

## АЛАНИНАЦИЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ

Е. Н. МАКАРОВА, А. Б. МЕЛКОЦЯН, Л. С. МАРКОСЯН

Дрожжевые клетки—продуценты аланинацилазы иммобилизованы инкапсулированием в полиамидные мембраны. Изучено влияние количества и физиологического состояния клеток, рН, концентрации и соотношения компонентов в полимеризационной смеси на активность, а также стабильность и механическую прочность полученных капсул. По аланинацилазной активности инкапсулированные дрожжевые клетки при температуре 37°, рН 7,0 и подаче субстрата 0,2 М как в периодическом, так и непрерывном процессах инкубирования не отличаются от нативных.

Метод иммобилизации ферментов микрокапсулированием в настоящее время широко применяется в производстве ароматических веществ, в бумажной и химической промышленности, в медицине. Известно несколько общих методов включения ферментов в полупроницаемые водонерастворимые оболочки: межфазной полимеризации и поликонденсации [7], двойного эмульгирования [3], разделения фаз испарением легколетучего растворителя [3]. В качестве пленкообразующего материала можно использовать целый ряд полимеров: поликарбонаты [4], 1,6-гексаметилендиамин [2, 9], триацетатцеллюлозу [8], фоточувствительную смолу [6] и др.

Среди большого количества публикаций, посвященных этому вопросу, очень мало работ по инкапсулированию интактных микробных клеток, особенно дрожжевых. Известно, что у микробных клеток в иммобилизованном состоянии ферментативная активность сохраняется, стабилизируется и проявляется в более широких пределах температуры и рН, что очень ценно при их практическом использовании. В связи с этим мы изучили возможность инкапсулирования дрожжевых клеток—продуцентов аланинацилазы и применения их в таком виде для непрерывного оптически направленного гидролиза N-ацетил-DL-аланина [1].

*Материал и методика.* В качестве продуцента аланинацилазы была использована культура дрожжей рода *Candida*, выращенная в синтетической глюкозосодержащей среде; состав питательной среды и условия выращивания опубликованы ранее [5].

Для инкапсулирования клеток дрожжей за основу был взят метод микрокапсулирования ферментов [7]. В результате проведенных нами предварительных исследований по изысканию оптимальных условий применения метода и его модификации отработана схема инкапсулирования интактных клеток дрожжей (табл. 1).

Количество включившихся в капсулы клеток определялось по разнице их исходного и оставшегося в реакционной смеси и в промывных водах после промывки капсул количества.

Таблица 1

Схема процесса инкапсулирования дрожжевых клеток

Этап	Компоненты	Концентрация	Количество, мл
1	Дрожжевые клетки (паста)	0,3 г/мл	5
	Полиэтиленполламин	1,5 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	5
	Хлороформ—циклогексан	1:1	5
	Дихлорангидрид себацнновой кислоты	2 <sup>0</sup> / <sub>0</sub>	5
2	Встряхивание при максимальной скорости на магнитной мешалке в течение 4—5 мин		
3	Прекращение реакции поликонденсации добавлением избыточного количества смешанного раствора и предотвращение слипания капсул приливанием равного объема 50 <sup>0</sup> / <sub>0</sub> -го раствора твин-20		
4	Центрифугирование при 10000 об/мин 5 мин и промывание капсул попеременно водой и этанолом		

Аланинацилазную активность проверяли по реакции деацелирования N-ацетил-DL-аланина свободными или иммобилизованными клетками дрожжей. Инкубационная смесь: 100 мг клеток, 2 мл 0,2 М раствора субстрата в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,0. Инкубирование при 37°, 2 часа. Активность выражали в мкМ образовавшегося L-α-аланина/г клеток/час.

