

редается для полной очистки на биологические очистные сооружения ПО «Химволокно».

ЛИТЕРАТУРА

1. Лурье Ю.Ю., Рыбникова А.И. Химический анализ производственных сточных вод. М.: Химия. - 1974.
2. Емельянова И.З. Химико-технологический контроль гидролизных производств. М.: Лесн.пром-ть. - 1976.
3. Яковлев С.В. и др. Очистка производственных сточных вод. М.: Стройиздат. - 1985.
4. Репин Б.Н. Современные технологии анаэробной обработки производственных сточных вод // Водоснабжение и санитарная техника. - 1995. - № 5. - С.27-29.
5. Корольков И.И., Лихонос Е.Ф. и др. Определение количества лигногуминовых веществ в гидролизатах // Гидролизная и лесохимическая промышленность. - 1967. - № 1. - С. 12-15.

УДК 543.544:577.123.2

И. В. Волкова, аспирант;
Т. В. Трухачева, нач. лаб. АО
«Белмедпрепараты»;
Н. В. Гриц, доцент;
В.Н. Леонтьев, доцент;
Р. Я. Мельникова, ст.н.сотр.;
В. Г. Лугин, мл.н.сотр.

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ НУКЛЕОЗИДОВ

The method of chemical hydrolysis of RNA from yeast cells with following enzymatic ribonucleotides dephosphorilation has been made. Liquid chromatography (HPLC) were used for analysis of degree process carried out.

Характерной чертой фармацевтической промышленности Республики Беларусь является сильная зависимость предприятий отрасли от закупок субстанций за рубежом. Из местных источников для приготовления готовых лекарственных средств используется только сырье растительного и животного происхождения, а также некоторые целевые метаболиты, получаемые путем микробиологического синтеза (антибиотики, ферменты, витамины и аминокислоты). Поэтому поиск

новых источников сырья для фармацевтической промышленности РБ является весьма актуальной задачей.

Известно, что для синтеза ценных лекарственных препаратов могут служить нуклеозиды (аденозин, гуанозин, цитидин и уридин), которые, в свою очередь, могут быть получены из дрожжевой РНК [1].

Однако до настоящего времени в РБ отсутствует технология получения нуклеозидов. В связи с этим целью настоящей работы явилась разработка химико-ферментативного метода получения нуклеозидов из дрожжевой РНК.

На первой стадии необходимо гидролизовать фосфодиэфирные связи РНК. Для этих целей наиболее приемлемым может выступать щелочной гидролиз в присутствии ионов Ca^{2+} , стабилизирующих структуру образующихся нуклеотидов. Гидролизат должен представлять собой сложную многокомпонентную смесь, состоящую из нуклеотидов (нуклеозид-5'-монофосфатов, нуклеозид-3'-монофосфатов, нуклеозид-2'-монофосфатов) в качестве основных компонентов, незначительных количеств дифосфатов этих же нуклеозидов (вследствие миграции фосфатных групп), свободных нуклеозидов, а также олигонуклеотидов (продуктов частичного гидролиза).

Второй стадией может служить ферментативное дефосфорилирование нуклеотидов до соответствующих нуклеозидов под действием микробных фосфатаз. Причем дефосфорилирование можно осуществлять непосредственно в полученной на первой стадии многокомпонентной смеси без дополнительной стадии выделения нуклеотидов. Необходимо только изменить рН гидролизата до оптимального для протекания ферментативной реакции значения.

Прежде, чем приступить к разработке химико-ферментативного метода гидролиза, необходимо было выбрать и отработать метод контроля изменения состава гидролизата. Наиболее перспективным и современным, для вышеуказанных целей, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В данной работе для качественного и количественного определения состава смесей нуклеотидов и нуклеозидов использовался жидкостный хроматограф "Shimadzu LC-10", оснащенный колонкой 4x250 мм с обращенно-фазовым сорбентом NUCLEOSIL 100-5, C18.

Для оптимизации условий хроматографирования (состав элюента и скорость элюирования) использовали искусственные смеси рибонуклеозидов, рибонуклеозид-2'-, рибонуклеозид-3'- и рибонуклеозид-5'-моно-, ди- и трифосфатов. Наивысшая селективность хроматогра-

фического процесса была достигнута при использовании в качестве элюента системы следующего состава: 0,05М дигидрофосфат калия, 0,025М тетрабутиламмония гидроксид с 10% метанола, доведенной до рН=5,0 ортофосфорной кислотой. Скорость элюирования - 0,5 мл/мин в течение первых 18 минут и 0,75 мл/мин до конца анализа. Время анализа составляло 60 минут.

