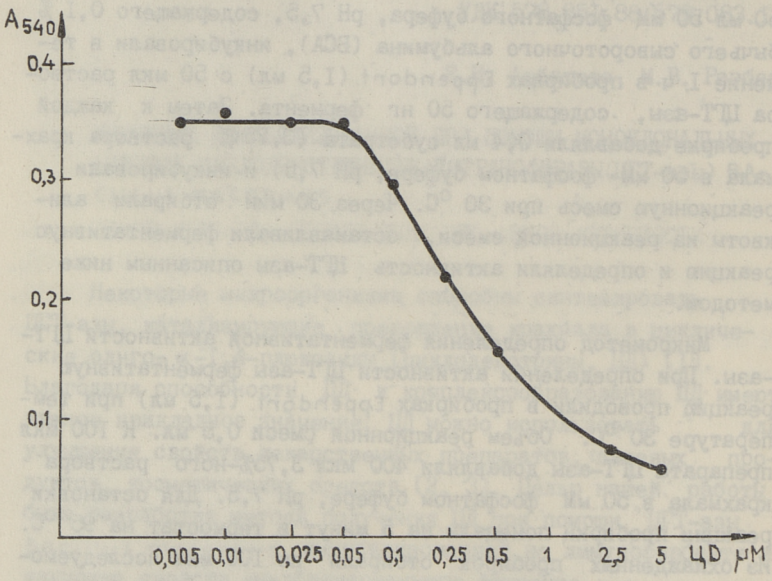


Рис. 1. Зависимость оптической плотности раствора фенолфталеина от концентрации β-циклодекстрина.

Преимуществом метода является быстрота, возможность одновременно определить большое количество проб.

Непрямой метод иммуноферментного анализа (ИФА). 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 (0,01 М фосфатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl) с 0,05 % детергента твин 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 антител 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 % ТВИН 20 (ЗФР-АТ). После инкубации плат в течение 2 ч при 37 °С раствор антител выливали, платы 5 раз промывали 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 противомышиных 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. После 15–30-минутной инкубации в темноте измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм на автоматическом фотометре Titertek Multiscan MS.

Результаты и обсуждение

Из культуральной жидкости Bacillus macerans выделили и очистили ЦГТ-азу с удельной активностью 70 $\frac{\text{мкмоль}}{\text{мин}}$ на 1 мг белка. Очищенный фермент использовали для получения МКА, как было описано в предыдущем нашем сообщении [4]. Были получены специфические МКА к ЦГТ-азе B. macerans, продуцируемые 15-гибридомными линиями клеток. Свойства МКА изучены с помощью различных методов иммуноферментного анализа (ИФА) и иммуноблотинга. По данным ИФА МКА 5B1 обладали большим сродством к ЦГТ-азе B. macerans. Эти антитела были выбраны для приготовления иммуносорбента на основе BrCN-активированной агарозы. Иммобилизованная на твердом носителе ЦГТ-аза обладала ферментативной активностью. Это согласовалось с ранее полученными нами данными, что МКА 5B1 связываются с ЦГТ-азой не по активному центру фермента. Было изучено ингибирование ферментативной активности ЦГТ-азы B. macerans ПКА и МКА. Как видно из рис. 2, связывание МКА 5B1 с ЦГТ-азой приводило к ингибированию ферментативной активности примерно на 40 %, в то время как ПКА ингибировали ее практически полностью. Активность фермента, иммобилизованного на иммуносорбенте, составляла 20 % от его активности в растворе. По-видимому, скорость работы связанного с антителом фермента меньше, чем свободной ЦГТ-азы, возможно также, что затруднен доступ субстрата к ферменту внутри

гранул агарозы. При пропускании раствора крахмала через колонку, как показано на рис. 3, из колонки выходил раствор крахмала вместе с циклодекстринами. Конверсия крахмала в циклодекстрины при условиях проведения эксперимента (0,5 % крахмала, 50 мМ фосфатного буфера, pH 7,5, комнатная температура) составляла 30 %. Однако субстрат (крахмал) снимает ЦГТ-азу с колонки. После пропускания 30 объемов колонки со скоростью 2 мл/мин на колонке остается 50 % связанного с носителем фермента (см. рис. 4). Это свидетельствует, по-видимому, о том, что при вхождении субстрата в активный центр молекулы ЦГТ-азы происходят конформационные изменения, которые ухудшают связывание фермента с антителом.

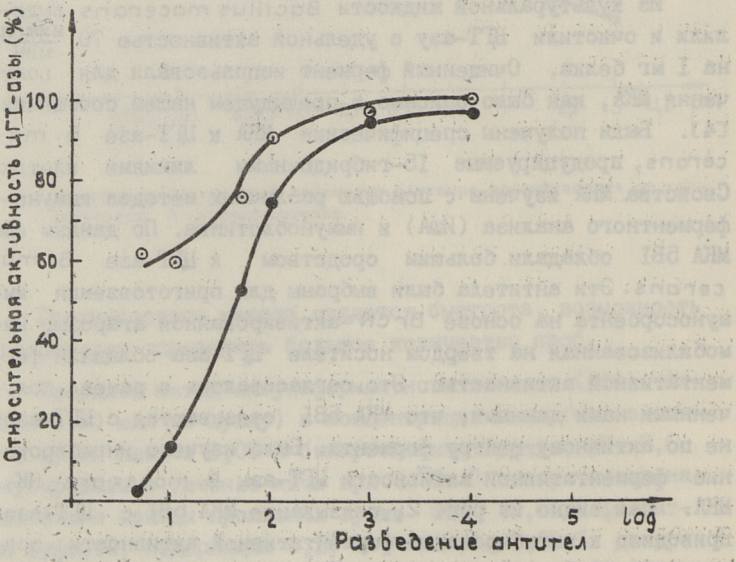


Рис. 2. Ингибирование ферментативной активности ЦГТ-азы ПКА (●) и МКА 5B1 (○).

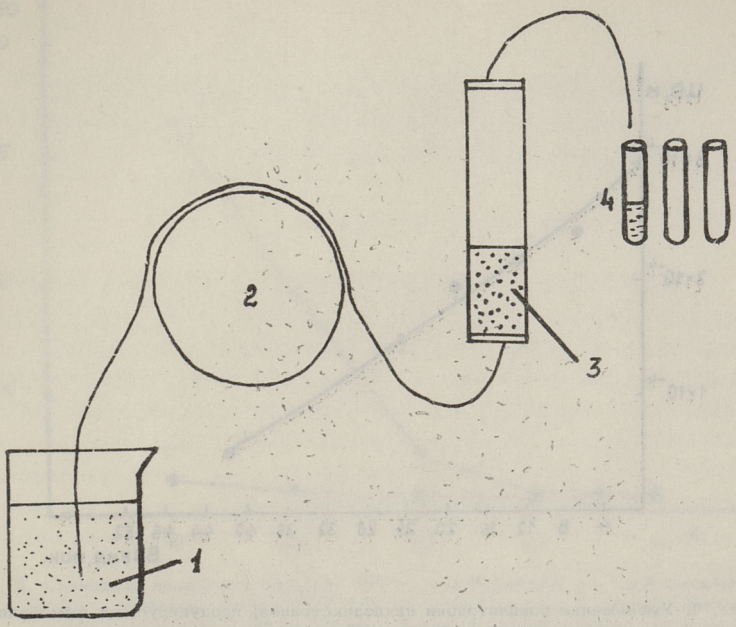


Рис. 3. Схематическое изображение проведения эксперимента с ЦГТ-азой, иммобилизованной на твердом носителе:
1 – субстрат (0,5 %-ный раствор крахмала), 2 – насос, 3 – колонка с иммобилизованной ЦГТ-азой, 4 – раствор с ЦД.

Для характеристики иммобилизованной ЦГТ-азы нам понадобился такой метод определения активности фермента, который позволяет быстро измерить большое количество проб, содержащих малые количества фермента. Для этого мы модифицировали фенолфталеиновый метод Mäkela et al. [5], как списано в разделе "Материалы и методы".

Поскольку ЦГТ-азы различных микроорганизмов гомологичны между собой, мы изучили методом ИФА также взаимодействие МКА и ПКА с ЦГТ-азой Bacillus circulans var. alkalophilis, представляющей интерес как фермент, широко использующийся в промышленном масштабе. ЦГТ-аза B. circulans была любезно предоставлена T. Korpelo и M. Mäkela (Финляндия). Результаты представлены на рис. 5. ПКА, полученные к ЦГТ-азе B. macerans, действительно, взаимодействовали с ЦГТ-азой B. circulans, од-

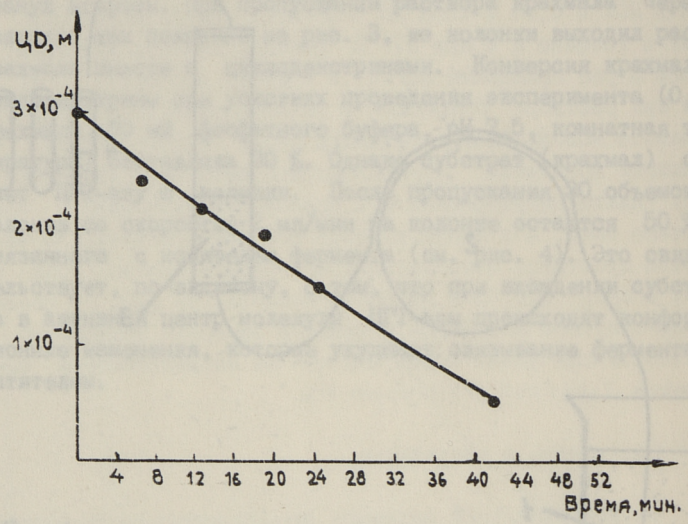


Рис. 4. Уменьшение концентрации циклодекстринов, продуцируемых иммобилизованной на иммуносорбенте ЦГТ-азой при пропускании через колонку раствора крахмала.

нако титр полисыворотки для фермента B.circulans был в 10 раз ниже. Это означает, что около 90 % антител в полисыворотке видоспецифичны. МКА 5В1 не узнавали нативный и денатурированный фермент B. circulans.

Таким образом, была получена и изучена иммобилизованная при помощи моноклональных антител ЦГТ-аза B. macerans, разработан микрометод для определения ферментативной активности. Изучено также взаимодействие ПКА и МКА с ЦГТ-азой B. circulans var. alkalophilis.

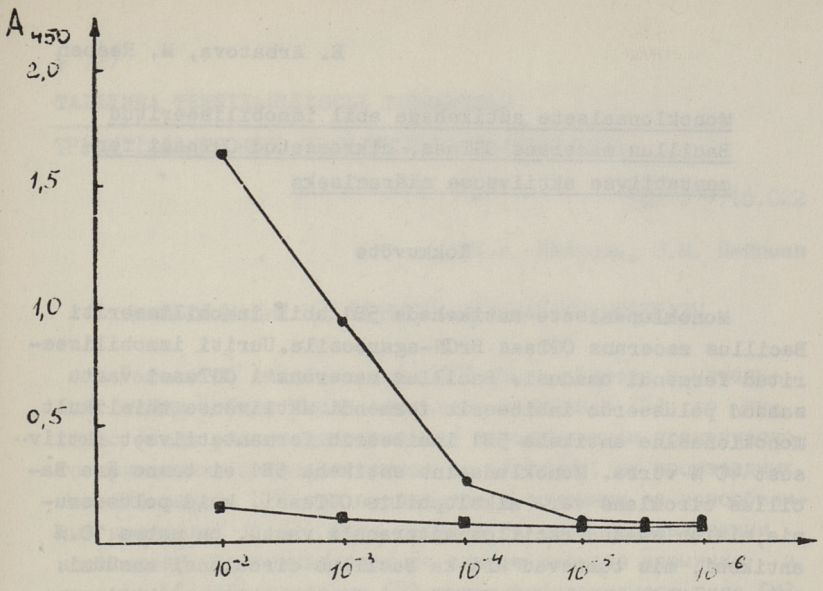


Рис. 5. Сравнение иммунореактивности ЦГТ-азы B.macerans (•) и B.circulans (▪) в непрямом методе ИФА (в лунках сорбировали 5 мкг/мл соответствующих антигенов). Использовали мышиную полисыворотку, полученную к ЦГТ-азе B.macerans. Субстратом был ортофенилендиамин.

Литература

1. Bender H. Production, characterization and application of cyclodextrins // Adv. Biotechnol. Processes. 1986. Vol. 6. P. 31-71.

2. Cyclodextrins and their inclusion complexes // Ed. J. Szejtli. Budapest. Akademiai Kiado. 1982. 296 p.

3. Егоров Н.С., Кестнер А.И., Вокк Р.А. История исследования циклодекстринов, свойства и области их применения // ВИНИТИ. Серия микробиология. 1988. Т. 20. Ч. I. С. 4-52.

4. Арбатова Е.Н., Халлинг Т.А., Реэбен М.В. Получение моноклональных антител к циклодекстринглюканотрансферазе Bac.macerans // Тр. Таллиннск. техн. ун-та. 1990. № 715. С. 49-57.

5. Makela M., Korpela T., Laakso S. Colorimetric determination of β-cyclodextrin: two assay modifications based on molecular complexation of fenolitalein // J. Biochem. Biophys. Methods. 1987. Vol. 14. P. 85-92.