*Результаты и обсуждение.* С целью подбора оптимального количества клеток, необходимого для инкапсулирования, было испытано 5 концентраций клеток: 10, 20, 30, 50 и 100 мг/мл. При низкой концентрации их (табл. 2) в реакционной смеси происходит моментальное скле-

Таблица 2

Включение клеток в капсулы и их аланинацилазная активность

Количество биомассы, мг сырого веса/мл	% включения клеток в капсулы	Активность, мкМ L-α-аланина/мл/час
10	90—95	капсулы не образовались
20	90—92	
30	80—84	66,2
50	80	69,0
100	75—84	77,5

ивание капсул в один комок; при концентрации, превышающей 20 мг/мл, образуются хорошо оформленные капсулы. Ацилазная активность последних достаточно высока, однако отсутствует ярко выраженная корреляция между активностью и количеством инкапсулированных клеток. Это говорит о том, что ферментативная активность капсул определяется лишь клетками, находящимися в пристенном слое мембран.

Из табл. 2 видно также, что в капсулы включается в среднем 80% клеток, а 20%—остается в промывных водах; чем ниже концентрация клеток, тем полнее включение.

Изучено влияние рН субстрата от 4,0 до 9,0 на деацилирование ацилаланина инкапсулированными клетками дрожжей. Данные табл. 3 свидетельствуют о том, что реакция активно протекает в широком интервале рН 5,0—8,0, но оптимальным является рН 7,0.

Таблица 3

Влияние значения рН реакционной смеси на ацилазную активность инкапсулированных клеток дрожжей (18 час.)

Значение рН	Активность, мкМ L-α-аланина/г клеток/час
4,0	3,7
4,5	18,6
5,0	22,0
6,0	26,2
7,0	29,5
8,0	27,0
8,5	12,3
9,0	2,0

Таблица 4

Влияние температуры инкубирования на ацилазную активность инкапсулированных клеток дрожжей

Температура, °С	Активность, L-α-аланин, мг/мл		
	2 час.	5 час.	18 час.
32	0,25	1,2	2,8
37	0,77	2,8	5,5
41	1,00	1,7	3,9
50	1,60	2,0	3,0

Зависимость активности инкапсулированных клеток дрожжей от температуры определялась в условиях периодического инкубирования при 32, 37, 41 и 50°. Данные табл. 4 показывают, что оптимальной температурой через 2 часа инкубирования является 50°, но уже через 5 час. наблюдается ингибирование реакции деацилирования повышенной температурой и оптимальной является 37°. При 32° активность клеток дрожжей заметно понижена.

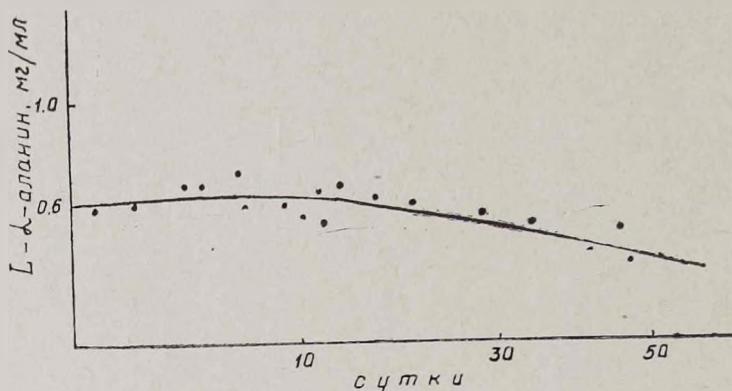


Рис. Активность колонки с инкапсулированными клетками дрожжей при непрерывном деацилировании ацилаланина.

В условиях непрерывного деацилирования субстрата был проведен длительный опыт в колонке размером 12×1,5 см при 37° с 5 г инкапсулированных клеток дрожжей. Через колонку пропускали 0,02 М раствор ацилаланина, рН 7,0, со скоростью 5—6 мл/час. Активность колонки измеряли периодически по объему проходившего раствора и содержанию в нем L-аланина. В этих условиях активность сохранялась

продолжительное время. Разброс точек на кривой (рис.) свидетельствует о том, что скорость протекания субстрата на протяжении опыта не была постоянной. При общей продолжительности опыта 50 суток активность колонки снизилась почти на 50%.

