

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ БЕТА-ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ *AUREOBASIDIUM PULLULANS* НА СИЛОХРОМЕ С-80

Е. Р. АЛЕКСАНИАН, Э. С. МАРКОСЯН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Осуществлена иммобилизация внеклеточной бета-фруктофуранозидазы *Aureobasidium pullulans* на силохроме С-80. Установлены оптимальные условия иммобилизации, при которых происходит максимальное связывание активности—76,3% от исходной. Показано, что свойства иммобилизованной и нативной бета-фруктофуранозидазы в основном сходны.

*A. pullulans*-ի արտաբջջային բետա-ֆրուկտոֆուրանոզիդազան իմմոբիլիզացվել է սիլոխրոմ С-80-ի վրա: Բացահայտվել են իմմոբիլիզացման օպտիմալ պայմանները՝ բետա-ֆրուկտոֆուրանոզիդազայի խտությունը (0,8 %) և կրիլի ֆեռֆերմենտի կոնտակտի ժամանակը (2 ժամ), որոնց դեպքում ապահովվան կապուցված ակտիվությունը է 76,3% սկզբնականից: Ճուշը է տրվել, որ իմմոբիլիզացված ֆերմենտն օժտված է նույնանման հատկություններով, ինչ որ կապված ֆերմենտը: Նկատվում է միայն ջերմաստիճանի օպտիմումի ոչ նշանակալից փոփոխություն:

The optimal conditions of immobilization of extracellular  $\beta$ -fructofuranosidase (0.8%) of *Aureobasidium pullulans* and the time of the enzyme's contact with the carrier (2 hours) are fixed, under which maximum activity connected with sylochrom is 76,3% from the initial. The properties of immobilized and native  $\beta$ -fructofuranosidase are mainly identical, except the temperature optimum and the influence of some chemical substances on the immobilized preparation.

*Грибы дрожжеподобные Aureobasidium pullulans—бета-фруктофуранозидаза—иммобилизация—силохром С-80.*

Применению иммобилизованных ферментов в разных технологических процессах и медицине в последнее время придается все большее значение. Уже разработаны технологии производства некоторых иммобилизованных ферментов [3—6].

Иммобилизованная бета-фруктофуранозидаза в настоящее время выпускается НИО «Фермент» в комплексе с мутаротазой и глюкозооксидазой для аналитических целей [3]. Однако потребность в ферменте этим не исчерпывается, так как появляются новые перспективы применения как иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы, так и клеток—продуцентов фермента в различных технологических процессах.

Основной сферой использования бета-фруктофуранозидазы как в нативном, так и иммобилизованном состоянии является производство жидкого сахара, которое приобретает все большее значение, так как на крупномасштабном производстве кристаллического сахара погрузочно-разгрузочные и транспортно-складские работы обходятся дорого [2]. В США, по данным Бреммана и соавт., [2], производство жидкого сахара стабилизировалось на уровне 20—25% от общих поставок сахара в стране.

В настоящей работе обобщены результаты изучения иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы *Aureobasidium pullulans*.

**Материал и методика.** В качестве продуцента бета-фруктофуранозидазы использовали дрожжеподобный гриб *Aureobasidium pullulans*, полученный из Всесоюзной коллекции микроорганизмов АН СССР. Культивирование проводили на питательной среде и в условиях, описанных ранее [1]. После удаления биомассы центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 мин бета-фруктофуранозидазу из надосадочной жидкости осаждали 96%-ным этиловым спиртом в соотношении 1:2. Осажденную бета-фруктофуранозидазу отделяли центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 мин, ресуспендировали в дистиллированной воде и лиофильно высушивали.

Силохром С-80 обрабатывали 30 мин 5%-ным раствором гамма-аминопропильтриэтоксисилана в ацетоне. Затем высушивали в сушильном шкафу при температуре 100—110° в течение 6—8 часов. К силохрому со связанными аминопропильными группами добавляли 25%-ный раствор глутарового диальдегида и перемешивали в течение часа при температуре 18—20°. Носитель промывали водой и использовали для иммобилизации бета-фруктофуранозидазы, которую проводили смешиванием 1,5 г силохрома (сухая масса) с 5 мл 0,8%-ного раствора фермента (кроме определения оптимальной концентрации фермента для иммобилизации). Полученную смесь перемешивали на качалке при 150 об/мин в течение 2 ч (кроме определения оптимального времени контакта фермента с носителем) при температуре 18—20°. Иммобилизованный препарат промывали на фильтре хлоридной водой до полного исчезновения белка в промывных водах и использовали в дальнейшем для исследования свойства связанной бета-фруктофуранозидазы.

Активность иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы определяли по следующей схеме: в колбу вносили 80 мг препарата (сухая масса), 2,4 мл 0,15 М фосфатно-цитратного буфера, рН 5,7, и 2,1 мл 0,5%-ной сахарозы. После нукубирования в термостабируемой качалке в течение часа при 50° (скорость вращения—150 об/мин) отбирали пробы для определения редуцирующих веществ по методу Шомли-Нельсона [9, 10].

