

5. Hammer P.E., Hill D.S., Lam S.T., van Pee K.-H., Ligon J.M.// *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. Vol.63. P.2147-2154.
6. Hohaus K., Altmann A., Burd W., Fischer I., Hammer P.E., Hill D.S., Ligon J.M., van Pee K.-H.// *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997. Vol.36. P.2012-2013.

УДК 577.152

ЭКСПРЕССИЯ НУКЛЕАЗ И ФОСФАТАЗ МИКРООРГАНИЗМАМИ ASPERGILLUS AWAMORI В ПРОЦЕССЕ ПРОМЫШЛЕННОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

Волкова И.В., Трухачева Т.В., Гриц Н.В., Босенко А.М.

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ
АО “Белмедпрепараты” (НФЦ), Минск, РБ

Культуру гриба *Aspergillus awamori* широко используют в качестве продуцента амилолитических ферментов, в частности, глюкоамилазы. В глубинных условиях культивирования оптимизированы составы питательных сред и другие параметры процесса, что позволяет получать культуральную жидкость (КЖ) с активностью по глюкоамилазе свыше 200 ед./мл [1]. В промышленных условиях при получении концентрированных форм ферментных препаратов и использовании при этом только осветленной КЖ имеется проблема эффективной утилизации образующейся биомассы. В связи с этим для практического использования представляют интерес биологически активные компоненты, накапливаемые внутри клетки в процессе культивирования продуцентов глюкоамилазы.

Цель настоящей работы - изучение динамики накопления нуклеаз и фосфатаз культурой гриба *Asp. awamori* в процессе промышленной ферментации.

В работе использовали штамм *Asp. awamori* 87, являющийся продуцентом глюкоамилазы. Для получения глюкоамилазы использовался глубинный способ культивирования продуцента на крахмалсодержащей среде в промышленном ферментаторе объемом 50 м³ при температуре 34-36 °С с механическим перемешиванием и аэрацией ферментационной среды. Процесс вели до выхода глюкоамилазной активности КЖ на постоянный уровень, что соответствует содержанию глюкозы в среде 3-5 г/л. Отбор КЖ для анализа осуществляли через каждые 24 часа, начиная с 40 часа от начала ферментации. Для определения нуклеазной и фосфатазной активности мицелий гриба отделяли фильтрованием, отмывали дистиллированной водой и 0,05 М ацетатным буфером, рН 5,0. Активность нуклеазы и фосфатазы определяли как в отмытой, так и в неотмытой биомассах при рН 5,0 и температуре 60 °С. Определение нуклеазной активности проводили методом спектрофотометрического анализа неосаждаемых этанолом продуктов гидролиза дрожжевой РНК [2]. Активность фосфатаз определяли по расщеплению п-нитрофенилфосфата (п-НФФ) [3].

Основные результаты исследований приведены в таблице.

Таблица.

Динамика накопления глюкоамилазы, нуклеазы и фосфатазы культурой гриба *Asp. awamori* в процессе ферментации

| Время культивирования, ч | Глюкоамилазная активность, ед./мл | Нуклеазная активность, ед./мг сухого мицелия | | Фосфатазная активность, ед./мг сухого мицелия | |
|--------------------------|-----------------------------------|--|------------|---|------------|
| | | отмытого | неотмытого | отмытого | неотмытого |
| 40 | 40 | 11 | 9 | 11 | 10 |
| 60 | 120 | 82 | 47 | 14 | 12 |
| 80 | 150 | 197 | 149 | 15 | 14 |
| 110 | 210 | 158 | 139 | 24 | 22 |
| 120 | 215 | 211 | 172 | 32 | 29 |

В процессе ферментации содержание глюкоамилазы в КЖ постоянно возрастает, и к концу ферментации глюкоамилазная активность достигает в среднем 210-215 ед./мл. Одновременно в биомассе накапливаются РНК-гидролизующие ферменты. В ходе ферментации максимум активности нуклеаз наблюдается через 80-100 часов от начала ферментации. В этот период активность нуклеаз в биомассе достигает 180-200 ед./мг сухого мицелия. Далее величина активности несколько снижается. К концу ферментации уровень активности вновь повышается. Удельная активность фосфатаз в процессе ферментации постепенно возрастает и к окончанию культивирования достигает 25-30 ед./мг сухого мицелия. Динамика накопления ферментов в отмытой и неотмытой биомассе имеет аналогичный характер, но уровень экспрессии ферментов в отмытой биомассе несколько выше.

Наблюдаемый нами двухфазный характер накопления РНК-гидролизующих ферментов уже был описан в литературе при изучении динамики накопления РНК-деполимераз в процессе роста культуры *Asp. clavatus desm.* [4]. Авторы высказывают предположение, что наличие нескольких максимумов РНК-азной активности связано с синтезом нескольких РНК-деполимераз.

