

663

ISSN 0136-3549

0320-3395

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI

TOIMETISED

**ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА**

**TRANSACTIONS OF TALLINN
TECHNICAL UNIVERSITY**

**ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ**



TALLINN 1988

663

ALUSTATUD 1937

TALLINNA POLÜTEHNILISE
INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

TRANSACTIONS OF TALLINN
TECHNICAL UNIVERSITY

УДК 577.15:66.097.3

ХАРАКТЕРИСТИКА
ДЕЙСТВИЯ
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Биотехнология III

Под общей редакцией А.И. Кёстнера

TALLINN 1988

ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
Труды ТПИ № 663

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Биотехнология Ш

На русском языке

Редактор М. Миккал

Техн. редактор В. Ранник

Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 01.04.88

Подписано к печати 27.07.88

МВ-07222

Формат 60x90/16

Печ. л. 6,0 + 0,5 приложение

Уч.-изд. л. 5,2

Тираж 300

Зак. № 535

Цена 1 руб.

Таллинский политехнический институт,

200108 Таллин, Эхитаяте гез, 5

Ротапринт ТПИ, 200006 Таллин, ул. Коскла, 2/9



Таллинский политехнический институт, 1988



УДК 577.15.004.15:547.458.68

А.И. Кёстнер

ЦЕЛЕВАЯ ФУНКЦИЯ ПРИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОМ ПОЛУЧЕНИИ
ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

Кинетика глубокой конверсии субстратов является основной целевой функцией оптимизации биокаталитических процессов. При решении задач оптимизации чаще всего рассматриваются простейшие системы - действие одного фермента на один субстрат и накопление продукта в растворе. При этом соблюдается условие $S_0 = S + P$, т.е. не учитываются параллельные конкурирующие реакции и возможность отвода продуктов из системы. Для таких систем кинетика глубокой конверсии описана обобщенным уравнением, которое нами применено в составе комбинированного кинетико-экономического уравнения при оптимизации [1].

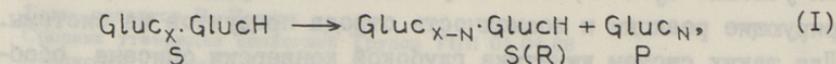
Реальные биокаталитические процессы нередко проводятся не высокоочищенными ферментами, а комплексными препаратами, которые могут катализировать также конкурирующие реакции с образованием нецелевого продукта. Стадия биокаталитического превращения может быть связана с удалением продуктов. В таких случаях уравнение баланса $S_0 = S + P$ уже не соблюдается, что требует принципиального усовершенствования основного уравнения кинетики глубокой конверсии субстрата.

Типичным примером биокаталитического процесса со сложной кинетикой является процесс превращения крахмала под действием неочищенных препаратов циклодекстрингликозилтрансферазы (ЦГТазы).

Целевой продукт данной реакции - циклодекстрины (ЦД) известны как своеобразные комплексообразователи, которые найдут широкое применение в разных областях промышленности [2, 3]. Технология производства ЦД разрабатывается в нашей лаборатории, но к настоящему времени еще не оптимизирована. Для оптимизации технологии необходимо количественное описание процесса биокаталитического превращения, для чего требуется формулировка кинетического уравнения в целевой функции оптимизации. В настоящей статье рассматриваются теоретические вопросы этой задачи.

Описание системы

Рассматривается превращение крахмала под действием неочищенного ферментного препарата, который содержит циклодекстрингликозилтрансферазу (ЦГТазу) и смесь амилаз. Основная целевая реакция протекает под действием ЦГТазы и заключается в переносе гликозидной связи по уравнению (I) с образованием ЦД (продукта P).



где -Gluc- α -1,4-D-глюкозный остаток

GlucH- восстанавливающий конец глюкозной цепи.

Число звеньев в кольце ЦД обозначено числом $6 \leq N \leq 8$. В основном $N = 7$. Реакция (I) протекает без изменения общего содержания гликозидных связей в системе. Субстратом S для целевой реакции служат линейные α -1,4-D-гликозидные цепи с длиной $X + I \geq 8$. Олигосахариды меньшей длины $X + I \leq 7$ считают редуцирующими веществами R, которые являются побочным продуктом.

В разбавленных растворах образование новых гликозидных связей термодинамически невозможно, но под действием ЦГТазы может протекать также реакция диспропорционирования. Эта реакция может частично восстанавливать субстрат $R \rightarrow S$.

Наряду с основной реакцией протекают непродуктивные реакции гидролиза субстрата, а также целевого продукта, что

приводит к уменьшению общего содержания гликозидных связей и образования редуцирующих веществ.

При первом приближении присутствие разветвляющихся α -I,6-гликозидных связей не рассматривается. В самом деле их присутствие в субстрате осложняет основную реакцию, а их гидролиз амилазами благоприятен для образования продукта.

Все ферментативные реакции протекают в водной фазе. Кроме того, в системе присутствует избыток комплексообразователя (толуола, Т) в виде второй жидкой фазы, что обеспечивает постоянную концентрацию толуола в водной фазе. Продукт ЦД образует малорастворимый комплекс К с толуолом, который кристаллизуется с конечной скоростью. Комплекс К является малорастворимым веществом, который выкристаллизовывается, образуя K_c . Процесс кристаллизации также не протекает бесконечно быстро. K_c образует третью, кристаллическую фазу в системе. Общая схема системы приведена на рис. I.

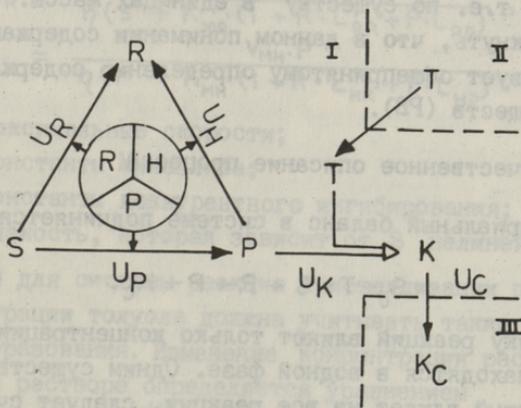


Рис. 1. Схема реакции превращения крахмала под действием препарата трансферазы в присутствии амилаз:
I - водная фаза, II - органическая фаза,
III - кристаллическая фаза. Остальные обозначения в тексте.

В последующих расчетах основные реактанты субстрат S , продукт P и побочный продукт R рассматриваются как индивидуальные соединения. Это предположение явно упрощено, так как в самом деле все реактанты представляют собой смеси разных компонентов

$$S = \sum_{i=8}^{\infty} S_i. \quad (2)$$

$$R = \sum_{j=1}^7 R_j, \quad (3)$$

$$P = \sum_{k=6}^8 P_k. \quad (4)$$

В первом приближении достаточно рассматривать взаимосвязи основных реактантов как условно индивидуальных веществ. В этом случае применяемые в расчетах кинетические константы являются условными, усредненными величинами, которые представляют взвешенную сумму отдельных однотипных констант. Все концентрации при этом выражаются через число глюкозных остатков, т.е. по существу в единицах массы. Следует особо подчеркнуть, что в данном понимании содержание R не соответствует общепринятому определению содержания редуцирующих веществ (РВ).

Количественное описание процесса

Материальный баланс в системе подчиняется уравнению (5)

$$S_0 + T = S + R + P + K_c. \quad (5)$$

На кинетику реакций влияют только концентрации веществ, которые находятся в водной фазе. Одним существенным фактором, который влияет на все реакции, следует считать вязкость. Вязкость определяется в основном содержанием субстрата как макромолекулярного вещества.

Расход субстрата причинен двумя ферментативными реакциями и подчиняется балансу

$$u_s + u_p + u_R = 0, \quad (6)$$

где u_s - отрицательная скорость расхода субстрата;
 u_p - скорость трансферазной реакции;

u_R - скорость амилазной реакции.

При составлении основной системы дифференциальных уравнений (7) учитываются также другие реакции

$$\begin{cases} \frac{dS}{dt} = u_S \\ \frac{dP}{dt} = u_P - u_H - u_K \\ \frac{dR}{dt} = u_R + u_H \end{cases} \quad (7)$$

где дополнительно

u_H - скорость ферментативного гидролиза продукта;

u_C - скорость образования продукта с толуолом.

При описании кинетики отдельных реакций принимается во внимание возможное ингибирующее действие продуктов, что характерно для многих подобных реакций. Нередко ингибирующее действие продуктов имеет смешанный характер. Для простоты принимается, что, в основном, ингибирование соответствует конкурентному механизму. В соответствии с этим определяют уравнения скорости

$$u_P = \frac{V_{MP} \cdot S}{\eta (S + K_{MP} \cdot (1 + R \cdot L_{PR} + P \cdot L_{PP}))}, \quad (8)$$

$$u_R = \frac{V_{MR} \cdot S}{\eta (S + K_{MR} \cdot (1 + R \cdot L_{RR} + P \cdot L_{RP}))}, \quad (9)$$

$$u_H = \frac{V_{MH} \cdot P}{\eta (P + K_{MH} \cdot (1 + R \cdot L_{HR} + P \cdot L_{HP}))}, \quad (10)$$

где V_M - максимальные скорости;

K_M - константы Михаэлиса;

L - константы конкурентного ингибирования;

η - вязкость, которая зависит от S нелинейно.

Важная для системы реакция кристаллизации при постоянной концентрации толуола должна учитывать также скорость комплексообразования. Изменение концентрации растворимого комплекса в растворе определяется уравнением

$$\frac{dK}{dt} = u_K - u_C, \quad (11)$$

где u_K - скорость образования комплекса;

u_C - скорость кристаллизации комплекса.

Скорости этих реакций выражаются уравнениями

$$u_K = k_K \cdot P \cdot T / \eta, \quad (12)$$

$$u_C = k_C \cdot (K - K_0) / \eta, \quad (13)$$

где k_k и k_c - константы скорости;
 K_0 - растворимость комплекса.

Из вышеизложенного следует, что даже упрощенное описание системы требовало бы определения многих эмпирических кинетических коэффициентов. Для упрощения дальнейшего анализа вводим некоторые упрощения, которые, однако, не должны быть априорно применены в любых произвольно выбранных условиях.

В дальнейшем принимается, что скорости комплексообразования и кристаллизации не являются лимитирующими и в системе устанавливается стационарное состояние

$$u_p = u_k = u_c. \quad (I4)$$

Для протекания кристаллизации необходимо условие $P > K_0$, но в условиях лимитирования процесса ферментативной реакции соблюдается приближительное равенство $P \approx K_0$.

Известно, что ЦД гидролизуются труднее линейных олигосахаридов. Учитывая еще низкую концентрацию свободного продукта в растворе, можно пренебречь реакцией гидролиза P , т.е. принимается $u_n \approx 0$.

При постоянных, притом низких значениях P его ингибирующее действие также оказывается незначительным, что позволяет соответственно упростить уравнения 8 и 9. Для обеспечения адекватности кинетических уравнений все константы следовало бы определить в присутствии толуола при равновесном с кристаллической фазой содержании продукта.

Даже в этом случае нахождение всех параметров нельзя считать простой задачей. Кроме того, следует учесть, что все параметры существенно зависят от температуры и в ходе продолжительной реакции протекает также инактивация фермента. Экспериментами установлено, что применяемые нами препараты обладают значительной стабильностью и учет поправки на инактивацию фермента не очень критичен для адекватности модели.

Определение целевой функции

Форма целевой функции, используемой при оптимизации процесса, во многом зависит от постановки задачи.

В данном случае первым естественным критерием при оптимизации является выход целевого продукта, который представляет собой безразмерную величину

$$\varepsilon_t = K_t / S_0, \quad (15)$$

где ε_t - безразмерный коэффициент превращения субстрата в кристаллический продукт;

t - время от начала реакции;

K_t - суммарное количество кристаллического продукта.

Конечное время для проведения реакции в принципе также подлежит оптимизации, но чаще всего определяется условием "практической стационарности" $\frac{dS}{dt} \approx 0$. С термодинамической точки зрения степень превращения субстрата при его умеренных начальных концентрациях должна быть близкой к единице, т.е. признаком конца реакции служит также условие $S \approx 0$.

Практический выход целевого продукта определяется соотношением интегралов.

$$\varepsilon_t = \int_0^t u_P \cdot dt / \int_0^t u_R \cdot dt. \quad (16)$$

Вместо сложного интегрирования двух уравнений по времени мы можем рассматривать соотношение скоростей, определяемых уравнениями 8 и 9 в упрощенной форме.

Делением уравнений получим

$$\frac{dP}{dR} = \frac{V_{MP}}{V_{MR}} \cdot \frac{S + K_{MR}(1 + R \cdot L_{RR})}{S + K_{MP}(1 + R \cdot L_{PR})}, \quad (17)$$

что сокращенно может быть представлено в форме

$$\frac{dP}{dR} = V_{PA} \cdot F(S, R). \quad (18)$$

Здесь $V_{PA} = V_{MP} / V_{MR}$ обозначает т.н. продуктивную активность исходного ферментного препарата, что в ходе реакции не меняется. Функция $F(S, R)$ выражает зависимость от концентраций часть правой стороны уравнения (17).

С учетом равенства

$$dP = -(dS + dR) \quad (19)$$

и перестановок уравнение (17) принимает вид

$$\frac{dS}{dR} = 1 + V_{PA} \cdot F(S, R). \quad (20)$$

Интегрируя это уравнение в пределах от S_0 до 0, получим суммарное количество побочного продукта.

Естественно, задача оптимизации процесса в целом приводится к минимизации R_p , чему соответствует при полной конверсии субстрата максимальное количество продукта.

Л и т е р а т у р а

1. Кёстнер А.И. Программы для оптимизации биокаталитических процессов. Сообщение III // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1986. № 633. С. 3-II.

2. S z e i t l y J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. Budapest, 1982. 269 p.

3. Егоров Н.С., Кёстнер А.И., Вокк Р.О. История исследования циклодекстринов, свойства и области их применения // Итоги науки. Серия микробиологии. 1988. Т. 20.

A. Köstner

The Objective Function for Biocatalytic Cyclodextrin Production

Abstract

Theoretical aspects of biocatalytic production of cyclodextrins have been discussed considering simultaneous transferase and hydrolysis reactions. The separation of product in the form of crystalline complex and the inhibition of reactions due to by-product formation have been accounted. An objective function has been derived by dividing the rates of main and unproductive reactions.

Sihifunktsioon tsüklodekstriinide
biokatalüütilisel saamisel

Kokkuvõte

Käesolevas artiklis on antud tsüklodekstriini biokatalüütilise saamismeetodi teoreetiline analüüs. Protsessi katalüsaatoriks on transferaasse ja hüdroolüüsse aktiivsusega preparaat. Süsteemi kirjeldamisel võetakse arvesse põhiprodukti eraldamist kristallilise kompleksühendi kujul ja fermentatiivsete reaktsioonide inhibeerimist substraadi hüdroolüüsi produktide kui kõrvalprodukti poolt. Protsessi optimeerimiseks on esitatud diferentsiaalvõrrand, mis on saadud põhi- ja kõrvalreaktsiooni kiiruste suhtest.

Б.И. Ческис, Г.Б. Шебека, А.Б. Паулюконис,
А.И. Кестнер

ХАРАКТЕРИСТИКА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ЛИЗИНАМИДАЗЫ

Очистка и свойства фермента лизинамидазы (КФ 3.5.1) из дрожжей *Cryptococcus laurentii* II2, катализирующего гидролиз линейного L-лизинамида (ЛА) и циклического амида лизина - L- α -амино- ϵ -капролактама (АКЛ), описаны нами ранее [1]. Этот фермент может быть использован в технологическом процессе получения L-лизина из химического сырья [2]. Для повышения эффективности процесса в качестве биокатализатора целесообразно использовать иммобилизованный фермент.

Литературные данные по иммобилизации ферментов, гидролизующих ЛА и АКЛ весьма немногочисленны. Имеется патент Японской фирмы "Торей" на получение иммобилизованного фермента, гидролизующего АКЛ, путем его адсорбции на ДЭАЭ-целлюлозе [3].

Сравнение препаратов лизинамидазы, полученных иммобилизацией фермента методами адсорбции, включения в структуру полиакриламидного геля и ковалентного связывания с разными носителями, показало преимущество последнего метода [4]. Для иммобилизации лизинамидазы нами был разработан метод ковалентного связывания фермента с неорганическим носителем - силихромом С-80 [5]. Целью настоящей работы явилось изучение основных характеристик иммобилизованного фермента, сравнение свойств препарата растворимого и иммобилизованного фермента.

Материалы и методы

В работе использовали L-лизин гидрохлорид и трис-(оксиметил)-аминометан фирмы "Calbiochem" (США); L-АКЛ и L-ЛА синтезировали по методикам [6, 7], остальные реагенты (Реахим) марки чда.

Препарат растворимого фермента получали путем разрушения клеток продуцента — дрожжей *Cryptococcus laurentii* II2 при помощи стеклянных шариков и термообработки гомогената по методике, приведенной в работе [8]. Активность фермента — 70–80 ед/мг белка. Ферментативную активность препаратов иммобилизованного фермента определяли методом, основанным на различии коэффициентов молярного поглощения лизина и его амидов при 227 нм [9]. В термостатируемую кювету, оборудованную мешалкой, вносили 4 мл 0,2 М раствора одного из субстратов в 0,05 М трис-НСI буфере, рН 7,7, содержащем 0,1 мМ $MnCl_2$. Энзиматическую реакцию начинали внесением иммобилизованного фермента (5–15 мг, в пересчете на сухой вес), перемешивали 30 мин при 50 °С. Затем отбирали аликвоту реакционной смеси, разводили дистиллированной водой, измеряли оптическую плотность раствора при 227 нм. Содержимое реакционной кюветы аккуратно переносили на стеклянный фильтр, промывали водой, ацетоном, сушили при температуре 50–60 °С 16–18 часов, взвешивали. Концентрацию лизина в реакционной смеси определяли из калибровочного графика. За единицу ферментативной активности принимали количество иммобилизованного фермента, катализирующее образование 1 мкмоль лизина в минуту в условиях опыта. Там, где это специально не оговаривается, приводятся данные по АКЛ-гидролазной активности.

Кинетику гидролиза D,L-лизинамида иммобилизованным ферментом изучали при рН 7,7, температуре 50 °С, в условиях рН-стата. Количество кислоты, пошедшей на титрование, регистрировали при помощи самописца. Стабильность препаратов иммобилизованного фермента определяли в проточном реакторе колоночного типа, прокачивая сквозь реактор 0,1 М раствор лизина, рН 7,7, со скоростью 10–12 мл/час, при различных температурах. Через определенные промежутки времени образцы биокатализатора извлекали из реактора, промывали 0,025 М трис-НСI буфером, рН 7,7, содержащим 0,1 мМ $MnCl_2$ и 0,01 % β -меркаптоэтанола, измеряли остаточную ферментативную активность.

Результаты и обсуждение

Препарат иммобилизованного фермента получали ковалентным связыванием лизинамидазы с предварительно активирован-

ным силохромом С-80, размер гранул 0,25-0,30 мм. В результате с выходом 55 % получали биокатализатор с уровнем ЛА-гидролазной активности - 3900 ед/г.

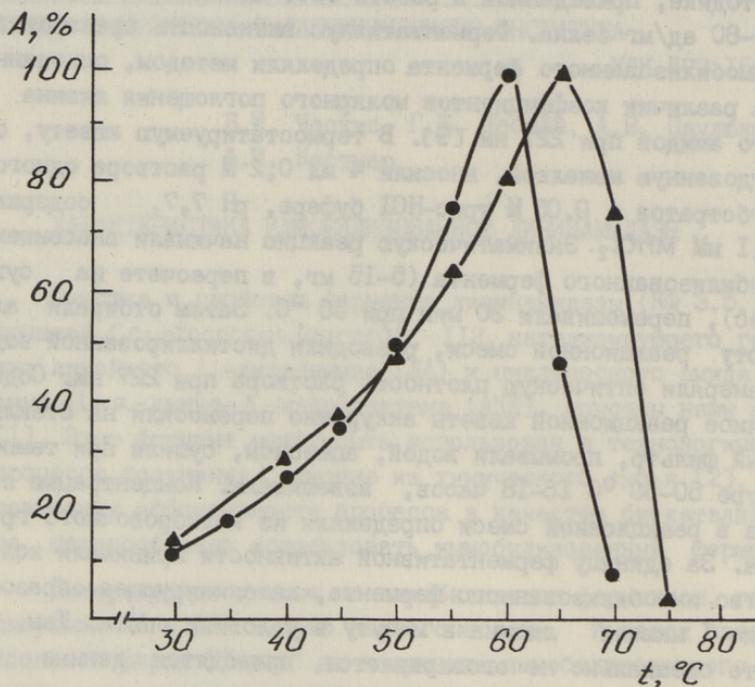


Рис. 1. Зависимость активности растворимого (—●—) и иммобилизованного (—▲—) фермента от температуры.

Важным свойством фермента является зависимость его активности от температуры. На рис. 1 показаны зависимости активности растворимой и иммобилизованной лизинамидазы от температуры реакционной смеси. Как следует из полученных данных, с ростом температуры активность как иммобилизованного, так и нативного фермента увеличивается с коэффициентом Q_{10} , приблизительно равным 2, до 60-65 °C. При более высоких температурах наблюдалась быстрая тепловая инактивация фермента. Энергия активации, определенная из графика, построенного в координатах Аррениуса, составила для нативного фермента 45,8 кДж/моль, для иммобилизованного - 57,8 кДж/моль.

