

ՀԱՅԻՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ

«ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԻՏԱԱՐՏԱԴՐԱԿԱՆ ԿԵՆՏՐՈՆ ՊՈԱԿ

ԴՅՈՒԿՈՎԱ ԿԱՐԻՆԵ ԳԵՈՐԳԻԻ

ԿԵՆՍԱՏՐԱՆՍՖՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ԵՂԱՆԱԿՈՎ L-ԹԻՐՈՋԻՆԻ և D-ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԹՎԻ
ՍՏԱՑՄԱՆ ԿԱՏԱՐԵԼԱԳՈՐԾՎԱԾ ՄԵԹՈԴՆԵՐԻ ՄՇԱԿՈՒՄ

Գ.00.14 – « Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ
քիմիական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

Երևան 2011

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЦЕНТР «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» ГНКО

ДЮКОВА КАРИНЕ ГЕОРГИЕВНА

РАЗРАБОТКА УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫХ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ
L-ТИРОЗИНА И D-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ БИОТРАНСФОРМАЦИЕЙ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук
по специальности 03.00.14 – «Биотехнология»

Ереван – 2011

Ատենախոսության թեման հաստատվել է «Կենսատեխնոլոգիա ԳՀԻ» ՓԲԸ (ներկայում ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ) գիտական խորհրդում:

Գիտական ղեկավար՝

քիմ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր
Ղ. Պ. Հալեբյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, քիմ. գիտ. դոկտոր
Ա. Ա. Շահինյան

քիմ. գիտ. թեկնածու Ա. Ռ. Միքայելյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի Պետական Համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2011 թ. դեկտեմբերի 16-ին ժամը 16⁰⁰ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՂ-ի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցեն 0056, ՀՀ Երևան, Գյուրջյան փող.14, հեռ/ֆաքս՝ (37410) 654183:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2011 թ. նոյեմբերի 16-ին

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու՝

Գ. Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета ЗАО «НИИ Биотехнологии» (ныне НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА).

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Г. П. Алебян

Официальные оппоненты:

академик НАН РА, доктор химических наук
А. А. Шагинян

кандидат химических наук
А. Р. Микаелян

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 16 декабря 2011 г. в 16⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 018 ВАК РА при НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/факс (37410)654183.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА.

Автореферат разослан 16 ноября 2011 г.

Ученый секретарь специализированного совета,
кандидат биологических наук

Г. Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В связи с неуклонно растущей потребностью в белковых и небелковых аминокислотах, происходит углубленное изучение существующих методов их получения и поиски новых способов, пригодных для практического использования. (The 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins. August 1-5, 2011, Beijing, China). Существующие на сегодняшний день технологические способы производства аминокислот в основном базируются на методах микробиологического синтеза и биотрансформации. Эти методы не только взаимно дополняют друг друга, но и, в определенном смысле, являются конкурирующими. В настоящее время большинство природных аминокислот производятся методом микробиологического синтеза. Однако, данный метод, несмотря на очевидные преимущества (унифицированность и доступность сырья, наличие типового оборудования и др.), обладает рядом недостатков, среди которых два наиболее существенных - это большие капитальные затраты при организации производства и необходимость в больших, имеющих стратегическое значение, ферментаторах. Осуществить такое производство под силу государствам, обладающим мощным экономическим потенциалом. В отличие от микробиологического синтеза, биотрансформационный метод получения аминокислот является несравнимо доступнее в реализации. Это, в частности, связано с использованием сравнительно небольшого количества биомассы, необходимого для приготовления биокатализатора, простотой, компактностью производственных технологических линий, отсутствием необходимости в больших капитальных вложениях для организации производства, экономичностью и рентабельностью даже малотоннажного производства.

Известные на сегодняшний день технологии получения некоторых аминокислот, основанные на биотрансформации, где в качестве исходного сырья используется фумаровая кислота, стали стартовыми для реализации технологий получения целого ряда новых соединений. Круг соединений, получаемых из фумаровой кислоты, значительно увеличился за последнее время, что в перспективе открывает еще более широкие возможности. Исходя из фумаровой кислоты можно получить L-яблочную, L- и D-аспарагиновые кислоты, L- α -аланин и β -аланин, L-фенилаланин L-тирозин, L-триптофан и L-ДОФА, аспаркам (панангин), аспартам (подсластитель) и др.

В настоящее время как в нашей республике, так и во всем регионе (РФ, Грузия, Азербайджан, Турция, Иран и т.д.) аминокислоты не производятся.

Вследствие указанных выше причин, безусловно, данная работа, посвященная биотрансформационному получению D-аспарагиновой кислоты и L-тирозина, является весьма важной и актуальной.

Цель исследований. Целью данной работы является усовершенствование биотрансформационных процессов получения L-тирозина и D-аспарагиновой кислоты, которые согласно разработанному нами подходу, входят в перечень продуктов, для которых фумаровую кислоту можно рассмотреть в качестве первичного исходного сырья.

Для достижения поставленной цели проведены следующие основные исследования:

1. Проведен критический обзор биотрансформационных методов получения L-тирозина и D-аспарагиновой кислоты и выявлены их основные недостатки.
2. Для радикального повышения эффективности биотрансформационного процесса синтеза L-тирозина из фенола, пирувата и ацетата аммония, разработан и исследован новый биокатализатор, иммобилизованной на твердой подложке тирозин-фенол-лиазы (ТФЛ) из клеток *C. freundii* (DMMSU-115)
3. Проведены исследования для разработки оптимальных условий: а) культивирования бактериальных клеток *C. freundii* и биосинтеза ТФЛ, б) выделения и очистки ТФЛ из *C. freundii*.
4. Для упрощения и улучшения экологических характеристик одновременного производства D-аспарагиновой кислоты и L-аланина исследован процесс декарбоксилирования D,L-аспарагиновой кислоты под действием L-аспартат- β -декарбоксилазы *Ps. docunhae* (ATCC-21192), в условиях, при которых для поддержания оптимального значения рН

реакционной среды, в качестве титранта, используется кристаллическая (свободная) D,L-аспарагиновая кислота.