E. Arbatova, M. Reeben

Monoklonaalsete antikehade abil immobiliseeritud Bacillus macerans CGTaas, mikromeetod CGTaasi fermentatiivse aktiivsuse määramiseks

Kokkuvõte

Monoklonaalsete antikehade 5B1 abil immobiliseeriti Bacillus macerans CGTaas BrCN-agaroosile. Uuriti immobiliseeritud fermendi omadusi. Bacillus macerans'i CGTaasi vastu saadud polüseerum inhibeerib fermendi aktiivsuse täielikult, monoklonaalne antikeha 5B1 inhibeerib fermentatiivset aktiivsust 40 % võrra. Monoklonaalne antikeha 5B1 ei tunne ära Bacillus circulans var. alkalophilis CGTaasi, kuid polüseerumis, mis on saadud Bacillus macerans'i vastu, on umbes 10 % antikehi, mis tunnevad ära ka Bacillus circulansi ensüümi. Töötati välja mikromeetod CGTaasi fermentatiivse aktiivsuse määramiseks 96-augulisel immunoloogilisel plaadil, mis võimaldab kiiresti mõõta suurt hulka väikese aktiivsusega proove.

J. Arbatova, M. Reeben

Bacillus macerans CGTase immobilized by Monoclonal Antibodies, Micromethod for Determining CGTase Activity

Abstract

Bacillus macerans CGTase has been immobilized to BrCN-agarose using monoclonal antibody 5B1. Some properties of the immobilized enzyme were characterized. Binding polyclonal antibodies resulted in up to full inhibition of CGTase activity, whereas under identical conditions binding of the monoclonal antibody 5B1 resulted in up to 40 % inhibition of enzyme activity. Polyserum obtained against CGTase of Bacillus macerans contains nearly 10 % antibodies specific also to CGTase of Bacillus circulans. However, monoclonal antibody 5B1 did not recognize Bacillus circulans CGTase. A micromethod on the basis of phenolphtaleine method was developed to measure CGTase activity in 96 well immunological plates.

№ 727
TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED
ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 577.15.022

К.Э. Паппель, Э.М. Пейпман

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ

Работы по иммобилизации ЦГТ-азы находятся в начальной стадии (общее число ссылок не превышает 15), но интерес к ним растет одновременно с расширением практического применения циклодекстринов и, особенно, их производных. Иммобилизация ЦГТ-азы проводится в основном на ионообменных носителях [1-4], хотя сообщается и об использовании носителей, приготовленных на основе оксидов алюминия и кремния [5, 6], хитозана [7] и полиакриламидного геля [8]. Внимания заслуживает работа, в которой фермент был включен в мембранную систему [9] с использованием установки для ультрафильтрации. Кроме того, в качестве носителей испытаны целлюлоза [8], молселект А [8] и альгинатный гель [7], не давшие, однако, практически значимых результатов. Источниками фермента при иммобилизации использовались культуры Bacillus macerans [3, 6, 8], Bacillus circulans [5, 9], Bacillus stearothermophilus [4] и Bacillus sp. 38-2 [1, 2, 7]. Из методов иммобилизации применяются адсорбция [2-4] или способ химического связывания с помощью глутарового альдегида [5-7] или карбодиимида [8]. Выходы активности при иммобилизации колеблются в очень широких пределах от 3,8 % [8] при связывании на Akrilex C-100 до 80 % при адсорбции на DIANION HP-20 (сополимер стирола и дивинилбензола) [4].

Целью настоящей работы являлось изучение возможностей иммобилизации ЦГТ-азы на агарозе и исследования каталитических свойств полученных препаратов. Применимость агарозы для иммобилизации разных ферментов общеизвестна [10]. Преимуществами ее как носителя считают значительную гидрофильность, емкость и возможность легко вводить в нее различные функциональные группы для последующего ковалентного связывания ферментов.

Материалы и методы

Объектом исследований являлась ЦГТ-аза, продуцируемая культурами B. macerans и B. circulans. Из культуральной жидкости B. macerans фермент выделялся путем осаждения сульфатом аммония согласно методике, описанной нами заранее [12]. Полученный препарат лиофилизировали и перед иммобилизацией диализовали против буфера. Диализ ферментного раствора проводился против 0,01 М фосфатного буфера в диализных мешочках из целлофана при температуре ≤ 10 °С в течение 8 часов (смена диализата через 4 часа, общий объем воды - 20 л). В работе использовали препараты с удельной активностью от 0,03 до 0,12 Е на мг белка. Препарат из B. circulans очищен методом аффинной хроматографии на α-ЦД агарозе по методике Мягела и сотр. [11] и имел удельную активность 10-24 Е на мг белка.

ЦГТ-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 [12].

Концентрация белка в ферментных растворах определялась спектрофотометрическим способом при 280 нм на спектрофотометре VSU-2P или М-40.

В качестве носителя применялась Br-CN -агароза фирмы Кемотекс АНЭР, имеющая 14 мкмоля активных групп на 1 мл набухшего геля. Диаметр зерен носителя 15-150 мкм. Иммобилизация ЦГТ-азы на носителе осуществлялась следующим образом. К ферментному раствору ЦГТ-азы при перемешивании добавлялось определенное количество носителя. Смесь выдерживали при определенной температуре для связывания фермента. Препарат иммобилизованной ЦГТ-азы (ИЦГТ) промывали на воронке Бюхнера соответствующим буфером, 1 н раствором NaCl и опять буфером до исчезновения следов белка в промывных водах. Отфильтрованный препарат ИЦГТ хранят во влажном виде при температуре 0-4 °С.

Эффективность процесса иммобилизации определяется по данным анализа активностей полученного препарата, промывных вод и исходного раствора.

Результаты и обсуждение

По литературным данным иммобилизация ферментов на активированном бромцианом носителе проводится в щелочной среде [13]. Исходя из этого и учитывая также данные по стабильности ЦГТ-азы [11, 12], иммобилизация фермента проведена в карбонатном буфере при pH 9,0 в присутствии 0,5 М NaCl с целью уменьшения неспецифической сорбции белка на носителе. Изучение влияния времени связывания на эффективность иммобилизации проведено при 4 и 20 °С. Опыты показали (рис. 1), что для иммобилизации ЦГТ-азы при 20 °С достаточно 4 часа. Потери активности при этом сравнимы с этими же при 4 °С и не превышают 20 %.

Результаты иммобилизации различных препаратов ЦГТ-азы представлены в таблице 1. Как видно из опытных данных, связыванием фермента на агарозном носителе можно получить катализатор с хорошим выходом и с высокой циклодекстринглюканотрансферазной активностью. Достигаемая активность препаратов равняется 62 Е на г катализатора при выходе по активности выше 53 %. При этом нужно отметить, что эффективность иммобилизации в значительной мере зависит от предварительной очистки фермента (опыты 1 и 2; 5-6 и 3, 4 табл. 1). При изучении основных каталитических свойств иммобилизованной на BrCN -агарозе препаратов ЦГТ-азы (ИЦГТ) исследованы pH, температурная и субстратная зависимость препаратов, а также рабочая стабильность их при синтезе циклодекстринов. Работа проводилась препаратами ИЦГТ, полученными при иммобилизации ЦГТ-азы B. circulans.

pH зависимость активности препаратов ЦГТ-азы определена в интервале pH среды от 4,0 до 9,0. При этом применены следующие буферные системы: 0,2 М ацетатный - pH 4,0-5,6, 0,2 М фосфатный - pH 5,8-8,0, 0,2 М глицин-NaOH - pH 8,5-9,5. Как видно из опытных данных (рис. 2) $pH_{опт.}$ иммобилизованной ЦГТ-азы равняется 7.0, что соответствует значению $pH_{опт}$ нативного фермента. Вид кривой pH-зависимости ИЦГТ по сравнению с нативной несколько иной.

Изучение температурной зависимости активности ЦГТ-азы проведено в интервале температур от 30 до 70 °С при pH среды 7,0, $[\bar{S}]_0$ = 33 г/л. Данные исследований представлены на рис. 3. По сравнению с нативным ферментом изменения

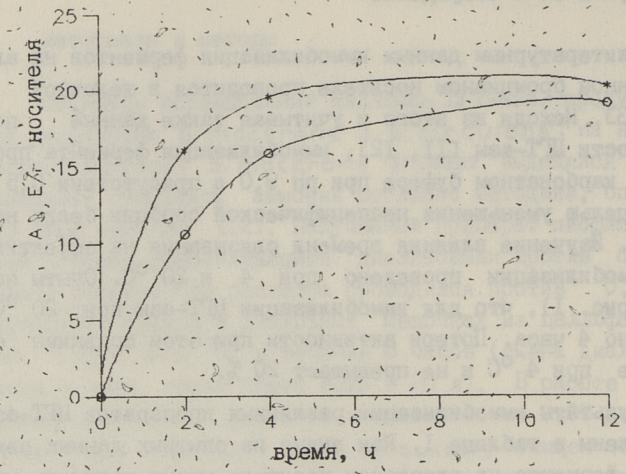


Рис. 1. Зависимость эффективности иммобилизации от времени:
* – активность ИЦГТ, иммобилизованная при 20 °С, Е/г носителя,
о – активность ИЦГТ, иммобилизованная при 4 °С, Е/г носителя.

Таблица I

Иммобилизация циклодекстринглюканотрансферазы на BrCN-агарозе

№ п/п	Источник фермента	Исходный раствор			Иммобилизованный препарат		
		А уд. Е м/г	активн., Е/г н.	белок мг/г н.	активн., Е/г н	выход. акт., %	потери акт., %
I.	B. macerans	0,03	6,7	223,3	4,8	71,6	не опр.
2.	B. macerans	0,I2	I8,5	I54,2	9,7	52,4	I8,I
3.	B. circulans	I0,4	67,0	6,5	20,I	30,0	I6,4
4.	B. circulans	I0,4	73,3	7,I	24,4	33,3	I6,7
5.	B. circulans	I3,7	I00,0	7,3	4I,I	4I,I	I5,8
6.	B. circulans	23,8	II5,6	4,9	62,I	53,7	I4,8

температурного оптимума ЦГТ-азы вследствие иммобилизации не отмечено. Значение энергии активации реакции синтеза β-циклодекстрина (E_A) равняется 18,5 кДж на моль.

Определение субстратной зависимости активности синтеза β-ЦД с помощью ИЦГТ проведено при начальных концентрациях субстрата – растворимого крахмала – от 3,7 до 30 г/л (т = 30 °С, pH 7,0). Обработка опытных данных в координатах $S_0/V - S_0$ дала значение K_M 8,8 г/л, что значительно выше этого же значения, полученного для свободного фермента [14].

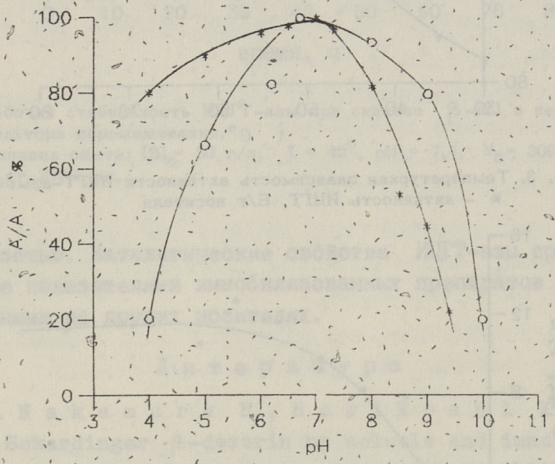


Рис. 2. pH-зависимость активности ИЦГТ-азы:
* – активность ИЦГТ, %,
o – активность нативной ЦГТ-азы, %.

Изучение синтеза β-циклодекстрина с помощью ИЦГТ-азы осуществлялось в непрерывном термостатируемом реакторе механической мешалкой при температуре 40 °С и pH среды 7,4. Количество применяемого катализатора I г, объем субстрата – растворимого крахмала – 300 мл, начальная концентрация его – 30 г/л. Как видно из данных, приведенных на рис. 4, степень конверсии крахмала в среднем равняется 41 %, что сравнимо с данными, полученными Хоксе и сотр. [9] при синтезе β-циклодекстрина с помощью ЦГТ-азы из B. circulans, заключенной в ультрафильтрационную систему.

В вышеприведенных условиях определялась также рабочая стабильность ИЦГТ-азы. Как видно из опытных данных, пред-

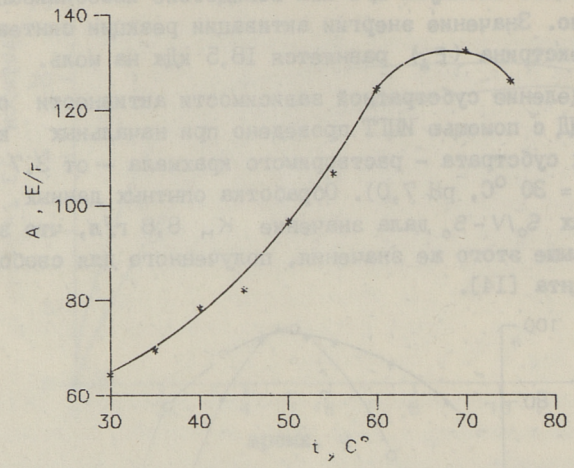


Рис. 3. Температурная зависимость активности ИЦГТ-азы:
* - активность ИЦГТ, Е/г носителя

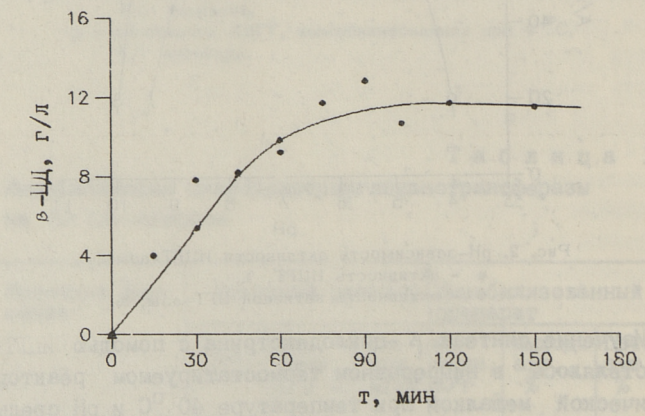


Рис. 4. Синтез β-ЦД из растворимого крахмала с помощью ИЦГТ:
● - концентрация β-ЦД, г/л.
Условия опыта: $[S]_0$ = 30 г/л, t = 40°, pH = 7,4, ИЦГТ - 1г, V_c = 300 мл.