На рис. 2 показаны зависимости активности от pH реакционной смеси для растворимой (кривая I) и иммобилизован-

ной (кривая 2) лизинамидазы. Смещение оптимума ферментативной активности иммобилизованного фермента в кислую область рН вызвано, возможно, разницей в концентрации ионов водорода в фазе носителя и в растворе.

Исследование зависимости активности иммобилизованного фермента от концентрации D,L-лизинамида и последующее преобразование полученных результатов в координатах Иди [10] позволили определить значение кажущейся константы Михаэлиса (рис. 3). Оно составило 13,5 мМ. Для сравнения

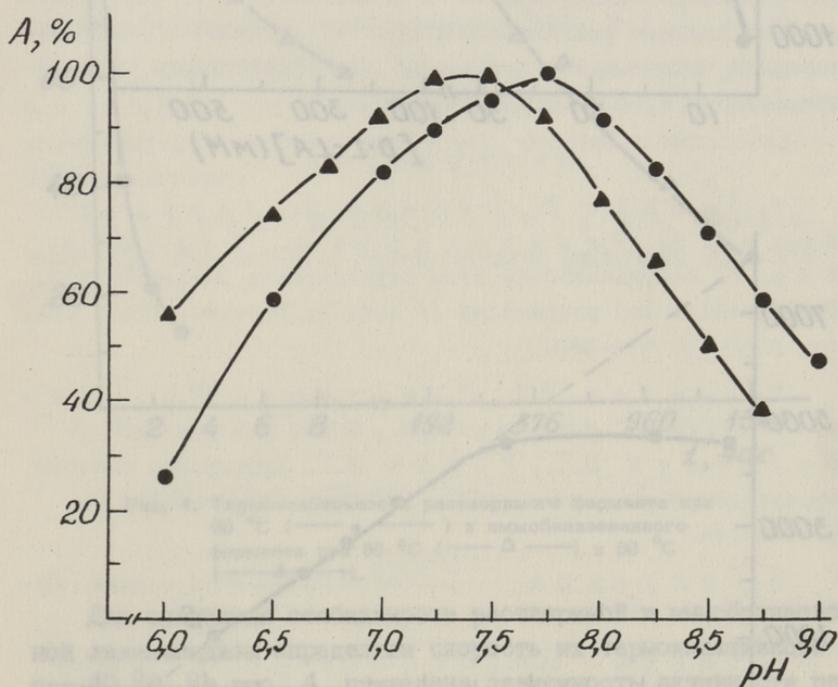


Рис. 2. Зависимость активности растворимого (—●—) и иммобилизованного (—▲—) фермента от pH.

следует отметить, что K_m гидролиза L-лизинамида гомогенным ферментом — 3,8 мМ. Полученные данные свидетельствуют также о том, что при больших концентрациях субстрата, как и в случае растворимого фермента, наблюдается снижение скорости гидролиза иммобилизованным ферментом. Результаты, полученные при изучении полных кинетических кривых гидро-

лиза D,L-лизинамида, будут приведены в отдельном сообщении.

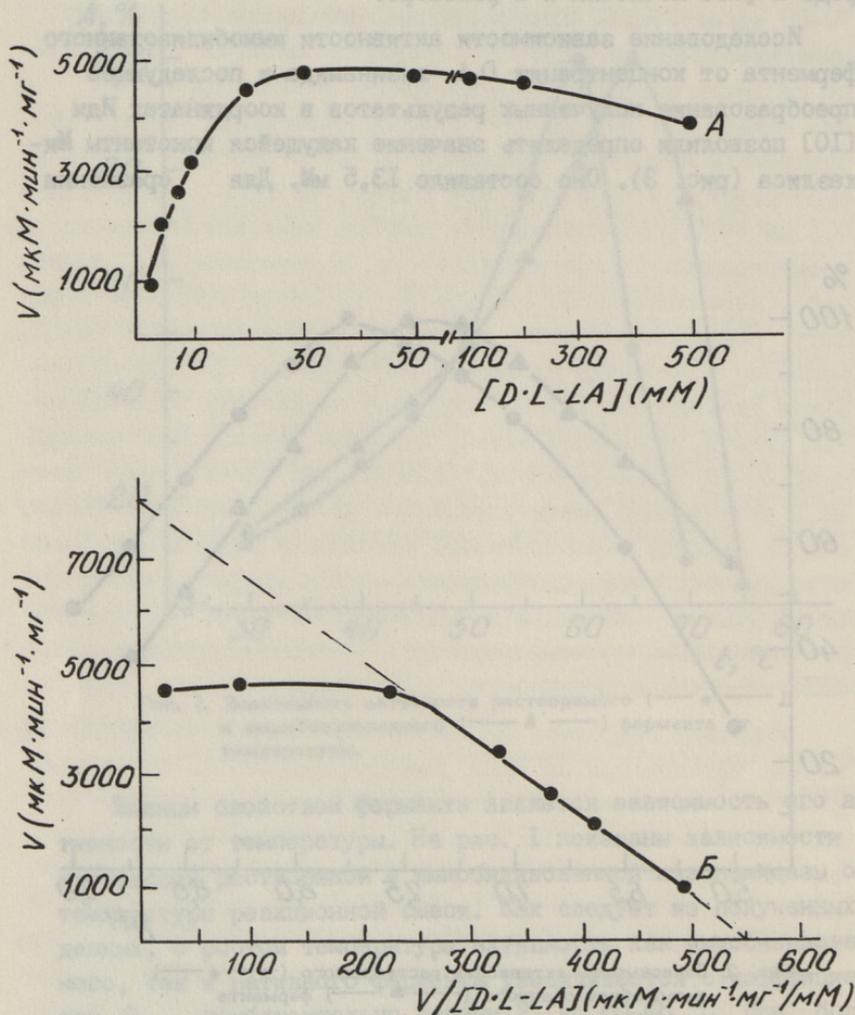


Рис. 3. Зависимость активности иммобилизованного фермента от концентрации DL-ЛА в реакционной смеси (кривая А). Линеаризация полученных данных в координатах Иди (кривая Б).

Операционную стабильность препарата иммобилизованного фермента изучали в реакторе колоночного типа (см. раздел

Материалы и методы) при 50 °С. Полученные данные показали, что ферменты обладают достаточно высокой стабильностью, время инактивации до 27 % начального уровня активности, 1344 часов (рис. 4).

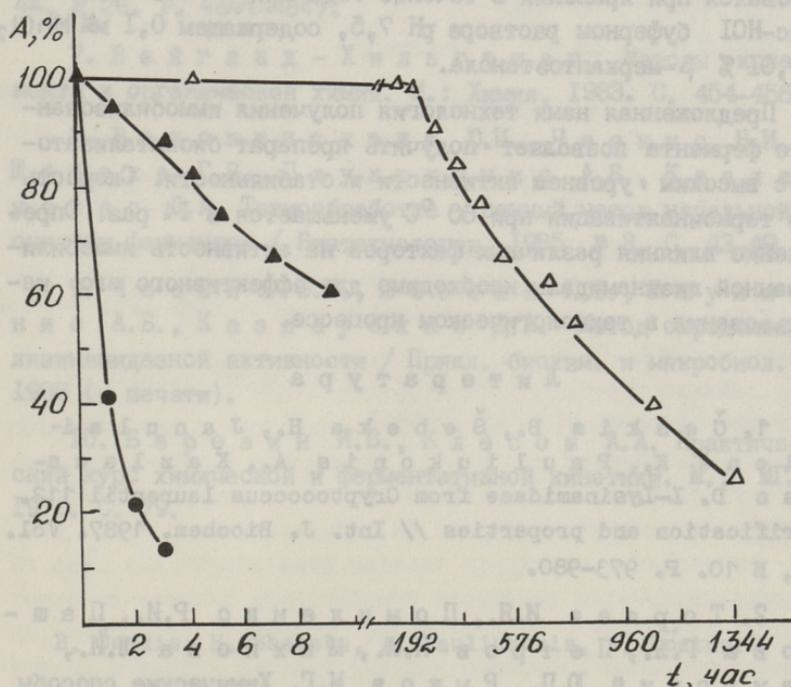


Рис. 4. Термостабильность растворимого фермента при 60 °С (—●—) и иммобилизованного фермента при 50 °С (—△—) и 60 °С (—▲—).

Для сравнения стабильности растворимой и иммобилизованной лизинамидазы определяли скорость их термоинактивации при 60 °С. На рис. 4 приведена зависимость активности растворимого и иммобилизованного фермента от времени инкубации при этой температуре. Кинетика термоинактивации растворимой и иммобилизованной лизинамидазы формально подчиняется уравнению первого порядка. Константы инактивации составили, соответственно, 0,80 и 0,057 час⁻¹. Таким образом, иммобилизация привела к значительной стабилизации лизинамидазы.

Важной характеристикой иммобилизованного фермента является его стабильность при хранении, так как процесс получе-

ния препарата иммобилизованного фермента может не совпадать с началом его использования. Лизинамидаза, ковалентно иммобилизованная на силихроме С-80, проявляет высокую стабильность при хранении - фермент практически не инактивировался при хранении в течение года при 4 °С в 0,05 М трис-НСI буферном растворе рН 7,5, содержащем 0,1 мМ MnCl₂ и 0,01 % β-меркаптоэтанола.

Предложенная нами технология получения иммобилизованного фермента позволяет получить препарат биокатализатора с высоким уровнем активности и стабильности. Скорость его термоинактивации при 60 °С уменьшается в 14 раз. Определение влияния различных факторов на активность иммобилизованной лизинамидазы необходимо для эффективного его использования в технологическом процессе.

Л и т е р а т у р а

1. Š e s k i s В., Š e b e k a Н., J a n u l a i t i e n ě К., P a u l i u k o n i s А., K a z l a u s k a s Д. L-Lysinamidase from *Cryptococcus laurentii* 112. Purification and properties // Int. J. Biochem. 1987. Vol. 92, N 10. P. 973-980.

2. Т о р я е в И.Я., П о м и л е н к о Р.И., П а ш к о в а Г.Л., П е т р о в Н.А., М а х н о в а Л.И., В а у г с к и й Ю.П., Р ы ж о в М.Г. Химические способы производства аминокислот / Тр. ВНИИПЭ, 1982, выпуск 6. С. 132-144.

3. Ф у к у м у р а Г. Способ изготовления лизина. Патент Японии № 15795. 1974. Межд. кл. С 07д 7/02.

4. Ч е с к и с В.И., Ш е б е к а Г.Б., П а у л ю к о н и с А.Б., К а з л а у с к а с Д.А. Оценка эффективности методов иммобилизации лизинамидазы / Биотехнология. 1988 (в печати).

5. Ч е с к и с В.И., Ш е б е к а Г.Б., П а у л ю к о н и с А.Б., К а з л а у с к а с Д.А., К е с т н е р А.И. Оценка стабильности биокатализаторов, полученных иммобилизованной L-лизинамидазой на различных носителях // Фундаментальные аспекты и практическое применение в медицине и сельском хозяйстве достижений биотехнологии. Тарту: изд-во ТГУ, 1986. С. 228-231.

6. Boyle W.J., Sifniades S., Van
Perren J.F. Asymmetric transformation of α -amino- ϵ -
caprolactam, a lysine precursor // J. Org. Chem. 1979. Vol.
44, N 26. P. 4841-4847.

7. Вейганд - Хильгетаг. Методы экспери-
мента в органической химии. М.: Химия, 1983. С. 454-456.

8. Веножинскене Ю.И., Ческис Б.И.,
Шебека Г.Б., Паулюконис А.Б., Казла-
ускас Д.А. Термообработка - ценный метод начальной
очистки ферментов / Биотехнология. 1985. № 3. С. 43-49.

9. Ческис Б.И., Шебека Г.Б., Паулюко-
нис А.Б., Казлаускас Д.А. Метод определения
лизинамидазной активности / Прикл. биохим. и микробиол.
1988 (в печати).

10. Березин И.В., Клесов А.А. Практиче-
ский курс химической и ферментативной кинетики. М.: МГУ,
1976. С. 79.

V. Českis, H. Shebeka, A. Pauliukonis, A. Köstner

Properties of Immobilized L-lysineamidase

Abstract

The biocatalyst, which was prepared by covalent bind-
ing of L-lysineamidase from *Cryptococcus laurentii* II2 to
silochrome S-80, was characterized. Such properties as
activity dependence on pH, temperature, apparent kinetic
constants obtained from initial velocity study, are de-
scribed. The biocatalyst shows the activity of 4500 IU/g
when hydrolysing L-lysineamide and 3900 IU/g when hydro-
lysing L- α -amino- ϵ -caprolactame (50 °C). Biocatalyst
retains 28 % of initial activity after 1344 h testing for
operational stability at 50 °C.

B. Českis, H. Šebeka, A. Pauliukonis, A. Köstner

Immobiliseeritud L-lüsiinamidaasi omadused

Kokkuvõte

Töös iseloomustati biokatalüsaatorit, mis saadi *Cryptococcus laurentii* 112 L-lüsiinamidaasi kovalentsel sidumisel silokroomile S-80. Kirjeldati ensüümi selliseid omadusi, nagu aktiivsuse sõltuvus reaktsiooni pH-st, temperatuurist. Algiiruste põhjal esitati ensüümi kineetilised konstandid. L-lüsiinamiidi hüdrolüüsil oli biokatalüsaatori aktiivsus 4500 E/g ja L- α -amino- ϵ -kaprolaktaami hüdrolüüsil 3900 E/g temperatuuril 50 °C.

Temperatuuril 50 °C säilis 1344 tunni pärast 28 % biokatalüsaatori algaktiivsusest.

Abstract

The properties of the immobilized L-lysine amidase from *Cryptococcus laurentii* 112 on silicic acid S-80 were investigated. Such properties as activity dependence on pH, temperature, and substrate concentration were studied. Kinetic constants were determined. The activity of the immobilized enzyme was 4500 E/g and 3900 E/g for the hydrolysis of L-lysine and L- ϵ -caprolactam, respectively, at 50 °C. The enzyme retained 28% of its initial activity after 1344 h at 50 °C.

УДК 577.15.004.14 +
+ 57.086.835.004.14

Н.В. Архангельская, А.К. Абдвахитова

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

I. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ
СВОБОДНЫХ И СВЯЗАННЫХ КЛЕТОК

Создание биокаталитических процессов с использованием иммобилизованных растительных клеток является активно разрабатываемым в настоящее время способом получения природных растительных соединений [1]. В основе действия подобных биокатализаторов лежит мультиферментный эндогенный синтез, опирающийся на основной метаболизм клетки. То есть для образования целевых продуктов, наибольший интерес из которых представляют вторичные метаболиты: алкалоиды, стероиды, гликозиды, пигменты и др., требуется осуществление в клетке реакций основного метаболизма, снабжающего вторичный синтез исходными веществами — предшественниками, макроэргическими соединениями, регенерированными коферментами. Следовательно, такие биокатализаторы могут быть созданы только на основе интактных или незначительно измененных живых клеток. В связи с этим возникает необходимость оценки метаболического состояния исходных и иммобилизованных растительных клеток. В качестве характеристики метаболического состояния целесообразно использовать понятие общей метаболической активности, отражающей интенсивность основного энергетического метаболизма и измеряемой химическими способами по расходу основного субстрата (например, углеводов или кислорода), выделению продуктов (в частности, АТФ), тепла или по активности ферментов основного метаболизма, например, процесса окислительного фосфорилирования.

Некоторые исследователи связывают эту активность с показателем жизнеспособности клеточной популяции, в большинстве случаев отождествляя его с долей живых клеток и оценивая морфологическими и цитохимическими методами с помощью специфических красителей, субкультивированием для определения доли клеток, способных к размножению, определением степени плазмолиза по выходу в среду метаболитов или проницаемости мембран для окрашенных соединений, измерением редуцирующей активности клеток [2]. Сопоставление результатов этих методов дает разноречивые оценки жизнеспособности (выживаемости) растительных клеток после некоторых воздействий. Например, после иммобилизации клеток *Catharanthus roseus* в гель желатины или желатинны+агарозы жизнеспособность популяции сохраняется по результатам измерения плазмолиза, но отсутствует, судя по измерениям клеточного роста или дыхания [3]. Причина несогласованности результатов разных методов заключается в отсутствии единого подхода к понятию жизнеспособности и различии исследуемых процессов. Кроме того, при количественной оценке жизнеспособности популяции клеток разными методами расхождения в результатах обусловлены разной зависимостью измеряемых параметров от метаболического состояния клеток, оказывающей эффект на конечный результат, обычно трактуемый как доля живых клеток.

Настоящая работа посвящена изучению возможности количественного измерения метаболической активности клеток в культуре и в составе биокатализатора по интенсивности дыхания клеточной популяции и использования данного показателя при определении состояния иммобилизованных клеток в биокаталитическом реакторе.

Материалы и методы

Культура, условия культивирования. Работа проведена на суспензионных культурах мака *Papaver somniferum* и табака *Nicotiana tabacum*. Культура мака выращивалась в соплоноконусных культиваторах с барботажем воздуха при 26 °С в темноте в среде Мурасиге-Скуга с добавлением 0,1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты (2,4Д). Культуру пассировали один раз в две недели. Культуру табака выращивали в колбах на роллере при 26 °С в темноте в среде

Мурасиге-Скуга с содержанием кинетина 0,215 мг/л и индолилуксусной кислоты 2 мг/л и пассировали раз в неделю.

Условия иммобилизации. Иммобилизацию клеток мака в матрицу пенополиуретана проводили в процессе выращивания культуры в стандартных условиях в присутствии частиц пенополиуретана известного веса в количестве 25 штук на 100 мл среды при средних размерах частиц 1 см^3 и весе 30 мг. Сырой вес свободных клеток или биокатализаторов определяли после подсушивания на фильтровальной бумаге, сухой вес — после высушивания образцов при 70°C в течение 24 часов.

Определение метаболической активности клеток. Активность потребления сахаров клетками измеряли по снижению концентрации сахарозы и редуцирующих моносахаров в культуральной или реакционной среде, измеренных комплексометрическим методом с применением трилона Б и мурексида в качестве индикатора [4]. Активность пересчитывали в мкг ред. сахаров/г.мин. Для определения концентрации сахарозы в среде проводили предварительный гидролиз сахарозы концентрированной соляной кислотой и вычисляли разность содержания редуцирующих сахаров до и после гидролиза.

Редуцирующую активность клеток определяли тетразолиевым методом по восстановлению метаболически активными клетками бесцветного хлорида 2,3,5-трифенилтетразолия до красного формазана [5]. Реакцию проводили в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,5 при 20°C в темноте в течение 18 часов. Восстановленный формазан экстрагировали из клеток этанолом и измеряли поглощение при 485 нм на фотоколориметре КФК-2МП. Редуцирующую активность пересчитывали на чистый формазан в мг/г клеток с учетом измеренного коэффициента молярной экстинкции $\epsilon = 2640$.

Принцип метода измерения дыхательной активности и ход измерений. Интенсивность (активность) дыхания клеток в культуре или при включении в носитель определяли по потреблению кислорода из культуральной или реакционной среды, т.е. по снижению концентрации растворенного кислорода в предварительно насыщенной воздухом водной среде при контакте с исследуемым объектом. Концентрацию кислорода в жидкости измеряли с помощью разработанного на кафедре сантехники ТПИ кислородного электрода, сигнал которого записывался на по-

тенциометре КСП-4 и пересчитывался на $\text{мкг/г}_{\text{клеток}} \cdot \text{мин}$ с калибровкой по растворимости кислорода в дистиллированной воде.

Измерения проводили в стационарной термостатируемой ячейке при температуре 26°C при перемешивании 50 мл среды после прекращения доступа воздуха. Активность определяли по начальной скорости потребления кислорода. При использовании стационарной ячейки пробы необходимо извлекать из культиватора или реактора, что исключается при исследовании непрерывного биокаталитического процесса в проточном реакторе. Для этой цели была использована проточная измерительная ячейка объемом 10 мл, через которую протекала реакционная смесь из реактора с иммобилизованными клетками. Активность рассчитывали по разности содержания кислорода в среде на входе и на выходе из реактора.

Результаты и обсуждение

Для оценки областей применения метода были исследованы зависимости дыхательной активности клеток в культуре от концентрации биомассы и жизнеспособности клеточной популяции (доли живых клеток).

1. Зависимость дыхательной активности клеток от концентрации биомассы. Образцы суспензионной культуры мака с разной концентрацией биомассы получали разведением исходной культуры питательной средой в разных соотношениях. Для исключения влияния стресса на дыхательную активность клеток при помещении их в непривычные условия, была использована среда культивирования, освобожденная от клеток. Интенсивности дыхания определяли в процентах к неразбавленной культуре, концентрацию биомассы — в процентах к исходной. Получена пропорциональная зависимость **интенсивности** дыхания от концентрации биомассы клеток, находящихся в одном метаболическом состоянии (рис. 1). Экспериментальные значения укладываются в область теоретической прямой, что указывает на возможность определения плотности суспензионных культур, находящихся в одинаковых фазах развития, по их дыхательной активности.

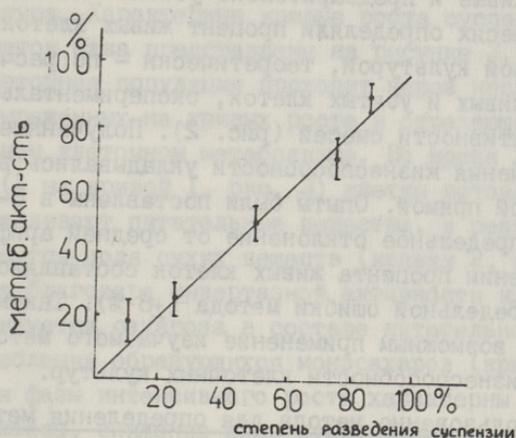


Рис. 1. Зависимость интенсивности дыхания клеток мака (в % к исходной суспензии) от степени разбавления суспензионной культуры.

