

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНЫХ АЦИЛАЗ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОПТИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ФОРМ АМИНОКИСЛОТ

Е. И. МАКАРОВА

Рассматриваются литературные и собственные экспериментальные материалы, касающиеся микробных ацилаз, представленных как в виде ферментных препаратов, так и интактных клеток продуцентов этих ферментов.

Приводятся данные о кинетических параметрах и некоторых физико-химических свойствах, оптической, субстратной специфичности и других характеристик микробных ацилаз.

Обсуждаются результаты использования иммобилизованных клеток дрожжей рода *Candida*, продуцентов алаанинацилазы, для получения L- α -аланина.

Исследования в области микробных ацилаз, проявляющих гидролитическую активность по отношению к ацилпроизводным аминокислот, выявили их широкое распространение у различных микроорганизмов — бактерий [1, 4, 6, 12], грибов [18, 24], актиномицетов [9] и дрожжей [16]. Ацилазы микробного происхождения привлекают внимание исследователей в связи с растущими перспективами их применения для разделения рацемических смесей аминокислот. Организовано промышленное производство некоторых оптически активных форм аминокислот [5, 25, 32].

Наиболее хорошо изучены бактериальные и грибные ацилазы, менее — актиномицеты и дрожжи, особенно аспорогенные формы последних.

Ведущее положение в области изучения и применения микробных ацилаз занимают японские ученые. Их исследования проведены в основном на ферментных препаратах, полученных различными методами извлечения ацилазы из бактериальных (*E. coli*, *Achr. pestifer*, *Pseudomonas*) и дрожжевых (*S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*) клеток [16, 17, 22, 33, 34] или выделения из культуральной жидкости экзогенного фермента грибов *Aspergillus oryzae* [18, 27].

Полученные ферментные препараты, частично очищенные методом осаждения аммонием сульфата и представляющие собой фракцию белка, выпадающую в осадок при насыщении от 0,4 до 0,7, в лиофилизированном состоянии сохраняют активность в течение нескольких месяцев.

Один из первых вопросов, подвергшихся детальному изучению, — это динамика ацилазной активности в процессе роста продуцентов и ее связь с другими функциями последних: накоплением биомассы, из-

менением рН культуральной среды и др. Оказалось, что активность ацилазы у различных микроорганизмов не всегда коррелирует с интенсивностью их роста [6, 18, 22]. У *A. pestifer*, например, активность резко возрастает, достигая максимума в начале и удерживаясь до середины логарифмической фазы роста, затем резко снижается [22]. У *A. огузае* при 15-дневном культивировании активность достигает максимума на шестые сутки, что также соответствует началу логарифмической фазы роста. Дальнейшее инкубирование приводит к снижению активности [18]. У *Azotobacter chroococcum* ацилазная активность возрастает параллельно интенсивности роста и достигает максимума к 30-му часу, т. е. в стационарную фазу роста [6]. Именно в этот период происходит интенсивный гидролиз блокированных аминокислот, необходимых для включения их в обмен веществ.

Учитывая, что ферментативная активность определяется не только генотипом продуцента, но зависит также от условий культивирования, состава питательной среды и других факторов внешней среды, большое внимание при изучении микробных ацилаз уделяется составу питательной среды [11, 12], в частности азотсодержащим компонентам. Установлено, что у *A. pestifer*—продуцента ϵ -лизинацилазы—источник азота оказывает существенное влияние на ацилазную активность. Пептон и NZ-амин обуславливают наивысшую активность, достигающую 430 и 350 мкМ лизина/час/мг белка, тогда как при наличии простых органических (мочевина), а также неорганических источников азота активность снижается и составляет лишь 40—120 и 10—20 мкМ лизина/час/мг белка соответственно [22].

На структуру активных центров микробных ацилаз в значительной степени проливают свет результаты исследований по влиянию ионов металлов и ферментных ингибиторов на их активность. Установлено, что ЕДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота) и ПХМБ (пара-хлоромеркурийбензоат) ингибируют полученные из грибов и дрожжей ферменты [16, 18]. Это указывает на то, что ионы металлов и сульфгидрильная группа играют большую роль в действии ацилаз микробного происхождения. Оказалось, что ацилаза, выделенная из гриба *A. огузае*, после инактивирования ингибитором ЕДТК реактивировалась добавлением Zn^{++} лишь частично, реактивирование же посредством Co^{++} было более полным. У дрожжевой ацилазы заметного стимулирования активности не наблюдалось при добавлении дивалентных ионов металлов, включая Co^{++} . Эти факты позволяют говорить о необратимости денатурирования дрожжевой ацилазы ферментными ингибиторами.