Сведений о накоплении внутриклеточных фосфатаз в литературе имеется немного. Описанный продуцент внутриклеточных РНК-гидролизующих ферментов *Spicaria violacea* [5] накапливает нуклеазы примерно в таком же количестве, как и гриб *Asp. awamori* 87, а фосфатазы - на несколько более высоком уровне. В целом полученные результаты позволяют рассматривать биомассу штамма *Asp. awamori* 87, получаемую в процессах биосинтеза глюкоамилазы в промышленных условиях, в качестве весьма перспективного для практического использования источника нуклеаз и фосфатаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов. - М.: Агропромиздат, 1987. - 335 с.
2. Абросимова-Амельянчик Н.М., Артамонова О.И. // Прикладная биохимия и микробиология. - 1974, Т. 10, вып. 3. - С. 420-431.
3. Безбородова С.И., Ильина Т.В. // Микробиология. - 1970, Т. 39, № 5. - С. 741-747.
4. Биосинтез микроорганизмами нуклеаз и протеаз. - М.: Наука, 1979. - 294 с.
5. Способ получения нуклеозидов: А.с. 1321065 А СССР, МКИ С 12 Р 19/40.

НЕКОТОРЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РАСШИРЕНИЯ СЫРЬЕВОЙ БАЗЫ ПРОИЗВОДСТВА ВОЛОКНИСТЫХ И ПЛЕНОЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Б.Э.Геллер

Могилевский технологический институт

В 1997 г. мировое производство синтетических волокнистых материалов превысило 23 млн. т, а натуральных - 17 млн.т. Примерно в два раза большим был объем производства пленочных материалов, в том числе и бумаги. Для полного перспективного удовлетворения потребностей всех отраслей промышленного и сельскохозяйственного производства годовой объем их производства должен быть по меньшей мере выше в 4 раза. Увеличение объемов производства и переработки полимерного сырья, а так же необходимой для этого энергии в обычных технологических вариантах обуславливает интенсификацию накопления CO₂ в атмосфере Земли и, как следствие, усиление "парникового эффекта". Одним из путей преодоления таких последствий антропогенной деятельности является производство энергии на базе "водородных технологий", в том числе при реализации технологии Hydrocarb, предложенной Стейнбергом [1].

Схема процесса Hydrocarb, называемого так же биориформингом, включает стадии эффективного расщепления углеродсодержащих материалов - органического топлива и биомассы-на обогащенную водородом газообразную фракцию и пироуглерод, подлежащий последующему захоронению. Сопряжение биотехнологических процессов получения ряда пленко- и волокнообразующих полимеров целлюлозы, фиброина, линейных полиэфиров с биориформингом позволяет:

- создать дополнительные ресурсы полимерного сырья;
- получить биомассу как компонент энергетического сырья;
- сократить использование ископаемого органического сырья на производство энергии;
- замедлить темпы уничтожения лесов.

Важным обстоятельством, связанным с применением биотехнологически синтезируемых полимеров, является их способность к регулируемой биодеградация [2].

"Бактериальная" целлюлоза.

Известно, что бактериальные культуры *Acetobacter: A. xylinum, acetigenum, pasteurinum, rancens* и некоторые другие способны образовывать целлюлозные мембраны на питательных средах, содержащих D-глюкозу. Синтез целлюлозы реализуется в присутствии целлюлазы, играющей роль как полимеразы, так и деполимеразы. Информация о строении участков ДНК, обуславливающих ее синтез, в настоящее время недостаточна для строгого описания процесса биосинтеза этого фермента. Целлюлаза обычно фиксируется в клеточной стенке. Переносчиком молекул D-глюкозы к синтезируемой цепи являются дифосфаты нуклеозидов уридина, гуанозина или, реже, аденозина. Стереоспецифический гетерофазный синтез целлюлозы облегчается тем, что гидролиз гликозидной связи глюкозы и фосфорнокислотного остатка нуклеозида, транспортирующего ее к поверхности фермента, сопровождается значительным уменьшением свободной энергии процесса.

"Бактериальные" полиэфиры [3].

Более 20 лет назад была установлена возможность бактериального синтеза оптически активных полимеров D-(-)-3-гидроксимасляной кислоты. При этом в цитоплазме бактерий *Alcaligenes entrophus* наблюдалось накопление гранул поли(3-гидроксibuтирата)-[P(3НВ)]. При вариировании питательных сред бактериальные культуры *Alcaligenes entrophus, A. latus*, а так же *Pseudomonas oleovorans* способны синтезировать как полимеры, так и сополимеры гидроксикислот с C1 до C8, характеризующиеся Tпл от 40 до 250оС и Mw>105. Возможен мик-