2. Зависимость дыхательной активности клеток от жизнеспособности культуры. Чтобы выяснить возможность применения метода измерения дыхательной активности для оценки жизнеспособности клеточной популяции, т.е. доли живых клеток, были поставлены опыты, в которых смешивались в разных со-

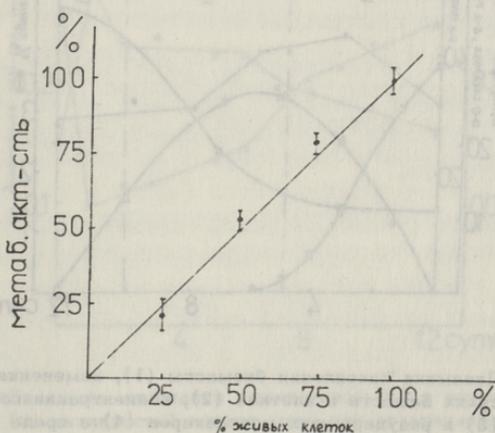


Рис. 2. Зависимость интенсивности дыхания клеток табака (в % к интактной культуре) от доли живых клеток.

отношениях живые и предварительно убитые кипячением клетки табака. В смесях определяли процент живых клеток по сравнению с исходной культурой, теоретически – по расчету при смешивании живых и убитых клеток, экспериментально – по дыхательной активности смесей (рис. 2). Полученные экспериментальные значения жизнеспособности укладывались в область теоретической прямой. Опыты были поставлены в 3-кратной повторности, предельное отклонение от средней арифметической при определении процента живых клеток составляло $\pm 6\%$ и не превышало предельной ошибки метода ($\pm 8\%$). Таким образом, оказывается возможным применение изучаемого метода для оценки уровня жизнеспособности клеточных культур.

3. Использование метода для определения метаболической активности клеток. Результаты вышеописанного опыта не учитывали метаболическое состояние изучаемой популяции, так как образцы с различной долей живых клеток были получены из одной исходной культуры. Между тем известно, что интенсивность дыхания изменяется в зависимости от уровня основного метаболизма клеточной культуры [6]. Для изучения возможности применения исследуемого метода для оценки метаболическо-

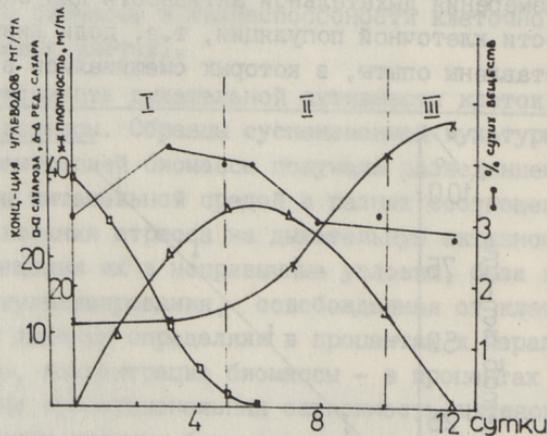


Рис. 3. Динамика накопления биомассы (1), изменения доли сухих веществ в клетках (2), концентрации сахарозы (3) и редуцирующих моносахаров (4) в среде при культивировании клеток мака.

го состояния клеток наиболее удобной моделью является растущая культура. Характерные кривые роста суспензионной культуры клеток мака представлены на рисунке 3. В процессе развития клеточная популяция проходит через несколько стадий, явно выраженных на кривых роста и отражающих изменения в основном клеточном метаболизме. Во время латентной фазы роста (I на кривой 1, рис. 3) клетки готовятся к делению и накапливают питательные вещества, в результате чего увеличивается доля сухих веществ (кривая 2, рис. 3). В это же время благодаря инвертазной активности клеточных мембран гидролизуется сахароза в составе питательной среды при низком потреблении образующихся моносахаров (кривые 3 и 4, рис. 3). Для фазы интенсивного роста характерны резкое увеличение биомассы, снижение доли сухих веществ, активное потребление углеводов (II на рис. 3). На стационарной стадии развития исчерпывается энергетический субстрат (углеводы), замедляется и завершается накопление биомассы (III на рис. 3), вид клеток меняется. Они увеличиваются в размерах до нескольких раз, меняется цвет культуры, она темнеет в результате накопления пигментов — культура переходит ко вторичному синтезу, при этом процессы основного метаболизма тормозятся [7].

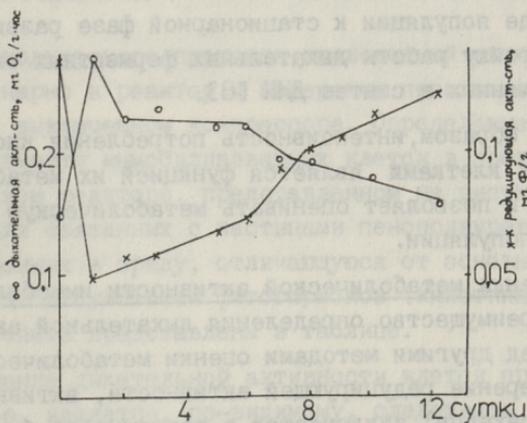


Рис. 4. Динамика изменения дыхательной (1) и редуцирующей (2) активностей клеток мака при культивировании.

Динамика изменения дыхательной активности клеток в процессе роста культуры представлена на рисунке 4 (кривая 1). Видно, что показатель скорости потребления кислорода четко

отражает смену метаболических состояний клеток. Резкое увеличение интенсивности потребления кислорода происходит сразу после пассирования и, вероятно, связано со стрессом в результате переведения клеток в непривычные условия. Затем показатель несколько снижается, оставаясь, однако, на высоком уровне ($0,25 \text{ мг } O_2/\text{г}_{\text{сыр. в. час}}$). Деление клеток вызывает падение дыхательной активности, которое наблюдается и на стационарной фазе развития, хотя и с меньшей скоростью. Прекращение потребления кислорода культурой отмечено примерно после четырех недель культивирования, однако пересевы обычно делают при достижении клетками стационарной фазы, при этом дыхательная активность клеток составляла $0,15 \text{ мг } O_2/\text{г. час}$.

Связь интенсивности потребления клетками кислорода с такими ведущими процессами основного метаболизма как окислительно-восстановительные процессы подтверждается результатами измерения редуцирующей активности клеток, определенной по активности восстановления трифенилтетразолия. Кривая редуцирующей активности (2 на рисунке 4) является как бы зеркальным отражением кривой дыхательной активности: редуцирующая активность наименьшая в начале цикла развития, растет при активном делении клеток и достигает максимума при переходе популяции к стационарной фазе развития, отражая перестройку работы дыхательных ферментных систем и систем, включенных в синтез ДНК [8].

Таким образом, интенсивность потребления кислорода растительными клетками является функцией их метаболического состояния и позволяет оценивать метаболическую активность клеточной популяции.

4. Оценка метаболической активности иммобилизованных клеток. Преимущество определения дыхательной активности клеток перед другими методами оценки метаболической активности (измерение редуцирующей активности, активности потребления сахаров) заключается в возможности быстрого мониторинга биокаталитических процессов с иммобилизованными клетками в условиях рабочего режима реактора. Оценка метаболической активности клеток в составе биокатализатора может быть осуществлена непрерывно по измерению потребления кислорода слоем биокатализатора в протекающем растворе суб-

страта, результат моментально записывается на ленте самописца и все время на анализ состоит из времени математических расчетов. Пример реакторной системы с регистрирующей кислородной ячейкой представлен на рисунке 5. В случае про-

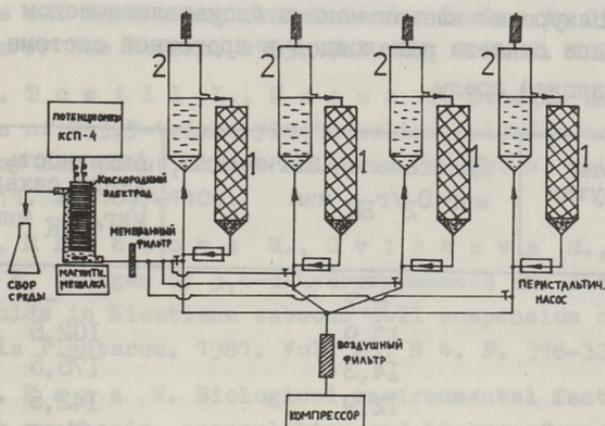


Рис. 5. Схема экспериментальной установки.

- 1 - колонный реактор с биокатализатором,
- 2 - сосуд для насыщения воздухом циркулирующей среды.

ведения периодического процесса кислородный датчик помещается стационарно в реактор и измерения производятся периодически при выключенном компрессоре. Определение метаболической активности иммобилизованных клеток в проточном биокаталитическом реакторе, представленном на рисунке 5, было проведено для связанных с частицами пенополиуретана клеток мака, помещенных в среду, отличающуюся от основной питательной среды отсутствием фитогормонов (кинетина и 2,4 Д). Результаты опыта представлены в таблице.

Увеличение дыхательной активности клеток при помещении их в реактор, является, по-видимому, следствием изменения условий существования. Достаточно стабильный уровень метаболической активности клеток в реакторе в течение нескольких дней отмечен двумя методами измерения активности. Падение активности на 5-е сутки процесса связано с контаминацией системы. Следует также отметить, что иммобилизованные клетки в проточной системе характеризуются повышенной

(по сравнению с растущей культурой) дыхательной активностью, что необходимо учитывать при оптимизации биокаталитического процесса.

Т а б л и ц а

Метаболическая активность иммобилизованных в пенополиуретан клеток мака в биокаталитическом процессе синтеза алкалоидов в проточной системе с циркуляцией среды

Время работы системы, сутки	Дыхательная активность, мкг O_2 /гБК мин	Активность потребления сахаров, мкг/гБК мин
0	6,7	-
1	13,9	102,6
2	14,3	175,5
3	12,9	142,5
5	10,5	54,0

Проведение ряда последовательных периодических биокаталитических процессов показало стабильную дыхательную активность иммобилизованных в пенополиуретан клеток мака (0,81 - 2,1 мкг O_2 /гБК мин в течение 80 суток, т.е. 7 рабочих циклов), сопоставимую с интенсивностью дыхания свободно суспендированных клеток на стационарной фазе развития (2,5 мкг O_2 /г сыр.в. мин).

Таким образом, имеется возможность оценки интенсивности процессов основного метаболизма клеток по их дыхательной активности. Определяемая описанным образом метаболическая активность является необходимой характеристикой иммобилизованных клеточных биокатализаторов в процессах получения целевых метаболитов.

Л и т е р а т у р а

1. Кёстнер А., Архангельская Н.В. Иммобилизованные растительные клетки // Иммобилизованные клетки в биотехнологии. Пуццо. 1987. С.44-56.

2. Самыгин Г.А., Волкова Л.А., Попов А.С. Сравнение разных методов для оценки жизнеспособности клеток суспензионных и каллусных культур // Физиология растений. 1985. Т. 32, № 4. С. 813-818.

3. Brodelius P., Nilsson K. Entrapment of plant cells in different matrices. A comparative study // FEBS Lett. 1980. Vol. 122, N 2. P. 312-316.
4. Von G. Tegge, Nierle W. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker in Stärkehydrolysaten // Die Stärke. 1965. Vol. 17, N 4. P. 107-110.
5. Towill L., Mazur P. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures // Can. J. Bot. 1975. Vol. 53, N 11. P. 1097-1102.
6. Hrubcova M., Cvirikova M., Pospisil F. Changes of 3,4-dihydroxybenzoic and 4-hydroxybenzoic acids in Nicotiana tabacum cell suspension culture // Biologia Plantarum. 1981. Vol. 23, N 4. P. 318-320.
7. Kuzz W. Biological environmental factors of product synthesis, accumulation and biotransformation by plant cell cultures // N.Z.J. Technol. 1986. Vol. 2, N 2. P. 77-81.
8. Trevors J. Electron transport system activity in soil, sediment and pure cultures // Crit. Rev. Microbiol. 1984. Vol. 11. P. 83-100.

N. Arkhangelskaya, A. Abdvakhitova

Plant Cell Immobilisation

I. A Method for Determining Metabolic Activity of Free and Immobilised Cells

Abstract

The paper presents a method for determining the metabolic activity of cells by measuring the cell respiratory activity. Correlation between respiratory activity, cell dimension and viability is shown. Respiratory activity dependence on the metabolic state of cells is illustrated by the growing suspended cell culture. The present method is applied to estimate metabolic activity of the cells immobilised in porous polyurethane in batch and continuous reactors.

Taimerakkude immobiliseerimine

I. Meetod vabade ja immobiliseeritud rakkude
ainevahetuse aktiivsuse määramiseks

Kokkuvõte

Suspendeeritud ja kandjasse immobiliseeritud taimerakkude kultuuri ainevahetuse aktiivsuse hindamiseks soovitatakse raku hingamisaktiivsuse määramise meetodit. On leitud, et hingamise aktiivsus, rakkude tihedus ja eluvõime on omavahel seotud. Hingamisaktiivsuse sõltuvust rakkude ainevahetuslikust seisundist on näidatud suspendeeritud rakukultuuri perioodilise kasvatamise varal. Kirjeldatud meetodi abil on hinnatud vahtpolüuretaani maatriksisse immobiliseeritud moonirakkude ainevahetuse aktiivsust perioodilises ja pidevas biokatalüütilises protsessis.

УДК 577.15.004.14 +
57.086.835.004.14

Н.В. Архангельская

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК
II. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ
МЕТОДОВ ИММОБИЛИЗАЦИИ

При выборе метода иммобилизации растительных клеток следует исходить из общих требований: простота и дешевизна метода, поддержание стерильных условий, отсутствие токсического эффекта на метаболическую активность клеток. Полученный биокатализатор должен содержать максимально возможное количество связанных клеток с высокой метаболической и биосинтетической активностями и быть подходящим для использования в биокаталитическом реакторе.

С этой целью провели сравнение двух наиболее щадящих способов иммобилизации клеток - включение в гель альгината кальция и связывание с матрицей пористого полимерного носителя.

Материалы и методы

Суспензионные культуры табака и мака выращивали по описанной ранее методике [1]. В работе использовали натрий альгиновокислый ("Fluka" и "Реахим") и пенополиуретан марки ППУ-Э (ОСТ 6-05-407-75) с разными размерами пор.

Для получения иммобилизованных в Са-альгинатном геле клеток смесь предварительно осажденной из суспензионной культуры биомассы с раствором альгината натрия (в конечной концентрации 2-3 %) в различных весовых соотношениях капали через капилляр под действием сжатого воздуха в 10-50 мм раствор хлористого кальция. Образующиеся гранулы

геля размером 1-2 мм выдерживали в растворе CaCl_2 в течение 30 минут, отмывали и помещали в культиватор с питательной средой или исследовали непосредственно на эффект иммобилизации.

Проникновение клеток в поры пенополиуретана происходит спонтанно при контактировании растущей культуры с частицами носителя при обычных условиях субкультивирования [1]. Для достижения максимальной концентрации биомассы на носителе требовалась повторная инкубация частиц пенополиуретана (ППУ) со связанными клетками в свежей питательной среде.

Содержание клеток в гранулах альгинатного геля определяли методом Кьельдаля. Содержание клеток в частицах ППУ определяли после высушивания последних в течение 24 часов при 70°C с учетом их исходного веса. При нарезании частиц носителя из блока ППУ отклонение от среднего веса составляло не более 2%.

Иммобилизованные клетки исследовали на активность основного метаболизма (тетразолиевым методом и по определению интенсивности дыхания [1]). Митотическую активность клеток определяли по доле пролиферирующих клеток, содержащих окрашиваемые ацеторсеином хромосомы [2].

Результаты и обсуждение

Изучали влияние условий иммобилизации на метаболическую активность клеток табака, включенных в гель альгината кальция. Варьировали концентрации альгиновокислого натрия, хлористого кальция и весовое соотношение клеток и компонентов геля.

Изменение концентраций компонентов геля приводит к изменению плотности получаемых гранул, которая растет в ряду 2-25, 3-10, 2-50, 3-25,

где первая цифра обозначает концентрацию альгината натрия в %, вторая - концентрацию хлористого кальция в мМ.

Метаболическая активность иммобилизованных клеток сразу после иммобилизации определена тетразолиевым методом, полученные данные суммированы в таблице I.

Т а б л и ц а I

Метаболическая активность иммобилизованных в гель альгината кальция клеток табака при разных условиях иммобилизации

Параметр	Вариант I	Вариант II	Вариант III	Вариант IV
Концентрация Na-альг. (%)	3 - 10	2 - 25	3 - 25	2 - 50
и CaCl_2 (мМ)				
Вес связанной биомассы (% от сырого веса)	17,5 26,2	30,0 44,6 59,5	26,2 39,4	37,0 56,0 74,2
Метаболическая активность, мг Φ/Γ БК	0,039 0,033	0,030 0,032 0,024	0,020 0,020	0,013 0,020 0,029
Коэффициент сохранения активности ⁺ , %	100 63	50 36 20	40 26,5	18 19 17,5

⁺ Метаболическая активность суспендированных клеток 0,193 мг Φ/Γ сыр. в. клеток.

Из представленных данных можно сделать следующие выводы:

- с увеличением плотности геля метаболическая активность иммобилизованных клеток снижается,

- клетки более чувствительны к повышению концентрации хлористого кальция при гелеобразовании,

- с повышением содержания клеток в биокатализаторе их относительная активность уменьшается. Возможным объяснением может быть увеличение числа клеток, расположенных в периферических областях гранул и, следовательно, подвергнувшихся большему воздействию соли кальция при гелеобразовании.

Наиболее щадящие условия гелеобразования позволяют получить биокатализатор с высокой удельной активностью (0,032-0,039 мг Ф/г), однако, механическая прочность таких катализаторов не велика. Например, гранулы варианта 2-25 теряют при 30-минутном перемешивании в среде магнитной мешалкой около 8 % своего веса. Из изученных вариантов биокатализаторов достаточно высокая удельная активность в сочетании с механической прочностью наблюдалась при использовании 2%-ного альгината натрия, 50 мм-го раствора CaCl_2 и содержании клеток в носителе 74 %. При этом, однако, терялся большой процент метаболической активности клеток.

Поведение иммобилизованных клеток в условиях периодической системы изучали с использованием основной питательной среды. Биокатализатор варианта 2 - 50 (содержание клеток II мг сухого веса на г БК) помещали в среду и при нормальных условиях культивирования определяли нарастание биомассы в гранулах катализатора, а также метаболическую активность связанных клеток (таблица 2).

Созданные условия способствовали размножению клеток внутри зерен катализатора, в результате чего структура его нарушалась, клетки выходили на поверхность частиц и некоторая часть их смывалась в среду. Несмотря на 4-кратный прирост биомассы, нельзя говорить о завершении клеточного роста за изучаемый период, соответствующий циклу развития данного штамма в условиях суспензионной культуры, так как редуцирующая активность клеток не достигла 100%-ного уровня.

ния (уровня активности интактной культуры), более того, процент сохранения активности снижался. Причинами этого могут быть замедление клеточного роста внутри гранул геля, необратимые повреждения части клеток при иммобилизации, а также изменение условий роста клеток при выходе на поверхность частиц катализатора.

Иммобилизация клеток в матрицу пористого полимерного носителя протекала спонтанно в условиях, соответствующих нормальному росту культуры, за счет проникновения клеток во внутреннее пространство пор пенополиуретановых частиц, их задерживанию там и размножению, в результате чего происходило заполнение носителя клетками. Связывание клеток

Т а б л и ц а 2

Наращение биомассы и метаболическая активность клеток табака в гранулах Са-альгинатного геля при инкубации в основной питательной среде

Параметр	Длительность инкубации (в сутках)			
	0	2	5	7
Сухой вес связ. клеток (мг) на г сыр. в. БК	11,1	10,6	11,5	55,7
Прирост веса в % к исходному	-	-4,5	3,6	402
Метаб. акт-сть клеток, мг Ф/г БК	0,029	0,027	0,039	0,067
Коэффициент сохр. активности, %	48	46	64	22

при оптимальных для изучаемой культуры размерах пор и частиц носителя (0,2-0,5 мм и 1 см³, соответственно) достигало 3 г/г БК по сухому весу, или 300 % от веса частицы ППУ (рис. 1), при этом метаболическая (редуцирующая) активность связанных клеток приближалась к уровню исходной интактной культуры (рис. 2). Максимальная концентрация клеток в биокатализаторе достигалась к концу второго цикла выращивания, то есть повторная инокуляция частиц катализатора со связанными клетками в свежую питательную среду активизировала размножение клеток. Некоторое увеличение сухого веса клеток

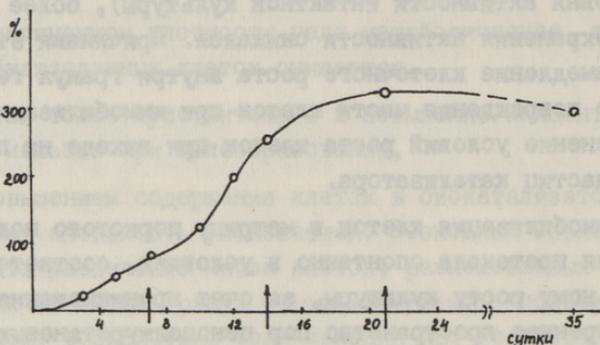


Рис. 1. Динамика изменения связанной биомассы клеток табака на частицах пенополиуретана при культивировании (в % к весу материала носителя). Стрелками указаны времена обновления среды.