Из рис. также видно, что отсутствует индукционный период, который при использовании дрожжей, иммобилизованных в полиакриламидный гель, продолжается 4—5 суток. Это говорит о том, что инкапсулированные в полиамидные мембраны клетки ведут себя как свободные. Об этом свидетельствует и одинаковая активность свободных и инкапсулированных клеток—в среднем 100 мкМ/г клеток/час.

Следовательно, иммобилизация дрожжевых клеток инкапсулированием в полиамидные мембраны позволяет получать капсулы размером 0,1—1 мм, которые обладают прочностью и стабильностью. При периодическом инкубировании они сохраняют первоначальную активность при многократном повторном использовании после промывки, а при непрерывном—она сохраняется в течение 50-ти суток.

Институт микробиологии АН АрмССР

Поступило 12.VII 1979 г.

## ՆԵՐԿԱԳՍՈՒՂԱՅՎԱԾ ՇԱՔԱՐԱՍՆԿԱՅԻՆ ԲՋԻՋՆԵՐԻ ԱՄԻՆԱՑԻԼԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ե. Ն. ՄԱԿԱՐՈՎԱ, Ա. Բ. ՄԵԼԹՈՆՅԱՆ, Լ. Ս. ՄԱՐԿՈՍՅԱՆ

Ալանինացիլազի պրոդուցենտ շաքարասնկերի բջիջները ներառվել են պոլիամիդային կապսուլների մեջ, Հետազոտվել են բջիջների քանակի, ֆիզիոլոգիական վիճակի, pH-ի և պոլիմերիզացիոն խառնուրդի բաղադրիչների կոնցենտրացիայի փոխհարաբերության ազդեցությունը ներկապսուլացված բջիջների ալանինացիլազային ակտիվության վրա: Ուսումնասիրվել են նաև ստացված կապսուլների կայունությունը, մեխանիկական ամրությունը:

Հաստատված է, որ ներկապսուլացված և նատիվ շաքարասնկային բջիջների աչիլազային ակտիվությունը չի սարբերվում ինկուբացիայի հետևյալ պայմաններում: ջերմաստիճանը՝ 37, pH-ը 6,0—8,0, սուբստրատի քանակը՝ 0,05—0,2M: Սուբստրատի տրանսֆորմացիայի անընդհատ պրոցեսը տե-վում է 50 օր:

## ALANINEACYLASE ACTIVITY OF THE INCAPSULATED YEASTS

E. N. MAKAROVA, A. B. MELKONIAN, L. S. MARKOSIAN

The encapsulation of yeast cell producing alanineacylase has been achieved by the use of polyamides. Immobilized and encapsulated yeast cells maintain their alanineacylase activity during 50 days under pH 6,0—8,0, 37° in continuous as well as periodic flow of substrate at concentrations of 0,05—0,2 M.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э. К. Микробиол. синтез, 1, 1, 1967.
2. Айсина Р. Б., Казанская Н. Ф., Лукашева Е. В., Березин И. В. Биохимия, 41, 9, 1656, 1976.
3. Донцова Г. И., Гнутова Н. М. Перспективы микрокапсулирования ферментов для медицинских целей. 7, М., 1977.
4. Лукашева Е. В., Айсина Р. Б., Грачева И. И., Казанская Н. Ф., Березин И. В. Биохимия, 42, 11, 2013, 1977.
5. Макарова Е. Н. Микробиология, 42, 2, 260, 1973.
6. Патент Японии. № 52-143279, 1977.
7. Chang T. M. S., MacIntosh F. C., Mason S. G. Canadian j. physiol. a. pharm., 44, 1, 115, 1966.
8. Charles M., Collighlin R. W., Tedman R., Beard K. W. Biotechnol. a. Bioeng., 16, 11, 1549, 1974.
9. Mori T., Sato T., Matuo Y., Tosa T., Chibata I. Biotechnol. a. Bioeng., 14, 663 1972.