Активность иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы рассчитывали по количеству образующихся редуцирующих веществ (в ммольях) на 1 г носителя за 1 мин.

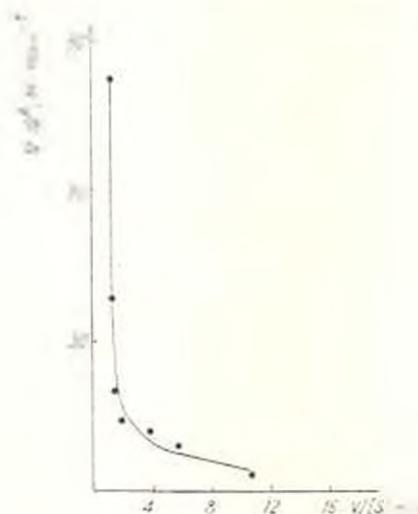
**Результаты и обсуждение.** С целью установления оптимальной концентрации бета-фруктофуранозидазы и времени контакта с носителем ферментные растворы различных концентраций (0,4, 0,8, 1,6, 2,0%) выдерживали с обработанным силохромом в течение 1, 2 и 3 часов. Как видно из данных табл. 1, максимальное количество белка (61,6% от исходного) связывается с носителем при использовании 0,8%-ного раствора бета-фруктофуранозидазы и 2-часовом контакте. Дальней-

Таблица 1. Иммобилизация бета-фруктофуранозидазы на силохроме С-80

Концентрация фермента, %	Время иммобилизации, ч	Количество белка			Активность бета-фруктофуранозидазы		
		в исходном растворе, мг	связавшегося на 1 г носителя	связавшегося на 1 г носителя, % от исходной	в исходном растворе, ед.	связавшегося на 1 г носителя	связавшегося на 1 г носителя, % от исходной
0,4	1	0,15	0,04	26,6	0,33	0,02	6,0
0,4	2	0,15	0,08	53,2	0,33	0,15	45,4
0,4	3	0,15	0,08	53,2	0,33	0,10	30,3
0,8	1	0,24	0,09	40,4	0,55	0,25	45,4
0,8	2	0,24	0,15	64,6	0,55	0,42	76,3
0,8	3	0,24	0,14	61,6	0,55	0,35	63,6
1,6	1	0,44	0,13	30,8	1,29	0,37	28,5
1,6	2	0,44	0,19	42,8	1,29	0,68	52,7
1,6	3	0,44	0,28	63,9	1,29	0,57	44,1
2,0	1	0,54	0,17	32,9	1,29	0,13	8,9
2,0	2	0,54	0,27	51,2	1,29	0,94	64,5
2,0	3	0,54	0,32	61,3	1,29	0,93	63,6

шее повышение концентрации не приводит к существенному увеличению количества связавшегося белка. При этом активность бета-фруктофуранозидазы составляет 76,3% от исходной. Исследование свойств иммобилизованной на силихроме С-80 бета-фруктофуранозидазы *A. pullulans* показало, что связанный фермент не претерпевает особых изменений, кроме небольшого сдвига температурного оптимума с 50° до 60°. Оптимальное значение pH равно 5,5–6,0. Такие же результаты получены Шустровой с соавт. [7] при иммобилизации бета-фруктофуранозидазы на силикагеле МСА-750. Установлено также, что связанный фермент, как и нативный [1], более стабилен при сравнительно низких температурах—18–20° и pH 5,7.

Интересно отметить, что зависимость активности иммобилизованного препарата от концентрации субстрата (в координатах Эди-Хофсти) выражается в виде кривой, не пересекающей оси абсцисс и ординат (рис.), т. е. полного насыщения фермента субстратом в пределах



Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата (0,1–50%) в координатах Эди-Хофсти.

0,1–50%) не происходит. Эта закономерность наблюдается также у нативного фермента [1], что подтверждает положение о существовании двух активных центров у внеклеточной бета-фруктофуранозидазы *A. pullulans*.  $K_m$  активных центров иммобилизованного фермента равны соответственно 0,28 и 1,5 М.

Как и у нативного фермента, у иммобилизованного также отмечается прямо пропорциональная зависимость бета-фруктофуранозидазной активности от концентрации препарата.

При изучении влияния различных соединений на активность связанного фермента выявлены некоторые, хотя и не очень существенные, различия в каталитической активности (табл. 2). Так, если анилин и пиридоксин почти в одинаковой степени ингибируют как нативный, так и иммобилизованный ферменты, то метасиликат натрия больше подав-

ляет активность нативного фермента, а р-хлормеркурибензоат—иммобилизованного. Степень активирования иммобилизованного фермента пиридоксальфосфатом на 29% выше, чем таковая нативного. Глутатион, не влияя на нативную бета-фруктофуранозидазу, вызывает активацию иммобилизованной на 31%.