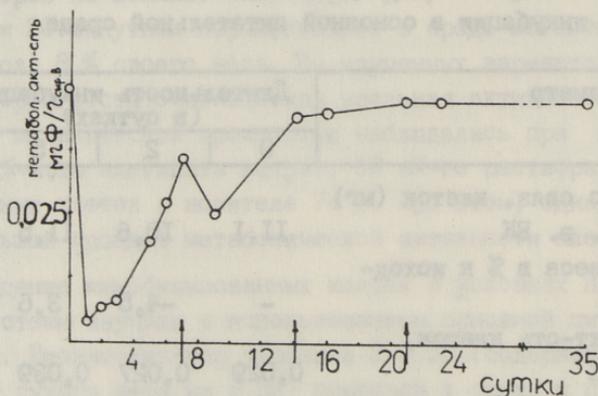


Рис. 2. Динамика изменения метаболической (редуцирующей) активности иммобилизованных на пенополиуретановой матрице клеток табака при культивировании.

в катализаторе в третьем цикле выращивания объясняется не процессами размножения, а нарастающим содержанием сухого вещества в клетках, что показано на рис. 3. При этом митотическая активность иммобилизованных клеток практически отсутствует (митотический индекс равен 0,3 %).

Дыхательная активность иммобилизованных клеток табака по окончании нарастания биомассы в частицах биокатализато-

ра составляла 0,64 мкг O_2 /г.мин и несколько увеличивалась при работе биокатализатора в условиях периодической системы (0,99 мкг O_2 /г.мин на 35 сутки). Данное значение дыхательной активности близко к показателю суспензионной культуры на стационарной фазе развития (0,96 мкг O_2 /г.мин на 14-е сутки).

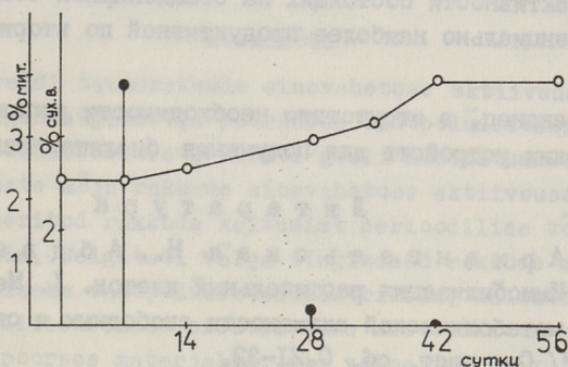


Рис. 3. Динамика содержания сухого вещества в иммобилизованных на пенополиуретановой матрице клетках мака и митотический индекс популяции при культивировании.

о-о - % сухого вещества в клетках,

●● - митотический индекс.

Распределение связанных клеток в объеме носителя изменяется по мере завершения процессов размножения. К концу второго цикла выращивания клетки в основном заполняют глубинные области, периферическая область частиц более свободна от клеток в связи с частичным смыванием с поверхности при перемешивании среды в культиваторе. При дальнейшей инкубации в питательной среде связанные клетки образуют плотный слой на поверхности частиц, смывание клеток при этом практически отсутствует, вероятно, благодаря возникновению полисахаридной пленки между клетками и матрицей пенополиуретана [3].

Таким образом, сравнительное изучение двух методов иммобилизации растительных клеток позволяет сделать вывод о преимуществах "пассивной" иммобилизации в пористой полимерной матрице, заключающихся в:

- более полном использовании основного метаболического потенциала клеток (коэффициент сохранения активности приближается к показателю интактной культуры),

- возможности создания высокой концентрации метаболически активных клеток в биореакторе (максимальная достигнутая концентрация связанной биомассы составляла 3 г сух. в./г материала носителя),

- получении неделящихся клеток, по показателю дыхательной активности состоящих на стационарной стадии развития, потенциально наиболее продуктивной по вторичным метаболитам,

- наконец, в отсутствие необходимости дополнительных технических устройств для получения биокатализаторов.

Л и т е р а т у р а

1. Архангельская Н., Абдвахитова А. Иммуобилизация растительных клеток. I. Метод определения метаболической активности свободных и связанных клеток // См. наст. сб. С.21-32.

2. Адамс Р. Методы культуры клеток для биохимиков. М. 1983. С. 102-103.

3. Rhodes M., Robins R., Turner R., Smith J. Mucilaginous film production by plant cells immobilised in a polyurethane or nylon matrix // Can. J. Bot. 1985. Vol. 63. P. 2357-2363.

N. Arkhangelskaya

Plant Cell Immobilisation

II. Comparative Study of Different Methods of Immobilisation

Abstract

Metabolic activities of plant cells entrapped in alginate gels and grown in porous polyurethane have been compared. Action of gel formation conditions on cell metabolic activity was examined. Conditions for obtaining maximum concentration of immobilised cells by cell growing in polyurethane matrix were established. Evidence is presented which suggests that immobilisation in polyurethane enables to obtain maximum concentration of cells with high metabolic activity on support particles.

Taimerakkude immobiliseerimine

II. Erinevate immobiliseerimismeetodite
võrdlev uurimine

Kokkuvõte

Võrreldi taimerakkude ainevahetuse aktiivsust pärast kaltsiumalginaatgeeli ja poorsesse vahtpolüuretaanmaatriksisse immobiliseerimist. Uuriti geeli moodustumise erinevate tingimuste mõju rakkude ainevahetuse aktiivsusele ning immobiliseeritud rakkude käitumist perioodilise töörežiimiga süsteemis. Selgitati välja tingimused rakkude maksimaalseks sidumiseks vahtpolüuretaanmaatriksis. Näidati, et rakkude immobiliseerimise efektiivseks meetodiks on nende fikseerimine poorses materjalis, mis võimaldab saavutada metaboolset aktiivsete rakkude maksimaalse kontsentratsiooni kandjas.

УДК 577.15.022:577.15.154.25 +

+ 547.458.233.36

Э.Х. Сиймер, К.Э. Паппель,

М.А. Курвитс

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ.

СООБЩЕНИЕ XI. КИНЕТИКА РЕАКТОРОВ ПРИ
ФЕРМЕНТАТИВНОМ ГИДРОЛИЗЕ ЛАКТОЗЫ В СЫВОРОТКЕ
МОЛОКА И ПРОДУКТАХ ЕЕ ПЕРЕРАБОТКИ

Сыворотка молока как побочный продукт молочной промышленности является ценным вторичным сырьем, требующим рационального использования. Основными компонентами сыворотки являются белки, лактоза и минеральные вещества. Молочный сахар в чистом, выделенном из молочных продуктов, виде находит применение в пищевой и фармацевтической промышленности, потребность в нем ограничена. Путем ферментативного гидролиза лактозы в сыворотке сладость и усвояемость продукта увеличиваются, открываются новые возможности использования лактозы в хлебопекарной, кондитерской и др. промышленности. Для промышленного производства глюкозогалактозных концентратов кроме сыворотки могут в принципе быть использованы концентрат гиперфльтрации сыворотки и маточные растворы кристаллизации и перекристаллизации лактозы. Последние содержат 15-18 % сухих веществ, из которых 90-95 % составляет лактоза. Ближайшее время должно показать, какое сырье для крупномасштабного производства глюкозо-галактозных сиропов является самым технологичным и рентабельным.

Технология производства иммобилизованного на силихроме препарата β -галактозидазы из *Penicillium canescens* под названием "Галактосил" разработана во ВНИИ Биотехнологии. Нами получены иммобилизованные на органоинеральных носителях препараты β -галактозидазы [2] и исследована ки-

нетика гидролиза растворов лактозы с помощью нативного [1] и иммобилизованного препаратов [2], а также приведены пилотные испытания на сыворотке молока [3]. Как это типично для большинства β -галактозидаз, фермент из *Penicillium canescens* сильно ингибируется продуктами гидролиза лактозы. Поэтому среди многих проблем, связанных с разработкой и оптимизацией технологии применения β -галактозидазы для обработки молочных продуктов, выбор подходящего кинетического типа реакторов является ключевым, определяющим условия проведения процесса, конечную степень конверсии лактозы и, естественно, конструкцию промышленных реакторов.

Целью настоящей работы являлось сравнение продуктивностей реакторов при ферментативном гидролизе лактозы с помощью иммобилизованной β -галактозидазы из *Penicillium canescens*.

Продуктивность реакторов

Рассмотрим продуктивность следующих типов реакторов:

- 1) периодический реактор с перемешиванием как реактор первого кинетического типа;
- 2) проточный реактор с перемешиванием как реактор второго кинетического типа;
- 3) каскад из соединенных последовательно проточных реакторов с перемешиванием.

Расчет продуктивностей реакторов основывается на имеющемся в нашем распоряжении полном количественном описании кинетики реакции лактозы [1, 2] и разработанной ранее методике расчета реакторов [4].

Продуктивность реакторов выражаем в отношении одной единицы предельной (максимальной) скорости V ($V = I$) в единице объема жидкой фазы. При этом учитывается, что общее количество ферментных единиц, загруженных в реакторы, равно для всех выбранных трех типов реакторов. При сравнении принимаем, что конечная степень конверсии лактозы в периодическом реакторе X_K равна этой же (стационарной) величине X_{CT} в проточных системах. Для упрощения принимаем, что исходный раствор не содержит моносахаридов (исходная

степень конверсии лактозы X_0 равна нулю). В этом случае продуктивность реактора первого кинетического типа равна [6]:

$$P_1 = \frac{X_k}{-(a+b+c) \ln(1-X_k) - (b+c)X_k - \frac{c}{2}X_k^2} \quad (1)$$

Продуктивность реактора второго кинетического типа равна стационарной скорости гидролиза лактозы:

$$P_2 = \frac{1-X_{CT}}{a + bX_{CT} + cX_{CT}^2} \quad (2)$$

Расчеты каскадов более сложны и требуют постепенного расчета степени конверсии в каждой ступени [4]. В данной работе мы приводим результаты для четырехкаскадного реактора, в котором ферментативная активность распределена равномерно между ступенями, т.е. при общем количестве одной единицы V в каждой секции находится $\frac{V}{4}$ единиц предельной скорости.

Расчеты приводим для трех конкретных исходных концентраций лактозы - 0,12 М, 0,231 М и 0,474 М, отвечающих приблизительно 4, 8 и 15%-ным (вес %) растворам лактозы. В таблице I даны необходимые для расчетов значения кинетических коэффициентов K_M , e , f и g , и вычисленные на их основе величины a , b и c для выбранных трех концентраций субстрата при pH 4,5 и температурах 30-50 °C.

Результаты расчета продуктивностей реакторов двух различных кинетических типов представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы, проточный реактор с перемешиванием по своей продуктивности сильно уступает периодическому реактору, в зависимости от конечной степени конверсии его продуктивность составляет 22-65 % от продуктивности реактора первого кинетического типа. Поэтому одиночный проточный реактор с перемешиванием можно считать непригодным типом для промышленного гидролиза лактозы в молочных продуктах.

Результаты расчета сравнимых продуктивностей реакторов трех типов приведены в таблице 3. Расчеты четырехсекционного каскада проточных реакторов проведены на ЭВМ с помощью специальной программы "Барбот".

Т а б л и ц а I

Значения кинетических коэффициентов реакции гидролиза лактозы при pH 4,5 с помощью β -лактозидазы из *Penicillium canescens* [1, 2]

Коэффициент	Значения коэффициентов при температуре		
	30 °C нативный фермент	40 °C иммобилизованный фермент	50 °C нативный фермент
K_m, M	0,12	0,11	0,035
e	0,55	0,85	1,38
f, M^{-1}	7,7	5,7	2,9
g, M^{-1}	-7,7	-5,7	-2,9
Для $[S]_0 = 0,12 M$			
a	2,00	1,917	1,292
b	1,474	1,534	1,728
c	-0,924	-0,684	-0,348
Для $[S]_0 = 0,231 M$			
a	1,520	1,476	1,152
b	2,329	2,167	2,050
c	-1,779	-1,317	-0,670
Для $[S]_0 = 0,474 M$			
a	1,253	1,232	1,074
b	4,200	3,552	2,755
c	-3,650	-2,702	-1,375

Расчеты подтверждают высокую эффективность каскада из соединенных последовательно проточных реакторов. Их продуктивность при гидролизе лактозы составляет приблизительно 70–90 % от максимальной возможной (т.е. от продуктивности реактора первого кинетического типа) в данных конкретных условиях продуктивности.

В ТПИ разработаны и построены четырехкаскадные барботажные биореакторы типа БКР [3, 5]. На Выруском молочном комбинате проведены пилотные испытания биореакторов БКР-5 и БКР-6/8 с использованием в качестве субстрата концентрата гиперфильтрации молочной сыворотки и маточных растворов

Т а б л и ц а 2

Продуктивность одной единицы предельной скорости V при гидролизе лактозы в реакторах двух кинетических типов (Π_1 - для периодического реактора с перемешиванием, Π_2 - для проточного реактора с перемешиванием)

	Температура 30 °С (нативный фермент)		Температура 40 °С (иммобилизованный фермент)		Температура 50 °С (нативный фермент)	
	при конечной степени конверсии	0,8 0,9	при конечной степени конверсии	0,7 0,8 0,9	при конечной степени конверсии	0,6 0,7 0,8 0,9
$[S]_0 = 0,12 \text{ M}$						
Π_1	0,311	0,276 0,241 0,202 0,157 0,317 0,279 0,241 0,200 0,153 0,415 0,357 0,300 0,242 0,178				
Π_2	0,200	0,157 0,117 0,078 0,039 0,199 0,154 0,113 0,074 0,036 0,242 0,181 0,129 0,081 0,039				
$[S]_0 = 0,231 \text{ M}$						
Π_1	0,362	0,318 0,275 0,231 0,180 0,370 0,323 0,277 0,230 0,175 0,435 0,372 0,312 0,251 0,185				
Π_2	0,223	0,176 0,132 0,089 0,046 0,224 0,173 0,128 0,085 0,042 0,249 0,187 0,133 0,085 0,041				
$[S]_0 = 0,474 \text{ M}$						
Π_1	0,350	0,303 0,261 0,220 0,176 0,341 0,291 0,244 0,200 0,152 0,423 0,360 0,301 0,244 0,182				
Π_2	0,205	0,163 0,124 0,088 0,048 0,214 0,167 0,125 0,085 0,045 0,237 0,179 0,128 0,083 0,041				

Доля выявляемой активности от предельной (максимальной) при гидролизе лактозы с помощью иммобилизованного препарата β -галактозидазы из *Penicillium canescens* (рН 4,5 40 °С) в реакторах трех типов

Исходная концентрация лактозы, М	Степень конверсии X_k (Х.ст.)	Доля выявляемой активности			Относительная продуктивность реакторов "бой" : каскад : ПРП
		в периодическом реакторе с перемешиванием	в каскаде из четырех точных реакторов	в протоном реакторе с перемешиванием (ПРП)	
[S] ₀ = 0,12	0,6	0,279	0,240	0,154	I : 0,862 : 0,552
	0,7	0,241	0,200	0,113	I : 0,828 : 0,469
	0,8	0,200	0,157	0,074	I : 0,786 : 0,370
	0,9	0,153	0,109	0,036	I : 0,715 : 0,235
[S] ₀ = 0,231	0,6	0,323	0,274	0,173	I : 0,849 : 0,536
	0,7	0,277	0,227	0,128	I : 0,818 : 0,462
	0,8	0,230	0,178	0,085	I : 0,776 : 0,370
	0,9	0,175	0,125	0,042	I : 0,715 : 0,240
[S] ₀ = 0,474	0,6	0,291	0,266	0,167	I : 0,915 : 0,574
	0,7	0,244	0,220	0,125	I : 0,902 : 0,512
	0,8	0,200	0,175	0,085	I : 0,874 : 0,425
	0,9	0,152	0,125	0,045	I : 0,825 : 0,296

перекристаллизации лактозы. Для кинетических исследований из каждой секции реактора брали пробы после достижения стационарности системы и анализировались по ранее опубликованной методике [3]. Типичные результаты опытов, сравненные с расчетными, изображены на рис. 1.

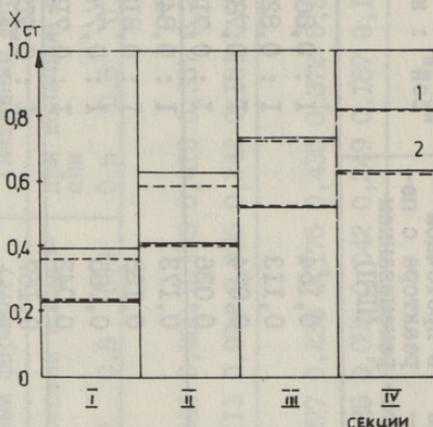


Рис. 1. Значение стационарной степени конверсии $X_{ст}$ в секциях барботажного реактора БКР-5. Гидролиз лактозы в маточном растворе перекристаллизации лактозы при 40°C , pH 4,5. Исходная концентрация лактозы: 1 - 0,281 М, 2 - 0,474 М. Пунктирные линии - расчетные.

Таким образом, на основе теоретических расчетов и пилотных испытаний можно рекомендовать для гидролиза лактозы в молочных продуктах каскадные биокаталитические реакторы, гарантирующие проведение непрерывного процесса при относительно высокой эффективности использования загруженного в реактор биокатализатора.

Л и т е р а т у р а

1. Курвитс М.А., Сиймер Э.Х. Кинетика одностратных ферментативных реакций. X. Кинетика гидролиза лактозы с помощью β -галактозидазы из *Penicillium canescens* // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1966. № 622. С. 15-23.
2. Паппель К.Э., Лайдсаар Р.Б. Свойства иммобилизованной β -галактозидазы // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1985. № 598. С. 99-106.

3. Паппель К.Э., Теаро Э.Н., Уус Э.Г.
Гидролиз лактозы в барботажном биокаталитическом реакторе
// Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1987. № 633. С. 67-75.

4. Сиймер Э.Х. Моделирование кинетических режимов биокаталитических реакторов // Материалы республиканской конференции Тарту - Кяэрику, 5-6 июня 1984 г. Тарту, 1986. С. 218-224.

5. Теаро Э.Н., Уус Э.Г., Кёстнер А.И.
Промышленные биокаталитические реакторы для процессов с иммобилизованными ферментами // Антибиотики и медицинская биотехнология. 1986. № 2. С. II2-II7.

E. Siimer, K. Pappel, M. Kurvits

Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions

XI. Kinetics of Reactors Used for Enzymatic Hydrolysis of Lactose in Milk Whey and Its By-products

Abstract

The kinetics of lactose hydrolysis by native and immobilized β -galactosidase from *Penicillium canescens* at pH 4.5 and 30-50 °C has been described for three kinetic types of reactors - batch, continuous stirred tank reactor (CSTR) and four-stage cascade of CSTR. Productivities of these reactors have been calculated and compared. It has been shown that four-stage cascades can be successfully used for the enzymatic hydrolysis of lactose in milk products.

Ühesubstraatsete fermentatiivsete reaktsioonide kineetika

XI. Reaktorite kineetika laktoosi fermentatiivsel
hüdrolüüsil piimavadakus ja selle tootlemis-
produktides

Kokkuvõte

Võrreldi kolme erinevat reaktoritüüpi, mida laktoosi hüdrolüüsil kasutatakse: perioodilist segamisreaktorit, läbivoolureaktorit ja järjestikku kaskaadi ühendatud läbivoolureaktorit. Arvutused viidi läbi kolmel erineval laktoosi lähtekontsentratsioonil - 0,12 M, 0,231 M ja 0,474 M. Uuritav temperatuuriintervall oli 30-50 °C, keskkonna pH 4,5. Tõestati, et laktoosi hüdrolüüsil piimavadakus on efektiivne kasutada 4-astmelist kaskaadi ühendatud läbivoolureaktorit, kusjuures katalüsaatoriks oleks immobiliseeritud β -galaktosidaas.

М.К. Фриеденталь, Т.Я. Аллмере

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ ТЕЛЯЧЬЕГО
ХИМОЗИНА ПРИ ГИДРОЛИЗЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО СУБСТРАТА

Протеолитическое действие химозина (К.Ф.3.4.23.4) характеризуется реакцией гидролиза Phe(105)–Met(106) связи в молекуле κ -казеина, выполняющего роль стабилизатора казеиновой мицеллы в молоке. В результате этого ограниченного протеолиза мицеллы казеина становятся термодинамически нестабильными и выпадают в осадок, что является основой производства сыра. Характеристика препаратов химозина в отношении такого сложного субстрата часто затруднительна и не оправдана.

Голландскими учеными предложено в качестве субстрата использовать синтетический гексапептид Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOme [1], что во многом облегчает возможность характеризовать препараты молокосвертывающих ферментов при сравнении их с химозином. В первых работах за ходом ферментативной реакции гидролиза гексапептида следили, в основном, используя нингидриновый метод [2, 3], который в последующем был заменен прямым спектрофотометрическим детектированием расщепления пептидной связи [4, 5].

Целью настоящей работы явились очистка торгового препарата сычужного фермента и определение протеолитической активности выделенного из него телячьего химозина по отношению к синтетическому субстрату, а также выявление кинетических констант K_m и k_{cat} реакции гидролиза в молекуле гексапептида.

Материалы и методы

Химозин был выделен из торгового препарата "Сычужный порошок" (ОСТ 49 144-79) путем диализа и последующей хроматографической очистки на ДЭАЭ-целлюлозе в градиенте NaCl

[6, 7]. Во фракциях определялись содержание белка путем измерения экстинкции при 278 нм (коэффициент экстинкции химозина $E_{1\text{см}}^{1\text{мг/мл}} = 1,530$) и 280 нм (коэффициент экстинкции пепсина $E_{1\text{см}}^{1\text{мг/мл}} = 1,485$) и молокосвертывающая активность по времени свертывания восстановленного обезжиренного молока (12 г/100 г в 10 мМ растворе CaCl_2 при pH 6,4). После последней ступени очистки фракции, содержащие химозин, подвергались диализу и лиофильной сушке, степень очистки проверялась методом электрофореза.