5. Определены кинетические характеристики процессов получения L-тирозина и D-аспарагиновой кислоты.

Научная новизна.

- Получен, испытан и описан новый биокатализатор, иммобилизованной на твердой подложке ТФЛ из клеток *C. freundii*, период полуинактивации которого, составляет 25 суток и по данному параметру превосходит все известные в 5-20 раз.
- Разработанный биокатализатор, иммобилизованной ТФЛ, предназначен для многократного использования и способен функционировать при высоких концентрациях фенола.
- Показана эффективность применения микроволновой радиации для рацемизации L-аспарагиновой кислоты.
- Разработаны научные основы для усовершенствования биотрансформационных методов получения L-тирозина из фенола, пирувата и ацетата аммония, а также D-аспарагиновой кислоты одновременно с L-аланином из D,L-аспарагиновой кислоты.

Практическая ценность.

- Разработана принципиальная схема усовершенствованного метода одновременного получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина ферментативным декарбоксилированием D,L-аспарагиновой кислоты.
- Разработан новый биокатализатор, иммобилизованной ТФЛ на твердом носителе, который удовлетворяет основным требованиям предъявляемым к биокатализаторам промышленного значения.
- Разработана принципиальная схема усовершенствованного метода получения L-тирозина из фенола, пирувата и ацетата аммония.

На защиту выносятся:

- Результаты исследований по подбору оптимального состава питательной среды для выращивания *C. freundii* (DMMSU-115). Результаты выделения и очистки тирозин фенолазы *C. freundii*.
- Результаты проведенной иммобилизации и исследований свойств и характеристик иммобилизованной ТФЛ.
- Результаты исследований кинетических характеристик биотрансформационного процесса с участием L-аспарат-β-декарбоксилазы штамма *Ps. docunhae* (ATCC-21192).
- Результаты оптимизации биотрансформационного процесса одновременного получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина (использования базовой концентрации субстрата и контроля pH реакционной смеси с помощью кристаллического субстрата).
- Результаты подбора условий кристаллизации D-аспарагиновой кислоты.
- Принципиальные схемы синтеза L-тирозина, а также одновременного получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина.

Связь работы с научными тематиками. Работа выполнена в рамках базового и тематического финансирования Госбюджетных тем РА.

Личный вклад соискателя. Собственный вклад включает постановку задач совместно с руководителем, решение поставленных задач, поиск и анализ научной литературы по теме, выполнение экспериментальных работ и оформление диссертационной работы. Анализ и обобщение полученных результатов исследований, оформление научных статей и патента проведены совместно с соавторами и научным руководителем.

Апробация диссертации. Результаты работы докладывались и обсуждались на семинарах лаборатории Инженерной Энзимологии и на заседании ученого совета НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА. Материалы диссертации представлены на международных конференциях „Biotechnology and the present”, St. Petersburg, 2004; “EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme”, St. Petersburg, 2006; “Advanced Biotechnology. Perspectives of Development in Armenia”, RA, Tsakhkadzor, 2006.

Место выполнения работы. Работа выполнена в НПЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Структура работы. Диссертация изложена на 143 страницах, состоит из 4 глав, содержит 13 таблиц, 32 рисунка, 283 наименований цитируемой литературы.

Публикации. Основные результаты исследований, изложенные в диссертационной работе, опубликованы в 7 работах (3 тезиса международных научных конференций, 1 патент РА и 3 научные статьи).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В первой части литературного обзора приводится описание областей применения и анализ мирового рынка аминокислот. Учитывая характер представленного материала и тематику диссертационной работы, в литературном обзоре основное внимание уделено биотехнологическим методам получения хиральных аминокислот, в том числе L-тирозина и D-аспарагиновой кислоты. Проведен анализ известных из литературы промышленных методов получения L-тирозина и D-аспарагиновой кислоты, основанных на применении пиридоксальзависимых ферментов: L-аспартат-β-декарбоксилазы и тирозин-фенол-лиазы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы, реактивы

В данном разделе главы описаны использованные приборы, материалы и реактивы, составы растворов и питательных сред, бактериальные штаммы.

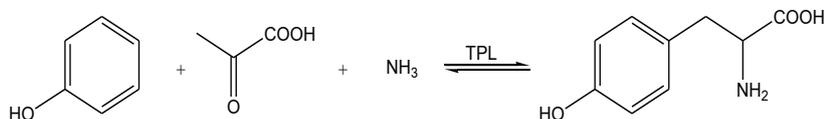
2.2. Методы исследований

В разделе главы описаны экспериментальные методы культивирования бактерий *C. freundii* (DMMSU-115) и *Ps. docunhae* (ATCC-21192); методы выделения и очистки тирозин-фенол-лиазы (ТФЛ), а также метод определения ее чистоты. Приводятся техники иммобилизации очищенной ТФЛ и рацемизации L-аспарагиновой кислоты; методы измерения активностей ТФЛ и L-аспартат-β-декарбоксилазы (АДК); методы определения стабильности, температурных и pH оптимумов свободной и иммобилизованной ТФЛ, а также экспериментальные методы определения кинетических параметров и способы их расчетов.

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. ЭНЗИМАТИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ L-ТИРОЗИНА

Данная часть работы посвящена разработке технологической схемы биотрансформационного процесса получения L-тирозина. Биотрансформационный метод получения L-тирозина основан на реакции присоединения фенола, пировиноградной кислоты и аммония, которая катализируется ферментом тирозин-фенол-лиазой.