На рис.1 представлены хроматограммы, отражающие полноту гидролиза дрожжевой РНК гидроксидом кальция. К суспензии РНК в дистиллированной воде добавляли $\text{Ca}(\text{OH})_2$ до рН=12. Полученную суспензию инкубировали при температуре 85 °С.

Как видно из представленного рисунка, через 50 минут достигается практически полный гидролиз РНК (по расчетам, 98 - 100% РНК гидролизировано).

Для идентификации пиков на хроматограммах использовали метод присадок. Таким образом, нам удалось идентифицировать практически все основные хроматографические пики на хроматограмме гидролизата и определить их относительные количества (рис.2). При этом было установлено, что в гидролизате присутствуют как нуклеотиды, так и нуклеозиды, однако количество последних существенно ниже.

Увеличение времени или температуры щелочного гидролиза не приводит к получению чистых нуклеозидов вследствие увеличения вклада побочных реакций. Поэтому для дефосфорилирования нуклеотидов использовали ферментативную реакцию. Ранее было установлено [2], что мицелий гриба *Trichoderma reesei* обладает сравнительно высокой фосфатазной активностью и может быть использован для фосфорилирования нуклеотидов.

Для проведения дефосфорилирования гидролизат подкисляли ортофосфорной кислотой до рН=5,0, вносили в него мицелий гриба *Trichoderma reesei* и инкубировали полученную суспензию при 45 – 50 °С с перемешиванием. Периодически из реакционной среды отбирали аликвоты, центрифугировали (для осаждения мицелия) 15 минут при 8000 g. и полученные супернатанты анализировали на хроматографе.

Динамика изменения состава гидролизата в результате дефосфорилирования нуклеотидов представлена на рис.3. Для количественного определения степени дефосфорилирования и содержания основных нуклеозидов провели калибровку колонки искусственной смесью нуклеозидов с известными, строго определенными концентрациями. Хроматограмма искусственной смеси нуклеозидов представлена на рис.4.