Раствор химозина приготавливали в 0,05 М ацетатном буфере с содержанием 1 М NaCl, pH 5,20.

В качестве субстрата использовали 1,1 мМ раствор гексапептида Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOme в 0,05 М ацетатном буфере с pH 4,70. Гексапептид был синтезирован и представлен ВНИИОЧБ АН СССР, г. Ленинград.

Активность химозина выражали в мкат/кг и вычисляли по начальной скорости реакции гидролиза Phe-Nle связи аналогично методике, использованной в работе [4]. По сравнению с данной методикой, нами однако, были допущены следующие изменения: измерение осуществлялось на UV-VIS спектрофотометре фирмы Бекман (США), модель 5260 и объем субстрата в термостатируемой кювете составлял 1,0 мл.

Результаты и обсуждение

Хроматограмма препарата сычужного фермента (1,6 г) приведена на рис. 1, где плавные и ступенчатые линии обозначают, соответственно, содержание белка и активность во фракциях. Из нее видно, что около 35 % от вводимых в колонку белков состоит из балластных белков, не имеющих молокосвертывающей активности и не связывающихся с ионообменником. При увеличении ионной силы буфера до концентрации 0,2 М NaCl в растворе из колонки элюируется белок, который и по данным литературы и по результатам проведенного нами электрофореза идентифицируется как химозин. Доля химозина составляет около 30 % от общего белка в растворе. При доведении концентрации соли до 0,40-0,45 М NaCl, из колонки выходит третий компонент - пепсин, который составляет 35 % от общего содержания белка. По проведенным нами

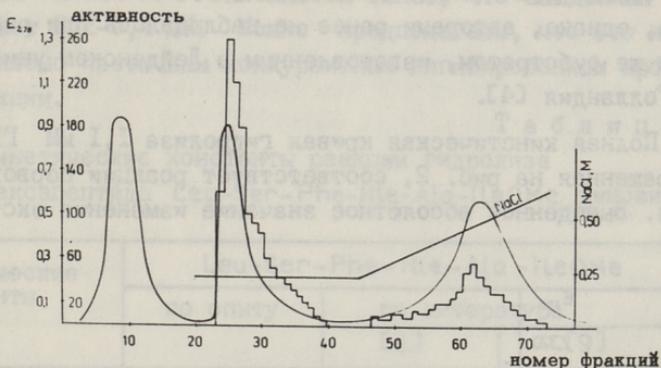


Рис. 1. Хроматограмма очистки препарата "Сычужный порошок" (ОСТ 49 144-79) на ДЭАЭ целлюлозе. Пояснение в тексте.

расчетам 75 % от всей молокосвертывающей активности, вносимого в колонку препарата, обусловлено химозином, а 25 % - пепсином. Следовательно, препарат "Сычужный порошок" по своему ферментному составу мало отличается от "ОСТ 49 144-79", предусматривающего содержание 80 % химозина по балансу молокосвертывающей активности. В то же время следует также отметить, что весовая доля химозина в белковом балансе всего каталитически активного белка составляет всего лишь 45 %.

Полученные препараты химозина и пепсина были однородны по данным электрофореза в полиакриламидном геле.

Далее снимались полные кинетические кривые реакции гидролиза химозином гексапептида Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOMe (далее Г'ЕКСАНle). В работе [1] показано, что данная реакция сопровождается исключительно разрывом Phe-Nle связи. Исходя из этого, можно предполагать, что уменьшение экстинкции по ходу реакции обусловлено расщеплением упомянутой пептидной связи. Также необходимо отметить, что в первых опытах такого рода у нас имелись некоторые трудности измерения скорости ферментативной реакции, что было связано с наличием самопроизвольного гидролиза пептида. Поэтому при обращении с упомянутым в разделе "Материалы и методы" субстратом следует быть внимательным и длительное хранение его прово-

диль только при пониженных температурах (4 °С). Данное явление, однако, авторами ранее не наблюдалось при работе с таким же субстратом, изготовленным в Лейденском университете, Голландия [4].

Полная кинетическая кривая гидролиза 1,1 мМ ГЕКСА Nle, изображенная на рис. 2, соответствует реакции первого порядка. Выведенное абсолютное значение изменения экстинкции

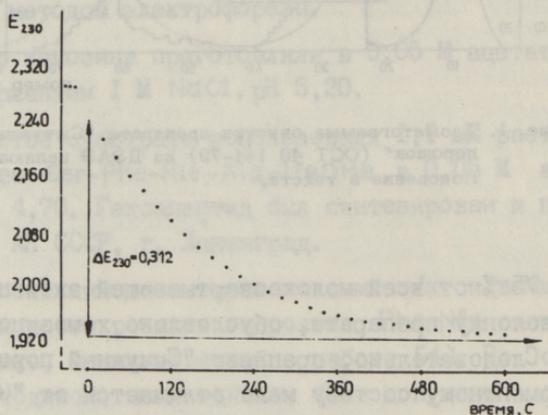


Рис. 2. Полная кинетическая кривая гидролиза 1,1 мМ раствора гексапептида Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-PeOMe в 0,05 М ацетатном буфере при pH 4,70. $[E]_0 = 0,16$ мкМ. Начало реакции "0" соответствует перемешиванию субстрата с ферментом.

$\Delta E_{\text{абс}}^{230}$ при 230 нм характеризует исходную концентрацию субстрата. По данным С. Виссера и др. [5] $\Delta E_{\text{абс}}^{230}$ для 1 мМ раствора ГЕКСА Nle в 0,05 М ацетатном буфере (pH 4,7) составляет $0,282 \pm 0,007 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Используя интегрированную форму уравнения Михаэлиса-Ментен [8]:

$$\frac{P}{t} = V - K_M \cdot \frac{A}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - P}$$

по данным полной кинетической кривой с помощью ЭЕМ вычисляли предельную скорость реакции V и константу Михаэлиса K_M . В таблице I приведены характерные кинетические данные по сравнению с опубликованными ранее в литературе.

На основании анализа кинетических данных, выявляется сходство между опытными и литературными данными. Величи-

на $k_{cat}/K_m \gg 0,1 \text{ с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$ характеризует хорошие субстратные свойства ГЕКСА Nle . Выясняется также, что найденная K_m превышает $0,2-0,4 \text{ мМ}$. Можно предполагать, что это явление обусловлено частичным конкурентным ингибированием продуктами реакции.

Т а б л и ц а I

Кинетические константы реакции гидролиза
гексапептида $\text{Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOME}$ химозином

Кинетические константы	Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOME		
	по опыту	по литературе	
		[5]	[9]
$K_m, \text{мМ}$	1,0	0,24	0,36
$k_{cat}, \text{с}^{-1}$	50,6	18,6	24,9
k_{cat}/K_m $\text{с}^{-1} \cdot \text{мМ}^{-1}$	50,6	77,5	69,2

Для определения специфической протеолитической активности (СПА) по начальной скорости реакции гидролиза I, I мМ ГЕКСА Nle была выбрана такая продолжительность реакции, при которой глубина превращения субстрата не превышала 10%. Были проведены 2 независимой серии опытов, каждая с 5 различными концентрациями фермента. Результатами этих опытов установлено, что химозин, выделенный из коммерческого препарата, характеризуется СПА = 730 ± 35 мкат/кг. Следовательно, активность очищенного и выделенного нами химозина сравнима с наилучшими зарубежными препаратами химозина [5].

Итак, применение синтетического субстрата вместо молока позволяет характеризовать молокосвертывающие ферменты по их специфическому ферментативному действию, исключая стадию свертывания. Применение синтетического ГЕКСА Nle , может быть, получит предпочтение при решении многих актуальных вопросов прикладной энзимологии в сыроделии, например, для определения состава сычужных ферментных препаратов в экспресс-анализе [10].

Авторы статьи выражают глубокую благодарность М.А. Самарцеву за предоставление синтетического субстрата.

Л и т е р а т у р а

1. K o n i n g d e P.J., R o o i j e n v a n P.J., V i s s e r S. Application of a synthetic hexapeptide as a standard substrate for the determination of the activity of chymosin // Neth. Milk Dairy Y. 1978. Vol. 32. P. 232-244.
2. Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetic studies with peptides of the sequence 101-112 of bovine k-casein / Visser S., Rooijen van P.J., Schattenkerk C., Kerling K.E.T. // Biochem. Biophys. Acta. 1976. Vol. 438. P. 265-272.
3. Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetic studies with bovine k-casein-(103-108)-hexapeptide analogues / Visser S., Rooijen van P.J., Schattenkerk C., Kerling K.E.T. // Biochem. Biophys. Acta. 1977. Vol. 481. P. 171-176.
4. F r i e d e n t h a l M., V i s s e r S. Enzyme adsorption and loss of activity in dilute solutions of chymosin and pepsin. Prevention with polyethylene glycol // Neth. Milk Dairy Y. 1985. Vol. 39. P. 63-70.
5. V i s s e r S., R o l l e m a H. Quantification of chymosin action on nonlabeled k-casein-related peptide substrates by ultraviolet spectrophotometry: description of kinetics by the analysis of progress curves // Anal. Biochem. 1986. Vol. 153. P. 235-241.
6. Determination of rennin and bovine pepsins in commercial rennets and abomasal juices / Garnot P., Thapon J.L., Mathieu C.M., Maubois J.L., Ribadeau-Dumas B. // Y. Dairy Sci. 1972. Vol. 55, N 12. P. 1641-1650.
7. Determination of chymosin and bovine pepsin in commercial bovine rennets and pepsins / Collin J.C., Martin P., Garnot P., Ribadeau-Dumas B., Mocquot G. // Milchwissenschaft. 1981. Vol. 36, N 1. P. 32-35.
8. Б е р е з и н И.В., К л ё с о в А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: МГУ, 1976. 320 с.
9. V i s s e r S. Proteolytic enzymes and their action

on milk proteins. A review // Neth. Milk Dairy Y. 1981. Vol. 35. P. 65-88.

10. Visser S., Friedenthal M., Rolem H. Quantification of chymosin and pepsin in bovine and calf rennets // Proceedings of the XXII International Dairy Congress. The Hague. 29 Sept. - 03 Oct. 1986. Dordrecht-Boston-Lancaster-Tokyo, 1986. P. 78.

M. Friedenthal, T. Allmere

Purification of Calf Chymosin and Its Characterization by the Action on a Synthetic Hexapeptide

Abstract

The content of chymosin and pepsin in a commercial powder rennet preparation has been determined. Thereafter the proteolytic action of the chromatographically isolated chymosin on a synthetic hexapeptide ester Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOMe was quantified. The reaction was established following the decrease of UV-absorption at 230 nm caused by the specific splitting of the Phe-Ile bond. Advantages of the synthetic peptide for the milk clotting preparation analysis have been presented.

M. Friedenthal, T. Allmere

Kümosiini puhastamine ja tema iseloomustamine sünteetilise substraadi hüdrolüüsireaktsiooni kaudu

Kokkuvõte

On määratud tööstusliku laapfermentpreparaadi valguline koostis. On näidatud, et 75 % kogu preparaadi piima kalgendavast aktiivsusest on põhjustatud kümosiinist, mis aga ei moodusta katalüütilisest aktiivsest valgust üle 45 %. On määratud kromatograafiliselt puhastatud kümosiini omadused tema poolt katalüüsitava heksapeptiidi (1,1 mN, 0,05 M Na-atsetaatpuhver, Ph 4,7) hüdrolüüsireaktsiooni kaudu. On toodud sünteetilise substraadi kasutamise eelised laapfermentpreparaatide iseloomustamisel.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА
BACILLUS MACERANS И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ
ПОЛУЧЕНИИ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

IV. БИОСИНТЕЗ ЦИКЛОДЕКСТРИНГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ
РАЗЛИЧНЫМИ ШТАММАМИ *BACILLUS MACERANS*

В связи с большим прикладным значением циклодекстринов (ЦД) выбор штаммов-продуцентов циклодекстринглюканотрансферазы (ЦГТазы), необходимой для синтеза ЦД, имеет большое значение, так как микробиологический синтез ЦГТазы представляет собой ключевой этап для производства ЦД.

Проведен целый ряд исследований, посвященных изучению способов получения ферментного препарата, в частности, выяснению условий культивирования продуцентов фермента [1-5]. Уже в конце 30-х - начале 40-х годов в работах Тильдена и Хадсон [6, 7] приведены не только условия культивирования продуцента фермента *Bacillus macerans*, но и способы выделения ферментного препарата и применение его для синтеза ЦД. Тем не менее, к настоящему времени некоторые аспекты культивирования бацилл - продуцентов ЦГТазы остаются невыясненными.

Несмотря на выделение и применение алкалофильных штаммов бацилл японскими исследователями в качестве источника циклизующего фермента, *B. macerans* все же заслуживает внимания как промышленный продуцент ЦГТазы и применяется в технологических разработках способов получения ЦД [8-12]. Поэтому целью наших исследований было осуществление подбора штамма *B. macerans* - продуцента ЦГТазы для получения β -ЦД на основании результатов исследования биосинтеза ЦГТазы различными штаммами бацилл.

Материалы и методы

Штаммы *B. macerans* ВКМВ-506, ВКМВ-697 и ВКМВ-698 были получены из Всесоюзной коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Лиофилизированные культуры микроорганизмов были использованы для засева в питательные среды, содержащие в качестве источника углерода и азота 15 % мелко нарезанного картофеля и 1,5 % мела для поддержания рН среды культивирования. Культуру для опытов выращивали в конических колбах емкостью 500 мл (150 мл среды) без аэрации и перемешивания. При культивировании бацилл использовали оптимальную температуру выращивания 37 °С, как было показано нами ранее [12].

С целью изучения динамики биосинтеза ЦГТазы культурами бацилл в культуральной жидкости каждые 24 часа определяли количество β -ЦД и активность ЦГТазы спектрофотометрически с помощью фенолфталеина [13, 14].

Для изучения конверсии крахмала ЦГТазой применяли различные концентрации субстрата (растворимого крахмала) - 2,5 г/л, 5,0 г/л и 10,0 г/л. Ферментативный катализ образования β -ЦД проводили без органических растворителей при температуре 45 °С - оптимальной температуре для проявления ферментативной активности ЦГТазы *B. macerans* ВКМВ-506, как было показано нами ранее [15].

В аналитической работе использовали реактивы со степенью чистоты "ч.д.а." или "хч."

Результаты и обсуждение

В настоящей работе определяли содержание β -ЦД и активность ЦГТазы в культуральной жидкости в ходе культивирования бацилл в течение 12-14 суток. На рисунках 1 и 2 приведены результаты изучения динамики образования β -ЦД и проявления активности ЦГТазы у трех исследованных нами штаммов *B. macerans*.

Как видно из рисунков 1 и 2, данные экспериментов свидетельствуют о двухстадийности процесса биосинтеза фермента культурами бацилл. Накопление фермента в культуральной жидкости повышается только после значительного снижения содер-

жания β -ЦД и достигает максимума на 9-11-й день культивирования бацилл, т.е. в поздней стационарной фазе роста микроорганизмов. В культуральной жидкости *B. pasteurans* ВКМВ-506 активность ЦТазы в несколько раз превышает значения

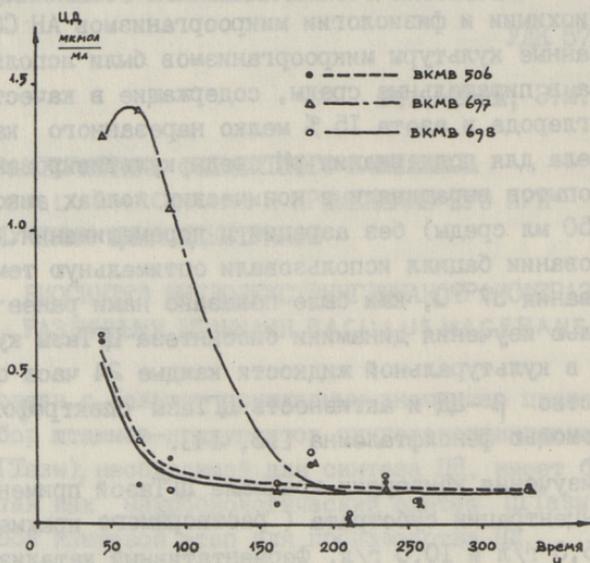


Рис. 1. Динамика образования β -ЦД в культуральной жидкости у различных штаммов бацилл.

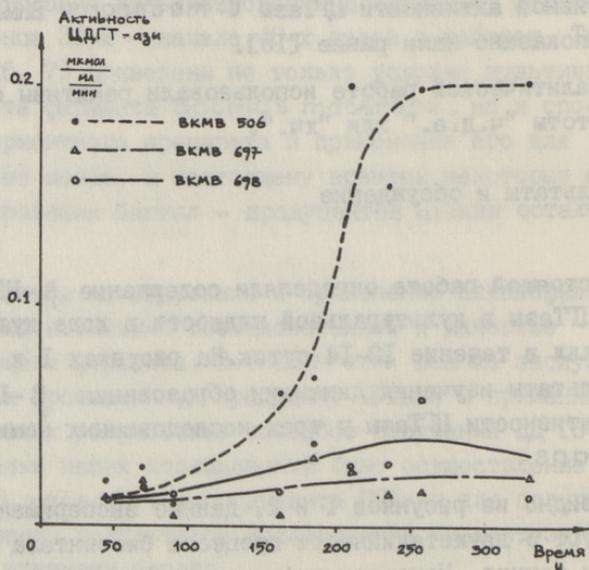


Рис. 2. Динамика биосинтеза ЦГТазы различными штаммами бацилл.

активности фермента, полученные для двух остальных исследованных нами штаммов ВКМВ-697 и ВКМВ-698, хотя содержание β -ЦД в первые дни культивирования штаммов ВКМВ-506 и ВКМВ-698 заметно друг от друга не отличалось. Следовательно, не обнаружено прямой корреляции между количественным содержанием β -ЦД при активном росте культур и ферментативной активностью ЦТазы в культуральной жидкости в стационарной фазе роста микроорганизмов.

Активность фермента ЦТазы в культуральной жидкости *V. macerans* ВКМВ-506 оставалась стабильной в течение всего периода наблюдения - со времени достижения максимальной активности в течение 100 часов.

В ходе изучения биосинтетических свойств различных штаммов бацилл были получены ферментные препараты ЦТазы с различной активностью - из *V. macerans* ВКМВ-506 - 0,15 - 0,20 Е/мл, ВКМВ-698 - 0,06-0,08 Е/мл и ВКМВ-697 - 0,03 - 0,05 Е/мл.

Так как для синтеза ЦД можно использовать ферментный препарат ЦТазы, полученный из культуральной жидкости бацилл после отделения клеток без дополнительной очистки, проводили ряд экспериментов по изучению биотрансформации растворимого крахмала за 4 часа без применения органических растворителей.

Как видно из рисунка 3, при низких концентрациях субстрата (2,5 г/л) глубина конверсии крахмала ЦТазой из *V. macerans* ВКМВ-506 достигла 61,0 % исходного количества субстрата при 45 °С.

На основании полученных результатов можно заключить, что в качестве продуцента ЦТазы из имеющихся штаммов *V. macerans* целесообразно использовать *V. macerans* ВКМВ-506, характеризующийся повышенной способностью продуцировать ЦТазу в культуральную жидкость. Несомненно, с помощью оптимизации условий культивирования можно сократить время культивирования бацилл-продуцентов ЦТазы и достигнуть значительного повышения ферментативной активности в культуральной жидкости *V. macerans* ВКМВ-506. Для синтеза ЦД можно применять ферментный препарат ЦТазы из культуральной жидкости после отделения клеток без дополни-

тельной очистки. Условия проведения ферментативного катализа образования β -ЦД требуют дальнейшего изучения.

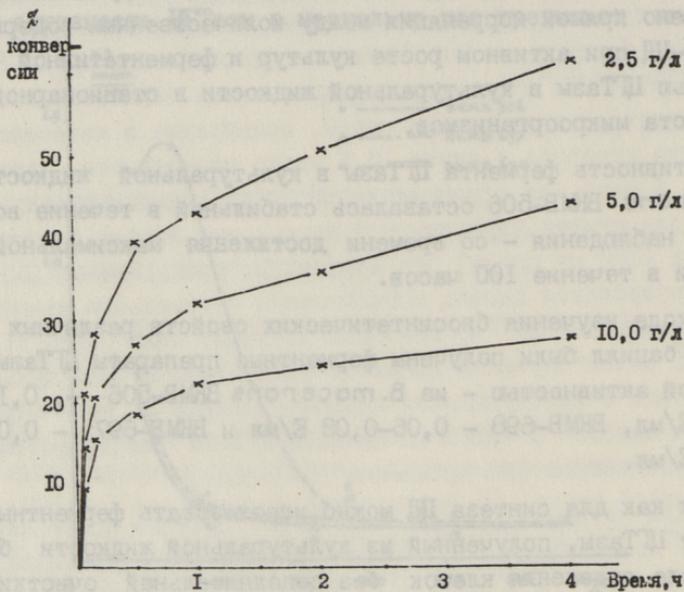


Рис. 3. Степень конверсии растворимого крахмала ферментным препаратом ШГТазы из *B. macerans* ВКМВ-506.