ставленных на рис. 5, после 72 часов работы активность катализатора снижается лишь на 25 %. Продуктивность катализатора до этого момента составляла 23,5 г β-ЦД на г катализатора.

Таким образом, подытоживая, можно сказать, что связыванием ЦГТ-азы на активированной бромцианом агарозе получен активный биокатализатор с циклодекстринсинтезирующей

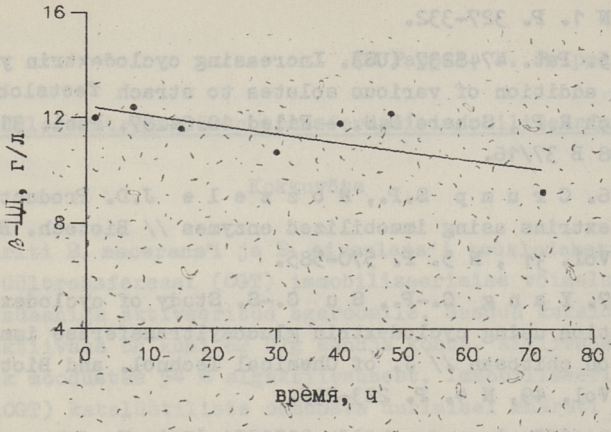


Рис. 5. Рабочая стабильность ИЦГТ-азы при синтезе β-ЦД в периодическом реакторе перемешивания.
Условия опыта: $[S]_0$= 30 г/л, t = 40°, pH = 7,4, V_0= 300 мл, $V_{об}$= 2700 мл.

способностью. Каталитические свойства ИЦГТ-азы сравнимы с этими же показателями иммобилизованных препаратов ЦГТ-азы, полученными на других носителях.

Литература

1. Nakamura N., Horikoshi K. Production of Schardinger β-dextrin by soluble and immobilized cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic Bacillus sp. // Biotech. Bioeng. 1977. Vol. 19., N 1. P. 87-99.

2. Kato T., Horikoshi K. Immobilized cyclomaltodextrin glucanotransferase of an alkalophilic Bacillus sp. N 38-2. // Biotech. Bioeng. 1984. Vol. 26, N 1. P. 595-598.

3. Hashimoto H., Hara K. et al. The continuous reaction of cyclodextrins formation by the column method using the immobilized enzyme on ion exchange resins // Denpun Kagahu. J. Jap. Soc. of Starch Sci. 1986. Vol. 33, N 1, P. 29-33.

4. Vandamme E.J., Declerog C. et al. Dynamic of the Bacillus circulans var alkalophilus cyclodextrin glycosyltransferase // Eur. Congr. Biotechnol. 3-rd.

1984. N 1. P. 327-332.

5. Pat. 4748237 (US). Increasing cyclodextrin yields by the addition of various solutes to strach feetslobes / Rohrbach R.P., Schere D.S. - Filed 10.04.87. Publ. 31.05.88. МК C08 B 37/16.

6. Crump S.P., Rozzele J.D. Production of cyclodextrins using immobilized enzymes // Biotech. Bioeng. 1989. Vol. 31 , N 5. P. 570-585.

7. Yang C.-P., Su C.-S. Study of cyclodextrin production using cyclodextrin glucosyltransferase immobilized on chitosan // J. of Chemical Technol. and Biotechnol. 1989. Vol. 49, N 4. P. 283-295.

8. Offenlegungsschrift 3330571 (DE). Verfahren zur Herstellung eines immobilisierten Cyclodextringlycosyltransferase Enzyms / Boross L., Daroczi J. et al. Filed 24.08.83. Publ. 19.04.84. Kl. C12 N9/24.

9. Pat. 4477568 (US). Process for the manufacture of cyclodextrin / Hokse H. et al. Filed 09.02.82. Publ.16.10.84. МК C12P 19/18, C12 N9/18.

10. Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин, В.К. Антонов, К. Мартинек. М., 1976. 4.II. С. 266-313.

11. Mäkela M., Mattsson P., Schinina E., Korpela T. Purification and properties cyclomaltodextrin glucanotransferase form an alkalophilic Bacillus // Biotech. Bioeng. 1988. Vol. 10. P. 414-427.

12. Паппель К.Э. Выделение и очистка циклодекстринглюканотрансферазы // Тр. Таллиннск. политехн. ин-та. 1989. № 688. С. 53-62.

13. Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин, В.К. Антонов, К. Мартинек. М., 1976. 4.I. С. 174-181.

14. Грачева И.М., Гернет М.В. Биохимические и физико-химические свойства амилаз и циклолизующих ферментов, механизм образования циклодекстринов // Итоги науки и техники. Микробиология. 1988. Т. 20. С. 53-96.

K. Pappel, E. Peipman

Tsüklodekstriinglükanotransferaasi immobiliseerimine

Kokkuvõte

Uuriti B. macerans'i ja B. circulans'i tsüklodekstriinglükosüültransferaasi (CGT) immobiliseerimise võimalusi broomtsüaaniga aktiveeritud agaroosile. Saadud katalüsaatori aktiivsus on kuni 62 U/g kandja kohta. Aktiivsuse väljatulek moodustas 54 % algaktiivsusest. Immobiliseeritud CGT (iCGT) katalüütiliste omaduste uurimisel määrati β-CD sünteesi aktivatsioonienergia (lahustuvast tärklisest) 18,5 kJ/mool, temperatuuri optimum 50 °C, pH-optimum 7,0 ja K_m = 8,8 g/l. Substraadi konversiooniastmeks β-CD sünteesil iCGT-ga segamisreaktoris 40 °C juures saadi üle 40 %. Pärast 72 töötundi 40 °C juures ei vähenenud katalüsaatori aktiivsus üle 25 %.

K. Pappel, E. Peipman

Immobilisierung der Cyclodextringlycosyltransferase

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Immobilisierung von Cyclodextrin-Glykosyltransferase an die mit BrCN aktivierte Agarose ist durchgeführt. Die Aktivität des neuen Katalysators ist 62 U/pro g des Trägers. Die Ausbeute der Aktivität bildet 54 % aus Anfangsaktivität. Die Untersuchung hat ergeben, daß die Aktivationsenergie des Prozesses der Synthese von β-CD aus löslicher Stärke 18,5 kJ/mol., T_{opt} = 50 C, pH_{opt} = = 7,0 und K_m = 8,8 g/l beträgt. Die Konversionsrate des Substrates ist höher als 41 %.

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 576.8

Э. Пейпман, К. Ванаталу, М. Кирме

БИОСИНТЕЗ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *Bacillus macerans* НА РАЗЛИЧНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Введение

Многие микроорганизмы, принадлежащие к gen. Bacillus а также к другим таксонам, при росте в среде, богатой крахмалом, продуцируют энзим – циклодекстринглюканотрансферазу (ЦГТ-аза, К.Ф. 2.4.I.I9), катализирующий синтез циклодекстринов.

Лабораторные продуценты ЦГТ-азы выращивали до применения в промышленности на ломтиках картофеля; жидкая среда состояла их ломтиков картофеля в воде с добавкой $CaCO_3$ для поддерживания pH в нейтральной области [I]. Используемые в настоящее время штаммы – продуценты ЦГТ-азы – для промышленной технологии выращивают на питательных средах, содержащих в качестве источника углерода растворимый крахмал (I.2-2.0 %), вытяжку из зерен (около 5 %), в качестве источников азота и фосфора – экстракт дрожжевой, соли аммония и фосфорной кислоты, а также микроэлементы [2, 3, 4]. Крахмалу, содержащемуся в среде, и циклодекстринам, синтезируемым в процессе культивирования микроорганизмов, отводится роль индукторов синтеза ЦГТ-азы [5].

В литературе отмечается, что продукция ЦГТ-азы возникает пропорционально росту культуры [4], но высказывается мнение и о том, что биосинтез происходит более успешно в условиях истощения источника углерода [5].

В данной работе попытались сравнить и оценить рост *B. macerans*'а и синтез ЦГТ-азы в различных средах и выяснить соотношение между ростом микроорганизма и секреции фермента.

Материалы и методы

Лиофилизированная культура B.macerans была использована для засева в питательную среду А, содержащую в качестве источника углерода и азота 15 % мелконарезанного картофеля и 1,5 % мела для поддерживания pH среды культивирования. Культуру для опытов выращивали в конических колбах емкостью 500 мл (150 мл среды). Посевная доза - 2 %. Температура культивирования 37 °С.

Для изучения роста и получения биомассы B.macerans составили синтетическую среду В, не дающую осадка и являющуюся прозрачной. При разработке среды В исходили из данных элементного состава биомассы микроорганизмов и картофеля, а также учитывали данные, приведенные в литературе по составу среды Лайна и Пирта [5, 6]. Синтетическая среда В имеет следующий состав (в г/л): $Na_2HPO_4 * 12\ H_2O$ 1.0, KH_2PO_4 1.0, NaCl 0.1, Na_2SO_4 0,45; $(NH_2)_2CO$ 2.85, ZnO 0.004, $CaCl_2$ 0.3, $MgSO_4 * 7H_2O$ 0.6, Fe_2SO_4 0,007, трилон Б 3.25, глюкоза 20,0. Культуру выращивали в течение 3 дней при 37 ° С в 250 мл колбах и полученный инокулят использовали для засева в ферментер BIOSTAT E (рабочий объем 4 л). Количество инокулята - 10 % от объема среды. Уровень кислорода регулировали на 5 % от насыщения. pH среды поддерживали на уровне 6,5 с помощью 4N NaOH и 4N HNO_3. Скорость перемешивания 250 об/мин [2].

В качестве третьей среды использовали полисинтетическую среду Лайна и Пирта [5], названную средой С. Источником углерода был растворенный крахмал 2 % и мальтоза 0.5 %. Культура выращивалась в ферментаторе ULTRAFERM--BIOTEC (рабочий объем 3 л), с аэрацией и перемешиванием. pH поддерживалась с титрантами (2N NaOH и 2N H_2SO_4) на 7.0. Опыты проводились в секторе молекулярной биологии Института химии и биологической физики АН ЭР [7].

При выращивании культуры оценивали рост культуры по оптической плотности при 540 нм на спектрофотометре "Spekol" и по сухому остатку биомассы. Число клеток считали на счетчике "COULTER-COUNTER".

Пробы извлекали в стерильных условиях через определенный интервал времени и подвергали непосредственно анализу или замораживали после центрифугирования и анализировали через несколько дней (среда С).

Потребление источника углерода оценивали по общему количеству углеводов в центрифугированной культуральной жидкости (ЦКЖ) с антроновым реактивом по соответствующей методике [8]. Редуцирующие углеводы измеряли комплексометрически по восстановлению меди [9].

ЦГТ-азная активность определялась по начальной скорости синтеза циклодекстрина (ЦД) из растворенного крахмала [10].

Амилазная активность определялась по йодометрическим методикам и по методике м/п "ХЕМОТЕХ" (ЭР) с применением реактива "Тестамил".

Результаты и обсуждение

Для выяснения закономерностей микробиологического синтеза ЦГТ-азы проводили культивирование B.macerans на картофельной среде А и на среде, в которой вместо ломтиков картофеля использовали отвар соответствующего количества картофеля - картофельный бульон. Культивирование проводили в колбах при 37 °С. Оценивали общее количество углеводов, активность ЦГТ-азы и pH в ЦКЖ. Результаты приведены на рис. 1-3.

Активность ЦГТ-азы начинает проявляться в ЦКЖ среды А с 72 ч, когда начинается и резкое потребление общих углеводов, и возрастает по исчерпании углевода до 70 Е/л. Активность ЦГТ-азы в ЦКЖ среды с бульоном синтезируется в двух стадиях: первый пик соответствует 72 ч, второй 164-188 ч и повышается точно также, как в среде А. Конечная активность ЦГТ-азы в среде с бульоном - 60 Е/л. Потребление углеводов начиналось с 24 ч. Предполагается, что в бульоне углеводы в более доступной форме - в растворе - для потребления микроорганизмами, чем в ломтиках картофеля. На рис. 1 видно, что в ЦКЖ среды А увеличивается общее количество углеводов до 140 ч, что объясняется видом источника углерода - ломтики картофеля затруд-

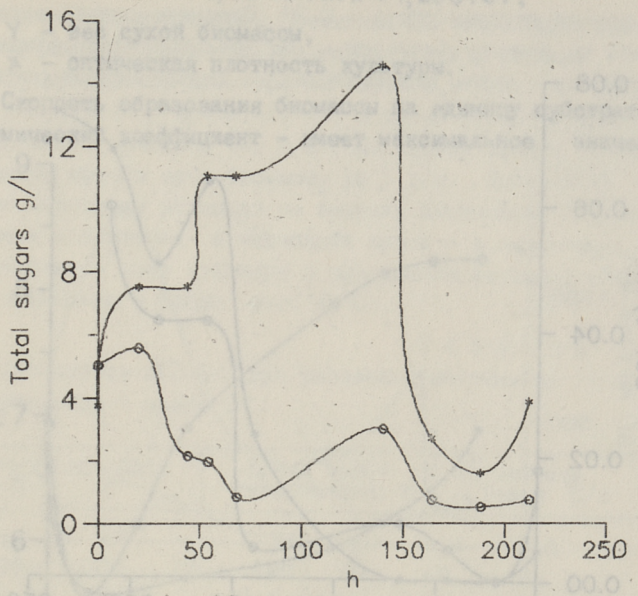


Рис. 1. Потребление общих углеводов в разных средах при культивировании B.macerans :
* – среда с ломтиками картофеля,
o – среда с бульоном картофеля.

