

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 synthesizes 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.

В работе использовали штамм *Aspergillus awamori*, являющийся продуцентом глюкоамилазы и ксиланазы, и штамм *Trichoderma reesei*, используемый в качестве продуцента целлюлазы. Для получения этих ферментов использовался глубинный способ культивирования продуцентов на крахмалсодержащей среде в промышленном ферментаторе объемом 50 м³ при температуре 34-36 °С механическим перемешиванием и аэрацией ферментационной среды. Процесс вели до выхода гидролитической активности культуральной жидкости (КЖ) на постоянный уровень. Отбор КЖ для анализа осуществляли через каждые 8 часов, начиная с 20-30 часов от начала ферментации. Для определения нуклеазной и фосфатазной активности биомассы грибов отделяли фильтрованием.

Активность нуклеазы и фосфатазы в биомассе определяли при рН 5,0 и температуре 60 °С. Определение нуклеазной активности проводили методом спектрофотометрического анализа неосаждаемых этанолом продуктов гидролиза дрожжевой РНК [7]. Активность фосфатаз определяли методом расщепления п-нитрофенилфосфата ("Fluka") [8].

На рис. 1 представлены данные о накоплении внутриклеточных нуклеаз в процессе промышленного культивирования штаммов-продуцентов гидролитических ферментов в сравнительном аспекте.

В процессе ферментации в биомассе продуцента глюкоамилазы (кривая 1) накапливаются РНК-гидролизующие ферменты. Максимум активности нуклеаз наблюдается через 80-100 часов от начала ферментации. В этот период активность нуклеаз в биомассе достигает 180-200 ед./мг сухих веществ (СВ). Далее величина удельной активности несколько снижается. К концу ферментации ее уровень вновь повышается.

Динамика накопления нуклеазы культурой гриба *Asp. awamori*, используемой в качестве продуцента ксиланазы (кривая 2), имеет аналогичный характер с кривой накопления нуклеазы этим же штаммом в процессе биосинтеза глюкоамилазы, но активность ксиланазы в КЖ достигает максимума через 60-70 часов от начала ферментации, что несколько быстрее, чем при получении глюкоамилазы. Возможно, что при продолжении ферментации также проявился бы двухфазный характер кривой накопления нуклеаз.



Рис. 1. Динамика накопления нуклеаз в процессе промышленного культивирования штаммов-продуцентов гидролитических ферментов: 1 - культура *Asp. awamori*, процесс биосинтеза глюкоамилазы; 2 - культура *Asp. awamori*, процесс биосинтеза ксиланазы; 3 - культура *Trichoderma reesei*, процесс биосинтеза целлюлазы

Уровень экспрессии нуклеаз культурой гриба *Trichoderma reesei* в процессе ферментации (кривая 3) существенно ниже, чем у предыдущего продуцента. Некоторое повышение нуклеазной активности обнаруживается через 60-70 часов от начала ферментации, в целом же активность внутриклеточных нуклеаз в биомассе продуцента целлюлазы находится на уровне 60 ед./мг СВ.

Описанные в литературе продуценты нуклеаз накапливают данный фермент в количестве 200-300 ед. активности на 1 мг СВ [7, 9]. Таким образом, культура гриба *Asp. awamori*, используемая как продуцент глюкоамилазы, проявляет достаточно высокую нуклеазную активность.

На рис. 2 представлены данные о накоплении внутриклеточных фосфатаз в процессе промышленного культивирования штаммов-продуцентов гидролитических ферментов.

Как видно из рис. 2, фосфатазы накапливаются культурами во всех исследуемых процессах. Культура гриба *Asp. awamori* в процессах биосинтеза глюкоамилазы и ксиланазы (кривые 1 и 2) накапливает фосфатазы на уровне не более 20-25 ед./мг СВ. Особый интерес представляет динамика накопления фосфатаз культурой гриба *Trichoderma*

reesei в процессе биосинтеза целлюлазы (кривая 3). На протяжении всей ферментации фосфатазная активность биомассы продуцента достаточно высокая (25-40 ед./мг СВ). Максимум активности фосфатаз наблюдается через 40-60 часов от начала ферментации. В этот период величина удельной активности превышает 40 единиц, что почти в 2 раза больше, чем величина активности фосфатаз у продуцента глюкоамилазы и ксиланазы.



Рис. 2. Динамика накопления фосфатаз в процессе промышленного культивирования штаммов-продуцентов гидролитических ферментов: 1 - культура *Asp. awamori*, процесс биосинтеза глюкоамилазы; 2 - культура *Asp. awamori*, процесс биосинтеза ксиланазы; 3 - культура *Trichoderma reesei*, процесс биосинтеза целлюлазы

В целом полученные данные по активности РНК-гидролаз в сравнении с литературными данными по используемым для гидролиза РНК ферментным комплексам позволяют сделать вывод, что штамм *Asp. awamori*, используемый в качестве продуцента глюкоамилазы, накапливает нуклеазы в таком же количестве, как и продуценты РНК-гидролизующих ферментов [7, 9], а фосфатазы - в несколько меньшем количестве [7, 10]. Культура гриба *Trichoderma reesei* накапливает фосфатазы на уровне 30-40 единиц активности, однако это несколько ниже уровня активности продуцентов фосфатаз.