Л и т е р а т у р а

1. Lane A.G., Pirt S.J. Production of cyclodextrin glycosyltransferase by batch and chemostat culture of *Bacillus macerans* in chemically defined medium // J. Appl. Chem. Biotechnol. 1973. Vol. 23. P. 309-321.
2. Nakamura N., Horikoshi K. Characterization of acid-cyclodextrin glycosyltransferase of an alkalophilic *Bacillus* sp. // Agr. Biol. Chem. 1976. Vol. 40, N 8. P. 1647-1648.
3. Nakamura N., Horikoshi K. Characterization and some cultural conditions of a cyclodextrin glycosyltransferase-producing alkalophilic *Bacillus* sp. // Agr. Biol. Chem. 1976. Vol. 40, N 4. P. 753-757.

4. B e n d e r H. Cyclodextrin-glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae*. 1. Synthese, Reinigung und Eigenschaften des Enzym von *K. pneumoniae* M 5 // Arch. Mikrobiol. 1977. Vol. 3. P. 271-282.

5. N o m o t o M., S h e w D.C., C h e n I.J., Y e n T.M., L i a o C.W., Y a n g C.P. Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic bacteria of Taiwan // Agr. Biol. Chem. 1984. Vol. 48, N 5. P. 1337-1338.

6. T i l d e n E.B., H u d s o n C.S. Conversion of starch to crystalline dextrans by the action of a new type of amylase separated from cultures of *Aerobacillus macerans* // J. Am. Chem. Soc. 1939. Vol. 61. P. 2900-2902.

7. T i l d e n E.B., H u d s o n C.S. Preparation and properties of the amylases produced by *Bacillus macerans* and *Bacillus polymyxa* // J. Bacteriol. 1942. Vol. 43. P. 527-544.

8. B e n d e r H. Production, characterization and application of cyclodextrins // Adv. Biotechnol. Processes. 1986. Vol. 6. P. 31-71.

9. S z e j t l i J. Cyclodextrins in biotechnology // Starch / Stärke. 1986. Vol. 38, N 11. P. 388-390.

10. L á s z l ó E., B á n k y B., S z e j t l i J. Vergleich der Cyclodextrintransglycosylase-Erzeugung bei verschiedenen *Bacillus macerans*-Stämmen // Starch/Stärke. 1980. Vol. 32, N 1. P. 27-29.

11. H o r i k o s h i K. Production and industrial applications of cyclodextrin // Proc. Biochem. 1979. Vol. 5. P. 26-30.

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

13. V i k m o n M. Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of cyclodextrins // 1. Int. Symp. on Cyclodextrins. Budapest. 1982. P. 69-74.

14. Кёстнер А.И., Вокк Р.А., Паппель К.Э., Пейпман Э.М. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикл. биохим. и микробиол. 1988 (в печати).

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

R. Vokk, E. Peipman

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

IV. Biosynthesis of Cyclodextrin Glucanotransferase
by Different Strains of Bacillus macerans

Abstract

Comparative studies of three strains of Bacillus macerans revealed that the CGTase from B. macerans BKMB 697 had the smallest activity in the cultural fluid (0,03 E/ml) while B. macerans BKMB 506 showed the maximum activity during the 9-11 days of cultivation (0,20 E/ml).

CGTase from B. macerans BKMB 506 had advantages in the production of β -cyclodextrin. Just as the cultivation conditions of bacilli, so the reaction conditions of starch conversion must be further improved.

R. Vokk, E. Peipman

Bacillus macerans'i fermentkompleksi iseloomustus
ja selle kasutamine tsüklodekstriinide saamiseks

IV. Tsüklodekstringlükanotransferaasi biosüntees
Bacillus macerans'i erinevatel tüvedel

Kokkuvõte

Käesoleva töö autorid on uurinud tsüklodekstringlükanotransferaasi biosünteesi kolme erineva *B. macerans'i* tüve poolt. Fermendi maksimaalne aktiivsus leiti kultuurvedelikus pärast 9-11 kultiveerimispäeva. Kõige kõrgem fermenti aktiivsus tuvastati tüvel BKMB-506 (0,2 E/ml).

Uurimistulemuste põhjal järeldatakse, et *B. macerans* BKMB-506 on kasutatav fermenti biosünteesiks tärglise konverteerimisel β -tsüklodekstriiniks. Mikroorganismi kultiveerimise tingimused aga vajavad optimeerimist, samuti tärglise konversiooni tingimused.

Р.А. Вокк, Э.М. Пейпман, В.А. Кросинг

ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА *BACILLUS*
MACERANS И ПРИМЕНЕНИЕ ЕГО ПРИ ПОЛУЧЕНИИ
 ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ

У. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ЦИКЛОДЕКСТРИН-
 ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА

Циклические олигосахариды — циклодекстрины (ЦД) являются продуктами биотрансформации крахмала. Под действием особого циклизующего фермента микробиологического происхождения — $I,4,\alpha$ -D-глюкан-4- α -($I,4$ - α -глюкано) трансферазы (ЦГТазы) (КФ.2.4.1.19) обрывок $I,4$ - α -D-глюкопиранозной цепи субстрата переносится через гидроксильную группу при C_1 к гидроксильной группе C_4 акцептора. В качестве источника фермента известны представители семейства *Bacillus* (*B. circulans*, *B. macerans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. ohbensis*, алкалофильные *Bacillus* sp.), некоторые виды *Klebsiella* и *Micrococcus* [1-5]. Субстратом для гликозилтрансферазной реакции могут служить полисахариды, состоящие из $I,4$ - α -глюкопиранозной цепи, в основном, крахмал из различных источников (кукурузный, картофельный и др.) [6, 7]. В роли акцептора для реакции циклизации различные авторы использовали целый ряд представителей углеводного ряда, начиная с глюкозы и мальтозы, причем эффективность изученных акцепторов была различна [8, 9].

Так как ЦГТазы из разных штаммов и видов микроорганизмов обладают различной специфичностью действия, т.е. в результате реакции циклизации образуется смесь циклодекстринов с шестью (α -ЦД), семью (β -ЦД) или более остатками глюкозы в различном их соотношении, для синтеза определенного циклодекстрина требуется правильный выбор штамма-производителя ЦГТазы. Наряду с алкалофильными штаммами бацилл для син-

теза β -ЦД применяются и различные штаммы *B. macerans* и *B. megaterium* [10, 11].

В настоящей работе изучали возможность применения неочищенного ферментного препарата ЦГТазы, продуцируемой в культуральную жидкость *B. macerans* ВКМВ-506, для получения β -ЦД.

Материалы и методы

B. macerans штамм ВКМВ-506 был получен из Всесоюзной коллекции микроорганизмов ИВМ АН СССР. Микробный синтез фермента проводили в конических колбах емкостью 1000 мл (200 мл питательной среды, содержащей 15 % мелко нарезанного картофеля и 1,5 % мела для поддержания pH среды культивирования) без аэрации при 37 °С. Ферментный препарат ЦГТазы получали из культуральной жидкости 8-10-дневной культуры *B. macerans* после отделения клеток центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 минут.

Активность фермента определяли спектрофотометрически по скорости образования β -ЦД с помощью фенолфталеина в 1%-ном растворе крахмала при pH 7,5 и температуре 45 °С, как описано ранее [12]. Определение β -ЦД проводили по методике Викмона [13].

В качестве субстрата для ферментативного синтеза β -ЦД использовали растворимый крахмал (ГОСТ 10163-76) или продажный картофельный крахмал с содержанием сухого вещества 81 %. Предварительную обработку субстрата проводили выделенным из культуральной жидкости ферментным препаратом ЦГТазы при 70 °С в течение 20-60 минут, как описано ранее [14]. При этом декстрозный эквивалент не превышал 10.

Декстрозный эквивалент находили как процент содержания перечисленных на глюкозу редуцирующих групп от исходного количества крахмала. Содержание редуцирующих групп определяли методом Тегге и Нирле по восстановлению Cu^{++} [15].

Глубину конверсии субстрата вычисляли как процент образовавшегося β -ЦД от сухого вещества исходного крахмала.

При изучении синтеза β -ЦД, проводимого в реакторах объемом до 5 л в присутствии комплексообразователя толуола

(в конечной концентрации до 5 % от объема конверсионной смеси), процент конверсии находили по выходу кристаллического продукта. Для выделения кристаллического β -ЦД из конверсионной смеси малорастворимый комплекс толуола с β -ЦД отцентрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 минут и комплекс разрушали при повышенной температуре с отгонкой толуола при помощи дистилляции водяным паром. β -ЦД перекристаллизовывали из водного раствора с содержанием сухого остатка 6-10 % и сушили при 80 °С в сушильном шкафу. Полученный белый кристаллический продукт взвешивали с точностью до 0,01 г.

Чистоту полученного β -ЦД в отношении содержания других углеводов в качестве примесей определяли методом гель-хроматографии аналогично методике Задона и др. [16]. В работе использовали колонку с внутренним диаметром 26 мм и высотой 600 мм, носителем служил Молселект Г-15. В качестве элюента применяли дистиллированную воду при комнатной температуре, скорость элюции 50 мл/час.

В полученных фракциях содержание углеводов определяли с помощью антрона [17]. Для этого в стеклянные пробирки, снабженные стеклянными крышками, вводили из бюретки по 2 мл 0,18%-ного раствора антрона в концентрированной серной кислоте, добавляли по 1 мл исследуемой пробы, содержащей 0,01 - 0,1 мг углеводов, и пробу выдерживали в кипящей водной бане в течение 5 минут. Затем пробы охлаждали водопроводной водой и фотометрировали при длине волны 625 нм.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе биотрансформацию крахмала ферментным препаратом ЦГтазы из *V. macerans* ВКМВ-506 осуществляли как без органических растворителей, так и в присутствии толуола в качестве комплексообразователя с продуктом ферментативной реакции - β -ЦД.

На первом этапе исследований определяли степень конверсии различных концентраций субстрата ферментным препаратом при температуре 45 °С. На рисунке 1 приведены результаты исследования конверсии крахмала без органических растворителей с помощью ферментного препарата активностью 0,2 Е/мл. Период наблюдения составлял 4 часа.

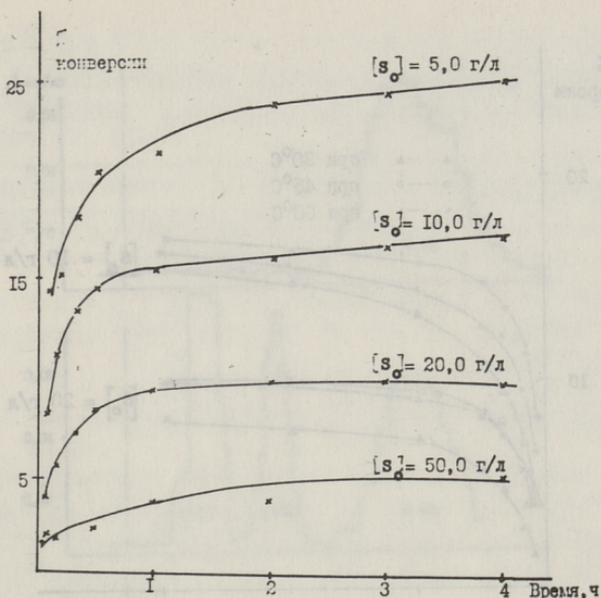


Рис. 1. Зависимость степени конверсии от концентрации субстрата.

Как видно из рисунка, степень конверсии крахмала ЦТазой уменьшается с повышением концентрации субстрата. Наибольшая степень конверсии достигнута при концентрации субстрата 5,0 г/л - 25 %.

С целью выяснения зависимости глубины конверсии от температуры, конверсию крахмала препаратом ЦТазы из культуральной жидкости бацилл изучали при трех различных температурах - 30, 45 и 60 °С. Как показали результаты экспериментов, представленные на рисунке 2, синтез β-ЦД в значительной мере зависит от применяемой температуры. Так, при наиболее низкой изученной нами температуре - при 30 °С за 4 часа образовалось в среднем 8, 14, и 22 % β-ЦД от исходного количества субстрата (при концентрации субстрата соответственно 20,0, 10,0 и 5,0 г/л). При 45 °С для всех концентраций субстрата были получены более высокие степени конверсии крахмала - от 9,7 до 25,3 % в зависимости от концентрации субстрата (соответственно 20,0 и 5,0 г/л). Результаты опытов, проведенных при 60 °С, свидетельствовали о некоторой инактивации фермента под действием температуры. Степень конверсии субстрата за 4 часа была относительно ниже по сравнению с результатами, полученными при 45 °С.

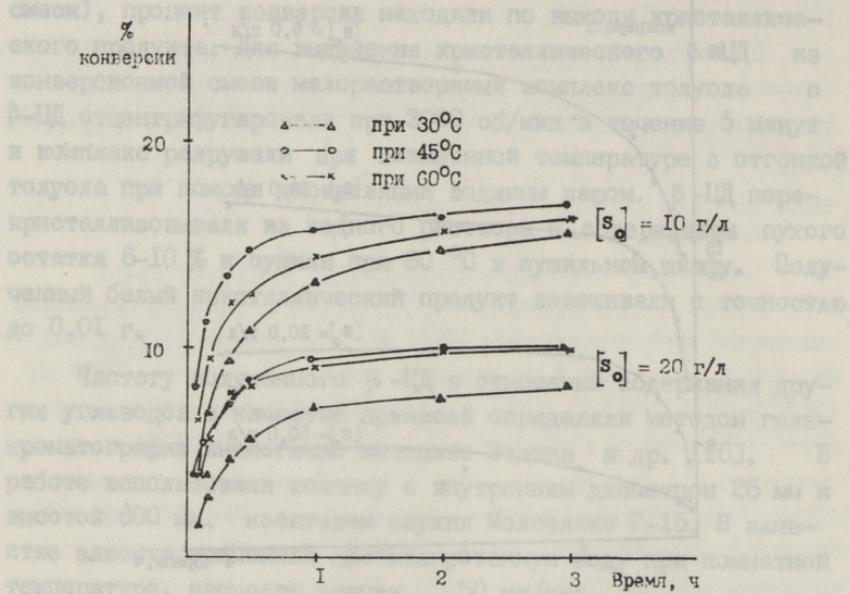


Рис. 2. Зависимость степени конверсии от температуры.

Как видно из рисунка 2, при проведении ферментативного синтеза β -ЦД из крахмала, ЦГТаза сильно ингибируется продуктами реакции. Поэтому в следующей части нашей работы для исследования конверсии при более высоких концентрациях субстрата мы пользовались толуолом, образующим труднорастворимый комплекс с продуктом реакции β -ЦД.

С целью разработки технологии получения β -ЦД были проведены эксперименты по ферментативному катализу синтеза β -ЦД в присутствии толуола при концентрациях субстрата 25,0 и 40,0 г/л продолжительностью до 120 часов. Каждые 24 часа из конверсионной смеси извлекали комплекс толуола с продуктом реакции. В таблице I приведены результаты конверсии двух различных концентраций крахмала.

Полученные данные свидетельствуют о возможности применения ферментного препарата ЦГТаза из культуральной жидкости *V. macegarans* ВКМВ-506 для синтеза β -ЦД. Достигнутая степень конверсии - 52 % является по литературе близкой к максимальной продуктивности ЦГТаза из *V. macegarans*.

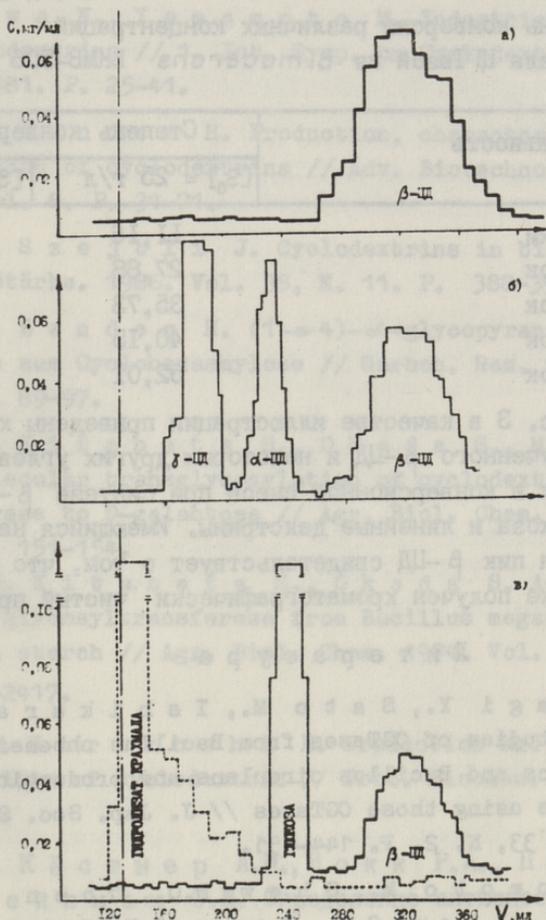


Рис. 3. Хроматограммы гелифильтрации.

Носитель: Молселект Г-15, колонка 26 x 600 мм (объем носителя 320 мл), элюент: дистиллированная вода, скорость элюции 50 мл/ч, температура комнатная.

- а) β -ЦД, выделенный и очищенный на кафедре органической и биохимии ТПИ (3,5 мг),
 б) α -ЦД (2,1 мг) + β -ЦД (3,0 мг) + γ -ЦД (2,8 мг) венгерской фирмы "Хиноин",
 в) гидролизванный α -амилазой крахмал (5,0 мг) + глюкоза (4,0 мг) + β -ЦД (3,0 мг).

Т а б л и ц а I

Степень конверсии различных концентраций
крахмала ЦТазой из *B. macerans* ВКМВ-506

Продолжительность конверсии	Степень конверсии, %	
	$[S_0] = 25$ г/л	$[S_0] = 40$ г/л
1 сутки	11,16	6,77
2 суток	27,88	14,67
3 суток	35,73	23,93
4 суток	40,15	31,23
5 суток	52,01	39,63

На рис. 3 в качестве иллюстрации приведены хроматограммы полученного β -ЦД и некоторых других углеводов, присутствующих в конверсионной смеси при синтезе β -ЦД - α -ЦД, γ -ЦД, глюкоза и линейные декстрины. Имеющийся на хроматограмме один пик β -ЦД свидетельствует о том, что по описанной методике получен хроматографически чистый продукт.

Л и т е р а т у р а

1. Yagi Y., Sato M., Ishikura T. Comparative studies of CGTases from *Bacillus ohbensis*, *Bacillus macerans* and *Bacillus circulans* and production of cyclodextrins using those CGTases // J. Jap. Soc. Starch Sci. 1986. Vol. 33, N. 2. P. 144-151.
2. Nomoto M., Shew D.C., Chen I.J., Yen T.M., Liao C.W., Yang C.P. Cyclodextrin glucanotransferase from alkalophilic bacteria of Taiwan // Agr. Biol. Chem. 1984. Vol. 48, N. 5. P. 1337-1338.
3. Bender H. Cyclodextrin-glucanotransferase von *Klebsiella pneumoniae*. 1. Synthese, Reinigung und Eigenschaften des Enzym von *K.pneumoniae* M 5 // Arch. Mikrobiol. 1977. Vol. 3. P. 271-282.
4. Паппель К.Э., Дихтярев С.И., Сугрובה Н.П. Особенности получения циклодекстринов и образование комплексов включения // ИНТ "Микробиология". 1988. Т. 21 (в печати).

5. Horikoshi K., Nakamura N., Matzuzawa N., Yamamoto M. Industrial production of cyclodextrins // 1. Int. Symp. on Cyclodextrins. Budapest. 1981. P. 25-41.

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

7. Szejtli J. Cyclodextrins in biotechnology // Starch/Stärke. 1986. Vol. 38, N. 11. P. 388-390.

8. Bender H. (1 \rightarrow 4)- α -glycopyranosyltransferprodukte aus Cyclohexaamylose // Garboh. Res. 1978. Vol. 65, N. 1. P. 89-97.

9. Kitahata S., Okada S., Misaki A. Intermolecular transglycosylation of cyclodextrin glycosyltransferase to D-galactose // Agr. Biol. Chem. 1979. Vol. 43, N. 1. P. 151-154.

10. Kitahata S., Okada S. Action of cyclodextrin glycosyltransferase from Bacillus megaterium strain No. 5 on starch // Agr. Biol. Chem. 1974. Vol. 38, N. 12. P. 2413-2417.

11. Horikoshi K. Production and industrial applications of cyclodextrin // Proc. Biochem. 1979. Vol. 5. P. 26-30.

12. Кёстнер А.И., Вокк Р.А., Паппель К.Э., Пейпман Э.М. Определение активности циклодекстринглюканотрансферазы // Прикл. биохим. и микробиол. 1988 (в печати).

13. Vikmon M. Rapid and simple spectrophotometric method for determination of micro-amounts of cyclodextrins // 1. Int. Symp. on Cyclodextrins. Budapest. 1981. P. 69-74.

14. Кросинг В.А. Предварительная обработка крахмала как сырья для синтеза циклодекстринов // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1987. № 633. С. 35-40.

15. Tegge G., Nierle W. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker in Stärke-hydrolysaten // Starch/Stärke. 1965. Vol. 17, N. 4. P. 107-110.

16. Z s a d o n B., S z i l a s i M., S z e j t l i J., S e r e s G., T ü d ö s K. Chromatography of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrin on dextran gel columns // Starch/Stärke. 1978. Vol. 30, N. 8. P. 276-279.

17. S c o t t T.A., M e l v i n E.H. Determination of dextran with anthrone // Anal. Chem. 1953. Vol. 25, N. 11. P. 1656-1661.

R. Vokk, E. Peipman, V. Krosing

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

V. Application of Crude Enzyme Cyclodextrin
Glycosyltransferase for Obtaining β -
Cyclodextrin

Abstract

The synthesis of β -cyclodextrin (β -CD) as the product of reaction between the enzyme cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase) from Bacillus macerans BKMB 506 and a soluble starch solution or a potato starch solution pretreated with the same CGTase was investigated. Conversion conditions such as substrate concentration, temperature and the amount of enzyme for β -CD production were examined.