В связи с актуальностью применения данного процесса для промышленного производства, реакция синтеза тирозина из фенола, пировиноградной кислоты и аммония была протестирована в различных реализациях ТФЛ: от использования в качестве биокатализаторов целых (Enei et al. 1973b; Куплетская 1981) и иммобилизованных клеток (Para et al. 1985; Тысячная и др. 1984; Тысячная и др. 1985; Pioselli et al. 2004; Lloyd-George and Chang 1993; Lloyd-George and Chang 1995) до прямого применения очищенных (Yamada et al. 1972; Nagasawa et al. 1981, Kim Do Yang et al. 2007) и иммобилизованных ферментов (Fukui et al. 1975a; Fukui et al. 1975 b). Однако, использование в качестве катализатора свободных клеток и очищенного фермента, вызывало многочисленные проблемы, в том числе, необратимое угнетение ТФЛ фенолом и образование больших скоплений клеточных агрегатов с осадком

L-тирозина в реакционной среде, что приводило к потере активности и постепенному снижению скорости синтеза ($t_{1/2}$ - 12-15 часов). Биокатализаторы на основе иммобилизованной ТФЛ, полученные методом включения в различные гели, не нашли широкого применения, так как оказались не технологичными по причине низкой каталитической стабильности иммобилизованной ТФЛ ($t_{1/2}$ - 24 часа) и недостаточной механической прочности матрицы.

Для повышения эффективности биотрансформационного процесса синтеза L-тирозина, нами разработан и исследован новый биокатализатор на основе иммобилизованной на твердой подложке ТФЛ из клеток *C. freundii* (DM MSU-115). Проведены исследования для разработки оптимальных условий культивирования бактериальных клеток *C. freundii* и биосинтеза ТФЛ, а также выделения и очистки ТФЛ из *C. freundii*. Определены кинетические характеристики процесса получения L-тирозина. Предложена технологическая схема процесса.

3.1.1. Разработка оптимальных условий культивирования бактериальных клеток *C. freundii* и биосинтеза ТФЛ.

С целью определения влияния состава среды на активность ТФЛ, проведен подбор оптимального состава питательной среды для выращивания клеток *C. freundii*, продуцирующих фермент ТФЛ. Опробированы синтетические и полноценные среды с некоторыми вариациями добавок, всего 11 сред. Результаты полученных данных, характеризующие удельную ТФЛ активность клеточных экстрактов, общий выход биомассы и суммарную активность в зависимости от состава питательной среды, представлены в табл. 1.

В результате проведенной работы выяснилось, что бактерии *C. freundii* обнаруживают высокую ТФЛ активность при выращивании как на богатых средах на основе мясо-пептонного бульона (МПБ) и гидролизатов БВК и сои, так и на разработанной нами синтетической среде № 10 с добавлением L-аспарагиновой кислоты.

Таблица 1.

Общий выход биомассы и удельная активность ТФЛ в зависимости от состава питательной среды.

Среда №	Общий выход биомассы (г/л) среды	Удельная активность, Ед/мг	Общая Активность Ед
1. МПБ + добавки	9.91	0.204	202,0
2. Гидролизат БВК +	10.36	0.227	235,0
3. Гидролизат сои+	9.89	0.232	229,0
4. L-тург+	0.31	0,009	0,3
5. L-тург, дрож. экстр.+	10.17	0.176	179,0
6. Глицерин+	0	0	0
7. Глицерин, дрож. экстр.	1.64	0	0
8. Глюкоза+	0	0	0
9. Глюкоза, дрож. экстр.	1.22	0	0
10. L-aspar+	8,46	0.330	279,0
11 L-aspar, дрож.экстр.+	10, 50	0,053	55,0

Предлагаемая нами синтетическая среда с добавлением L-аспарагиновой кислоты обеспечивает быстрый рост культуры с высокой удельной ТФЛ активностью. Данная среда была нами использована в последующих экспериментах для получения биомассы клеток *C. freundii*.

3.1.2. Метод очистки ТФЛ из клеток *C. freundii*. Изучение свойств и характеристик очищенной ТФЛ.

Для исследования физико-химических характеристик ТФЛ и ее дальнейшей иммобилизации, было проведено выделение фермента и его очистка. Примененный метод очистки ТФЛ из клеток *C. freundii* состоит из трех этапов: хроматографию на ионообменнике,

содержащем ДЭАЭ - тойоперл 650М, хроматографию на гидроксипатите и гель – фильтрацию через тойоперл 55F. После обессоливания и концентрирования, получили фермент с высоким выходом. Была достигнута удельная активность ТФЛ равная 1,41 Ед/мг, что соответствует показателям значений активности очищенных препаратов ТФЛ, известных из литературы (Kumagai et al. 1970; Демидкина и др. 1984; Сысуев и др.1980). В результате очистки значение удельной активности фермента увеличилось в 6,1 раз, а общий выход составил 40,2 % (табл.2).

Таблица 2.

Результаты очистки ТФЛ из *C. freundii*.

Этапы	Объем, мл	Белок, мг/мл	Удельная акт., Ед/мг	Выход. %
Разрушение и получение клеточного экстракта	56	15,9	0,23	100,0
Хроматография на ДЭАЭ- тойоперл 650М	45	3,2	0,65	45,1
Хроматография на гидроксипатите	10	7,5	1,22	44,8
Гель-фильтрация через тойоперл 55F	15	3,9	1,41	40,2

Методом аналитического электрофореза в 7,7 % полиакриламидном геле проведена оценка степени чистоты полученного препарата ТФЛ. Показано наличие единственной белковой полосы, соответствующей активности ТФЛ.

Методом гель - фильтрации определена молекулярная масса ТФЛ из *C. freundii*, которая составляет 205 КДа. Для сравнения отметим, что согласно японским исследователям молекулярная масса ТФЛ из *E. Intermedia* - 170 КДа (Kumagai et al. 1970), а ТФЛ из *E. herbicola* - 259 КДа (Kumagai et al. 1972).

Данный фермент имеет температурный оптимум около 35 °С и рН оптимум около 8,5. При хранении очищенного фермента в 50 мМ К,Na-фосфатном буфере (рН 8,0) с 10 мМ, меркаптоэтанола (МЭ) в течение трех суток при температуре 4 °С, его активность снижается в 10 раз, а по истечении 15 суток фермент инактивируется полностью, в то время, как при хранении в глицерине с МЭ в течение 15 суток активность ТФЛ снижается в 2 раза, а по истечении 2 месяцев в 10 раз.

3.1.3. Ковалентная иммобилизации очищенной ТФЛ. Изучение свойств и характеристик полученного биокатализатора.

Учитывая отрицательный опыт иммобилизации методом включения в гели, иммобилизация ТФЛ нами была проведена на поверхности твердых носителей. В качестве носителей были использованы силикагель и силохром.