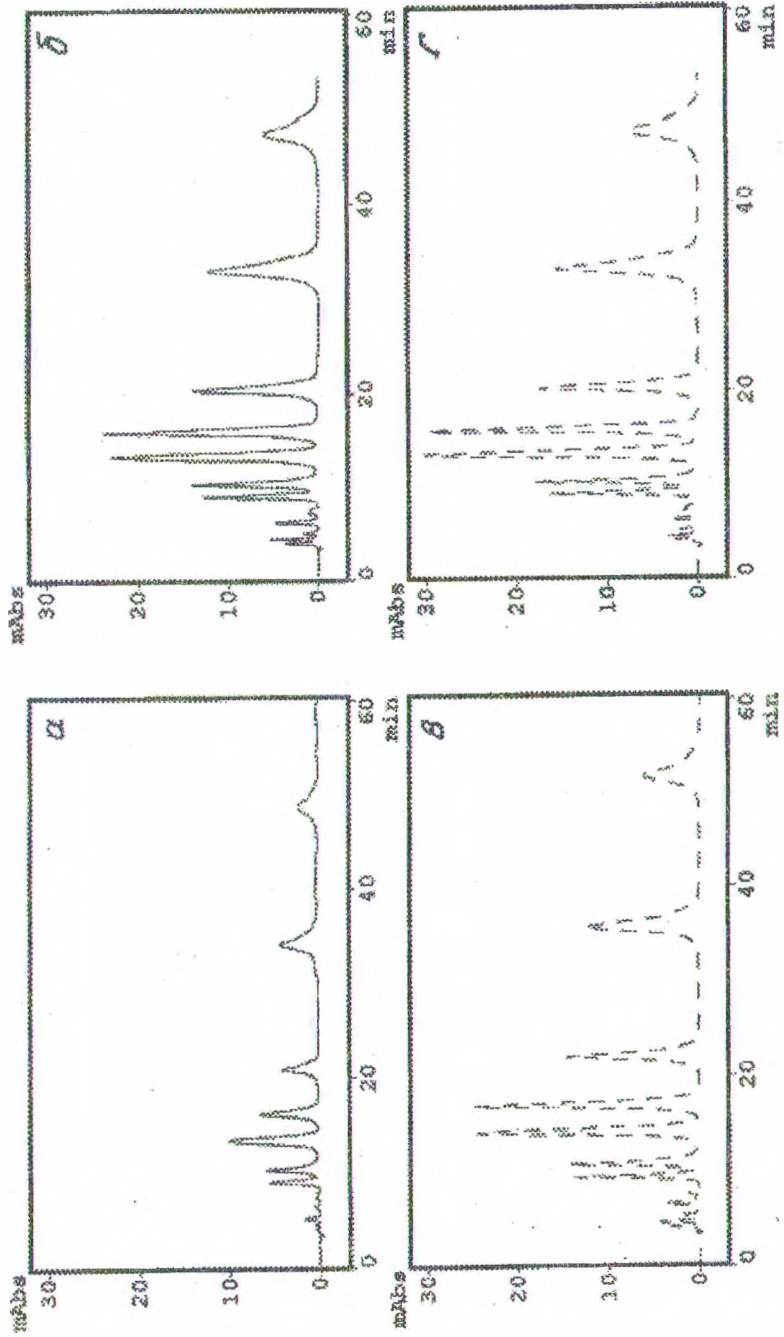


Рис. 1. Хромотограммы, отражающие полноту химического (щелочного) гидролиза дрожжевой РНК. Время гидролиза: а — 10 мин, б — 20 мин, в — 40 мин, г — 50 мин

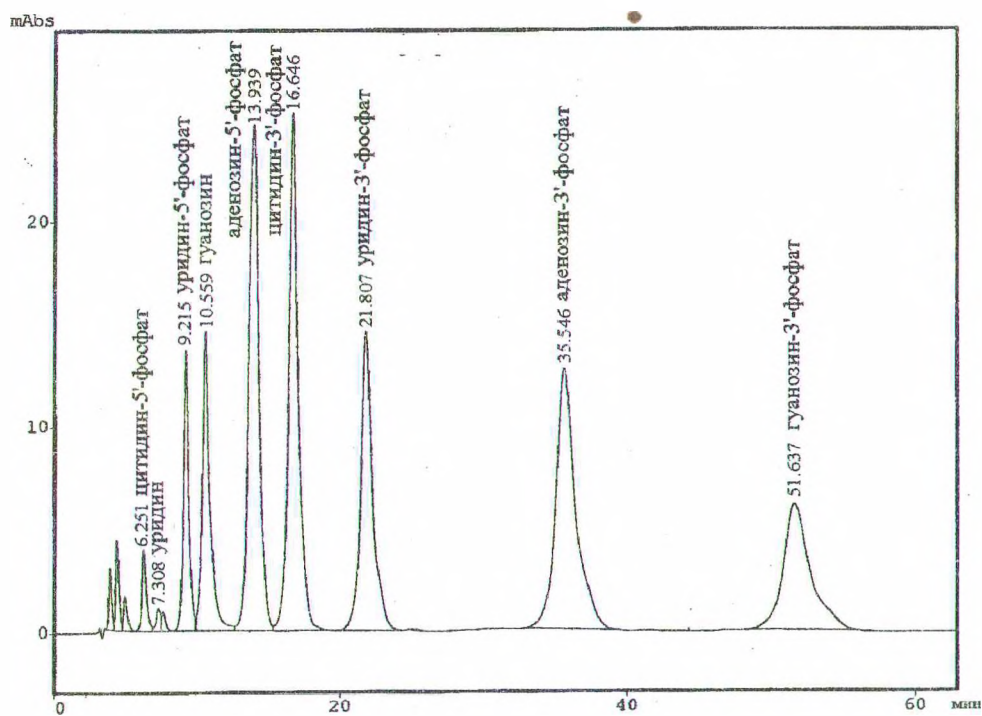


Рис. 2. Хроматограмма гидролизата с идентифицированными основными хроматографическими пиками

На основании хроматограмм, представленных на рис.3 и 4, рассчитали количественные изменения содержания основных рибонуклеозидов в ходе дефосфорилирования рибонуклеотидов под действием фосфатаз, продуцируемых мицелием гриба *Trichoderma reesei*. Результаты расчетов представлены в таблице.