Энзиматические свойства микробной ацилазы изучали по влиянию на реакцию деацилирования субстрата рН, температуры, концентрации субстрата и др. На полноту протекания реакции существенное влияние оказывает обратимость реакции гидролиза амидной связи. Для выяснения роли обратимости проведено детальное кинетико-термодинамическое изучение модельной реакции гидролиза N-фенилацетил-L-аланина, катализируемой пенициллинамидазой. Определено значение кон-

станты равновесия реакции при рН 6,8 и 25°, равное $0,5 \pm 0,1$. В оптимальных условиях проведения ферментативной реакции оно будет достигнуто уже при концентрациях продуктов около 0,2М [13].

Для реакции деацилирования оптимальным считается рН инкубационной смеси 6,5—7,2, но последний может изменяться в зависимости от характера субстрата [16, 31]. Гидролиз некоторых ацетилпроизводных лейцина, аспарагиновой кислоты и триптофана протекает при более высоком значении рН, чем у тех же хлорацетилпроизводных. Скорость реакции зависит также от природы буфера и температуры. Из 3-х испытанных буферных растворов—фосфатного, цитратного и вероналового, последний оказался более благоприятным для всех испытанных субстратов. Оптимальной температурой для проявления активности этого фермента является 42°. Более высокая температура оказывает ингибирующее влияние: 52° через 2 часа, а 47° через 3 часа инкубирования [16].

В настоящее время к числу важнейших проблем, связанных с исследованием микробных ацилаз, относятся, во-первых, более широкий охват различных физиологических и систематических групп микроорганизмов для характеристики ацилазной активности в целях выявления биологического значения последней для продуцентов и ее направленно-го регулирования; во-вторых, изыскание эффективных продуцентов ацилаз и создание непрерывно действующих стабильных процессов без затрат на выделение и очистку ферментов для промышленного производства природных аминокислот. Научное и практическое значение этих проблем трудно переоценить.

Решение второй проблемы связано с использованием методов иммобилизации ферментов и клеток, позволяющих стабилизировать ферментативную активность, расширить рН- и температурный оптимумы, удлинить срок действия ферментов и клеток.

Первые работы по иммобилизации грибных ацилаз были выполнены в Японии. Из множества испытанных носителей наиболее удачным для фермента оказалась ДЕАЕ-целлюлоза [5, 25, 27, 28]. Изучение свойств нерастворимой грибной ацилазы, ковалентно связанной с иодоацетилцеллюлозой, и нативной ацилазы показало, что константа Михаэлиса первой равна $6,7 \cdot 10^{-3}$ М, а последней— $5,7 \cdot 10^{-3}$ М. Однако максимальная скорость нерастворимой ацилазы была почти в 3 раза выше, чем нативной.

Кривые рН-активности нерастворимой аминокислотной ацилазы с ацетил-DL-метионином в качестве субстрата показали расширение зоны активности по направлению к более щелочному рН. Значительные различия имеются между двумя ферментными препаратами во влиянии температуры и энергии активации. Эти результаты позволяют авторам работы предполагать, что структура нерастворимой аминокислотной ацилазы подвергается некоторым конформационным изменениям при ковалентном связывании с носителем [27].

В качестве носителя для иммобилизации фермента и интактных клеток используют и полиакриламидный гель [19, 25]. Разработан спо-

соб получения его гранул, преимущество которого заключается в том, что в последнем микробные клетки равномерно располагаются по всему объему [26]. Для этого полимеризационную смесь сразу же после добавления надсернистого аммония эмульгируют в атмосфере азота при 4° в смеси толуола, хлороформа, тетраметиленамина и твина. Полимеризация заканчивается через 15 мин. Полученные гранулы имеют четкую сферическую форму. Размер гранул 0,1—0,6 мм, его можно варьировать, меняя скорость мешалки и концентрацию твина.