няют доступ к углероду для микроорганизмов. Это отразилось и на синтезе ЦГТ-азы, которая проявилась в бульоне уже к 72 ч. С другой стороны, активность ЦГТ-азы повысилась ступенчато как в среде А, так и в среде с бульоном; концевые активности равны почти 70 Е/л и 60 Е/л соответственно.

pH обеих сред падает до 5.6 и повышается с 24 ч до конца культивирования: pH среды А 7.9 и среды с бульоном – 8.45.

Для выяснения закономерностей микробиологического синтеза ЦГТ-азы от роста культуры стали изучать рост самой культуры. Среда А, содержащая мел, ломтики картофеля и др. твердые ингредиенты, затрудняет оценку роста культуры прямыми методами (вес биомассы, число клеток). Поэтому составлена новая синтетическая питательная среда Б. Культуру выращивали в течение 70 ч до истощения среды источником

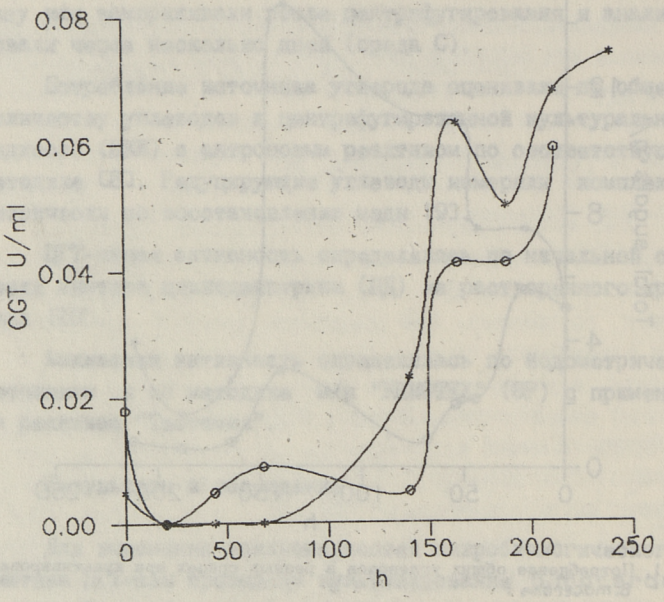


Рис. 2. Динамика проявления активности ЦГТ-азы в ходе культивирования B.macerans в разных питательных средах:
* - среда с ломтиками картофеля,
o - среда с бульоном картофеля.

углерода - глюкозы. Рост микроорганизма имел характер, приближенный к диакустическому росту. В первой степени увеличивалась биомасса со скоростью 0,226 $ч^{-1}$ (выход биомассы 0,23 ±0,02 г/л); во второй степени к 45 ч - 0,149 $ч^{-1}$ (выход биомассы 0,76 ±0,02 г/л). К концу опытов сухой вес биомассы достигал около 2 г/л. Регистрация редокспотенциала выявила скачок потенциала на 18-20 часах культивирования. Этому соответствует начало быстрого уменьшения концентрации глюкозы в среде и резкого увеличения концентрации биомассы - начало экспоненциальной фазы роста.

Сравнение разных методов оценки биомассы показало, что зависимость сухого веса биомассы (оптическая плотность) не является во всей области измерения линейной. Подходящим уравнением является логарифмическое:

$$Y = 0,36434 \ln x + 1,256167,$$

где Y – вес сухой биомассы,

x – оптическая плотность культуры.

Скорость образования биомассы на единицу субстрата – экономический коэффициент – имеет максимальное значение

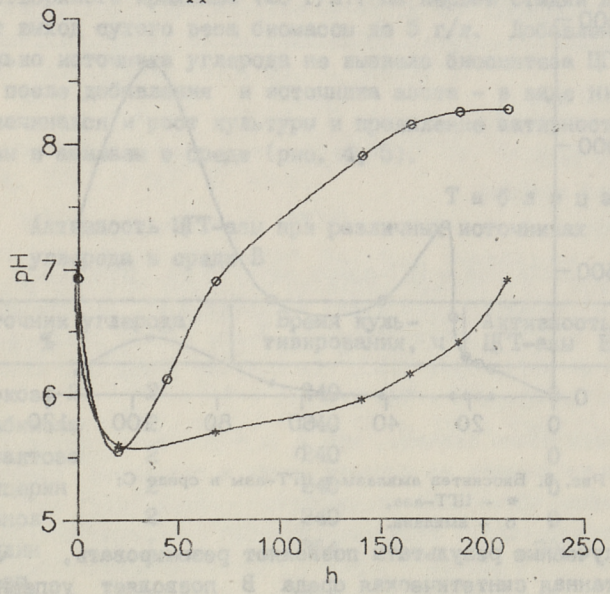


Рис. 3. Изменение pH в разных питательных средах: * – среда с ломтиками картофеля, o – среда с бульоном картофеля.

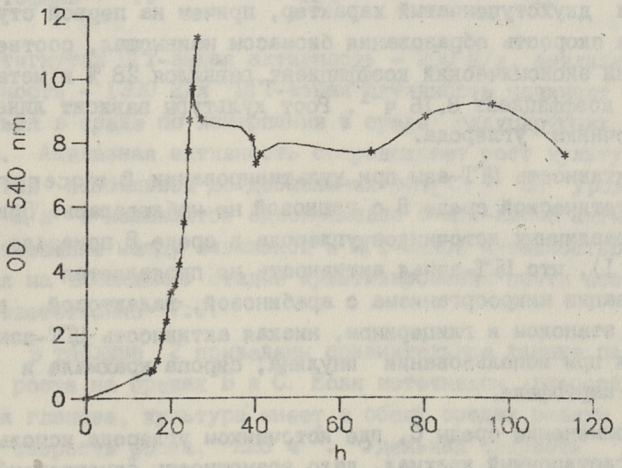


Рис. 4. Кривая роста B.macerans в среде C (объяснения в тексте).

при первой ступени роста – 0,28. Скорость потребления субстрата на единицу биомассы – метаболический коэффициент по глюкозе – также максимальная на первой стадии роста и составляет 8.16 $ч^{-1}$.

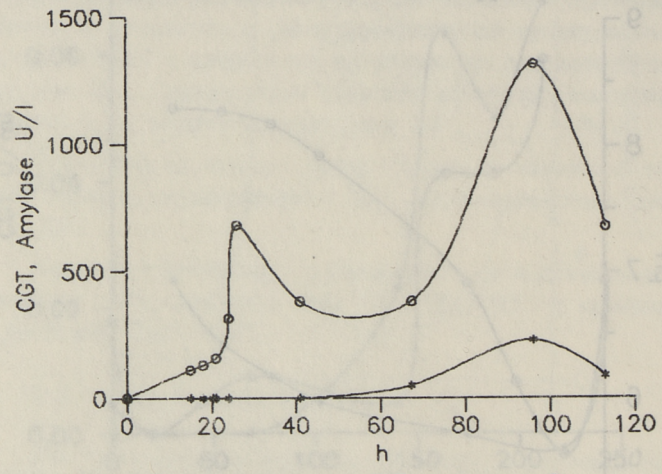


Рис. 5. Биосинтез амилазы и ЦГТ-азы в среде С:
* – ЦГТ-аза,
o – амилаза.

Полученные результаты позволяют резюмировать, что разработанная синтетическая среда В позволяет успешно культивировать B. macerans. Рост на синтетической среде имел двухступенчатый характер, причем на первой ступени была скорость образования биомассы наивысшая, соответствующий экономический коэффициент равнялся 28 % и метаболический коэффициент 8.16 $ч^{-1}$. Рост культуры зависит линейно от источника углерода.

Активность ЦГТ-азы при культивировании B. macerans на синтетической среде В с глюкозой не наблюдалась. Применение различных источников углерода в среде В показало (табл. I), что ЦГТ-азная активность не проявляется при культивации микроорганизма с арабинозой, галактозой, глюкозой, этанолом и глицерином, низкая активность ЦГТ-азы имеется при использовании инулина, сиропа крахмала и кусочков картофеля.

Применение среды С, где источником углерода использовался растворимый крахмал, дало возможность одновременно

оценивать рост культуры и биосинтез ЦГТ-азы. Выращивание культуры проводилось с двумя источниками углерода: во первых, выращивание культуры на глюкозе (7 г/л) до исчерпания глюкозы из среды (21 ч), и после этого добавление растворимого крахмала (20 г/л). На первой стадии достигнут выход сухого веса биомассы до 5 г/л. Добавление только источника углерода не вызвало биосинтеза ЦГТ-азы. Но после добавления и источника азота - в виде NH_4Cl, 7 % - начинался и рост культуры и проявление активностей ЦГТ-азы и амилазы в среде (рис. 4, 5).

Таблица I

Активность ЦГТ-азы при различных источниках углерода в среде В

Источник углерода %		Время культивирования, ч	Активность ЦГТ-азы Е/л
Глюкоза	2	240	0
Арабиноза	2	240	0
Галактоза	2	240	0
Глицерин	2	240	0
Этанол	2	240	0
Инулин	I	264	30
Сироп крахмала	I	264	40
Картофель	I0	264	20

Достигнутая ЦГТ-азная активность - 200 Е/л, амилазная активность - I300 Е/л ЦГТ-азная активность начинает повышаться в среде по исчерпании в среде редуцирующих сахаров. Амилазная активность сопровождает рост культуры, остается стабильной до добавления NH_4Cl на уровне 400 Е/л и повышается одновременно с ЦГТ-азной активностью. Соотношение между амилазной и ЦГТ-азной активностью остается на последней стадии культивирования почти постоянным, соответственно 7:I.

В таблице 2 приведены сравнительные данные параметров роста на средах В и С. Если источником углерода является глюкоза, культура имеет в обеих средах равную удельную скорость роста, 226 $ч^{-I}$. Удельная скорость роста культуры в среде С низкая, так как в среде в данном случае уже потреблены основные питательные компоненты.

Таблица 2

Параметры роста на средах ЦВ и С

Среда / источник углерода	μ_{max} $ч^{-1}$	Y_{max} %	q_{max} $ч^{-1}$
Среда В			
глюкоза, 20 г/л	0,226	28	8,16
Среда С			
глюкоза, 7 г/л	0,226	30	1,17
растворимый крахмал			
20 г/л	0,006	54	0,02

Выход амилазной и ЦГТ-азной активности (выражена в единицах на час и на количество крахмала в г) составляет 3900 и 600 Е/ч*г соответственно. Такие данные сравнимы с данными из литературы [13], где получен выход ЦГТ-азной активности на среде С - 745 Е/ч*г.

В итоге можно сказать, что в B. macerans можно успешно культивировать на синтетических и природных средах. Но, ЦГТ-азная активность проявляется в среде, где источником углерода служит крахмал, продукты гидролиза крахмала, и по данным этой работы - инулин, по потреблению источника углерода и редуцирующих сахаров. Крахмал сам по себе не является индуктором биосинтеза ЦГТ-азы. После выращивания бациллы на среде с глюкозой можно переключить культуру на биосинтез ЦГТ-азы. Лимитация азота подавляет биосинтез ЦГТ-азы. Высокая активность ЦГТ-азы достигнута при культивации B. macerans на естественной и полусинтетической средах.

Литература

1. Szejtli J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. - Budapest: Akademiai Kiado. 1982. P. 296.

2. Horikoshi K. Production on industrial application of β-cyclodextrins // Process Biochemistry. 1979. Vol. 5. P. 26-30.

3. Horikoshi K., Ando T., Yoshida K., Nakamura W. Production of cyclodextrin. UK Patent No. 1459654. 1974.

4. Hokse H., Kaper F., Wijnkema J.T. Process for the manufacture of cyclodextrin. US Patent No. 4477568. 1984.

5. 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. 23. P. 309-321.

6. Пейпман Э.М., Пальм Т.Б. Метод получения биомассы Bacillus macerans // Тр. Таллиннск. техн. ун-та. 1989. № 688. С. 43-51.

7. Пейпман Э., Ванаталу К. Характеристика ферментного комплекса Bacillus macerans и применение его при получении циклодекстринов. УП. Изучение роста Bacillus macerans и биосинтеза ЦГТ-азы // Тр. Таллиннск. техн. ун-та. 1990. № 715. С. 28-36.

8. Scott T.A., Melvin E.H. Determination of dextran with anthrone // Anal. Chem. 1953. Vol. 25, N 11. P. 1656-1661.

9. Tegge G., Nierle W. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker in Strkehydrolysaten // Stärke. 1965. Vol. 17, N 4. S. 107-110.

10. Кестнер А., Вокк П., Паппель К., Пейпман Э. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикл. биохим. и микробиол. 1989. Т. 25. №3. С. 425-430.