Из таблицы видно, что за 6 часов ферментации происходит практически полное превращение нуклеотидов в нуклеозиды (выход ~99 % от теоретически возможного). Причем в основном дефосфорилирование протекает за первый час, в особенности это касается производных цитидина и уридина (рис.3).

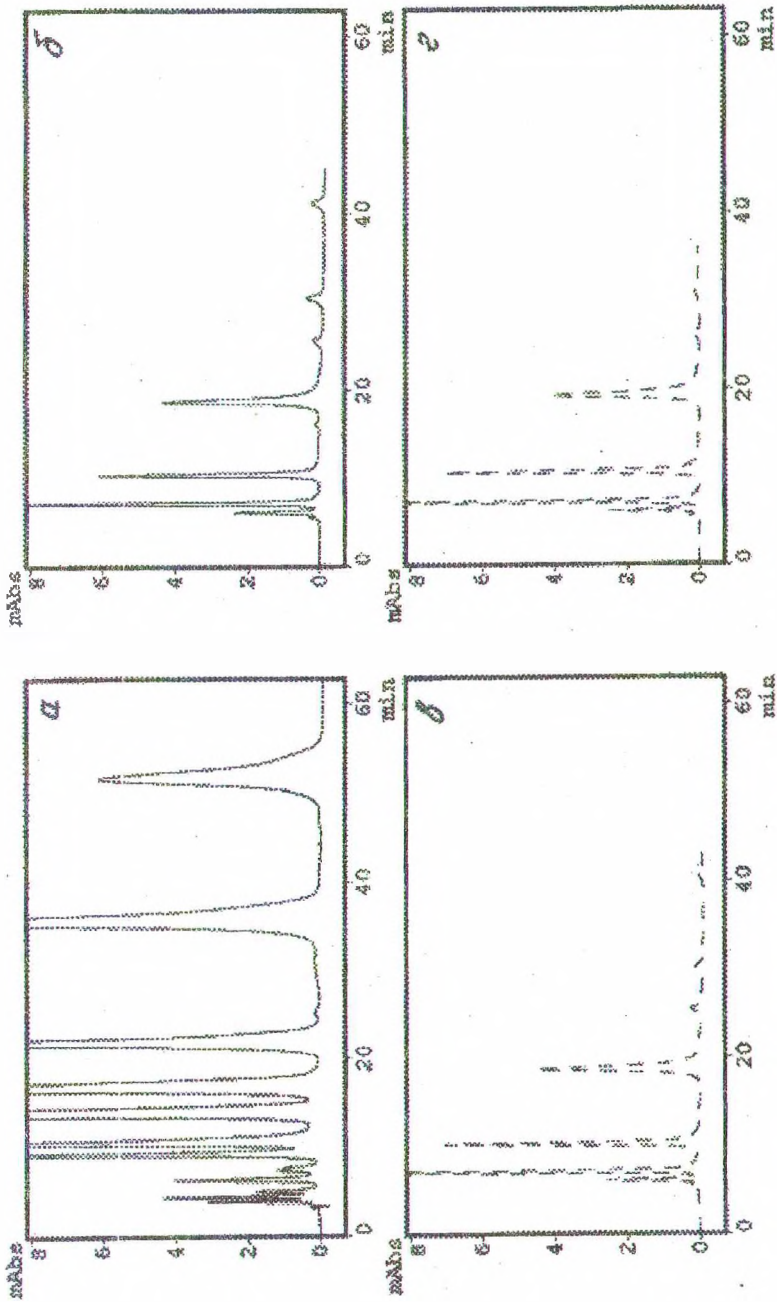


Рис. 3. Динамика изменения состава гидролизата в результате дефосфорилирования нуклеотидов: а-исходный гидролизат, б-через 1 ч ферментации, в-через 3 ч ферментации, г-через 5 ч ферментации