B. macerans BKMB 506 seems to be useful for the practical production of CGTase, which can be utilized for industrial purposes in manufacturing β -CD.

R. Vokk, E. Peipman,

V. Krosing

Bacillus macerans'i fermentkompleksi iseloomustus
ja selle kasutamine tsüklodekstriinide saamiseks

V. Tsüklodekstringlükanotransferaasse fermentpreparaadi
kasutamine β -tsüklodekstriinide saamiseks

Kokkuvõte

Käesoleva töö autorid on uurinud tärglisse biotransformatsiooni produkti β -tsüklodekstriini saamise võimalusi *Bacillus macerans* BKMB-506 poolt sünteesitud fermenti tsüklodekstringlükanotransferaasi abil. Uuriti tärglisse konversiooni sõltuvust substraadi kontsentratsioonist, temperatuurist ja fermenti hulgast.

Tulemuste põhjal võib soovitada *B. macerans* BKMB-506 kasutamist tsüklodekstringlükanotransferaasi saamisel β -tsüklodekstriini tootmiseks.

А.Я. Кяэрд , Т.К. Вялимяэ

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКОНДЕНСАТОВ ДИМИНОЭФИРОВ ДЛЯ
МОДИФИКАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ АМИНОГРУПП

Наиболее часто используемыми реакциями при получении модифицированных и иммобилизованных белков являются реакции ацилирования и аминоацилирования, алкилирования (арилирования), азосочетания, образования иминов и, в меньшей степени, окислительно-восстановительные и радикальные реакции. Иногда используются и смешанные методы.

Химические реакции образования новых ковалентных связей затрагивают различные функциональные группы белков в зависимости от характера модифицирующего химического реагента и от реакционной способности, участвующей во взаимодействии группировки белковой молекулы.

В качестве мягких ацилирующих агентов могут быть рекомендованы иминоэфиры карбоновых кислот и их поликонденсаты.

В предварительных опытах мы установили, что 1,3,5-триазинный поликонденсат диэтилового эфира диминоадипиновой кислоты является подходящим реагентом для модификации и иммобилизации аминокрупп белков.

Цель работы состоит в разработке метода синтеза 1,3,5-триазинного поликонденсата диэтилового эфира диминоадипиновой кислоты для модифицирования белков, исследовании реакционной способности полученного модификатора, в частности, характеристик кинетики модифицирования в водных средах, а также в выдаче рекомендаций по применению полученных соединений для модифицирования белков.

При синтезе поликонденсата диэтилового эфира дииминоадипиновой кислоты применяли дигидрохлорид диэтилового эфира дииминоадипиновой кислоты (синтезирован нами).

Объектом модифицирования служил β -аланин ("Reanal", Венгрия).

Элементный анализ синтезированных веществ. Все элементные анализы сделаны на анализаторе CHN, модель I85 ("Hewlett Packard", США).

0,6-0,8 мг исследуемого вещества сжигают в потоке кислорода при температуре 1050 °C в течение 50 с. Состав вещества получают в %.

ИК-спектроскопия синтезированных веществ. Все ИК-спектры были сняты на спектрофотометре UR-20 ("Carl Zeiss", ГДР) при ширине щели 4 см⁻¹, со скоростью развертки по волновым числам 160 см/мин.

Жидкие образцы были анализированы в чистом виде без применения растворителей. Твердые образцы изучались в виде взвеси в парафиновом масле или в виде пленок, осажденных из растворителей на окошке кюветы из бромистого калия.

При идентификации веществ использованы данные, опубликованные в работе [1] и каталоге [2].

Спектры ЯМР ¹³C высокого разрешения конечных и промежуточных продуктов, продуктов гидролиза и модифицирования сняты на 20%-ных растворах в гексадекагидродиметилсульфоксиде, дейтероацетоне, дейтероводе и дейтерохлороформе при комнатной температуре на частоте 125,76 МГц на спектрофотометре со сверхпроводящим соленоидом AM-500 ("Bruker", ФРГ) с полной развязкой от протонов с применением Фурье-преобразования.

Химические сдвиги углерода-13 (X.C. ¹³C) измерены от внутреннего стандарта тетраметилсилана (TMS).

Спектры ЯМР ¹³C высокого разрешения твердых образцов сняты на спектрофотометре СХР-200 ("Bruker", ФРГ) на частоте 50,31 МГц с применением кросс-поляризации и быстрого вращения образца под магическим углом, применяя датчик, построенный в Институте химической и биологической физики АН ЭССР.

Кинетику реакций гидролиза триазинового поликонденсата диэтилового эфира диминоадипиновой кислоты и модифицирования первичных аминогрупп с его помощью исследовали термохимическим методом. Теоретический подход к решению подобных задач изложен в работах [3, 4]. Методика исследования кинетики реакций термохимическим методом приведена в работе [5].

Результаты и их обсуждение

Триазиновый поликонденсат ДБК (диэтиловый эфир диминоадипиновой кислоты) синтезировали по следующей методике: в закрытую колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещали 0,05 моля (13,65 г) дихлоргидрата ДБК, 0,2 моля (27,60 г) углекислого калия и 100 мл абсолютного диэтилового эфира. Эту смесь держали в холодильнике при температуре 2 °С в течение 12 часов при постоянном перемешивании, затем фильтровали и из фильтрата отгоняли в вакууме при комнатной температуре диэтиловый эфир. После отгонки эфира в вакууме остаток нагревали 30 минут при 30 °С /1 кПа и получали желтоватую жидкость (d_4^{20} 0,9860, n_D^{20} 1,4575) с выходом 7,30 г.

Состав синтезированного продукта исследовали при помощи элементного анализа:

	C, %	H, %	N, %
найдено	59,87	10,11	13,89

Строение синтезированного продукта исследовали по ИК- и ЯМР ^{13}C -спектрам. По ИК-спектру полоса при 1100 см^{-1} ($\text{C}-\text{O}$) доказывает присутствие алифатической простозэфирной группы. Характерная полоса при $1650-1660\text{ см}^{-1}$ доказывает присутствие азометиновой группы $\nu(\text{C}=\text{N})$. Полоса при 1545 см^{-1} указывает на присутствие связи $\text{C}=\text{N}$ в триазиновом цикле.

На существование триазинового поликонденсата указывает также ЯМР ^{13}C - анализ (см. табл. I).

По данным элементного анализа, ИК- и ЯМР ^{13}C -спектров установлено, что синтезированный продукт - триазиновый поликонденсат ДБК, содержащий триазиновые циклы и концевые ($\text{C}=\text{NH}$) группы:

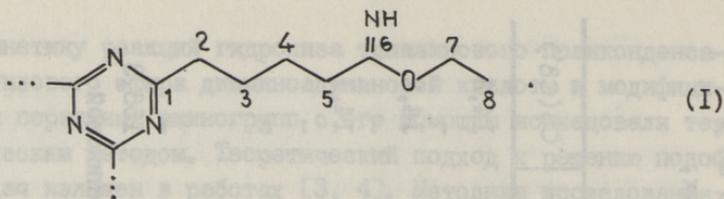
^{13}C (в м.д. относительно ТМС) иминоэфиров и их производных, продуктов их гидролиза и продуктов, полученных при использовании их в качестве модификаторов в DMCO-d_6 а)

№ формулы вещества	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7(C7')	C8(C8')
(1) б)	181,5	33,3	24,3 ^x	24,8 ^x	34,2	177,1	62,5	14,3
(2)	120,4	15,6	24,0	24,0	15,6	120,4	-	-
(3)	173,2	33,4	24,1	24,1	33,4	173,2	60,1	14,2
(4)	178,2	37,0	24,2	24,3	16,0	120,5	-	-
(5) б)	177,9	37,2	24,2 ^x	24,4 ^x	33,3	172,9	59,8	14,1
(6)	41,7	33,6	26,4	26,4	33,6	41,7	-	-
(7)	173,8	32,9	23,8	23,8	32,9	173,9	51,4	-
в DMCO-d_6 / 182,2 & 180,9	33,5	24,7	24,7	24,7	33,5	182,2 & 180,9	61,0	-
в твердом состоянии								
(8)	-	149,7	-	149,7	-	149,7	-	-
(9)	156,3	39,8	29,7	25,8	25,8	29,7	39,8	156,3

а) Химические сдвиги ядер ^{13}C адипиновой кислоты, диэтилового эфира и динитрила адипиновой кислоты хорошо согласуются с литературными данными [6].

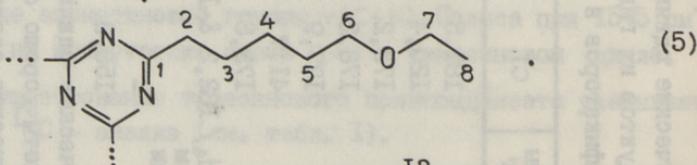
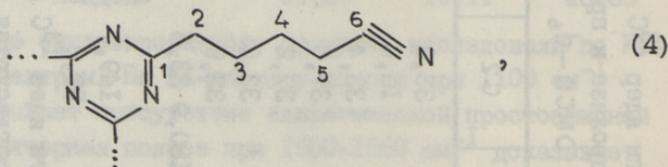
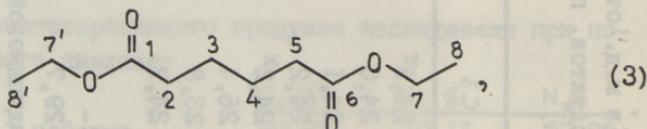
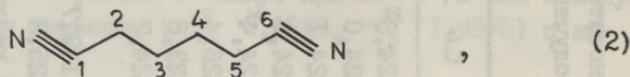
х) Химические сдвиги этих ядер могут меняться местами.

б) Для прямого сравнения и наглядности нумерация соединений отличается от правил IUPAC.



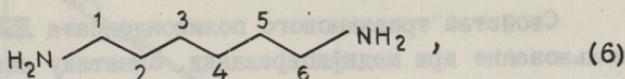
По литературным данным [7] циклизация иминоэфиров происходит в присутствии каталитических количеств их солей, в результате получают структурированные полимеры.

Характеристика реакций гидролиза триазинового поликонденсата ДБК при использовании его в качестве модификатора соединений, содержащих первичные аминогруппы. Для получения конечных продуктов гидролиза триазинового поликонденсата ДБК (I) провели гидролиз данного продукта в воде при температуре 30 °С в течение 10 часов. рН гидролизуемого раствора равнялся 8,1. Воду выпаривали в вакууме (1,3 кПа) досуха, оставалась светло-коричневая липкая масса. После гидролиза триазинового поликонденсата ДБК по спектру ЯМР ^{13}C в продуктах гидролиза установили следующие соединения (см. табл. I):

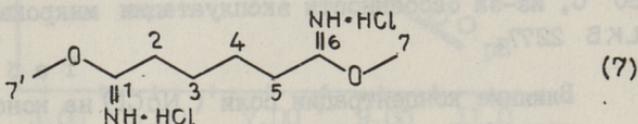


Как можно судить по спектру ЯМР ^{13}C , при гидролизе триазинового поликонденсата ДБК образовались 12 частей вещества (2), 4 части вещества (3), 2 части вещества (4) и 1 часть вещества (5).

Реакцию амидинирования первичных аминогрупп (в качестве модельного вещества использовался гексаметилендиамин

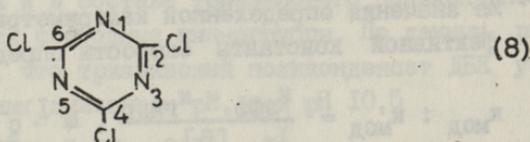


растворимый в органических растворителях) с помощью дихлоргидрата диметилового эфира диминоадипиновой кислоты

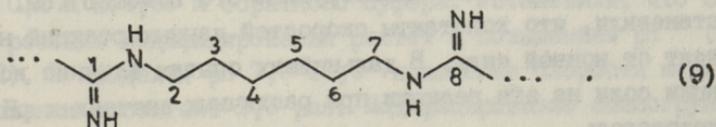


провели в гексадегидродиметилсульфоксиде при комнатной температуре (см. табл. I). По спектру ЯМР ^{13}C установлено образование амидиновой связи ($-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}-$) и присутствие свободного метанола ($\delta = 48,5$ м.д.). Очевидно, образовалась смесь различных продуктов реакции амидинирования — олигомеры, которые по-разному протонированы. Все это делает отнесение линий спектра к отдельным углеродным атомам в конкретных соединениях очень сложным.

Для упрощения интерпретации линий спектра модифицированного гексаметилендиамина модифицирование первичных аминогрупп (модельным веществом взяли гексаметилендиамин, растворимый в $\text{DMCO}-d_6$) провели с помощью 2,4,6-трихлор-1,3,5,-триазина



в $\text{DMCO}-d_6$. Реакция между гексаметилендиамином и 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазином (молярное отношение 3:1) прошла при комнатной температуре с энергичным выделением хлористого водорода и теплоты. По спектру ЯМР ^{13}C установили образование соединения (см. табл. I):



Образование соединения (9) свидетельствует о разрыве триазинового кольца при действии первичных аминов и указывает на образование аминоказометина.

Свойства триазинового поликонденсата ДБК и его использование при модифицировании. Кинетику реакций гидролиза триазинового поликонденсата ДБК и модифицирования первичных аминогрупп с его помощью исследовали при различных значениях pH (3,0–10,5) при постоянной температуре, равной 30 °C, из-за особенности эксплуатации микрокалориметра LKB 2277.

Т а б л и ц а 2

Влияние концентрации соли (NaCl) на константы скоростей реакций гидролиза триазинового полимера ДБК и модифицирования иминогрупп (модельным веществом β-аланин) с его помощью при температуре 30 °C и pH 8,5 (0,2 М боратный буфер) а)

Концентрация NaCl, М	$k_{\text{гидр}} \cdot 10^4, \text{ с}^{-1}$	$k_{\text{эфф}} \cdot 10^4, \text{ с}^{-1}$	$k_{\text{мод}} \cdot 10^2, \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
0,1	2,43 ± 0,35	6,97 ± 1,04	1,06
0,5	2,63 ± 0,40	6,59 ± 0,86	0,99
1,0	2,63 ± 0,24	6,79 ± 0,95	1,04
1,5	2,70 ± 0,38	6,30 ± 0,81	0,90
2,0	2,58 ± 0,41	6,50 ± 0,93	0,98

а) Из значения определенной калориметрически суммарной эффективной константы скорости определена величина

$$k_{\text{мод}} : k_{\text{мод}} = \frac{k_{\text{эфф}} - k_{\text{гидр}}}{[B]_0}, \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1} \text{ значение}$$

$k_{\text{гидр}}$ определено из специальных опытов и $[B]_0$ – начальная концентрация субстрата [4].

При исследовании влияния концентрации NaCl на константы скоростей реакций гидролиза триазинового поликонденсата ДБК и модифицирования аминогрупп с его помощью (см. табл.2) установили, что константы скоростей данных реакций не зависят от ионной силы. В дальнейших опытах влияние концентрации соли на эти реакции при различных значениях pH не исследовалось.

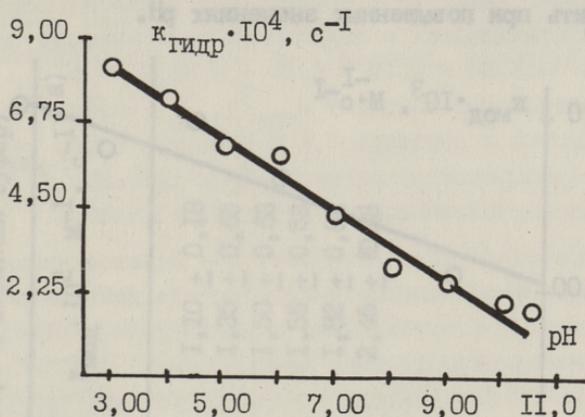


Рис. 1. Зависимость константы скорости реакции гидролиза триазинового поликонденсата ДБК от pH при температуре 30 °С.

Константа скорости реакции гидролиза триазинового поликонденсата ДБК постоянно уменьшается при увеличении pH (см. рис. 1; pH 3,0–6,0 0,1 М ацетатный буфер, pH 7,0–9,0 0,2 М боратный буфер, pH 9,0–10,5 0,05 М боратный буфер). При значении pH 10,5 скорость реакции гидролиза триазинового поликонденсата ДБК в 4,5 раза меньше, чем при значении pH 3,0. Можно полагать, что происходит разрыв 1,3,5-триазинового кольца и в составе триазинового поликонденсата ДБК гидролизуются свободные иминогруппы. По данным рисунка 1 установили, что триазиновый поликонденсат ДБК устойчив при повышенных значениях pH, при pH 10,5

$$k_{\text{гидр}} \cdot 10^4 = 1,87 \pm 0,15, \text{ c}^{-1}.$$

Поскольку триазиновый поликонденсат ДБК более устойчив и аминокгруппы модельного вещества реакционноспособны в щелочной среде, реакцию модифицирования аминокгрупп при помощи этого поликонденсата исследовали в пределах pH 7,0–10,5 0,2 М и 0,05 М боратного буфера. Установили, что скорость реакции модифицирования растет с повышением pH (см. рис. 2). В пределах pH 7,0–10,0 повышение скорости модифицирования достигает 1,5 раз. Модифицирование аминокгрупп

модельного вещества триазиновым поликонденсатом ДБК следует проводить при повышенных значениях рН.

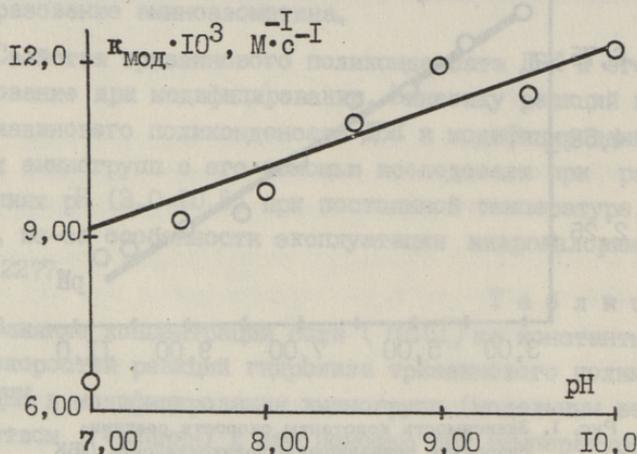


Рис. 2. Зависимость константы скорости реакции модифицирования аминокрупп триазиновым поликонденсатом ДБК от рН при температуре 30 °С.

По рис. 1 и 2 можно констатировать повышение отношений $k_{\text{мод}}/k_{\text{гидр}}$ при увеличении рН. Модифицирование β -аланина с помощью триазинового поликонденсата ДБК наиболее эффективно при рН 10,0, где значение отношения $k_{\text{мод}}/k_{\text{гидр}} = 58,6 \text{ M}^{-1}$ максимально.

Поскольку по данным работы [8] скорость реакции гидролиза ДБК снижается, а скорость реакции амидинирования первичных аминокрупп с помощью ДБК увеличивается в несколько раз при небольших добавках диоксана в водный раствор, целесообразно исследование влияния диоксана на реакции гидролиза триазинового поликонденсата ДБК и модифицирования аминокрупп с его помощью.

Реакции гидролиза триазинового поликонденсата ДБК и модифицирования аминокрупп с его помощью на β -аланине исследовались в 0,2 М боратном буфере, рН 8,5 при концентрациях диоксана 5–40 масс% (см. табл. 3). Установили, что константа скорости реакции гидролиза триазинового поликонденсата ДБК имеет максимум ($k_{\text{гидр}} \cdot 10^4 = 5,02 \pm 0,93, \text{c}^{-1}$) при концентрации диоксана 10%. Константа скорости реакции мо-

Значение констант скоростей $k_{\text{гидр}}$ и $k_{\text{мод}}$. Концентрация триазинового поликонденсата ДБК во всех опытах 0,01 М. Темп. 30 °С, pH 8,5 (0,2 М боратный буфер)

№ опыта	Содержание диоксида, масс %	Исходная конц. β -аланина, М	$k_{\text{эфф}} \cdot 10^4$, $\frac{\text{с}^{-1}}{\text{с}}$	$k_{\text{гидр}} \cdot 10^4$, $\frac{\text{с}^{-1}}{\text{с}}$	$k_{\text{мод}} \cdot 10^2$, $\text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ а)
1	0	0,0412	7,48 ± 2,65	2,95 ± 0,25	1,10 ± 0,18
2	5	0,0869	15,2 ± 5,4	3,47 ± 0,45	1,35 ± 0,65
3	10	0,0820	17,3 ± 4,2	5,02 ± 0,93	1,50 ± 0,63
4	20	0,0471	11,3 ± 2,1	3,98 ± 0,42	1,55 ± 0,53
5	30	0,0358	9,55 ± 2,28	3,02 ± 0,63	1,82 ± 0,82
6	40	0,0402	11,5 ± 1,0	1,67 ± 0,57	2,45 ± 0,38

а) Вычислено по уравнению $k_{\text{мод}} = \frac{k_{\text{эфф}} - k_{\text{гидр}}}{[B]_0}$ [4].

дифицирования аминогрупп триазиновым поликонденсатом ДБК линейно увеличивается с повышением концентрации диоксана ($k_{\text{мод}} \cdot 10^2 = 1,10 \pm 0,18 - 2,45 \pm 0,38, \text{М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Соотношение кинетических констант $k_{\text{мод}}/k_{\text{гидр}}$ зависит от концентрации диоксана в растворе 0,2 М боратный буфер (рН 8,5) - диоксан: уменьшается при добавлении диоксана и постепенно повышается с увеличением концентрации диоксана.