Характеристики иммобилизованной ТФЛ. Иммобилизация ТФЛ была проведена ковалентно на поверхности модифицированных и немодифицированных силанизированных носителей, с применением глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. В результате иммобилизации нами было получено 5 образцов иммобилизованного фермента (1а, 1 б, 2а, 2 б, 2в), характеристики которых приведены в табл. 3.

Сравнение характеристик полученных биокатализаторов показывает, что сохраненная активность ТФЛ после иммобилизации на силохроме составляла 3-10 %, а на силикагеле 1-5 %. Такой результат можно объяснить или слишком жесткой фиксацией фермента на носителе, ограничивающей его конформационную подвижность и, следовательно, затрудняющей доступ к нему субстрата, или тем, что при фиксации фермента через аминокгруппы затрагиваются структуры, входящие в состав его каталитического центра. Последнее предположение наиболее вероятно, так как хорошо согласуется с литературными данными о том, что в каталитический центр фермента входят именно аминокгруппы (Antson et al. 1993).

Таблица 3.

Характеристики иммобилизованной ТФЛ.

Образцы иммоб. ТФЛ	Связ. белок (мг/г _{кат})	ТФЛ активность иммоб. фермента (Ед/г _{кат})	Сохран. ТФЛ Активность (%)	Глубина превр. фенола за 24 часа (%)
1a	12,7	0,200	4,3	72,2
1b	14,9	0,098	1,8	48,7
2a	10,1	0,363	10,0	90,6
2b	11,2	0,192	4,8	71,2
2c	17,5	0,147	3,4	78,0

1a - фермент, иммобилизованный на силикагеле;

1b - фермент, иммобилизованный на силикагеле с полимерным покрытием;

2a - фермент, иммобилизованный на силихроме;

2b - фермент, иммобилизованный на силихроме с полимерным покрытием;

2c - фермент, иммобилизованный на силихроме, обработаном диметилхлорсиланом.

Количество связанного белка в случае модифицированных носителей больше, однако, при этом наблюдается не увеличение активности фермента в результате иммобилизации, а ее снижение. Анализ полученных данных показывает, что модификация не способствовала увеличению активности полученных биокатализаторов. Наиболее высокая ТФЛ активность наблюдается у биокатализатора 2a, который был получен в результате иммобилизации ТФЛ на поверхности силанизированного силихрома без дополнительной модификации носителя.

Исследования, проведенные с иммобилизованной ТФЛ, показали, что все полученные образцы синтезируют тирозин из фенола пирувата и ацетата аммония с разной степенью конверсии от 48,7 % до 90,6%.

Синтез тирозина. На рис. 1 представлена кинетическая кривая расхода фенола в реакции синтеза тирозина, при участии иммобилизованной ТФЛ. Реакционная смесь (общий объем 10 мл) содержала: 0,1 М фенола, 0,45 М пирувата натрия, 0,6 М ацетата аммония, 10^{-4} М пиридоксальфосфата. Реакцию проводили при постоянном интенсивном перемешивании, при pH 8 и температуре 30⁰С. Концентрацию фенола определяли спектрофотометрически по поглощению при $\lambda = 268$ нм, а концентрацию тирозина - на аминокислотном анализаторе.

Реакция протекает с большой глубиной превращения ~ 90% по отношению к исходному содержанию фенола. Здесь, необходимо отметить, что при одинаковой глубине конверсии иммобилизованная ТФЛ осуществляет синтез тирозина несколько медленнее, чем растворимая ТФЛ.

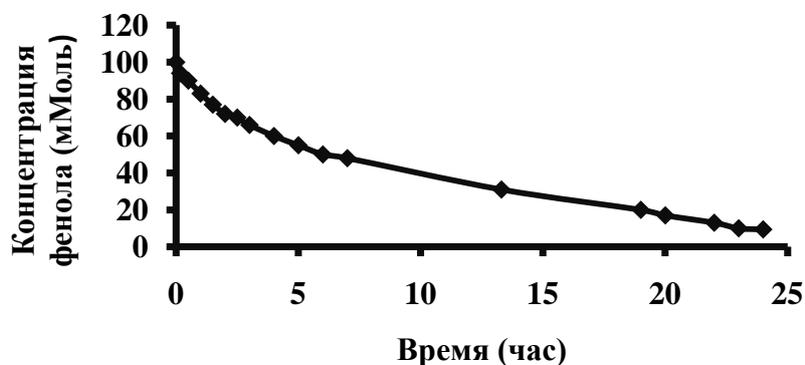


Рис. 1. Кинетика расхода фенола в реакции синтеза тирозина при участии иммобилизованной ТФЛ. Концентрация иммобилизованной ТФЛ - 1 мг/мл.

Определение стабильности иммобилизованной ТФЛ. Результаты исследований динамики инактивации иммобилизованной ТФЛ при синтезе тирозина в периодическом режиме приведены в табл. 4.

Таблица 4.

Динамика инактивации иммобилизованной ТФЛ при синтезе тирозина в периодическом режиме.

Образцы Иммобилиз. ТФЛ	Время измерения ТФЛ активности (сутки)						Период полу- инактивации $t_{1/2}$ биокатали- затора (сутки)
	0	6	13	21	28	38	
	ТФЛ активность (Ед/г _{кат})						
1a	0,200	0,208	0,262	0,069	0,017	0	18
1б	0,098	0,068	0,016	0			8
2a	0,360	0,394	0,388	0,380	0,126	0,030	25
2б	0,192	0,196	0,068	0,0168	0		12
2с	0,147	0,247	0,315	0,290	0,077	0	25

$t_{1/2}$ для растворимого фермента 12-15 часов

Как видно из таб. 4, период полуинактивации различных образцов иммобилизованной ТФЛ составляет от 190 до 600 ч (8 - 25 сут), в то время, как для интактных клеток и частично очищенного фермента этот показатель равен 12 - 15 ч (Куплетская 1981; Kim Do Yang et al. 2007).

