

Максимальный выход циннаборина наблюдается к 142-му часу культивирования продуцента на неохмеленном пивном сусле при pH 5,6-5,8 и температуре 26-28°C.

Целью настоящей работы явилось изучение структуры и свойств циннаборина.

Методом колоночной гель-хроматографии на Тоуреаг! HW-50 было установлено, что циннаборин имеет молекулярную массу около 15 кДа. Полимер имеет суммарный отрицательный заряд, вследствие чего связывается с DEAE-целлюлозой и снимается с нее 0,75М KCl.

В электронных спектрах поглощения циннаборина имеются 2 максимума при 264 и 306 нм, интенсивность которых разнонаправленно изменяется с изменением pH. При этом наблюдается изобестическая точка при 283 нм, свидетельствующая о взаимопревращениях двух форм препарата. По кривой спектрофотометрического титрования рассчитали значения pK, равные 6,1 и 9,25 для функциональных групп хромофора, диссоциация которых приводит к спектральным изменениям. После проведения кислотного гидролиза циннаборина и последующей нейтрализации раствора в электронном спектре поглощения оба максимума при 264 и 306 нм пропадают и появляется новый максимум при 280 нм.

Полученные результаты позволяют предполагать, что в качестве хромофорной группы в молекуле циннаборина выступает 4,7-диоксикумариновый фрагмент. Известно [1], что для 4-ОН pK=5,9, а для 7-ОН pK=9,22, что очень близко к полученным нами значениям.

Кислотный гидролиз кумаринов проходит с разрывом лактонного кольца, в результате чего образуется замещенная ароматическая структура, для которой и характерно поглощение в области 280 нм.

Хроматографический анализ гидролизата циннаборина показал наличие в его структуре глюкозы и маннозы, причем глюкоза является основным компонентом полисахарида.

Было также обнаружено слабое взаимодействие циннаборина с реактивом Фолина-Чикольте, характерное для ароматических аминокислот полипептидов, однако, в данном случае, вероятно, нельзя исключить участия в реакции хромофорной группы. В связи с этим, вопрос о том, является ли скелет циннаборина истинным полисахаридом или гликопротеином, остается открытым.

Исходя из среднего значения коэффициента молярной экстинкции для замещенных оксикумаринов ( $\epsilon=71000$ ), рассчитали, что одна хромофорная группа приходится на 20-40 моносахаридных звеньев циннаборина.

Одним из характерных свойств противоопухолевых лактонов является ингибирование сульфгидрильных ферментов [2]. Ингибиторный анализ показал, что циннаборин обратимо ингибирует активность алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1) по смешанному типу с константой  $K_i=2 \cdot 10^{-6}$ М.

Таким образом, ингибирование активности сульфгидрильных ферментов оксикумариновым фрагментом циннаборина может быть одним из возможных механизмов противоопухолевой активности препарата.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Перельсон М.Е., Шейнкер Ю.Н., Савина А.А. Спектры и строение кумаринов, хромонов и ксантонов. - М.: Медицина, 1975. - 223 с.
2. Семенов А.А. Природные противоопухолевые соединения (структура и механизм действия). - Новосибирск: Наука, 1979. - 222 с.

УДК 577.157.2

## РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА - ТРИАЗА

**Леонтьев В.Н., Пленина Л.В., Хлюстов С.В., Цыманович С.Г., Горбачевский А.В., Максимова Р.А., Серебрякова Т.Н.**

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Предприятие диагностических и лекарственных препаратов «Диалек», Минск, РБ  
Московский государственный университет, Москва, Россия

Одним из приоритетных направлений современной биотехнологии является разработка методов получения новых лекарственных препаратов. Для нужд тромболитической терапии наиболее перспективным считается применение ферментных препаратов, получаемых микробиологическим синтезом.

Триаза - фибринолитический препарат широкого спектра действия. Он гидролизует фибрин, фибриноген, казеин, желатин, тромбин, синтетические эфиры аргинина [1]. В отличие от стрептокиназы и других аналогичных ферментных препаратов, триаза не ингибируется компонентами плазмы крови и, что самое главное, проявляет одновременно фибринолитическую и активаторную активность.