Из вышесказанного вытекает, что перевод дигидрохлорида ДБК в форму свободного основания под действием углекислого калия в диэтиловом эфире сопровождается реакциями поликонденсации, что вызывает возникновение триазиновых колец с сохранением активных групп. Получаемый продукт триазинового поликонденсата ДБК является полифункциональным модификатором аминокислот, который может быть использован в водной и неводной средах. Модифицирование первичных аминогрупп модельных соединений триазиновым поликонденсатом ДБК позволяет достигать более высоких значений $k_{\text{мод}}/k_{\text{гидр}}$, до 6 раз превышающих таковые для случая ДБК. Коэффициент $k_{\text{мод}}/k_{\text{гидр}}$ существенно зависит от рН. Скорость реакции гидролиза ДБК минимальна при значениях рН 7,0, а скорость реакции разложения реакционноспособных групп триазинового поликонденсата ДБК уменьшается с повышением рН до 10,5. Энергия активации реакций гидролиза и разложения одинакова для обоих веществ и изменяется в зависимости от рН в пределах 40-70 кДж/моль.

В среде диоксан - боратный буфер скорость разложения триазинового поликонденсата ДБК максимальна при концентрации диоксана 10 %, а скорость модифицирования аминогрупп с его помощью линейно увеличивается с повышением концентрации диоксана. Соотношение кинетических констант $k_{\text{мод}}/k_{\text{гидр}}$ уменьшается при добавлении диоксана и постепенно повышается с увеличением концентрации диоксана.

Л и т е р а т у р а

1. З а й ц е в а Е.Л., Я к у б о в и ч А.Я.,
Б р а з Г.И. и др. Об эфирах бисиминоадипиновой и -терефталевой кислот // ЖОХ. 1964. Т. 3. Вып. II. С. 3709-3713.

2. The Aldrich Library of Infrared Spectra / Ed. by Ch. J. Pouchert. Aldrich Chemical Company, 1970. 1203 p.

3. К я э р д А.Я., Т а м м е р а й д И.И. Модификация белковых веществ иминоэфирами. II. Математическая модель кинетики процесса // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1985. № 598. С. 67-76.

4. К ä ä r d A., K ö s t n e r A., S i i m e r E. A kinetic study of the reaction between diethyl ester of bisimino-adipic acid and beta-alanine by the thermochemical method // Science Tools. 1986. Vol. 33, N. 2. P. 24-27.

5. К я э р д А.Я., С и й м е р Э.Х. Модификация белковых веществ иминоэфирами. Сообщение III. Микрокалориметрическое исследование кинетики реакции гидролиза иминоэфиров // Тр. Таллинск. политехн. ин-та. 1986. № 622. С. 47-53.

6. В р е м с е r W., E r n s t L., F r a n k e B. et al. Carbon-13 NMR spectral data. Weinheim, 1981. 891 p.

7. З а й ц е в а Е.Л., Б р а з Г.И., Я к у б о - в и ч А.Я. и др. Синтез смешанных 2,4,6-триалкил-1,3,5-триазинов и полимерных триазиновых соединений и иминоэфиров // ЖВХО им. Менделеева. 1962. Т. 8. Вып. 2. С. 232-233.

8. К я э р д А.Я., К ё с т н е р А.И., С и й м е р Э.Х. Модификация лизина дигидрохлоридом диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты // ЖОХ. 1987. Т. 23. Вып. 8. С. 1671-1678.

Production of Bisiminoadipic Acid Ester
Polycondensates for Modifying Primary Aminogroups

Abstract

A method for synthesizing the 1,3,5-triazine polycondensate of DEA (diethyl ester of bisiminoadipic acid) has been elaborated. Reaction kinetics and reaction possibilities for obtaining the polyfunctional modifier in water and water-dioxane solutions have been observed.

In water solution the modification of primary aminogroups of model compounds with DEA 1,3,5-triazine polycondensate enabled to get up to 6 times higher $k_{\text{mod}}/k_{\text{hydr}}$ values than in case of DEA only. The coefficient $k_{\text{mod}}/k_{\text{hydr}}$ essentially depended on pH. The DEA hydrolysis reaction rate has been minimized by the pH value of 7.00, but the decomposition reaction rate of the DEA triazine polycondensate decreased, by rising pH value up to 10.5. Activation energies of hydrolysis and decomposition reactions were equal for both compounds and, depending on pH values (7.00-10.0), varied from 40 up to 70 kJ/mole.

In dioxane-borate buffer solution the decomposition reaction rate of DEA triazine polycondensate was maximum when the dioxane concentration was 10 %, but the modification rate of aminogroups in the presence of dioxane increased linearly by raising its concentration.

The correlation of kinetics constants $k_{\text{mod}}/k_{\text{hydr}}$ decreased by adding dioxane and increased gradually while raising the dioxane concentration.

Diiminoestrite polükondensaatide saamine primaarsete aminorühmade modifitseerimiseks

Kokkuvõte

Täiustati DEA (diiminoadipiinhappe dietülester) 1,3,5-triasiinse polükondensaadi saamise meetodit. Uuriti saadud polüfunktsionaalse modifikaatori reaktsioonivõimet vee- ja mittevsesikeskkonnas.

Veekeskkonnas saavutatakse primaarsete aminorühmade modifitseerimisel DEA polükondensaadiga 6 korda suurem kineetiliste konstantide suhe ($k_{\text{mod}}/k_{\text{hüdr}}$) kui DEA-ga modifitseerimisel. Koefitsient $k_{\text{mod}}/k_{\text{hüdr}}$ sõltub oluliselt pH-st. DEA hüdroolüüsi reaktsioonikiirus on minimaalne pH väärtusel 7,0, aga DEA triasiinse polükondensaadi reaktsioonivõimeliste rühmade lagunemise reaktsioonikiirus väheneb pH tõusuga (pH kuni 10,5). Hüdroolüüsi- ja lagunemisreaktsiooni aktivatsioonienegiad on mõlemal ainel ühesuguses suurusjärgus ja muutuvad olenevalt pH-st (7,0 - 10,0) 40-70 kJ/mol.

Dioksaani ja boraatpuhvri lahuses on DEA triasiinse polükondensaadi lagunemise reaktsioonikiirus maksimaalne. 10 % dioksaanilisandi juuresolekul, aminorühmade modifitseerimiskiirus sünteesitud modifikaatoriga aga suureneb lineaarselt dioksaani kontsentratsiooni tõustes. Kineetiliste konstantide suhe $k_{\text{mod}}/k_{\text{hüdr}}$ väheneb boraatpuhvri dioksaani lisamisel ja suureneb järkjärgult dioksaani kontsentratsiooni tõstmisel.

ВЫДЕЛЕНИЕ АДЕНОЗИНФОСФАТОВ ПУТЕМ ОСАЖДЕНИЯ

Важнейшие направления современной биотехнологии связаны с синтезом и модификацией нуклеиновых кислот. Для практического решения названных работ требуются мономерные нуклеозидфосфаты, в частности, нуклеозиддифосфаты и - трифосфаты.

Такие соединения, как аденозинтрифосфаты, могут быть применены в лекарственных и косметических препаратах. В связи с этим необходимо обеспечить научно-исследовательские институты и учреждения, которые работают в области биотехнологии, необходимым количеством высококачественных нуклеозидфосфатов. Следовательно, с расширением применения нуклеозидфосфатов целесообразно усовершенствовать методы их препаративного получения.

Материалы и методы

Для препаративного получения АТФ (аденозин-5'-трифосфат) применяли иммобилизованные в альгинатный гель пивные дрожжи. Для иммобилизации пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Сакусского пивозавода применялся метод включения клеток в альгинатный гель [1].

Процесс биофосфорилирования проводили по выработанной методике [2] с некоторыми модификациями, а именно - в отсутствие толуола, уксусной и щавелевой кислот. Эти вещества оказывают разрушающее воздействие на иммобилизованные клетки.

Для проведения препаративного разделения аденозинфосфатов в форме натриевых солей использовалась колонка фирмы "Pharmacia Biotechnology", Швеция, объемом 600 мл, которая

была соединена с проточной кюветой спектрофотометра "Spectord UV VIS" ("Carl Zeiss", ГДР). За ходом хроматографического разделения наблюдали при длине волны 254 нм. На анионите АРА - 5п разделили аденозинфосфаты по выработанной методике [2].

Выделенные аденозинфосфаты идентифицировали при помощи ЖХВД ("Du Pont", США) на колонке с обращенной фазой. Заранее определяли время выхода аденозина и соответствующих моно-, ди- и трифосфатов (препараты "Reanal", Венгрия).

Использованы химические реактивы, анионит АРА - 5п и катионит КУ-2-8 со степенью чистоты "чистый".

Результаты и обсуждение

Процесс биофосфорилирования проводился в растворе следующего состава:

Т а б л и ц а I

Состав среды биофосфорилирования

Вещество	Количество ^х , г
Аденозин	5,00
Калий хлористый	0,36
Магний хлористый	0,36
Сахароза	16,6
Фосфат натрия	10,0
Дрожжи (иммобилизованные)	50,0
Вода	250

^х Расход материалов для синтеза 1 г АТФ.

Процесс биофосфорилирования проводился по общепринятой методике. Перемешивание проводили барботированным воздухом. Процесс прекращали после стабилизации pH (приблизительно через 1,5-2 часа). Имобилизованные дрожжи отфильтровывали и аденозинфосфаты осаждали из реакционной смеси добавлением ацетата бария. Бариевую соль аденозинфосфатов переводили в натриевую форму обработкой сульфокатионитом КУ-2-8 в натриевой форме. За ходом реакции наблюдали по

поглощению (при 254 нм) фильтрата реакционной смеси (см. рис. I).

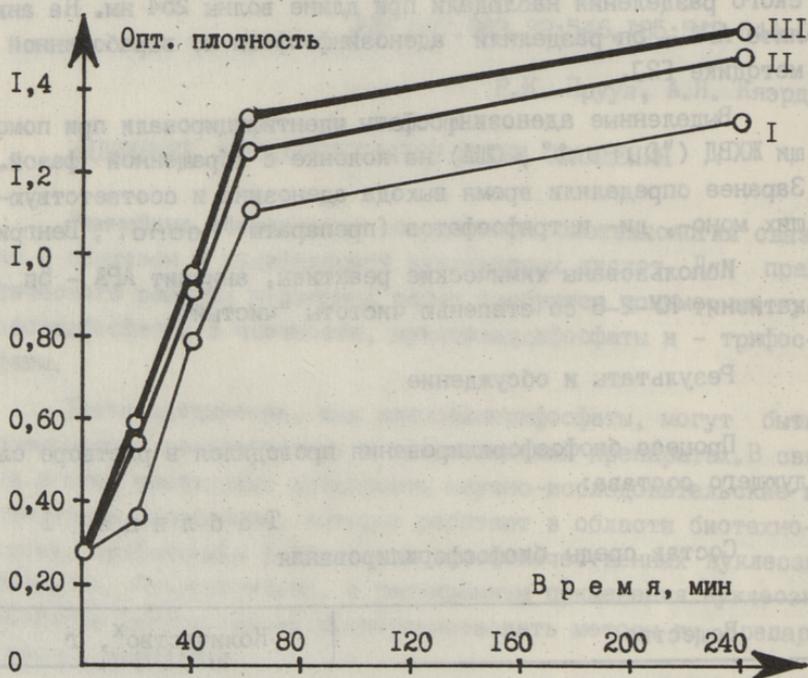


Рис. 1. Зависимость оптической плотности аденозинфосфатов от времени. Содержание катионита КУ-2-8 на 1 г смеси бариевых солей аденозинфосфатов I - 0,5 г; II - 1,5 г и III - 2,5 г.

Видно, что процесс перекатионирования протекает довольно быстро. При этом наблюдается полное растворение бариевых солей аденозинфосфатов. Суспензию бариевых солей аденозинфосфатов в дистиллированной воде контактировали с отдельными навесками натриевого катионита. Показано (см. рис. I), что для перевода в форму растворимых солей 1 г бариевых солей аденозинфосфатов требуется 2 г катионита КУ-2-8 в натриевой форме. При этом аденозинфосфаты практически не адсорбируются катионитом и выход по азотистому основанию составляет свыше 95%. Катионит в бариевой форме может быть легко регенерирован. При этом важно отметить, что при обработке реакционной смеси бариевых солей аденозинфосфатов катионитом в натриевой форме выделяется эквивалентное ко-

личество ионов натрия, то есть реакционная смесь не загрязняется избытком солей.

Разница в растворимости отдельных аденозинфосфатов не столь большая, чтобы выделить соединения с разной степенью фосфорилирования в чистом виде. Метод осаждения аденозинфосфатов в виде бариевых солей может быть рекомендован для выделения аденозинфосфатов из реакционной смеси и последующего их разделения хроматографическими методами.

Аденозинфосфаты в натриевой форме разделяли на анионите АРА - 5 п (Cl^- форма). Путем ступенчатого элюирования растворами 0,03 н LiCl в 0,01 н HCl разделяли моно- и дифосфаты и 0,6 н LiCl в 0,01 н HCl разделяли АТФ. АТФ из элюата выделяли с помощью этилового спирта.

При биофосфорилировании 5 г аденозина получали 0,9-1,2 г АТФ следующими выходами на разных этапах процесса (см. табл. 2):

Т а б л и ц а 2

Выход продукта АТФ на разных этапах процесса

Э т а п	Выход, %
Биофосфорилирование аденозина	67
Осаждение аденозинфосфатов ацетатом бария	56
Разделение смеси натриевых солей аденозинфосфатов на анионите АРА-5п	62
Осаждение АТФ из элюата этиловым спиртом	91
Содержание основного вещества АТФ в литиевой форме	96

Проведение биофосфорилирования иммобилизованными клетками, осаждение основного продукта и последующее разделение на ионите требует дальнейшего изучения для повышения продуктивности процесса.

Л и т е р а т у р а

1. F l i n k J., J o h a n s e n H. A novel method for immobilization of yeast cells in alginate gels of various shapes by internal liberation of Ca-ions // Biotechnol. Lett. 1985. Vol. 7, N 10. P. 765-768.

2. Разработать и освоить технологию производства нуклеозидфосфатов: Отчет / Таллинск. политехн. ин-та; Рук. А. Кэстнер. № ГР 01870012574; Инв. № 01870021505. Таллин, 1986. 69 с.

R. Pruul, A. Kaard

Separation of Adenosinephosphates
by Precipitation

Abstract

The mixture of adenosinephosphates has been obtained by the method of biophosphate adenosine and it has been settled from the reaction mixture in the form of barium salts. The recationation of barium salts of adenosinephosphates into natrium salts has been carried out with cationite KU-2-8.

The mixture of natrium salts of adenosinephosphates has been separated by means of anionite ARA-5p (Cl⁻form) with stepped elution by LiCl and HCl. 0.9-1.2 grammes of adenosine-5'-triphosphate has been obtained by biophosphorating 5 grammes of adenosine.

R. Pruul, A. Kaard

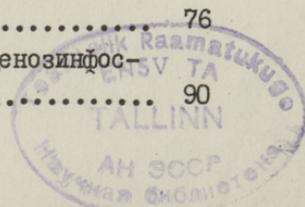
Adenosiinfosfaatide eraldamine sadestamise teel

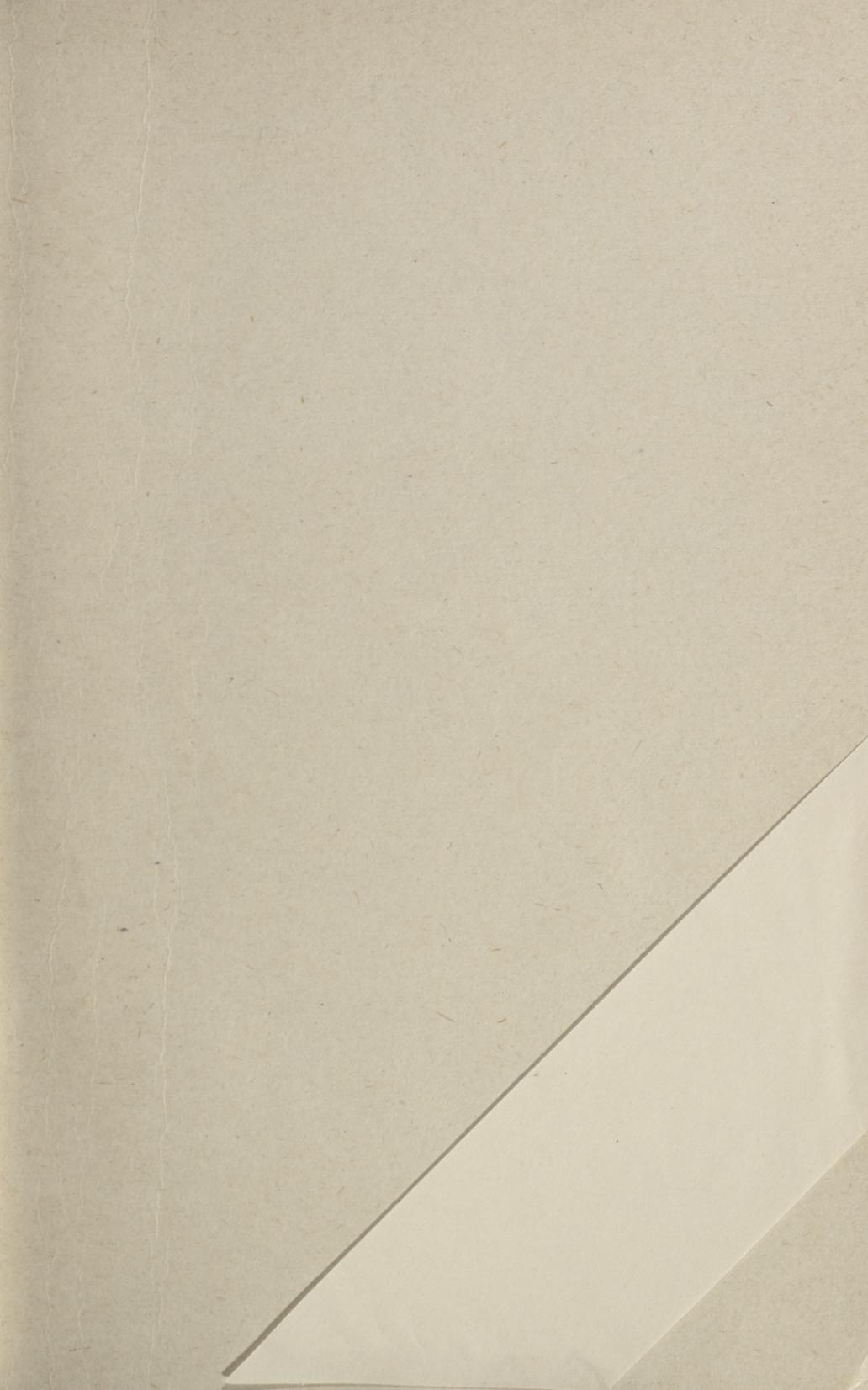
Kokkuvõte

Adenosiini biofosforüleerimisel saadi adenosiinfosfaatide segu. Antud reaktsioonisegust sadestati adenosiinfosfaadid baariumi sooladena. Adenosiinfosfaatide baariumi soolad kationeeriti kationiidi KU-2-8 abil ümber naatriumi sooladeks. Saadud adenosiinfosfaatide naatriumi soolad lahutati anioniidil ARA-5p (Cl⁻vorm) astmelise elueerimise teel erinevate kontsentratsioonidega LiCl ja HCl lahustega. 5 g adenosiini biofosforüleerimisel ja edasisel puhastamisel saadi 96 %-lise põhiaine sisaldusega adenosiin-5-trifosfaati 0,9-1,2 g.

С о д е р ж а н и е

1.	А.И. Кёстнер. Целевая функция при биокаталитическом получении циклодекстринов.....	3
2.	Б.И. Ческис, Г.Б. Шебека, А.Б. Паулконис, А.И. Кёстнер. Характеристика иммобилизованной лизинамидазы.....	12
3.	Н.В. Архангельская, А.К. Абдвахитова. Иммобилизация растительных клеток. I. Метод определения метаболической активности свободных и связанных клеток.....	21
4.	Н.В. Архангельская. Иммобилизация растительных клеток. II. Сравнительное изучение различных методов иммобилизации	33
5.	Э.Х.Сиймер, К.Э. Пашель, М.А. Курвйтс. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение XI. Кинетика реакторов при ферментативном гидролизе лактозы в сыворотке молока и продуктах ее переработки.....	42
6.	М.К. Фриеденталь, Т.Я. Аллмере. Очистка и характеристика действия телячьего химозина при гидролизе синтетического субстрата.....	51
7.	Р.А. Вокк, Э.М. Пейпман. Характеристика ферментного комплекса <i>Bacillus Macerans</i> и применение его при получении циклодекстринов. IV. Биосинтез циклодекстринглюканотрансферазы различными штаммами <i>Bacillus Macerans</i>	58
8.	Р.А. Вокк, Э.М. Пейпман, В.А. Кросинг. Характеристика ферментного комплекса <i>Bacillus Macerans</i> и применение его при получении циклодекстринов. V. Применение ферментного препарата циклодекстринглюканотрансферазы для получения β -циклодекстрина.....	66
9.	А.Я. Кяэрд, Т.К. Вялимяэ. Получение поликонденсатов диминоэфиров для модификации первичных аминогрупп.....	76
10.	Р.К. Пруул, А.Я. Кяэрд. Выделение аденозинфосфатов путем осаждения.....	90





Цена 1.- руб.