Следует отметить, что практически для всех образцов иммобилизованной ТФЛ, в первые несколько циклов эксплуатации, наблюдали некоторое увеличение активности, что, возможно, объясняется увеличением доступности фермента для субстрата. В течение более чем 20 суток активность биокатализатора 2a сохранялась на высоком уровне, после чего начинала проявляться инактивация. В итоге, за 38 циклов эксплуатации биокатализатора 2a, было синтезировано максимальное количество тирозина (табл. 5).

Таблица 5.

Производительность иммобилизованной ТФЛ в реакции синтеза L-тирозина (продолжительность одного цикла - 24 часа).

Образцы иммобилиз. ТФЛ	Кол-во циклов синтеза	Суммарное количество синтезированного L-тирозина, г/г белка	Суммарное количество синтезированного L-тирозина г/г _{кат} .
1a	26	86,6	1,1
1b	11	13,4	0,2
2a	38	207,9	2,1
2b	15	53,5	0,6
2с	28	80,0	1,4

Суммарная производительность иммобилизованной ТФЛ (образец 2a) за указанное время составила ~200 г тирозина/ г белка, в то время, как для растворимой ТФЛ в виде интактных клеток *C. freundii* она составляет ~ 40 г тирозина/ г белка (Куплетская 1979), а для частично очищенного фермента термостабильной *S. toebii* ~ 30 г тирозина/ г белка (Kim Do Yang, et al. 2007).

Определение температурного и pH максимумов. Для исследования физико-химических свойств иммобилизованной ТФЛ нами был выбран образец 2a, обладающий наилучшим сочетанием активности и стабильности.

Как видно из рис. 2 (А), зависимость каталитической активности иммобилизованного фермента от pH имеет отчетливо выраженный pH максимум при значении pH 9, который примерно на 0,5 ед. смещен в щелочную область по сравнению с pH максимумом нативного фермента. Температурный максимум активности иммобилизованной ТФЛ равен 50 °C и по

сравнению с аналогичным показателем для растворимого фермента смещен на 15 градусов в область более высоких температур. Это характерно для большинства иммобилизованных ферментов и объясняется повышением устойчивости к тепловой денатурации за счет ограничения степеней свободы в молекуле фермента (рис. 2 В).

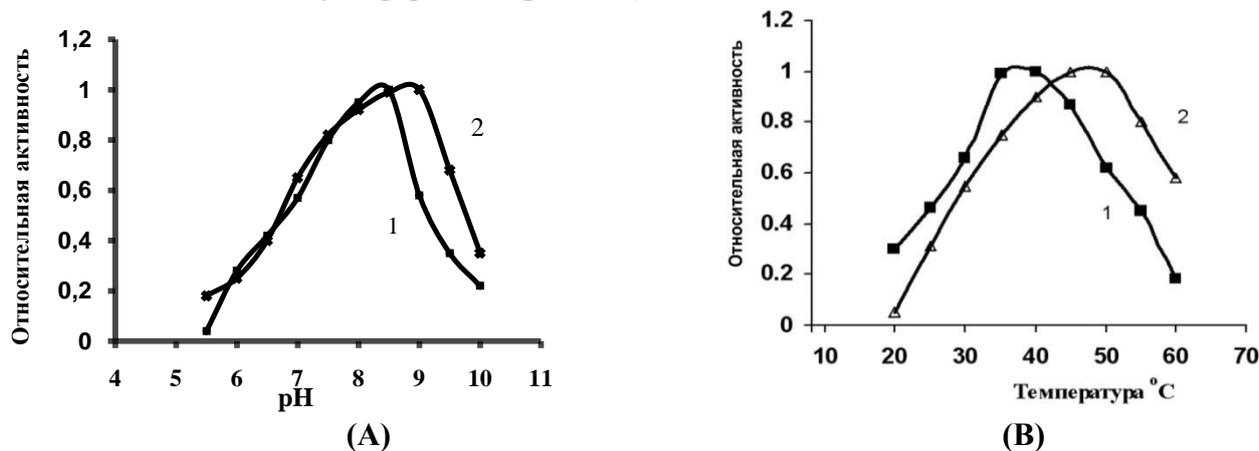
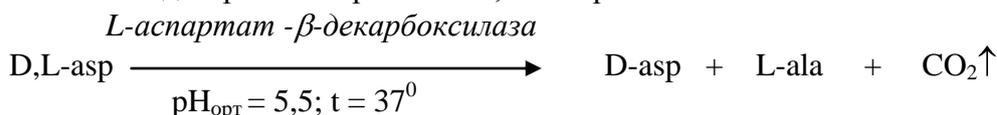


Рис. 2. Влияние pH (А) и температуры (В) на активность свободной и иммобилизованной ТФЛ: 1 – свободная ТФЛ; 2 – иммобилизованная ТФЛ.

После хранения иммобилизованной ТФЛ в буфере в течение 6 месяцев она сохраняет свою активность (~8%), в то время, как растворимая ТФЛ в тех же условиях полностью инактивируется через 15 суток. Таким образом, в результате иммобилизации значительно увеличивается срок хранения биокатализатора.

3.2. ПОЛУЧЕНИЕ D-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ И L-АЛАНИНА ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАНИЕМ D,L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

В основе производственного метода получения D-аспарагиновой кислоты лежит реакция ферментативного декарбоксилирования D,L-аспарагиновой кислоты.



Если кратко охарактеризовать данную реакцию, то необходимо подчеркнуть следующее: 1) реакция сопровождается газовыделением; 2) протекает с повышением pH, которая, при полной конверсии субстрата, достигает значения pH 8,7; 3) повышение pH способствует активизации аланин рацемазы; 4) D-asparagin обратимо ингибирует декарбоксилазную активность; 5) при полном декарбоксилировании L-изомера, в реакционной системе образуются два продукта, которые необходимо выделить в чистом виде.