Все эти и другие исследования явились теоретической основой для организации в Японии производства ряда аминокислот промышленным способом, с использованием метода оптически направленного гидролиза ацилпроизводных рацематов этих аминокислот, полученных химическим синтезом [5, 25, 32]. Процесс проходит по схеме, приведенной в одной из ранних обзорных статей по микробным ацилазам [2]. Согласно схеме, рацемат ацетил-DL-аминокислота асимметрично гидролизуется на L-аминокислоту и ацетил-D-аминокислоту, которая вновь подвергается рацемизации.

Поиск более дешевых и эффективных способов иммобилизации ацилазы привел к использованию акриловых полимеров, а также неорганических носителей—пористых керамики и стекол [21, 23]. Меньше работ об иммобилизации самих продуцентов ацилаз, хотя уже в 1968 г. в ФРГ был оформлен патент на метод иммобилизации интактного мицелия *A. oryzae*—продуцента ацилазы в нитрат целлюлозы [10], клеток микобактерий—в полиакриламидный гель [3].

Материал и методика. Объектом исследования служили культура бактерий из рода *Mycobacterium*, полученная из лаборатории споросных бактерий Института микробиологии АН АрмССР, а также культуры дрожжей рода *Candida* и *Saccharomyces*, полученные из Всесоюзной коллекции микроорганизмов.

Для микобактерий использовали сахарозо-лентозную питательную среду следующего состава (%): сахароза—1; пептон—2; $MgSO_4$ —0,5; K_2HPO_4 —0,2; дрожжевой экстракт—0,5; pH среды—7,0—7,2. Продолжительность периода культивирования 48—72 часа.

Для дрожжей использовали глюкозо-минеральную среду следующего состава (%): глюкоза—1; $(NH_4)_2SO_4$ —0,31; KH_2PO_4 —0,121; $MgSO_4$ —0,0625; NaCl—0,0125; $CaCl_2$ —0,0125; биотин 2 мкг/л или дрожжевой экстракт—0,5; pH среды 5,2—5,5. Продолжительность периода культивирования 18—24 часа.

Выращивание всех культур проводили в условиях интенсивной аэрации на качалках 250 об/мин в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 30 мл среды. Температура выращивания 28—30°.

Аминоацилазную активность определяли по реакции деацилирования субстрата в инкубационной смеси: 50 мг стыгой биомассы, 1 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 7,0; 1 мл 0,2 М раствора N-ацетил-DL-метионина. Продолжительность инкубирования 2 часа при 37°. Освободившийся L-метионин определяли общепринятым методом хроматографирования в тонком слое целлюлозы с последующим элюированием 60%-ным этанолом с хлористым кадмием 0,1% и колориметрированием. Активность выражали в мкМ аминокислоты на г клеток/час (удельная активность).

Выделение аминокислот из реакционной смеси в кристаллической форме проводили по методу Гринштейн [20].

Оптическую активность аминокислот определяли инкубированием аминокислоты с D-оксидазой гомогената печени крыс по методу, применяемому на кафедре биохимии Ереванского университета.

Результаты и обсуждение. Изыскание продуцентов ацилаз С этой целью было проверено 11 культур дрожжей на их способность к оптическому гидролизу ацетил-DL-метионина по сравнению с таковой 4-х культур микобактерий, уже известных продуцентов метионинацилазы [11]. Данные табл. 1 показывают, что все испытанные нами культуры дрожжей, хотя и в разной степени, проявляют активность в отношении заданного субстрата.

Одна группа культур дрожжей обладает активностью, сравнимой с таковой микобактерий (*S. cerevisiae*, *S. chevalieri*, *S. tropicalis* и 2 штамма *S. carlsbergensis*), остальные — уступают микобактериям. Эти результаты согласуются с данными литературы о широком распространении ацилаз в живой природе, что, в свою очередь, является свидетельством необходимости этих ферментов для нормальной жизнедеятельности организмов. Например, известно, что аминокислоты орнитинового цикла Кребса — аргинин и орнитин синтезируются в микроорганизмах из глутаминовой кислоты через ряд ацетилированных промежуточных веществ при помощи ацетилорнитазы и трансацетилирующего фермента [30], т. е. в микроорганизмах постоянно имеется широкий набор различных ацилаз, катализирующих реакции ацилирования, деацилирования и трансацилирования, тем самым участвуя в синтезе и распаде азотсодержащих соединений.