11. Matzuzawa M. et al. - Starch/Stärke. 1975. N 27. P. 410-413.

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

13. Laszlo E., Banky B., Szejtli J. Vergleich der Cyclodextrin-transglykosylase - Erzeugung bei verschiedenen Bacillus macerans - Stammen // Starch/ Stärke. 1980. 32, N 1. S. 27-29.

E. Peipman, K. Vanatalu, M. Kirme

Tsüklodekstriinglükosüültransferaasi biosünteesi Bacillus macerans'i kultiveerimisel erinevail söötmeil

Kokkuvõte

Uuriti CGT-aasi biosünteesi Bacillus macerans'i kultiveerimisel erinevail söötmeil ja süsinikuallikail (kartulitükid ja puljong, sünteetiline ja poolsünteetiline sööde, glükoos, arabinoos, tärklis jt.). Suurimad CGTaasi aktiivsused saadi, kasutades süsinikuallikana tärklist, tärklise hüdrolüüsiprodukte ja käesoleva töö andmeil ka kasutades inuliini. Kasvatades kultuuri söötmel glükoosiga, on võimalik teda ümber lülitada CGTaasi biosünteesile. Lämmastiku limitatsioon aeglustab CGTaasi biosünteesi.

E. Peipman, K. Vanatalu, M. Kirme

Biosynthese der Cyclodextringlycosyltransferase während der Kultivierung von Bacillus macerans in verschiedenen Medien

Zusammenfassung

Die Untersuchung der Biosynthese der CGTase von Bacillus macerans in verschiedenen Medien und Kohlenstoffquellen ist durchgeführt (Kartoffelstücke, -Bouillon, synthetisches u. halbsynthetisches Medium, Glucose, Arabinose, Stärke u.a.). CGT-Aktivität ist höher in Medien, worin Stärke, Produkte der Stärkehydrolyse und Inulin als Kohlenstoffquelle dienen. Nach der Kultivierung des Bacillus in Medium mit Glykose kann man die Kultur zur Biosynthese CGTase umschalten, wobei Stickstoff als limitierender Faktor gilt. Die höchsten Aktivitätswerte der CGTase wurden im natürlichen und halbsynthetischen Medien geacnteu (200 U/l).

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 668.526.85:547.458.68

А. Менерт

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА ЭФИРНОГО МАСЛА ТМИНА С БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ МЕТОДОМ ЭКСТРАГИРОВАНИЯ

В процессе извлечения из растительного сырья, особенно перегонкой, эфирные масла освобождаются от природных фиксаторов – смол и жирных масел – и таким образом легко подвержены действию света, окислению и испарению.

Главным преимуществом циклодекстринов, чем обосновано использование их в промышленности ароматизаторов, до сих пор является защита включенных в молекулярные комплексы с ними компонентов вкусовых веществ от вышеупомянутых действий.

В нашей предыдущей работе [1] показано, что весьма возможно получить комплексы эфирных масел с β-ЦД непосредственно из растительного сырья, минуя отдельную стадию извлечения масла. Вначале эфирные масла из растительного сырья переводятся в газовую фазу и вслед за тем адсорбируют их раствором β-ЦД. Таким образом комплексообразование эфирных масел с β-ЦД наряду с защитой является и своеобразным способом извлечения масла из растительного сырья.

Экстрагирование как способ извлечения эфирного масла давно известен, но ограничивается производством лишь нескольких масел ввиду огне- и взрывоопасности большинства растворителей. Раствор β-ЦД лишен таких недостатков и может также использоваться в качестве экстрагента на основе комплексообразующей способности β-ЦД с составными частями эфирных масел.

Целью настоящей работы была разработка условий получения комплекса тминного масла с β-ЦД методом экстрагирования и количественная характеристика полученного комплекса.

Материалы и методы

В работе использовались препарат β-ЦД подсобного предприятия "Биоэстрон" колхоза Куусалу и целые плоды тмина (Carum carvi L.) местного происхождения.

Для приготовления комплексов эфирных масел с β-ЦД средством экстрагирования служил, изображенный на рис. I, термостатированный экстрактор вместимостью I0 или 45 мл, заполненный растительным сырьем.

Колбу с раствором β-ЦД в смеси этанол-вода (I:3) (2) поместили на магнитную мешалку с обогревом (I). С помощью перистальтического насоса (3) раствор β-ЦД направили в нижнюю часть экстрактора (4). В спирали, находящейся в водяной рубашке экстрактора, раствор β-ЦД нагревался до температуры 70 °С и вслед за этим был направлен на растительное сырье (5) в верхней части экстрактора. Температуру 70 °С выбрали, чтобы использовать и способность гидродиффузии растительной ткани, т.е. диффузии находящегося в растении эфирного масла под влиянием влаги и тепла через клеточную мембрану [2]. За образованием комплекса следили в пробах, которые брали с помощью шприца (7).

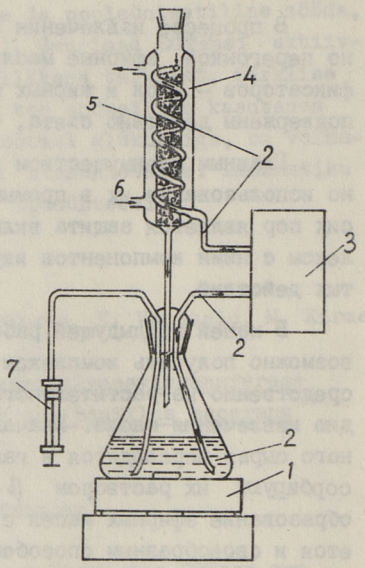


Рис. 1. Прибор для получения комплекса эфирного масла с β-ЦД методом экстрагирования: 1 – магнитная мешалка с обогревом; 2 – раствор β-ЦД, 3 – перистальтический насос, 4 – экстрактор, 5 – растительное сырье, 6 – вода из термостата, 7 – шприц для отбирания проб.

Выкристаллизацию твердого комплекса осуществляли по методу, описанному Сейтли и др. [3]. Содержание эфирного масла в тмине определяли методом Гинзберга [4].

Содержание эфирного масла в реакционной смеси и в твердых комплексах определяли, используя УФ-спетрофотометрию, с помощью спектрофотометров "Specord UV-Vis" и "VSU-2P" (Carl Zeiss, Jena), как это описано ранее [5]. Характерные для тминного масла максимумы поглощения при λ = 236 нм и λ = 320 нм обусловлены карвоном [6]. Верма [7] измерял содержание чистого карвона и карвона в составе укропного масла в растворах метилового спирта при λ =320 нм. В данном исследовании содержание тминного масла определено при λ = 236 нм, с учетом большего при этой длине волны значения коэффициента молекулярного поглощения (ε = 1,52 и ε = 4,28, соответственно, см. рис. 2).

Результаты и обсуждение

Целью первоначальных экспериментов было изучение самого процесса комплексообразования, чтобы выяснить оптимальные соотношения исходных веществ, продолжительность процесса и объемную скорость раствора β-ЦД. Объектом исследования являлся жидкий комплекс тминного масла с β-ЦД, результаты приготовления которого приведены в таблице I.

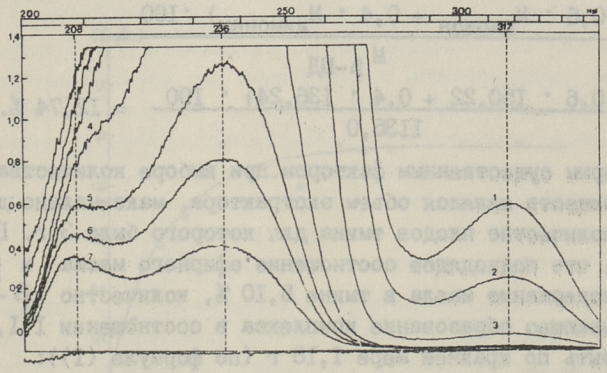


Рис. 2. УФ-спектр тминного эфирного масла. Концентрации:
1 - 4,28 мг/мл, 2 - 2,14 мг/мл, 3 - 0,428 мг/мл, 4 - 0,0856 мг/мл, 5 - 0,0428 мг/мл, 6 - 0,0268 мг/мл, 7 - 0,0143 мг/мл. Разбавления сделаны 96 %-ным этанолом.

В основе содержания эфирного масла в комплексе с циклодекстрином лежит соотношение масс молекулы-гостьи и молекулы хозяина, поскольку эфирные масла и их компоненты образуют с β-ЦД чаще всего комплексы в соотношении I:I. Если

Таблица I

Получение жидкого комплекса тминного масла с β-ЦД

№ опыта	Исходные вещества			Макс. содержание эф. масла в реакц. смеси		Выход масла		
	кол-во плодов тмина, г	кол-во эф. масла (по расчету) мг	объемная скорость раств. β-ЦД	мг/мл	время для достижения этого, мин	мг	% из расчетного количества	% из плодов тмина
I	3,0002	I53,0	I,30	0,947	65	93,76	6I,28	3,I3
2	3,0	I53,0	I,30	0,687	50	67,9I	44,39	2,26
3	3,0	I53,0	I,30	0,82I	60	8I,56	53,3I	2,72
4	3,0020	I53,I	0,65	0,650	80	64,68	42,25	2,I5
5	3,00I0	I53,I	0,65	0,567	70	56,37	36,82	I,88
6	I,0020	5I,0	I,30	0,375	60	37,29	72,97	3,72
7	2,00I5	I02,I	I,30	0,673	50	67,04	65,66	3,35

состав тминного масла принять приблизительно как 60 % карвона и 40 % лимонена, максимально возможное содержание масла в комплексе было бы следовательно:

$$\frac{(0{,}6 \cdot M_{\text{карвон}} + 0{,}4 \cdot M_{\text{лимонен}}) \cdot 100}{M_{\beta\text{-ЦД}}} =$$

$$= \frac{(0{,}6 \cdot 150{,}22 + 0{,}4 \cdot 136{,}24) \cdot 100}{1135{,}0} = 12{,}74\ \%.$$

Вторым существенным фактором при выборе количества исходных веществ являлся объем экстрактора, максимально допустимое количество плодов тмина для которого было 3 г. Предполагая, что подходящее соотношение эфирного масла и β-ЦД 0,I3 и содержание масла в тмине 5,I0 %, количество β-ЦД, обеспечивающее образование комплекса в соотношении I:I, должно быть по крайней мере I,I8 г (по формуле (I)):

$$b' = \frac{0{,}13 \cdot a \cdot 100}{c} = \frac{b \cdot 100}{c}\ [г], \qquad (I)$$

где a – количество β-ЦД, г;

b – количество эфирного масла, г;

b' – количество растительного сырья по расчету, г;

c – содержание эфирного масла в растительном сырье, %;

$$a = \frac{b' \cdot c}{0{,}13 \cdot 100} = \frac{3 \cdot 5{,}1}{13} = 1{,}18 \text{ г}.$$

Под количеством эфирного масла по расчету подразумевают количество масла, которое может содержаться в растительном сырье. Это можно найти по содержанию масла в данной партии сырья, определенному например по Гинзбергу.

Фактически работали с растворами β-ЦД с концентрацией 2,25 г/100 мл в объеме 100 мл, что гарантировало заметный избыток β-ЦД и тем самым обеспечение всех молекул компонентов масла (гостья) молекулами β-ЦД (хозяина). Дополнительным подтверждением этого являются опыты 7 и 8 – при уменьшении количества тмина оставалось низким и максимальное содержание масла, если сравнить например с опытами 1–3, проведенными в сходных условиях (см. табл. 1).

По этим предварительным данным трудно сделать вывод об оптимальном соотношении эфирного масла и β-ЦД. Максимальное выделение эфирного масла из плодов тмина – 72,97 % – получили при соотношении 0,0227 (опыт 6), но вполне удовлетворительный выход масла можно получить и при соотношениях вдвое или втрое больше (опыты 1, 7).

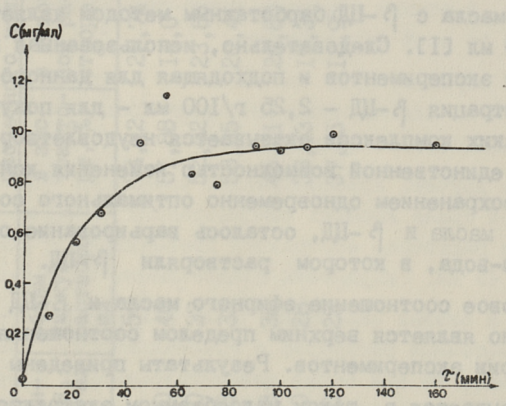


Рис. 3. Динамика накопления тминного масла в комплекс с β-ЦД по методу экстрагирования.

Эксперименты проводили продолжительностью от 120 до 180 минут. Максимального содержания эфирного масла в реакторе достигали в течение 50–80 минут (см. табл. 1). Оптимальной продолжительностью эксперимента можно считать 80–

- 100 минут. Ход образования комплексного тминного масла с β-ЦД в зависимости от времени изображен на рис. 3

Из двух проверенных объемных скоростей раствора β-ЦД лучшим оказывается 1,30 мл/мин, в результате которого максимальное содержание эфирного масла достигается в среднем в течение 60 минут (опыты 1-3 и 6, 7, см. табл. 1). При вдвое меньшей скорости время эксперимента удлиняется до 70-80 минут, а максимально достигаемое содержание эфирного масла в реакционной смеси остается низким (опыты 4 и 5).

Вместе с тем, из удачных экспериментов видно, что содержание эфирного масла в данной партии плодов тмина, полученных методом экстрагирования, приближается к действительному содержанию масла (5,10 %), определенному методом Гинзберга.