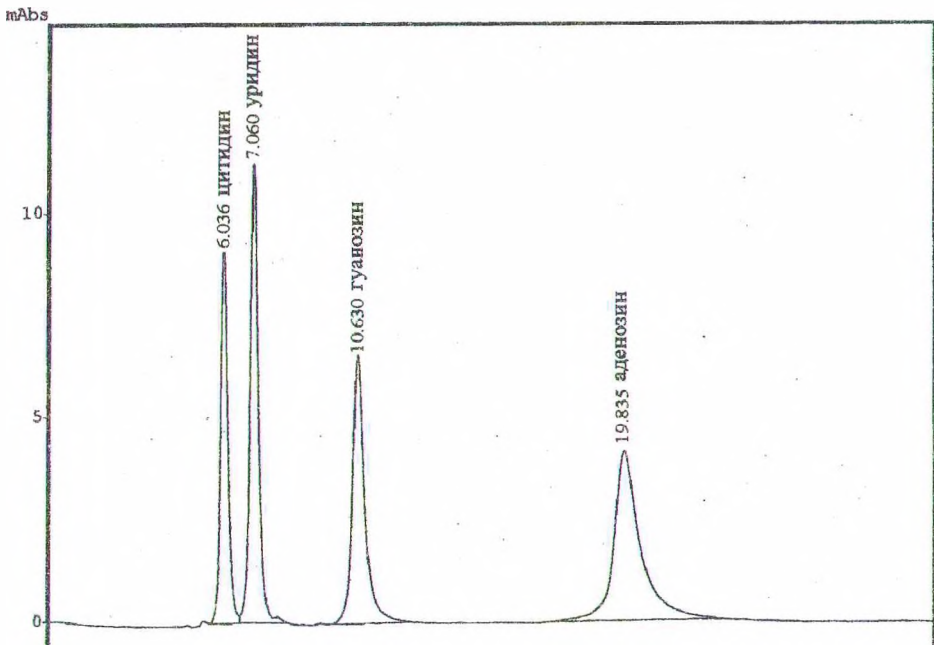


Рис. 4. Хроматограмма искусственной смеси нуклеозидов

Таблица

Изменение содержания основных рибонуклеозидов в процессе дефосфорилирования рибонуклеотидов

Рибонуклеозиды	Содержание, г/л			
	через 1 ч	через 3 ч	через 5 ч	через 6 ч
Цитидин	1,37	1,38	1,45	1,45
Уридин	4,34	4,36	4,53	4,53
Гуанозин	3,93	4,54	4,75	4,85
Аденозин	3,84	3,87	4,02	4,08

Обращает на себя внимание тот факт, что фосфатазы гриба *Trichodeema reesei* катализируют дефосфорилирование как нуклеозид-5'-фосфатов, так и нуклеозид-3'-фосфатов. Очевидно, что эти реакции должны катализироваться разными ферментами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова И.В., Трухачева Т.В., Ермоленко Т.М. и др. О перспективах создания промышленной технологии получения индивиду-

альных рибонуклеозидов путем гидролиза РНК //Труды БГТУ. Сер. III.-1998. -Вып. VI. - С.163-165.

2. Волкова И.В., Гриц Н.В., Трухачева Т.В. и др. Накопление нуклеаз и фосфатаз в процессах промышленного культивирования штаммов-продуцентов гидролитических ферментов // Материалы конференции «Разработка импортозамещающих технологий и материалов в химической промышленности». Минск: БГТУ, 1999.-С 208-212.

УДК 577.15

И. В. Волкова, аспирант;
Т. В. Трухачева, нач.лаб. АО
«Белмедпрепараты»;
А. М. Босенко, нач.лаб. АО
«Белмедпрепараты»;
Н. В. Гриц, доцент

НАКОПЛЕНИЕ НУКЛЕАЗ И ФОСФАТАЗ В ПРОЦЕССАХ ПРОМЫШЛЕННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

The ability of hydrolyzing enzymes fungi-producers for the synthesis of intracellular nucleases and phosphatases was examined. Activities of nucleases and phosphatases were found to vary with cultures growth. It was shown that fungus *Aspergillus awamori* which is used as a glucoamylase producer synthetizes a relatively large amount of intracellular nuclease.

Нуклеозиды, входящие в состав РНК, являются исходным сырьем для синтеза ценных лекарственных препаратов. Это препараты сердечно-сосудистого действия, противовирусные, противоопухолевые, противомикробные средства, иммуностимуляторы, антидепрессанты, противоболевые агенты [1-5].

Наиболее удобным и доступным методом промышленного получения индивидуальных рибонуклеозидов является гидролиз РНК [6]. Ферментативный гидролиз РНК до нуклеозидов осуществляется под действием двух групп ферментов: нуклеаз и фосфатаз.

Цель настоящей работы - изучение динамики накопления нуклеаз и фосфатаз в процессах промышленного культивирования штаммов-продуцентов гидролитических ферментов.