Таблица 1
Удельная ацилазная активность у микобактерий и дрожжей
(классификация штаммов по ВКМ)

Культуры микроорганизмов	Активность, мкМ метионина/г клеток час
<i>S. pulcherrima</i> 64	16,5
<i>S. utilis</i>	17,6
<i>S. guilliermondii</i> НП-4	18,4
<i>S. guilliermondii</i> 42	18,8
<i>S. tropicalis</i> 959	26,4
<i>S. arborea</i> 33	27,6
<i>S. tropicalis</i> КЗ-10	35,2
<i>S. carlsbergensis</i> 1173	37,0
<i>S. carlsbergensis</i> 108	37,0
<i>S. chevalieri</i> 37	66,0
<i>S. cerevisiae</i> 12	76,0
<i>M. salivarium</i> 638	45,2
<i>M. perrugosum</i> 647	45,5
<i>M. perrugosum</i> 628	60,0
<i>M. coeliacum</i> 615	70,0

Ацилазная активность в динамике роста микроорганизмов. В первые часы роста биомасса дрожжей и микобактерий обедняется ацилазой по сравнению с посевным материалом на 27 и 18%, но все же активность достаточно высока — 44,0 и 40,6 мкМ соответственно (табл. 2).

У *S. chevalieri* активность постепенно возрастает и ближе к концу логарифмической фазы (8 час.) фактически стабилизируется. После 24-х час., когда из среды исчерпаны все питательные вещества, наблюдается снижение ацилазной активности, а к 72-м час. она исчезает полностью.

У *M. coeliacum*, характеризующейся более растянутым периодом роста и развития, резкое увеличение активности происходит к 18 час. и достигает максимума к 36 часам. Через двое суток активность достаточно высокая; дальнейшее культивирование приводит к ее резкому снижению в клетках.

Таким образом, у обеих культур ацилазная активность резко возрастает в период интенсивного роста биомассы, т. е. наблюдается коррелятивная связь между этими процессами. Такая же закономерность отмечается для *A. chgoosocum* [6].

Таблица 2

Динамика ацилазной активности у микроорганизмов
(Биомасса, мг а. с. в./100 мл; удельная активность, мкМ аланина/г клеток/час)

Продолжительность, час	<i>S. chevalieri</i>		<i>M. coeliacum</i>	
	прирост биомассы	удельная активность	прирост биомассы	удельная активность
0	45,2	60,0	60,0	65,8
2	96,0	44,0	59,0	60,0
4	136,6	36,0	66,0	40,6
6	240,0	48,4	95,5	30,0
8	305,5	60,0	106,2	30,9
14	370,0	66,0	165,0	36,8
18	500,8	68,6	200,5	55,4
24	480,0	68,5	250,0	62,0
36	476,0	32,0	360,0	68,0
48	480,0	10,0	380,0	54,8
72	483,0	0	388,0	26,0

Оптимизация аланинацилазной активности у микроорганизмов проводилась обогащением питательной среды одним из следующих соединений (%): этаноламин 0,1, этаноламинфосфат 0,1, глицерофосфат 0,1, бета-хлорэтиловый эфир стеариновой кислоты 0,5, бета-оксиэтиламинд 0,5, дрожжевой экстракт 0,5. Оптимальная концентрация добавок была установлена предварительными исследованиями. Учитывалось влияние на урожай биомассы и аланинацилазную активность клеток (табл. 3).

Самым эффективным стимулятором роста оказался бета-хлорэтиловый эфир стеариновой кислоты, при этом ацилазная активность резко снижается у дрожжей, но остается без заметного изменения у микобактерий. Этанолминфосфат стимулирует оба процесса у обеих культур, а этаноламин стимулирует активность фермента лишь у микобактерий. Наблюдается отсутствие корреляции в стимулировании активности фермента и накоплении биомассы одним и тем же соединением. Ацилаланин не оказывает заметного влияния на активность аланинаци-

лазы у микобактерий и ингибирует у дрожжей. Это говорит о том, что этот фермент у изученных микроорганизмов является конститутивным, как лизинацилаза у *A. pestifer* [22]; у гриба *A. oryzae* последняя является индуцируемым ферментом [18].