Далее была поставлена цель выкристаллизации жидкого комплекса, полученного при разработанных условиях.

Для кристаллизации комплексов β-ЦД с ароматизаторами по методу совместной кристаллизации (cocrystallization) рекомендуется концентрация раствора β-ЦД 5,5 г/100 мл [3]. Оптимальной концентрацией для получения твердых комплексов тминного масла с β-ЦД барботажным методом является 3,0 г/100 мл [1]. Следовательно, использованная в предыдущей серии экспериментов и подходящая для данного экстрактора концентрация β-ЦД - 2,25 г/100 мл - для получения кристаллических комплексов оказывается неудовлетворительной. Поэтому, единственной возможностью изменения концентрации β-ЦД, с сохранением одновременно оптимального соотношения эфирного масла и β-ЦД, осталось варьирование объема смеси этанол-вода, в котором растворяли β-ЦД.

Весовое соотношение эфирного масла и β-ЦД выбрали 0,075, оно является верхним пределом соотношения в предыдущей серии экспериментов. Результаты приведены в табл. 2.

Оказывается, в таком малообъемном экстракторе можно получить комплексы тминного масла с β-ЦД с довольно большим выходом только в жидком виде и до концентрации β-ЦД 3,03г/100 мл, за счет одновременного уменьшения объема циркулирующего раствора до 33 мл.

Таблица 2

Получение твердого комплекса тминного масла с β-ЦД в экстракторе с объемом 10 мл

№ опыта	β-циклодекстрин		Выход тминного масла из расчетного количества			Твердый комплекс		Выход эф. масла из плодов тмина (в экстракторе), %
	концентрация, г/100 мл	объем циркул. раствора мл	в экстракторе, %	в маточном растворе, %	в твердом комплексе, %	выход, %	содержание масла, %	
1	2,0	50	74,22	21,74	41,27	40,9	7,04	1,85
2	2,50	40	51,88	14,0	18,49	20,63	6,25	1,33
3	2,70	37	52,02	23,85	22,87	21,71	7,35	1,32
4	3,03	33	58,05	20,41	35,49	34,27	7,22	1,45
5	3,33	30	45,61	26,87	13,58	14,44	6,56	1,087
6	3,60	28	38,43	19,31	21,60	30,49	4,94	0,98
7	3,90	25	37,05	12,95	17,95	18,55	6,75	0,99

Проверка достоверности полученных результатов в виде выхода масла из плодов тмина показывает, что он в согласии с содержанием масла по Гинзбергу (2,5 %).

Дальнейшее уменьшение объема раствора до 25 мл для повышения концентрации β-ЦД до 3,90 г/100 мл оказывается недостаточным, чтобы циркулировать через систему. Уменьшается выход масла, заключенного в жидкий комплекс как в отношении масла по расчету, так и в отношении плодов тмина.

Попытки повысить концентрации β-ЦД путем уменьшения объема раствора при неизменном количестве тмина не улучшают и условий кристаллизации. При всех концентрациях β-ЦД в маточном растворе остается в среднем 19,9 % масла, что приблизительно столько же, сколько получают в виде твердого комплекса (в среднем 21,7 %, кроме опыта 1, см. табл. 2). Возможное увеличение выходов масла и продукта остается незаметным ввиду огромных потерь материала у стенок системы как во время образования комплекса, так и при кристаллизации и фильтрации.

Единственным положительным результатом отметим удерживание содержания масла в среднем при 6,59 % во всех комплексах, в основе которого лежит равное соотношение масла и β-ЦД во всей серии опытов.

Таким образом, этот малообъемный экстрактор мог бы служить только для изучения динамики процесса, без выделения кристаллического продукта.

Чтобы изучать кристаллизацию комплекса тминного масла с β-ЦД при более высоких концентрациях β-ЦД при неизменном объеме раствора, экстракция проводилась в экстракторе с объемом 45 мл. Результаты представлены в таблице 3.

Если в слабых растворах β-ЦД разделение эфирного масла между маточным раствором и кристаллическим комплексом почти равное, то при более концентрированных растворах разница почти двукратная, в пользу кристаллического комплекса. Максимальный выход эфирного масла (36,5 %) достигается при концентрации β-ЦД 3,6 г/100 мл.

Как и можно было предугадать, при высших концентрациях β-ЦД получают и большие выходы продукта. Начиная с концентрации 2,7 г/100 мл они в пределах 50 %, что превышает этот показатель барботажного метода (35 %) [11], но все же

Таблица 3

Получение твердого комплекса тминного масла с β-ЦД в экстракторе с объемом 45 мл

№ опыта	Конц. β-ЦД г/100 мл	Выход тминного масла из расчетного количества			Твердый комплекс		Выход эф. масла из плодов тмина (в экстракторе), %
		в экстракторе, %	в маточном растворе, %	в твердом комплексе, %	выход, %	содержание масла, %	
I	2,5	5I,0	26,09	27,36	34,07	7,30	I,3I
2	2,7	55,53	24,60	33,53	53,75	5,67	I,43
3	3,0	57,23	I3,22	28,24	45,33	5,66	I,47
4	3,3	40,93	I2,52	25,87	55,85	4,2I	I,05
5	3,6	74,98	I8,80	36,49	49,62	6,68	I,93
6	3,9	63,48	I4,I3	24,2I	43,32	5,08	I,63

уступает выходу продукта по методы совместной кристаллизации (89,9 %) [3].

Одновременно содержание масла в комплексах не уменьшается.

Оптимальной для данного экстрактора можно считать концентрацию β-ЦД 3,6 г/100 мл, при которой выход продукта 50 % от исходных веществ с содержанием масла в нем около 7 %. В комплекс включено до 75 % находящегося в плодах тмина эфирного масла (см. табл. 3).

Наряду с другими различиями, в последних двух сериях опытов различаются и соотношения эфирного масла и β-ЦД, они соответственно 0,075 (табл. 2) и 0,1 (табл. 3). Если для приготовления комплекса принимать эфирное масло в количестве, превышающем его оптимальное соотношение с β-ЦД, очевидно, что часть масла может находиться в комплексе в адсорбированном на поверхности кристаллов β-ЦД виде. Наоборот, если, используя избыток β-ЦД, добывается больший выход эфирного масла, можно предполагать, что дело имеется только с включенным в комплекс с β-ЦД эфирным маслом.

Таблица 4

Изменение выхода тминного масла в зависимости от соотношения масла и β-ЦД

Весовое соотношение тминного масла и β-ЦД	Выход тминного масла (в экстракторе) из расчетного кол-ва, %	Конц. β-ЦД, г/100 мл
0,0227	72,97	2,25
0,0454	65,66	2,25
0,0680	61,28	2,25
0,075	74,22	2,0
0,1	51,0	2,5

К примеру в таблице 4 сравнивали данные из трех предыдущих серий опытов. В последней строке приведен выход масла первого опыта из табл. 3. Видно, что этот, по сравнению с другими, при почти такой же концентрации β-ЦД, намного меньше. Большие выходы при соотношении тминного масла и β-ЦД 0,1 получили лишь в более сильных растворах β-ЦД.

Итак, оказывается, что для лучшего образования комплекса тминного масла методом экстрагирования необходим определенный избыток β-ЦД. Это, видимо, отчасти обусловлено использованием растительного сырья в неизмельченном виде и вместе с тем увеличением диффузионного сопротивления.

В заключение отметим, что о спиртово-водных растворах β-ЦД действительно может идти речь как о возможных экстрагентах для извлечения эфирного масла из растительного сырья. Однако точные условия получения комплекса требуют еще более подробного изучения.

Литература

I. Менерт А.А. Получение комплексов эфирных масел тмина и лаврового листа с бета-циклодекстрином // Труды ТТУ. 1990. № 715. С. 58-69.

2. Справочник технолога эфирномасличного производства / Под ред. А.П. Чипиги. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1981. 184 с.

3. Szejtli J., Szente L., Kolta R., Lindner K., Zilahi T., Koeszegi B. A method for preparation of cyclodextrin inclusion complexes with natural and artificial spices, aroma and flavour compounds. Hung. pat. 174 699 (1979).

4. Персидская К.Г., Чипига А.П. Справочник для работников эфирномасличных предприятий. М.: Легкая и пищевая промышленность. 1981. 144 с.

5. Менерт А.А., Лаас Р.Ф., Крээн М.И. Количественная характеристика комплексообразования укропного и лаврового масла с бета-циклодекстрином // Труды ТТУ. 1989. № 688. С. 79-91.

6. Горяев М., Плива И. Методы исследования эфирных масел. Алма-Ата: Изд-во АН Каз. ССР. 1962. 752 с.

7. Verma S.M. Carvone analysis by ultra violet absorption in Indian dill oils (Anethum sowa) // Current Science. 1960. Vol. 29. N 9. P. 345-346.

A. Menert

Köömneõli β-tsüklodekstriinikompleksi saamine ekstraktsioonmeetodil

Kokkuvõte

Käsitletakse β-tsüklodekstriini (β-CD) lahuse kasutamist võimaliku ekstrahendina taimsest materjalist eeterlike õlide eraldamiseks. Kasutades lähteainena purustamata köömneseemneid (Carum carvi L.), õnnestus eraldada kuni 75% neis leiduvast eeterlikust õlist, paraku tahke β-CD kompleksi koostises osutus olevat vaid 36 %. Optimaalsetel tingimustel saadud kristalse kompleksi saagis oli 50 %, mis on suurem kui barbotaažmeetodi puhul.

A. Menert

Complex Formation of Caraway Oil with β-cyclodextrin by Extraction method

Abstract

The possibility of utilizing the solution of β-cyclodextrin (β-CD) as a solvent for extraction of essential oil from plant substance is discussed. In the case of caraway (Carum carvi L.) as a raw material we succeeded in isolating up to 75 % of essential oil present in the whole seed but unfortunately only 36 % of it appeared to be in the composition of crystal β-CD complex. The total yield of crystal complex obtained in optimum conditions was 50 % which exceeds the yield of gas-bubbling method.

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

УДК 541.182.644

Г. Калбин

ПОЛУЧЕНИЕ ИОНОТРОПНЫХ ГЕЛЕЙ КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Ионотропные гели полисахаридов находят применение в качестве матриц для иммобилизации ферментов и клеток. С этой целью испытаны гели альгинатов, пектинатов, каппа-каррагинана, хитозана и некоторых синтетических полимеров [1]. Образование гелей при сшивании растворов карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) ионами двух- и трехвалентных металлов описано еще в 1959 году [2]; однако до настоящего времени в литературе не описано попыток их использования в биотехнологии.

Карбоксиметилцеллюлоза производится в промышленном масштабе и является крупнотоннажным и недорогим продуктом. КМЦ применяется в пищевой промышленности [3, с. 217], а значит, доказана ее безвредность. Карбоксиметилцеллюлоза нашла широкое применение в медицине, так как удовлетворяет жестким требованиям, предъявляемым к полимерам медицинского назначения [4]. В отличие от полисахаридов, выделяемых из природного сырья (альгинатов, каррагинанов и т.п.), КМЦ является продуктом полусинтетическим, т.е. свойства полисахарида можно целенаправленно изменять. Использование КМЦ в качестве носителя при наличии удобного метода иммобилизации было бы весьма логичным.

Исходя из вышеизложенного, представляется необходимым изучить способы получения и свойства ионотропных гелей КМЦ с точки зрения их пригодности в качестве матриц для иммобилизации.

Как правило, полисахариды образуют ионотропные гели не со всеми поливалентными катионами. Например, альгинаты не образуют гелей в присутствии ионов магния [5], ж-каррагинан, образующий прочные гели под действием ионов калия, не гелируется ионами натрия и лития [6]. Нами прове-

дено систематическое исследование с целью определения катионов, вызывающих образование гелей карбоксиметилцеллюлозы, и сравнения физико-химических характеристик полученных гелей.

Характеристика исходных веществ

Исходный материал для получения гелей КМЦ - Na -КМЦ - коммерчески доступен в виде препаратов с различными характеристиками.

Натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы характеризуется степенью замещения по карбоксиметильным группам и степенью полимеризации, которые согласно ОСТ 6-05-386-80, указываются в обозначении марок Na-КМЦ дробью. В числителе приводится число КМ-групп, содержащихся в 100 элементарных звеньях макромолекулы целлюлозы, в знаменателе - степень полимеризации.

В соответствии с такой маркировкой препараты Na-КМЦ, использованные в нашей работе, будут обозначены как 70/300, 55/500, 70/450, 85/550 и 70/740.

Соли поливалентных металлов, использованные нами для приготовления растворов - источников противоионов, а также реактивы, примененные для анализа, имели квалификацию "х.ч." или"ч.д.а."

Проведение эксперимента

Na-КМЦ (85/550) была растворена в дистиллированной воде в концентрации 5 %. Полученный раствор по каплям прибавляли к растворам солей различных металлов при соотношении объемов раствор Na-КМЦ/раствор соли около 1:20. Концентрации растворов солей и результаты испытаний приведены в таблице I.

Карбоксиметилцеллюлоза образует ионотропные гели при обработке ионами Ba^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}, Al^{3+}, Fe^{3+}. При контакте с двухвалентными ионами железа образуется очень непрочный гель, разрушающийся при слабом перемешивании раствора. Контакт с катионами Mg^{2+}, Ca^{2+} и Hg^{2+} не приводит к гелеобразованию. Гели трехвалентных катионов тверже, чем образованные в тех же условиях двухвалентными противоионами.