На накопление тех или иных ферментов влияют многие факторы, в частности состав питательной среды, температура, рН, которые в данном случае подобраны с точки зрения накопления целлюлазы и

глюкоамилазы. Возможно, при специальном подборе условий культивирования и оптимизации состава питательной среды уровень экспрессии РНК-гидролизующих ферментов в биомассе изученных культур может быть повышен. В целом культуры *Asp. awamori* и *Trichoderma reesei* представляются перспективными для направленного биосинтеза нуклеаз и фосфатаз, а их биомассы, получаемые в процессах биосинтеза глюкоамилазы и целлюлазы в промышленных условиях, можно рассматривать как перспективные источники для практического использования нуклеаз и фосфатаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Земсков В.М., Лидак М.Ю., Земсков А.М., Микстайс У.Я. Низкомолекулярная РНК. Рига, 1985.
2. Заявка 2688003 Франция, МКИ⁵ С 07 Н 19/04, А 61 К 31/70. Derives du nucleosides, leur preparation et leurs application biologiques/ Silvie, Bosgiraud C., Depelley J. et. al.; Universite de Limoges.- № 9202401; Заявл. 28.02.92; Оpubл. 3.09.93.
3. Заявка 4207363 ФРГ, МКИ⁵ С 07 Н 19/073, А 61 К 31/70. Antivirale Nucleosidanaloga, ihre Herstellung und ihre pharmazeutische Verwendung/ Matthes E., Janta-Lipinski M.; Max-Delbruck-Centrum fur molekulare Medizin. - № Р 4207363.4; Заявл. 4.03.92; Оpubл. 9.09.93.
4. Пат. 5153180 США, МКИ⁵ А 61 К 31/70. Fluorinated nucleosides and process for treating retrovirus infections there with/ Matthes E., Janta-Lipinski M., Gaerther K. et. al. - № 566486; Заявл. 13.08.90; Оpubл. 6.10.92; НКИ 514/50.
5. Пат. 5378693 США, МКИ⁶ С 07 Н 19/073, 19/173. 2'-Halomethylidene cytidine, uridine and guanozine compounds and their pharmaceutical compositions/ McCarthy James R., Edwards Michael L., Matthews Donald P.; Merrell Dow Pharmaceuticals Inc..- № 113505; Заявл. 27.08.93; Оpubл. 3.01.95; НКИ 514/45.
6. Волкова И.В., Трухачева Т.В., Ермоленко Т.М., Гриц Н.В. О перспективах создания промышленной технологии получения индивидуальных рибонуклеозидов путем гидролиза РНК // Сборник трудов БГТУ. - 1998. - Вып. 6. - С. 161-165.
7. Барай В.Н., Бравсевиц И.А., Кухарская Т.А., Зинченко А.И. Гидролиз ДНК до нуклеотидов и нуклеозидов с использованием внеклеточных фосфогидролаз *Spicaria violacea* // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. - 1997. - № 4. - С. 67-72.

8. Барай В.Н., Кухарская Т.А., Ерошевская Л.А., Зинченко А.И. Химико-ферментативный гидролиз РНК до нуклеозидов с использованием мицелия *Spicaria violacea* // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. - 1997. - № 2. - С. 61-65.
9. Юсупова Д.В., Порфирьева О.В., Соколова Р.Б., Петухова Е.В. Эндонуклеаза *Serratia marcescens*. Новые продуценты фермента // Биотехнология. - 1992. - № 1. - С. 26-29.
10. Трушкина А.Г., Николаева В.М., Ежов В.А. Внутриклеточные и внеклеточные фосфатазы гриба *Penicillium brevicompactum*: выделение и некоторые характеристики // Прикл. биохимия и микробиология. - 1992. - №2. - С. 178-183.

УДК 573.6.086.83; 663.1

Т. И. Ахрамович, ассистент;

Н. В. Гриц, доцент;

В. Н. Леонтьев, доцент

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ 4,5-ЭПОКСИНОНАНА

The synthesis of 4,5-epoxynonane by *P.aeruginosa*, *P.fluorescens* from nonene-4 and by *S.cerevisiae*, *L.kefir* from 5-chloro-4-nonanone and by *R.glutinis* from 4-chloro-5-nonanone was carried out.

Среди многообразия микроорганизмов можно выделить 2 группы, обладающие окислительным и восстановительным типами метаболизма. К первым относятся микроорганизмы, участвующие в аэробных процессах, среди которых следует выделить процессы биодegradации (полного окисления) органических субстратов до CO_2 и H_2O и биотрансформации (неполного окисления) органических субстратов, ведущей к образованию кислот, спиртов, кетонов, оксиранов и др. Микроорганизмы с восстановительным типом метаболизма, участвуя в анаэробных процессах, биодegradируют и биотрансформируют органические субстраты с образованием метана, сероводорода или аммиака в первом случае и парафинов, спиртов, эфиров – во втором.

Эти факторы необходимо учитывать при разработке технологии микробиологического получения ценных химических веществ. В этом аспекте представлялось интересным изучить возможности получения оптически активных эпоксидных соединений, находящих широкое промышленное применение, с использованием микроорганизмов, обладающих окислительным и восстановительным типами метаболизма. Эпоксидные соединения применяются в производстве полимеров,