Дрожжевой экстракт стимулировал рост и ферментативную активность у микроорганизмов. Это дало возможность предположить, что индивидуальные аминокислоты также могут выполнять эту функцию. Нами были испытаны аминокислоты семейства глутаминовой кислоты и мочевины; все они были использованы в качестве единственных источников азота для дрожжей и как добавки — для микобактерий, т. к. питательная среда в этом случае содержит органическую форму азота.

Таблица 3
Влияние добавок на рост и ацилазную активность микроорганизмов, % от контроля

Д о б а в к и	<i>M. coeliacum</i>		<i>C. chevalieri</i>	
	биомас-са	активность	биомасса	активность
Контроль	100	100	100	100
Этаноламин	157,4	205,1	140,0	82,4
Этаноламинфосфат*	100	203,0	150,5	220,0
Глицерофосфат*	146,0	130,5	110,6	10,0
Бета-хлорэтиловый эфир стеариновой кислоты*	241,0	60,0	220,4	51,6
Бета-оксиэтиламин*	124,2	292,2	100,5	275,0
Дрожжевой экстракт	100	100	145,8	120,4
N-ацетил-DL-аланин	120,1	10,5	100,0	0,2

* Синтезированы в Ереванском филиале ИРЕА Амирханяном М.

Таблица 4
Влияние источников азота на аланинацилазную активность микроорганизмов, % от контроля

Источники азота	<i>C. tropicalis</i>	<i>S. carlsbergensis</i>	<i>M. coeliacum</i>
Аммоний сульфат	100	100	
Глутаминовая кислота	100	99,2	100
Глутамин	198,0	130,4	110,2
Пролин	55,8	67,3	34,0
Аргинин	105,6	98,5	100,0
Орнитин	100,0	98,4	80,0
Цитруллин	115,5	115,0	100,0
Мочевина	100,0	104,6	86,6
Аммоний сульфат и н-гексадекан	170,4		

Данные табл. 4 показывают, что стимуляторами аланинацилазной активности у дрожжей являются глутамин и цитруллин, то есть соединения, которые способствуют накоплению в клетках общего азота, а значит и белка [7]. Стимулирование ацилазной активности у *C. tropicalis* КЗ-10 н-гексадеканом подтверждает то же самое. Таким образом, ацилазная активность возрастает вместе с возрастанием в клетках об-

щего количества белка и наоборот, о чем свидетельствует вариант с пролином—бедным источником азота. На фоне дрожжевого экстракта, как это имеет место у *M. coeliacum*, стимулирование активности фермента выражено менее ярко.

Итак, возможна регуляция аланинацилазной активности у дрожжей соединениями, влияющими на общий белковый обмен.

Субстратная и оптическая специфичность микробных ацилаз. Данные табл. 5 свидетельствуют о том, что все представленные здесь культуры обладают широкой субстратной специфичностью. Об этом же утверждают научные публикации относительно ацилаз, выделенных из других микроорганизмов [11, 16—19, 22]. Нельзя не заметить, что дрожжи более активны по отношению к аминокислотам лейциновой группы, а микобактерии—к метионину, валину и аланину.

Таблица 5

Субстратная и оптическая специфичность ацилазы дрожжей и микобактерий, (удельная активность, мкМ аминокислоты/г клеток/час)

Субстрат деацилирования	<i>S. chevalieri</i>	<i>S. carlsbergensis</i> 1173	<i>M. coeliacum</i>
Ацетил-DL-метионин	64,4	50,5	69,9
Ацетил-D-триптофан	0	12,0	0
Ацетил-DL-триптофан	9,0	32,0	21,2
Ацетил-D-фенилаланин	0	15,4	0
Ацетил-DL-фенилаланин	19,6	40,4	40,0
Ацетил-DL-валин	24,4	49,5	77,0
Ацетил-L-лейцин	72,0	51,6	следы
Ацетил-DL-норлейцин	56,0	60,2	6,6
Ацетил-DL- α -аланин	55,0	48,0	60,5
Бензоил-L-гистидин	0	30,2	18,5
Паранитробензоил-L-глутаминовая кислота	10,4	32,0	22,4

Дрожжи *Saccharomyces* отличаются от двух других культур менее строгой оптической специфичностью: они подвергают гидролизу ацил-D-аминокислоты. Можно предположить, что эта культура имеет несколько ацилаз, в том числе отдельные D- и L-, которые близки по свойствам и оказывают каталитическое действие при близком или одном и том же режиме. Во всяком случае эту культуру нельзя использовать для получения L-триптофана и L-фенилаланина.