Анализ известных из литературы методов получения D-аспарагиновой кислоты показал, что pH реакционной среды не удается поддерживать на уровне оптимального значения $\text{pH}_{\text{opt}} = 5,5$. Существует единственная производственная технология, с применением колонного биоореактора, работающего под давлением, при использовании которой происходит полное растворение CO_2 , при этом pH в осевом направлении меняется от 6,2 до 7,5. Повышение pH приводит к двукратному снижению эффективности эксплуатации биокатализатора и создает условия для повышения активности аланинрацемазы (Senuma et al. 1989). Другой метод, где регулирование pH реакционной среды осуществляется минеральной кислотой (Pat. Jap., Kato et al. 1982), в итоге приводит к дополнительному накоплению в реакционной среде большого количества аммониевой соли минеральной кислоты, что осложняет технологический процесс выделения и очистки продуктов. При использовании высоких концентраций субстрата (~ 3М)

значительное снижение скорости декарбоксилирования объясняется ингибирующим действием D-аспарагиновой кислоты (Senuma et al. 1989).

Для разработки эффективной технологии получения D-asp необходимо решить три проблемы: поддерживать pH реакционной среды на уровне оптимального значения, устранить помехи, вызываемые газовой выделением и разделить D-asp и L-ala в виде чистых продуктов.

Исходя из вышесказанного, для повышения эффективности биотрансформационного процесса, нами исследовано ферментативное декарбоксилирование D,L-аспарагиновой кислоты под действием L-аспарат-β-декарбоксилазы *Ps. docunhae* (ATCC-21192) в реакторе с перемешиванием и свободным удалением газообразного CO₂. В качестве субстрата используется 1М раствор D,L-asp, а для поддержания оптимального значения pH реакционной среды применяется кристаллическая (свободная) D,L-asp. Определены кинетические характеристики ферментативного декарбоксилирования D,L-asp. Исследован процесс выделения D-asp и L-ala в чистом виде. Предложена технологическая схема процесса получения D-asp.

3.2.1. Рацемизация L-asp.

Для получения D-asp в качестве исходного сырья мы использовали L-asp. Была проведена термо-химическая рацемизация L-asp, которая состояла из двух этапов. Первый этап – термическая обработка водного раствора L-asp, осуществлена нами в реакторе под воздействием микроволновой радиации в течение 2 минут, в то время как обычный процесс автоклавирования, с применением высокой температуры и давления, длится 2 часа. Вследствие воздействия микроволновой радиации, длительность второго этапа – кипячение в соляной кислоте, по сравнению с обычным процессом сократилась с 7 ч до 5 ч. В результате рацемизации, полученные нами кристаллы имели значение удельного вращения D,L-asp $[\alpha]_d^{20} - 0^{\circ}$ ($c = 4,6$ в 6N HCl), что дает основание констатировать, что технику микроволновой радиации (MAOS) можно с успехом, использовать для ускорения и упрощения процесса рацемизации L-asp. По сравнению с методом рацемизации, описанным в литературе, нам удалось существенно сократить время проведения процесса и значительно снизить его энергозатраты. (Патент РА, Дюкова и др. 2007).

3.2.2. Определены кинетических характеристик процесса получения D-аспарагиновой кислоты.

Биотрансформация D,L-аспарагиновой кислоты. Стадию энзиматического превращения L-asp в L-ala из D,L-asp с сохранением D-asp осуществляли с использованием свободных клеток микроорганизмов, обладающих L-аспарат-β-декарбоксилазной активностью *Ps. docunhae*.

Кинетика декарбоксилирования D,L-asp. На рис. 3. представлены кривые изменения концентрации субстрата, продуктов реакции и pH в течение биотрансформационного процесса, при исходной концентрации D,L-asp 1М и использовании кристаллической D,L-asp в качестве титранта.

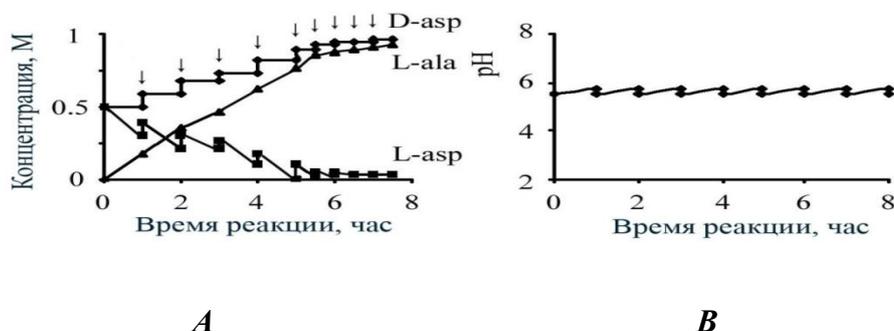


Рис. 3. Кривые изменения концентрации субстрата, продуктов реакции и pH в течение процесса декарбоксилирования: (А) – начальная концентрация D,L-asp 1М (биокатализатор в

виде препарата свободных клеток, ПФ (10^{-4} М), пируват (10^{-3} М); температура в реакционной среде 37°C ; титрант – кристаллическая D,L-asp); (B) – рабочий диапазон рН (5,5-5,7).

Анализ кривых показывает, что использование базовой концентрации субстрата (1 М раствор аммониевой соли D,L-asp) с поддержанием рН реакционной смеси путем добавления кристаллической D,L-asp, позволяет проводить процесс биотрансформации до конверсии субстрата $\sim 95\%$ практически с постоянной скоростью. Это означает, что при поддержании рН реакционной среды на заданном оптимальном уровне 5,5-5,7 не наблюдается снижение скорости трансформации за счет исчерпания субстрата и/или ингибирования продуктами реакции. Последние факторы, вероятно, могут оказывать влияние при значениях конверсии выше 95%.

3.2.3. Влияние различных факторов на активность и стабильность

L-аспартат- β -декарбоксилазы.

Влияние концентрации L-аспарагиновой кислоты на скорость ее ферментативного декарбоксилирования. Зависимость начальной скорости реакции декарбоксилирования L-аспарагиновой кислоты от концентрации L-asp [s] (0 - 1000 mM) - $V=f(S)$, в среде 2,0 mM бифталатного буфера при участии ферментного препарата АДК, имеет вид равнобочной гиперболы и является типичной для ферментативных реакций. Преобразование данной зависимости в координатах Лайнуивера-Берка показало, что насыщение фермента субстратом протекает в две стадии (ри. 4).