Продуцентом триазы является несовершенный сапрофитный гриб *Trichothecium roseum*. В естественных условиях продуцент встречается на различных растительных остатках (опавших листьях, плодах, орехах) как микопаразит или сапрофит. На плотных агаризованных средах *T.roseum* образует широкорастущие розовые колонии, окраска которых зависит от интенсивности развития розовых конидий [2]. Характерными особенностями *T.roseum* являются морфологическая и физиологическая изменчивость, что выражается в характере роста

колоний, окраске конидий, типе спороношения, интенсивности биосинтеза антибиотиков и фибринолитических ферментов. Авторы работы [3] предполагают, что эти явления обусловлены гетерокарионизмом. Они показали, что дикий штамм, обладающий наибольшей вариабельностью, отличается значительным содержанием разноядерных конидий. Высокая фибринолитическая активность отмечается у достаточно стабильных штаммов, имеющих микроконидиальное спороношение и полученных при воздействии химических мутагенов [4].

Для выращивания продуцента триазы культуру *T. roseum* пересеивали в пробирки со скошенным агаром Чапека и инкубировали при 25-26°C в течение 7-9 суток. После чего пробирки выставляли на дневной свет при комнатной температуре на 3-4 дня. При этом колонии приобретали розовую окраску. Полученный споровый материал из одной пробирки переносили методом смыва в 50 мл ферментационной среды и инкубировали на установке УВМТ 12-250 в условиях аэрации (240 мин<sup>-1</sup>) при 25-26°C в течение 96 ч.

В течение первых суток наблюдали интенсивный рост конидий, вторые сутки характеризовались развитием конидиосцев. Через 72 ч ферментации мицелий начинал лизироваться, а к 96-му часу лизис становился очень интенсивным, и наблюдались клетки с сильным жировым перерождением.

Биомассу отделяли центрифугированием при 6000 мин<sup>-1</sup> в течение 20 мин. Супернатант концентрировали в 3-4 раза на мембранном фильтре ПА-10. Полученный интенсивно окрашенный в коричневый цвет концентрат подвергали ионообменной хроматографии на колонке 1,2x10 см с QAE-сефадексом А-50, уравновешенной 0,05М К<sub>2</sub>Na-фосфатным буферным раствором (рН 6,8). Элюирование проводили сначала дистиллированной водой, затем К<sub>2</sub>NaРi-буферным раствором, а потом градиентом концентрации КСl (от 0 до 2М) в том же буферном растворе. В результате ионообменной хроматографии были получены прозрачные бесцветные фракции, а на старте колонки осталась зона с прочно связанным коричневым пигментом. Результаты определения активности полученных фракций представлены в табл.

Таблица

Активность полученных фракций

Время гидролиза, ч	Вид активности	Концентрат КЖ	Номера фракций					
			3	11	15	16	17	19
5	Общая	517	361	0	0	25	64	60
	Фибринолитическая	342	256	0	0	0	12	12
	Активаторная	175	105	0	0	25	52	48
	(% к общей)	33,8	29	0	0	100	81	80
12	Общая	1763	1120	0	0	56	225	163
	Фибринолитическая	1280	896	0	0	0	141	72
	Активаторная	483	224	0	0	56	84	91
	(% к общей)	27,3	20	0	0	100	37	56

Как видно из табл., основная активность сосредоточена в третьей фракции, которая не удерживалась QAE-сефадексом и элюировалась дистиллированной водой, вследствие чего для очистки может быть использована не колоночная, а batch-ионообменная хроматография. Обращает на себя внимание также наличие только активаторной активности во фракции 16, т.е. метод колоночной ионообменной хроматографии может быть применен для выделения чистого активатора плазминогена.

Анализ с помощью SDS-электрофореза в ПААГ показал более высокую чистоту фракции 3 и препарата, полученного ионообменной batch-хроматографией, по сравнению с препаратом, полученным традиционным способом переосаждения белка этанолом.

Таким образом, исследования показали, что метод ионообменной batch-хроматографии на QAE-сефадексе может быть применен для получения высокоочищенного препарата - триаза.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Г.В., Серебрякова Т.Н., Максимова Р.А. // Авт. свид-во № 564334, 1977.
2. Максимова Р.А., Шаркова Т.С., Хуратова Б.Г. // Гематология и трансфизиология. - 1983, № 7. - С.33-36.
3. Пальмова Н.П., Максимова Р.А. // Микробиология. - 1970, Т.39, вып.4.
4. Пальмова Н.П., Максимова Р.А. // Микология и фитопатология. - 1969, Т.3, вып.6. - С.499-501.