Таблица I

Исследование гелеобразования КМЦ

Источник противоионов	Концентрация раствора соли, М	Гелеобразование	а) Примечание (цвет частиц геля)
I	2	3	4
Двухвалентные катионы	0,05	–	
$CaCl_2$	0,10	–/+	–
	0,25	–/+	
	0,05	–	
$Mg(NO_3)_2$	0,10	–	–
	0,25	–	
	0,05	–/+	
$Ba(NO_3)_2$	0,10	+	белый
	0,25	+	
	0,05	–/+	
$CdCl_2$	0,10	+	белый
	0,25	+	
	0,05	+	
$CuSO_4$	0,10	+	голубой
	0,25	+	
	0,05	+	
$ZnCl_2$	0,10	+	белый
	0,25	+	
	0,05	+	
$Pb(NO_3)_2$	0,10	+	белый
	0,25	+	
$Hg(NO_3)_2$	0,05 (насыщен. раствор)	–/+	бурый
$Ni(NO_3)_2$	0,05	+	светло-зеленый
	0,10	+	
	0,25		
	0,05	–/+	светло-зеленый
$FeSO_4(NH_4)_2SO_4$	0,10	–/+	
	0,25	–/+	
Трехвалентные катионы	0,05	+	
$Fe(NO_3)_3$	0,10	+	красный
	0,25	+	

I	2	3	4
$Al_2(SO_4)_3$	0,05	+	белый
	0,I0	+	
	0,25	+	
$NH_4Al(SO_4)_2$	0,05		белый
	0,I0	+	
	0,25		

а) Символы соответствуют виду системы спустя 20 минут после добавления раствора Na-КМЦ:

– прозрачный или слегка мутный раствор;
–/+ в растворе присутствуют аморфные агрегаты полимера,
+ частицы геля имеют четкие очертания и преимущественно сферическую форму.

Для оценки гелей-носителей по растворимости в воде в предполагаемых рабочих условиях был проведен эксперимент, результаты которого представлены в таблице 2. Для удобства ее прочтения методика эксперимента будет описываться здесь же.

Испытывались гели, полученные из Na-КМЦ четырех различных марок: 70/300, 55/500, 85/550 и 70/740. Для Na-КМЦ марки 70/740 в качестве гелеобразователей были использованы три различных соли эквинормальные в отношении ионов Me^{3+} – растворы $Al_2(SO_4)_3$, $NH_4Al(SO_4)_2$ и $Fe(NO_3)_3$ (строки 6, 7, 8 в табл. 2).

Частицы носителей приготовлялись протиранием гелевых блоков через сито с последующим выдерживанием в растворе гелеобразователя при комнатной температуре в течение получаса и мокрым просеиванием в водопроводной воде. На примере геля, полученного из Na-КМЦ марки 55/500, для сравнения были испытаны сферические частицы, для формования которых был использован вибрирующий капилляр (игла шприца) – строки 2, 3 табл. 2. Во всех случаях использовались частицы одной ситовой фракции: 0,25–0,63 мм.

В строках 2 и 4 табл. 2 приведены результаты опытов, отличающихся друг от друга только концентрацией исходного раствора Na-КМЦ: 5 и I0 %, в строках 6 и I0 – отличающихся друг от друга только температурой раствора $NH_4Al(SO_4)_2$ при выдерживании частиц после протирания через сито.

Эксперименты проводили следующим образом:

а) образцы носителя взвешивали и помещали в стеклянные ячейки. Влажный вес частиц определялся после осушения их поверхности фильтровальной бумагой; значения $m_{вл.}^{исх.}$ приведены в колонке 2 таблицы 2.

б) в ячейки добавляли примерно десятикратный по отношению к объему частиц объем водопроводной воды и к слою частиц опускали капилляр для подачи воздуха. В одном случае pH воды предварительно был доведен до 5,0 добавлением лимонной кислоты. Результаты этого эксперимента представлены в строке 9 табл. 2.

в) ячейки помещали в воздушный термостат при 57 $\pm$2 °C и включали компрессор. Подаваемый в каждую ячейку через капилляр слабый ток воздуха постоянно перемешивал жидкость, не взмучивая частицы. По мере испарения воды при необходимости ее объем доводили до первоначального.

г) по окончании эксперимента (через 15 суток) были определены в каждой ячейке:

- объем воды и концентрация в ней КМЦ. Количество растворившейся КМЦ m_0 в миллиграммах приведено в колонке 3 таблицы 2;

- остаточный влажный вес частиц (после осушения их поверхности фильтровальной бумагой) $m_{вл.}^{ост.}$ колонка 4;

- остаточный сухой вес $m_{сух.}$, для чего частицы были высушены при 150 °C в течение 30 часов, - колонка 5.

На основании полученных данных были вычислены:

Влажность геля

Начальная влажность определена по формуле

$$\frac{m_{вл.}^{исх} - (m_{сух.} + m_0)}{m_{вл.}^{исх.}} \cdot 100 \quad [\%]$$

ее значения приведены в 6-й колонке таблицы.

Влажность частиц гелей в конце эксперимента вычислена как

$$\frac{m_{вл.}^{ост} - m_{сух.}}{m_{вл.}^{ост.}} \cdot 100 \quad [\%]$$

и представлена в колонке 7.

Таблица 2

Растворимость гелей КМЦ в водопроводной воде при 57±2 °С за I5 суток

	Марка КМЦ, гелирующий агент, условия приготовления и испытания	Исходный влажный вес, $m_{бл.}^{исх.}$, г	Растворимость КМЦ (рассчитано по концентрации КМЦ в растворе) m_0, мг	Остаточный влажный вес, $m_{бл.}^{ост.}$, г	Остаточный сухой вес, $m_{сух.}$, г	Влажность геля: начальная $\frac{m_{бл.}^{исх.}-(m+m_0)}{m_{бл.}^{исх.}}$, %	Влажность геля: конечная $\frac{m_{бл.}^{ост.}-m_{сух.}}{m_{бл.}^{ост.}}$, %	Отношение влажностей нач./кон.	Растворимость носителя: на влажн. вес $\frac{m_0}{m_{бл.}^{исх.}}$, мг/г	Растворимость носителя: на сухой вес $\frac{m_0}{m_{сух.}+m_0}$, мг/г	Примечание
	I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0	II
I	70/300, $NH_4Al(SO_4)_2$, I0% р-р Na-КМЦ, гель протерт через сито	I,5858	3,87	I,5300	0,2848	8I,8	8I,4	I,00	2,44	I3,4	Из 5%-ного раствора Na-КМЦ гель не образуется
2	55/500, $NH_4Al(SO_4)_2$, 5% р-р, через сито	I,7066	I,59	0,7790	0,0984	94,I	87,4	I,08	0,93	I5,9	Частицы слипаются, гель непрочный
3	55/500, $NH_4Al(SO_4)_2$, 5% р-р, гранулы получены выдавливанием из шприца	I,5060	I,46	0,6642	0,0839	94,3	87,4	I,08	0,97	I7,I	Улучшение зернистости, повышение прочности геля
4	55/500, $NH_4Al(SO_4)_2$, I0% р-р, через сито	I,5305	2,63	0,8224	0,I378	90,8	83,2	I,09	I,72	I8,7	
5	85/550, $NH_4Al(SO_4)_2$, 5% р-р, через сито	I,5000	I,I5	0,3004	0,I582	89,4	47,3	I,89	0,77	7,2	
6	70/740, $NH_4Al(SO_4)_2$, 5% р-р, через сито	I,5II0	0,98	0,3352	0,I678	88,8	49,9	I,78	0,65	5,8	Частицы твёрдые, носитель сыпучий
7	70/740, $Fe(NO_3)_3$, 5% р-р, через сито	I,4880	0,79	0,2835	0,I294	9I,3	54,4	I,68	0,53	6,I	Частицы мелкие, игольчатые, красного цвета
8	70/740, $Al_2(SO_4)_3$, 5% р-р, через сито	I,5050	9,72	0,3560	0,I007	92,7	7I,7	I,29	6,46	88,0	Частицы покрупнее, но тоже жёсткие
9	70/740, $NH_4Al(SO_4)_2$, 5% р-р, через сито, в воду добавлена лимонная кислота	I,5073	3,5I	0,52I0	0,I5II	89,7	7I,0	I,26	2,33	22,7	
I0	70/740, $NH_4Al(SO_4)_2$, температура раствора квасцов +40 °С 5% р-р, через сито	I,I2I4	I,6I	I,3938	0,I8I2	83,7	87,0	0,96	I,44	8,8	

В 8-й колонке таблицы вычислено отношение влажностей частиц в начале эксперимента (свежеприготовленных) и по окончании опыта.

Растворимость носителей

Количество растворившейся КМЦ по отношению к влажному весу частиц $m_0/m^{исх.}_{вл.}$ приведено в 9-й колонке и по отношению к сухому весу $m_0/(m_{сух.}+m_0)$-в 10-й колонке таблицы 2. Данные колонки 9 были использованы при первоначальной оценке результатов эксперимента, когда еще не был определен сухой вес $m_{сух.}$.

Обсуждение результатов

Исходя из данных таблицы 2, можно сделать следующие выводы (см. колонку 10):

1. Наименьшей растворимостью обладают гели из Na-КМЦ марки 70/740 (ср. строки 1, 2, 5, 6). Хотя сравнение на основе использованных марок Na-КМЦ не является строго систематическим (варьируется также и степень замещения КМЦ), вывод о том, что повышение степени полимеризации исходной КМЦ приводит к уменьшению растворимости ее ионотропных гелей, можно считать экспериментально подтвержденным.

2. Из трех гелеобразователей - $NH_4Al(SO_4)_2$ $Fe(NO_3)_3$ и $Al_2(SO_4)_3$ (строки 6, 7, 8) - два первых приводят к образованию гелей с одинаково низкой растворимостью. В случае же использования сульфата алюминия растворимость полученного геля по меньшей мере на порядок выше. Как будет показано ниже, такой гель и по плотности, и по механическим свойствам уступает первому варианту.

Остановимся на этом подробнее. Для опыта были приготовлены эквинормальные (0,1 Н) в отношении ионов трехвалентных металлов растворы солей. Разница в свойствах (растворимости) получаемых гелей карбоксиметилцеллюлозы обуславливается, очевидно, свойствами активных катионов, существующих в растворе.

Хорошая комплексообразующая способность ионов железа (III) приводит к тому, что даже в твердом состоянии в железных квасцах существует ион $[Fe(H_2O)_6]^{3+}$, а в сильнокислых

водных растворах солей железа (Ш) (pH используемого раствора $Fe(NO_3)_3$ равен 0,65) дальнейший гидролиз протекает следующим образом [7, с. 1042-1043]:

$$[Fe(H_2O)_6]^{3+} + H_2O \rightleftarrows [Fe(H_2O)_5(OH)]^{2+} + H_3O^+; \quad K_1 = 10^{-3,05}$$

$$[Fe(H_2O)_5(OH)]^{2+} + H_2O \rightleftarrows [Fe(H_2O)_4(OH)_2]^{+} + H_3O^+; \quad K_2 = 10^{-3,26}$$

$$2[Fe(H_2O)_6]^{3+} + 2H_2O \rightleftarrows [Fe_2(H_2O)_8(OH)_3]^{4+} + 2H_3O^+; \quad K = 10^{-2,91}$$

Образующийся бинуклеарный катион легко образует стабильные комплексы с анионами - донорами кислорода - карбоксилатами, фосфатами, гидроксикарбоксилатами и феноксидами; большинство из них анионного типа, а тринуклеарный карбоксилатный комплекс - катионный: $[Fe_3O(OCOR)_6(H_2O)_3]^+$.

Данных об образовании таких комплексов в водных растворах алюминия нами в литературе не найдено, однако, независимо от того, в какой именно гидратированной форме ионы алюминия связываются с карбоксиметилцеллюлозой, легко объяснимо различие в гелирующей способности растворов $NH_4Al(SO_4)_2$ и $Al_2(SO_4)_3$. Известно [8, с. 534], что в разбавленных водных растворах квасцы практически нацело распадаются на простые ионы:

$$KAl(SO_4)_2K^+ + Al^{3+} + 2SO_4^{2-},$$

тогда как ступенчатая диссоциация сульфата алюминия приводит к высвобождению лишь части ионов алюминия. Таким образом, результат нашего эксперимента может быть объяснен, несмотря на эквинормальность использованных растворов, различной концентрацией сшивающих катионов в растворах солей.

3. Различные методы формования гранул - стряхивание с вибрирующего капилляра в раствор соли-гелеобразователя или протирание через сито предварительно отвержденного геля, - как и ожидалось, не оказали влияния на растворимость полученных частиц (строки 2, 3 табл. 2).

Для завершения процесса гелеобразования необходима лишь определенная длительность контактов геля с противоионами (установлено, что длина образца ионотропного геля пропорциональна корню квадратному из продолжительности диффузии [9, с. 99]).

4. Длительность такого контакта, очевидно, зависит от концентрации КМЦ. Об этом свидетельствуют данные в строках 2 и 4 табл. 2. Если взять исходный раствор КМЦ в два раза более концентрированный, а время выдерживания в квасцах не увеличивать, полученный гель будет менее стойким.

5. Ускорить диффузию сшивающих ионов мы пытались, повысив температуру раствора квасцов, в котором выдерживались свежеприготовленные частицы. В 10-й строке таблицы 2 приведены результаты опыта, в котором температура раствора $NH_4Al(SO_4)_2$ была +40 °С. Укрепления геля мы таким образом не достигли (ср. со строкой 6), скорее наоборот. Влажность полученного геля в ходе опыта несколько увеличилась - столбцы 6 и 7 - тогда как у всех гелей, приготовленных при комнатной температуре, уменьшилась.