Аланинацилазная активность иммобилизованных дрожжевых клеток. При помощи одного из продуцентов аланинацилазы из рода *Candida* нами были наработаны и получены в кристаллическом виде аминокислоты: метионин, аланин, валин, норлейцин. Все они были со 100% -ым содержанием L-формы.

В целях более эффективного использования каталитических свойств дрожжей были проведены исследования по возможности иммобилизации клеток дрожжей.

Первый способ, который мы применили для иммобилизации дрожжей, это включение в полиакриламидный гель. Процесс иммобилизации по методу Чибаты [19] представлен в табл. 6, которая приобрела свой окончательный вариант после исследований по изысканию опти-

мального количества биомассы, концентрации акриламида, величины гранул и др.

Второй метод, который мы применили для иммобилизации дрожжей, это инкапсулирование в полиамидные мембраны по методу Чанга [15].

В иммобилизованном состоянии клетки дрожжей сохраняют ацилазную активность продолжительное время. Так, в непрерывной системе с подачей субстрата через колодку, заполненную клетками, иммобилизованными в полиакриламидный гель, активность сохраняется 70, а в полиамидные капсулы—50 суток.

Таблица 6

Схема процесса иммобилизации клеток микроорганизмов включением в полиакриламидный гель

Последовательность этапов	Компоненты	Концентрация	Количество, мл
I	Бактериальные или дрожжевые клетки в виде пасты		1 г
	N-ацетил-DL-α-аланин	0,2 М	0,1
	Фосфатный буфер, рН 7,0	0,01 М	1,0
	Акриламид	38% _{v/v}	2,8
	N,N'-метиленбисакриламид	2,5% _{v/v}	0,5
	Тетраметилэтилендиамин	5,0% _{v/v}	0,5
	Надсернокислый аммоний (строго соблюдать очередность компонентов)	5,0% _{v/v}	0,5
II	Полимеризация в течение 30 мин при 37°		
III	Измельчение и продавливание блока геля через сито с размером отверстий 0,5 мм		
IV	Промывание полученных гранул полиакриламидного геля с включенными клетками декантацией водой до исчезновения мути		

На основании вышеприведенных данных можно рекомендовать иммобилизованные одним из испытанных методов клетки дрожжей в качестве продуцентов аланинацилазы и клетки микобактерий в качестве продуцентов метионинацилазы для получения соответственно L-аланина и L-метионина непрерывным деацилированием N-ацетил-DL-α-аланина и N-ацетил-DL-метионина.

Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 13.VII 1979 г.

ՄԻԿՐՈՐԱՅԻՆ ԱՅԻԼԱԶՆԵՐԻ ՕԳՏԱԳՈՐԾՈՒՄԸ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՕՊՏԻԿԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎ ԶԵՎԻ ՄՏԱՑՄԱՆ ՀԱՄԱՐ

Ե. Ն. ՄԱԿՍԻՈՎՍ

Քննվում են ամինաթթուների ստացման համար միկրոբային աջիլազների կիրառման վերաբերյալ որոշ գրականության տվյալներ և սեփական փորձերի արդյունքները:

Ներկայացվում են իմոբիլիզացված շաքարասնկային բջիջների օգտագործման արդյունքները՝ DL-ալանինի օպտիկական հիդրոլիզի համար:

USE OF MICROBIAL ACYLASES FOR PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE FORMS OF AMINOACIDS

E. N. MAKAROVA

Recent data and the results of own experimental investigations on the microbial acylases and their use for preparation of aminoacids have been discussed.