Таблица 2. Влияние некоторых химических соединений на активность иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы

Соединение $10^{-4}$ М	Активность иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы	
	ед. г носителя	% от контроля
Контроль (без добавок)	0.42	100
Анилин	0.10	24.3
Пиридоксин	0.23	54.0
Натрий кремнекислый	0.28	67.5
р-Хлормеркурибензоат	0.30	70.2
Глутатион окисленный	0.55	131.0
Пиридоксальфосфат	0.61	143.2

Изучение влияния ионов металлов на иммобилизованную бета-фруктофуранозидазу (табл. 3) показало, что наибольшая потеря активности имеет место в присутствии ионов ртути и серебра (94,8 и 86,9% соответственно), которые являются также сильными ингибиторами нативного фермента.

Таблица 3. Влияние различных ионов металлов на активность иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы

Ионы металлов, $10^{-2}$ М	Активность иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы	
	ед. г носителя	% от контроля
Контроль (без добавок)	0.38	100
Pb <sup>2+</sup>	0.40	107.7
Ca <sup>2+</sup>	0.39	102.8
Ni <sup>2+</sup>	0.38	100.0
Co <sup>2+</sup>	0.37	98.9
Zn <sup>2+</sup>	0.34	92.0
Cu <sup>2+</sup>	0.30	81.3
Fe <sup>2+</sup>	0.25	67.4
Cd <sup>2+</sup>	0.25	67.4
Mo <sup>2+</sup>	0.20	54.7
Ag <sup>+</sup>	0.05	13.1
Hg <sup>2+</sup>	0.02	5.2

С целью выявления возможности использования иммобилизованной бета-фруктофуранозидазы с большей эффективностью мы исследовали гидролиз сахарозы в отходах сахарного производства—мелассе, полученной из Спитакского сахарного завода. Содержание сахарозы в мелассе составляло 48—50%. Для проведения реакции мелассу из-за большой вязкости разбавляли дистиллированной водой в 4 раза и использовали в качестве субстрата. Реакция протекала в статических условиях в колбах при 50° при постоянном перемешивании (180 об/мин)

и промывании препарата дистиллированной водой после каждого употребления. Бета-фруктофуранозидаза оказалась достаточно стабильной и практически не утрачивала активности при многократном использовании.

Таким образом, на основании приведенных данных можно заключить, что иммобилизация внеклеточной бета-фруктофуранозидазы *A. pullulans* на силихроме С-80 не приводит к существенным изменениям свойств фермента. Иммобилизованный ферментный препарат можно использовать не только для гидролиза чистых высококонцентрированных растворов сахарозы, но и отходов сахарного производства, содержащих сахарозу, — мелассы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С. Биолог. ж. Армении, 35, 10, 809—811, 1982.
2. Бренман С. А., Марьянич В. Л., Иволго Н. С., Ковальчук В. С. Производство и использование жидкого сахара. М., 1984.
3. Глемжа А. А. Микробные ферменты в народном хозяйстве. Вильнюс, 1985.
4. Клесов А. А. Тез. IV Всесоюз. симп. «Инженерная энзимология», 1, 25—27, Киев, 1983.
5. Клесов А. А. В кн.: Биотехнология. 103—112, М., 1984.
6. Нахлетян Л. А. Тез. IV Всесоюз. симп. «Инженерная энзимология», 1, 41, Киев, 1983.
7. Щустрова Н. И., Стальная Н. Д., Самошина Н. М., Нахлетян Л. А. Прикл. биохим. и микробиол., 16, 5, 780—783, 1980.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 265—275, 1951.
9. Nelson N. J. J. Biol. Chem., 153, 1, 375—380, 1941.
10. Somogyi M. J. Biol. Chem., 195, 1, 19—23, 1952.

Поступило 15.XII 1987 г.

Биолог. ж. Армении, т. 41, № 2, 1988

УДК 577.15.08.154

### ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМОФИЛЬНОЙ БАЦИЛЛЫ

А. М. БАЛЯН, В. А. АБЕЛЯН, Л. С. МАРКОСЯН

Институт микробиологии АН АрмССР, г. Абовян

Изучена возможность биоконверсии крахмала в сахаристые продукты с помощью термофильного штамма *Bacillus sp.*

Показано, что нативные и стабилизированные клетки обладают пуллулазазной и амилolyтической активностью; при гидролизе крахмала указанным штаммом в зависимости от продолжительности процесса образуются мальтоза и глюкоза.

Առավանդատեսությամբ է ուսումնասիրվել հարմարանոթների *Bacillus sp.* սերմնաֆիշտամբի միջոցով Պարզվել է, որ էնչպե՛ս միկրոօրգանիզմն օժտված է պուլլուլանազային և ամիլոլիտիկ ակտիվությամբ: Կախված հիդրոլիզի տևողությունից ստանան արալոզիդում է մինչև մալտոզայի և գլյուկոզայի:

The possibility of starch hydrolysis into sugar products by means of native and stabilized cells of the thermophilic strain *Bacillus sp.* is studied.