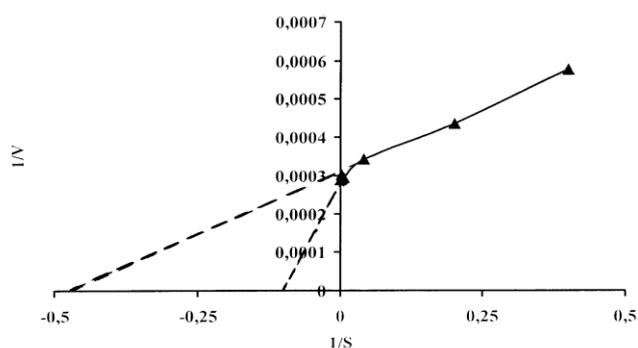


Рис. 4. Зависимость начальной скорости [v] декарбоксилирования L-asp ферментным препаратом клеток микроорганизмов, обладающих АДК активностью от концентрации L-asp [s] в координатах Лайнуивера-Берка.

Данные стадии характеризуются различными концентрационными параметрами насыщения (K_m). Два предельных значения параметра насыщения катализатора субстратом: $K_{m1} = 4,5 \times 10^{-4}$ М при $[L\text{-asp}] < 10^{-3}$ М и $K_{m2} = 1 \times 10^{-3}$ М при $[L\text{-asp}] > 10^{-3}$. Полученное значение $K_{m2} = 1 \times 10^{-3}$ М говорит о том, что для 0,5 М раствора L-asp, даже при конверсии 90%, концентрация субстрата в реакционной смеси $[L\text{-asp}] > 10K_{m2}$, вследствие чего, снижения скорости реакции по мере потребления субстрата не происходит.

Влияние концентрации L-аланина на скорость декарбоксилирования L-аспарагиновой кислоты. Увеличение концентрации L-аланина даже до значений, насыщающих реакционную среду, практически не влияет на скорость ферментативного декарбоксилирования D,L-аспарагиновой кислоты. Нами проведен анализ течения реакции также в условиях образования кристаллического продукта в реакционной среде. Согласно полученным данным, при использовании свободных клеток, после начала выпадения кристаллов продукта в реакционной среде, скорость декарбоксилирования не претерпевала изменений.

Ингибирование L-аспартат- β -декарбоксилазной активности D-аспарагиновой кислотой. Описанное в литературе торможение реакции, вследствие ингибирования D-asp, нами не наблюдалось (см. рис. 3). Поэтому были проведены дополнительные исследования и определен тип ингибирования L-аспартат- β -декарбоксилазы D-аспарагиновой кислотой. По-

лучены значения начальной скорости реакции декарбоксилирования для различных концентраций субстрата L-asp при изменении концентрации ингибитора D-asp (рис. 5).

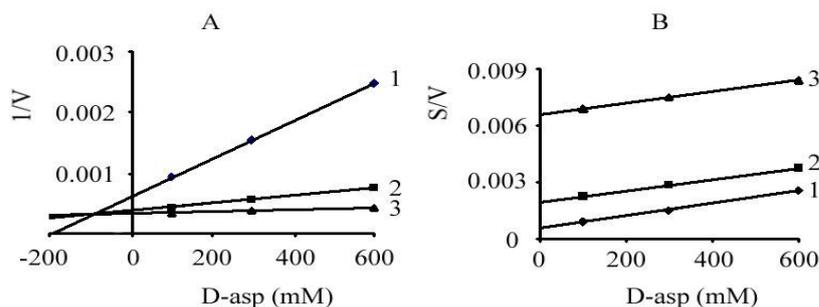


Рис. 5. Зависимости $1/V$ от $[D-asp]$ (а), и S/V от $[D-asp]$ (б), при $[L-asp]$: 1- 1mM, 2 - 5mM, 3 - 20mM.

Анализ графических данных позволяет предположить, что рассматриваемая реакция ингибируется по конкурентному механизму. На основании данного предположения, методом многомерного линейного регрессионного анализа (Корниш-Боуден 1979), рассчитаны значения кинетических параметров и получены следующие результаты: $K_m = 1,14 \pm 0,39$ мМ, $V_{max} = 3210,06 \pm 171,39$ мМ/час, $K_i = 118,44 \pm 5,98$ мМ. Значение константы Михаэлиса, полученное нами, сопоставимо с данными литературы (Алебян 1990; Tate 1970).

На основании известной формулы, описывающей механизм конкурентного ингибирования $V = V_{max}S / [K_m(1 + i/K_i) + S]$, и полученных нами кинетических параметров, были рассчитаны величины начальной скорости для высоких концентраций субстрата и ингибитора. На рис. 6. отображены кривые, полученные экспериментальным (1) (Senuma 1989) и расчетным (2) путем.

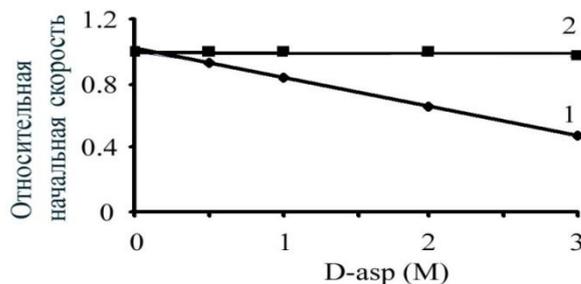


Рис. 6. Зависимость начальной скорости реакции от концентрации D-asp в реакционной среде в присутствии 1,5 М L-asp. 1) экспериментальная кривая (Senuma 1989); 2) расчетная кривая.

Как видно из представленных на рис. 5 кривых, для соотношения 1,5 М L-asp : 3 М D-asp расчетное снижение скорости составляет всего 2 %, что согласуется с результатами нашего эксперимента. Данный результат позволяет предположить, что наблюдаемый эффект торможения реакции, описанный в работе (Senuma 1989), по нашему мнению, не является следствием ингибирования активности биокатализатора D-asp. Об этом свидетельствует также величина K_i , значительно превышающая K_m ($K_i = 100K_m$). По-видимому, 60 % снижение скорости реакции объясняется влиянием ионной силы раствора, поскольку были использованы довольно высокие концентрации аммониевых солей D-asp и L-asp. Такое влияние на иммобилизованный фермент может быть связано, как со структурными деформациями полимерной сетки и изменениями размеров пор носителя под давлением возрастающей ионной силы раствора, так и воздействием ионной силы непосредственно на сам фермент.