The results on the application of the immobilized yeast cells gel for the optical resolution of acetyl-DL- α -alanine have been reported.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Аболинь Т. К.* Управление микробным синтезом, 76, Рига, 1977.
2. *Африкян Э. К.* Микробиолог. синтез, 1, 1, 1967.
3. *Африкян Э. К., Макарова Е. Н., Маршавина З. В., Асцянян С. Г.* Тез. 2-го Всесоюзного симпозиума «Получение и применение иммобилизованных ферментов», 158, Абовян, 1977.
4. *Кимура Ю., Африкян Э. К.* Докл. АН СССР, 173, 4, 945, 1967.
5. *Котова Г. А., Безбородов А. М.* Получение аминокислот с использованием иммобилизованных ферментов. Обзор. серия 5, 33, М., 1978.
6. *Лидере А. Ф., Зильберс А. М.* Управление микробным синтезом. 66, Рига, 1977.
7. *Макарова Е. Н.* Микробиология, 42, 2, 260, 1973.
8. *Макарова Е. Н., Мелконян А. Б., Балаян А. М., Маршавина З. В.* Тез. 2-го Всесоюзного симпозиума. Получение и применение иммобилизованных ферментов, 102, 1977.
9. *Орещина М. Г.* Тез. 7-й конф. молодых ученых «Проблемы микробиологии и вирусологии», 107, Рига, 1977.
10. Патент ФРГ, № 1227855, 1968.
11. *Хачатурян А. А.* Тез. 5-го съезда ВМО, секция: Физиология микробов и техн. микробиология, 217, Абовян, 1975.
12. *Хачатурян А. А., Африкян Э. Г.* Биолог. ж. Армении, 31, 8, 806, 1978.
13. *Шевядас В. Ю., Галаев И. Ю.* Тез. 2-го Всесоюзного симпозиума «Получение и применение иммобилизованных ферментов», 119, Абовян, 1977.
14. *Яковлева В. Н., Малофеева И. В., Купитская М. Б.* Иммобилизованные клетки микроорганизмов, АН СССР, НЦБИ, ИБФМ, 118, Пущино, 1978.
15. *Chang T. M., MacIntosh F. C., Mason S. G.* Canadian J. Phys. a. pharm., 44, 1, 115, 1966.
16. *Chibata I., Ishikawa T.* Bull. Agric. chem. Soc. (Japan), 22, 4, 360, 1958.
17. *Chibata I., Kitsumi M., Yamada Sh.* Bull. Agric. chem. Soc., 22, 1, 25, 1958.
18. *Chibata I., Ishikawa T., Tosa T.* Bull. Agric. chem. Soc., (Japan), 24, 1, 37, 1960.
19. *Chibata I., Tosa T., Sato T.* Appl. microbiol., 27, 5, 878, 1974.
20. *Greenstein J. P., Winitz M.* Chemistry of the amino acids, 3, N. Y.—L. John Wiley a. sons inc, 1961.
21. *Howard W. H., Clarence D. C.* Biotechn. and Bioeng., 16, 11, 1537, 1974.
22. *Ishikawa T., Tosa T., Chibata I.* Agric. Biol. chem. (Japan), 26, 3, 194, 1962.
23. *Jokote J.* Agric. Biol. chem. (Japan), 39, 8, 1545, 1975.
24. *Kato J., Kisumi M., Chibata I.* Appl. Microbiol., 23, 4, 758, 1972.
25. *Mori T., Sato T., Tosa T., Chibata I.* Enzymologia, 43, 4, 1972.
26. *Ohmija K., Terao C., Shimizu S., Kobayashi T.* Agric. Biol. chem. (Japan), 39, 2, 491, 1975.
27. *Sato T., Tosa T., Chibata I.* Arch. Biochem. a. Biophys., 147, 2, 1971.
28. *Tosa T., Mori T., Fuse T., Chibata I.* Agric. Biol. chem., (Japan), 33, 1947, 1969.
29. *Tosa T., Mori T., Chibata I.* Enzymologia, 40, 49, 1971.
30. *Vogel R., McLellan W., Hirvonen A., Vogel H.* Metabolic regulation. Acad. press. N. V.—L., 1971.
31. *Werner K., Friedhelm S.* Z. Physiol. chem., 356, 6, 915, 1975.
32. *Yamamoto K., Tosa T., Jamashita K., Chibata I.* Eur. J. Appl. Microbiol., 3, 169, 1976.
33. *Jukio K., Tetsu H., Shoichi K., Joko K.* Chem. a. pharm. Bull., 26, 9, 2698, 1978.
34. *Jukio K., Tetsu H., Shoichi K., Joko K.* Chem. a. pharm. Bull., 26, 9, 2705, 1978.