6. Из сравнения данных, приведенных в строках 6 и 9 табл. 2, можно видеть, что присутствие в растворе лимонной кислоты - вещества с хорошей комплексообразующей способностью - приводит к растворению геля КМЦ. Это свойство всех ионотропных гелей, которое необходимо принимать во внимание при использовании этого метода иммобилизации. В ходе работы с гелями КМЦ мы нашли, что удобнее всего при необходимости растворять гель КМЦ в цитратнофосфатном буфере. При температуре +40 °С и слабом перемешивании частицы диаметром 2 мм полностью растворяются за 1,5-2 минуты; широкий диапазон pH этого буфера (2,2-8,0) удобен для работы с ферментами.

По данным таблицы 2 можно вычислить величину, количественно характеризующую процесс гелеобразования, конкретнее - плотность сшивки геля. Величина λ, определенная как

$$\lambda = \frac{C_{гель}}{C_{р\text{-}р}},$$

где $C_{гель}$ - содержание сухого вещества в свежеприготовленном геле, рассчитано как $(m_{сух} + m_0)/m^{исх.}_{вл.}$, %;

$C_{р\text{-}р}$ - содержание (концентрация) КМЦ в исходном растворе, %; показывает, насколько уплотнилась глобула КМЦ при сшивке.

Значения λ приведены в таблице 3 сравнительными сериями.

Таблица 3

Сравнение гелей КМЦ по величине λ

Гели получены:	λ	№ строки в табл. 2 (условия приготовления геля)
Из различных марок КМЦ		
70/300	I,82	I
55/500	2,I4	2
85/550	2,I2	5
70/740	2,24	6
С помощью солей		
$NH_4Al(SO_4)_2$	2,24	6
$Fe(NO_3)_3$	I,74	7
$Al_2(SO_4)_3$	I,46	8
При исходной концентрации КМЦ		
5 %	2,I4	2
I0 %	I,67	4
При температуре раствора квасцов		
20 °С	2,24	6
40 °С	3,26	I0

Видно, что гидрогели КМЦ содержат примерно в 2 раза меньше воды, чем исходные вязкие растворы. Неплотная сшивка геля может быть обусловлена либо низкой молекулярной массой КМЦ, как в случае КМЦ со степенью полимеризации 300, либо малым количеством активных катионов в растворе соли, как в случае сульфата алюминия, либо недостаточным временем контакта с гелеобразователем, как с I0%-ной КМЦ. При повышении температуры раствора соли, действительно, получается более плотный гель, но, как уже указывалось, это не снижает его растворимости.

Таким образом, проведенное нами исследование позволяет рекомендовать для испытаний в качестве матрицы для иммобилизации ферментов и клеток ионотропные гели карбоксиметилцеллюлозы, полученные на основе препаратов Na-КМЦ с высокой степенью полимеризации и алюмоаммонийных квасцов.

Способ получения иммобилизованных дрожжей Saccharomyces cerevisiae с применением этого носителя успешно защищен авторским свидетельством СССР [IO].

Литература

1. Bucke C. Methods of immobilizing cells // Process Eng. Aspects of Immobilized Cell Syst.. 1986. P. 20-34.

2. Петропавловский Г.А. Карбоксиметилцеллюлоза - ее химические и физико-химические свойства // Ж. прикл. химии. I959, 32, 2, 24I-253.

3. Franzke Cl. Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 1. Lebensmittel-Inhaltstaffe. Akademie-Verlag, Berlin. 1981. 256 S.

4. Капуцкий Ф.Н., Юркиетович Т.Л. Лекарственные препараты на основе производных целлюлозы. Минск: Университетское, I989. III с.

5. Bucke C. Cell immobilization in calcium alginate // Methods in Enzymology. 1987. Vol. 135, part B. P. 341-356.

6. Chibata J., Tosa T., Sato T., Takata I. Immobilization of cells in carrageenan // Meth. in Enzymol. 1987. Vol. 135, part B. P. 189-198.

7. Comprehensive inorganic chemistry. Vol. 3. Pergamon Press. 1975. 1387 p.

8. Краткая химическая энциклопедия. М., I963. Т. 2. I088 с.

9. Толстогузов В.Б. Искусственные продукты питания. М.: Наука, I978. 232 с.

IO. Кёстнер А.И., Калбин Г.Г., Бекер М.Е., Блуибергс Я.Э., Данилевич А.Ф., Лайвениекс М.Г., Лаукевиц Я.Я., Посметный Ю.Е. Способ получения иммобилизованных пекарских дрожжей Saccharomyces cerevisiae. Заявка на а.с. № 4681869/I3 от 07.02.89. Положит. реш. 27.02.90.

G. Kalbin

Karboksümetüültselluloosi ionotroopsete geelide saamine

Kokkuvõte

Esmakordselt uuriti süstemaatiliselt karboksümetüültselluloosi (KMTs) ionotroopsete geelide saamismeetodeid ja füüsikalis-keemilisi omadusi.

Tulemused osutavad, et ensüümide ja rakkude immobiliseerimisel võib maatriksiks soovitada geele, mis on saadud kõrge polümerisatsiooniastmega Na-KMTs preparaatide ja ammoonium-alumiinium maarjase baasil.

G. Kalbin

Ionotropic Gelation of Carboxymethyl Cellulose

Abstract

Techniques of obtaining and physico-chemical characteristics of ionotrope gels of CMC were investigated systematically.

The results indicate that gels based on high-polymeric CMC and aluminium ionotrope may be used as matrixes for immobilized enzymes and microorganism's cells.

Eesti TA Raamatukogu
Tallinn

№ 727

TALLINNA TEHNIKAÜLIKOOLI TOIMETISED
ТРУДЫ ТАЛЛИННСКОГО ТЕХНИЧЕСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

ПРИКЛАДНЫЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

БИОТЕХНОЛОГИЯ УI

УДК 577.154.21.022:536.629.7

Микрокалориметрическое исследование иммобилизованной инвертазы. Кёстнер А., Клеве У. - Труды Таллиннского технического университета. 1991. № 727, с. 3-11.

Сконструирована и построена микроколонка для работы в активной зоне микрокалориметра ЛКБ 2277. Исследовалось тепловыделение иммобилизованными дрожжевыми клетками с инвертазной активностью. Катализатор получен включением клеток в ионотропный гель карбоксиметилцеллюлозы и имел активность 370-550 Е/г. Тепловыделение проходит через максимум перед установлением стабильного стационарного состояния. Интеграл этого дополнительного теплового эффекта составляет около 1000 мДж на грамм катализатора. Уровень стационарного тепловыделения зависит аналогично от концентрации субстрата той же зависимости для свободной инвертазы. Измеряемый поток тепла увеличивается с увеличением скорости протока субстрата. Тепловой выход существенно зависит от способа упаковки катализатора в колонку и может быть выше 0.9. Исследованная микрокалориметрическая система может быть рекомендована для исследования общей метаболической активности гетерогенных биокатализаторов.

Рисунков - 2, библ. наименований - 3.

УДК 577.15.082

Динамический, флуоресцентный pH-биосенсор для контроля биотехнического гидролиза пенициллина
Кяэрд А., Каше В., Ренкен Э., Шитке Г. - Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 12-22.

Изготовлен и испытан on-line биосенсор типа PcA-Sepharose-AF (PcA- пенициллинамидаза, AF - аминофлуоресцеин) для контроля биотехнического гидролиза бензилпенициллина (BP). Разработана система биотехнического гидролиза BP, система автоматических анализов на основе флуоресцентного биосенсора, управляемого с помощью ЭВМ. Сравнены разные типы биосенсорных элементов. Подходящим типом биосенсорного элемента является PcA-Sepharose-AF область измерения конц. BP - 0,1-10 mM линейная область измерения конц. BP - 0,1-2 mM максимальное число измерений в час 20, точность измерения ±2 %, стабильность применения не менее 2 месяцев.

Таблиц - 1, рисунков - 6, библ. наименований - 6.

УДК 577.151.042

Иммобилизация метаболически активных клеток. I Включение Pseudomonas putida в криогели поливинилового спирта. Холстинина В., Кяэрд А.- Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 23-29.

Создана продуктивная установка для включения метаболически актичных клеток в криогель ПВС (поливиниловый спирт). Разработана методика иммобилизации Pseudomonas putida в криогель ПВС. Полученный биокатализатор имеет активность, измеряемую по потреблению бензойной кислоты, A = 0,104 Ед/г абс. сухого препарата и сохранение активности после иммобилизации 59,4 %.

Рисунков - 1, библ. наименований - 2.

УДК 664.28

Получение катионного производного крахмала
Рандла Т., Креэн М. - Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 30-39

Катионные производные крахмала широко используются в бумажной промышленности. В настоящей работе для модифицирования картофельного крахмала использовали 3-хлор-2-гидроксипропил-триметил-аммонийхлорид в виде водного раствора. Процесс катионирования осуществлялся в твердофазной системе в щелочной среде при 20-50 °С в течение 8-10 часов. При вышеприведенных условиях достигли полного привязывания модификатора к крахмалу и получили образцы катионного крахмала со степенью замещения 0,03.

Рисунков - 2, библ. наименований - 6.

УДК 578.851.86, 579.083.13

Изучение иммобилизованной при помощи моноклональных антител циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТ-азы) Bacillus macerans. Микрометод для определения ЦГТ-азной активности. Арбатова Е Н., Реэбен М В. - Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 40-48

Получена иммобилизованная при помощи моноклональных антител (МКА) 5В1 к BrCN -агарозе ЦГТ-аза Bacillus macerans. Изучены некоторые свойства иммобилизованного фермента. Установлено, что поликлональные антитела (ПКА) ингибируют ЦГТ-азую активность практически полностью, МКА 5В1 ингибируют ее только на 40 %. В полисыворотке, полученной к ЦГТ-азе Bacillus macerans примерно 10 % антител узнают ЦГТ-азу Bacillus circulans var. alcolophilis однако МКА 5В1 не узнают нативную и денатурированную ЦГТ-азу Bacillus circulans. Разработан микрометод определения ферментативной активности ЦГТ-азы в 96-луночных иммунологических платах, позволяющий быстро измерить большое количество проб, содержащих малые количества фермента.

Рисунков - 5, библ. наименований - 5.

УДК 577.15.022

Иммобилизация циклодекстринглюканотрансферазы Паппель К.Э., Пейпман Э.М. - Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 49-57.

Изучены возможности иммобилизации на активированной бромцианом агарозе циклодекстринглюканотрансферазы B. macerans и B. circulans. Получен биокатализатор с активностью до 62 Е на г носителя. Выход активности составлял 54 % от первоначального. Исследованы основные каталитические свойства иммобилизованной ЦГТ-азы (ИЦГТ). Выяснилось, что энергия активации реакции синтеза β-циклодекстрина из растворимого крахмала равняется 18,5 кДж/моль, температурный оптимум - 50 °С, $pH_{опт.}$ - 7,0 и $K_м$ - 8,8 г/л. Достигаемая степень конверсии субстрата при синтезе β-ЦД с помощью ИЦГТ в реакторе с перемешиванием превышает 41 %. После 72 часов работы при 40 °С активность катализатора снижается не более чем на 25 %.

Таблиц - 1, рисунков - 5, библ. наименований - 14.

УДК 576.8

Биосинтез циклодекстринглюканотрансферазы при культивировании Bacillus macerans на разных питательных средах. Пейпман Э., Ванаталу К., Кирме М. - Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 58-68

Изучен биосинтез ЦГТ-азы при культивации B. macerans на разных питательных средах и источниках углерода (ломтики картофеля и картофельный бульон, синтетическая и полусинтетическая среда, глюкоза, арабиноза, крахмал и др.). ЦГТ-азная активность проявляется в среде, где источником углерода служит крахмал, продукты гидролиза крахмала и инулин. После выращивания бациллы на среде с глюкозой можно переключить культуру на биосинтез ЦГТ-азы. Высокая активность ЦГТ-азы достигнута при культивации B. macerans на естественной и полусинтетической среде.

Таблиц - 2, рисунков - 5, библ. наименований - 13.

УДК 668.526.85 : 547.458.68

Получение комплекса эфирного масла тмина с бета-циклодекстрином методом экстрагирования.
Менерт А.А. - Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 69-80.

Рассматривают возможности применения раствора β-циклодекстрина (β-ЦД) в качестве экстрагента для извлечения эфирного масла из растительного сырья. В случае, когда тмин являлся исходным веществом, удалось извлечь из целых плодов до 75 % находящегося в них эфирного масла, однако включенным в комплексе с β-ЦД оказалось его лишь 36 %. Выход кристаллического комплекса при оптимальных условиях 50 %, что превышает этот показатель барботажного метода.

Таблиц - 4, рисунков - 3, библ. наименований - 7.

УДК 541.182.644

Получение ионотропных гелей карбоксиметилцеллюлозы
Калбин Г. - Труды Таллиннского технического университета. 1991, № 727, с. 81-92.

Впервые проведено систематическое исследование способов получения и физико-химических характеристик ионотропных гелей карбоксиметилцеллюлозы (СМС) с точки зрения их пригодности.

Показано, что в качестве матриц для иммобилизации ферментов и клеток могут быть рекомендованы гели, полученные на основе препаратов Na-СМС с высокой степенью полимеризации и алюмоаммонийных квасцов.

Таблиц - 3, библ. наименований - 10.

Ep.6.7 Tallinna Tehnikaülikool
Toimetised
727 1991

2.—
~~Руб. 14.10~~