Влияние концентрации D-asp на АДК стабильность. Зависимость стабильности биокализатора от концентрации D-asp в реакционной среде при постоянной концентрации L-ala изучена на нескольких модельных системах и представлена на рис. 7.

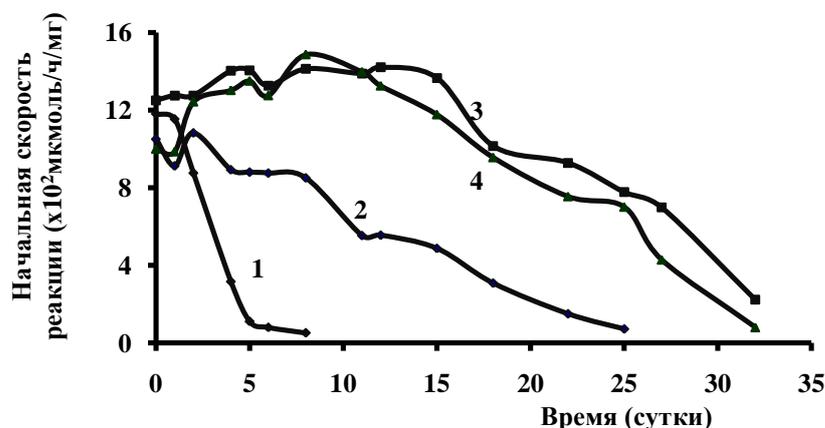


Рис. 7. Влияние концентрации D-asp на стабильность АДК. Ферментный препарат инкубировали при $37 \pm 0,2$ °C и pH 5,5 в модельных системах с неизменной концентрацией L-ala (0,2 M) и различными концентрациями D-asp (M): 1- 0,2; 2 - 0,5; 3 - 1,0; 4 - 1,5.

Анализ полученных кривых показывает существование зависимости между концентрацией D-asp в реакционной среде и стабильностью фермента. Очевидно, что увеличение концентрации D-asp производит стабилизирующий эффект на L-аспартат-β-декарбоксилазу.

В процессе эксперимента, через определенные промежутки времени, из реакционной среды отбирали пробы на стерильность. Было обнаружено наличие посторонней микрофлоры. Заражению подверглись среды с низким содержанием D-asp, в то время, как реакционные смеси с содержанием D-asp 1-1,5 M оставались неконтаминированными. Таким образом, высокая концентрация (~1 M) D-asp в реакционной среде явилась фактором, предотвращающим ее заражение посторонней микрофлорой.

3.2.4. Разделение D-аспарагиновой кислоты и L-аланина.

Выделение и очистка D-asp. Выделение D-asp проводили осаждением из раствора маточника серной кислотой при pH 2,8. Результаты исследований на модельных растворах представлены на рис. 8.

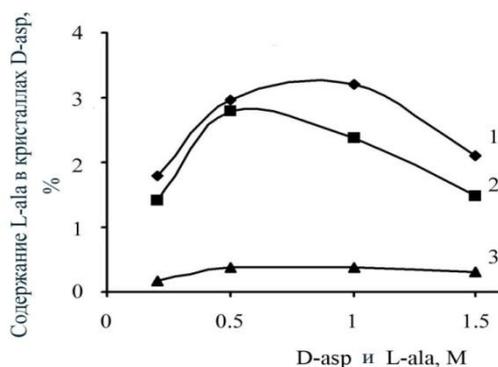


Рис. 8. Содержание L-ala в кристаллах D-asp при различных соотношениях D-asp/ L-ala в маточном растворе (0,2/0,2; 0,5/0,5; 1,0/1,0; 1,5/1,5): 1 – L-ala в кристаллах D-asp, 2 – L-ala в промытых кристаллах, 3 – L-ala в кристаллах после перекристаллизации.

При осаждении D-asp из растворов, содержащих D-asp и L-ala в эквимолярных соотношениях, содержание остаточного L-ala в кристаллах D-asp имеет вид кривой 1, изображенной на рис. 8. После дополнительной промывки кристаллов в ледяной воде, незначительное снижение содержания L-ala свидетельствует о том, что загрязнение D-asp не является поверхностной адсорбцией, а происходит на стадии формирования кристаллов (рис.8, 2), и только перекристаллизация, независимо от концентрации компонентов в смеси, дает положительный эффект очистки (рис.8, 3).

Выделение и очистка L-ala. На стадии выделения аланина, традиционная деминерализация с использованием ионнообменной хроматографии, нами заменена электродиализом. Данный метод обессоливания позволил нам исключить применение целого ряда трудоемких процедур, характерных при эксплуатации ионнообменной колонны; существенно уменьшить количество используемых кислотных и щелочных растворов, исключить образование регенерационных и сорбционных стоков, а также исключить стадию аммиачной элюции с последующим упариванием элюата.

Из обессоленного, посредством электродиализа маточного раствора, выделяли второй продукт - L-ala. Очистить кристаллы L-ala от D-asp путем промывок довольно трудно, вследствие низкой растворимости D-asp. Для увеличения выхода кристаллов L-ala с высоким качеством чистоты, обессоленный раствор перед кристаллизацией освобождали от D-asp, пропуская через колонну с анионнообменной смолой. В течение данного процесса раствор L-ala одновременно освобождался и от остаточных количеств неорганических анионов, что в дальнейшем способствовало резкому сокращению объема воды, необходимого для промывки готовых кристаллов. Элюат на выходе из колонны упаривали и направляли в кристаллизатор для получения чистых кристаллов L-ala. Колонну с анионитом использовали до полного насыщения смолы D-аспарагиновой кислотой.

Технологическая схема получения D-asp и L-ala из D,L-asp. Весь процесс осуществлен нами в соответствии с технологической схемой, приведенной на рис. 9.

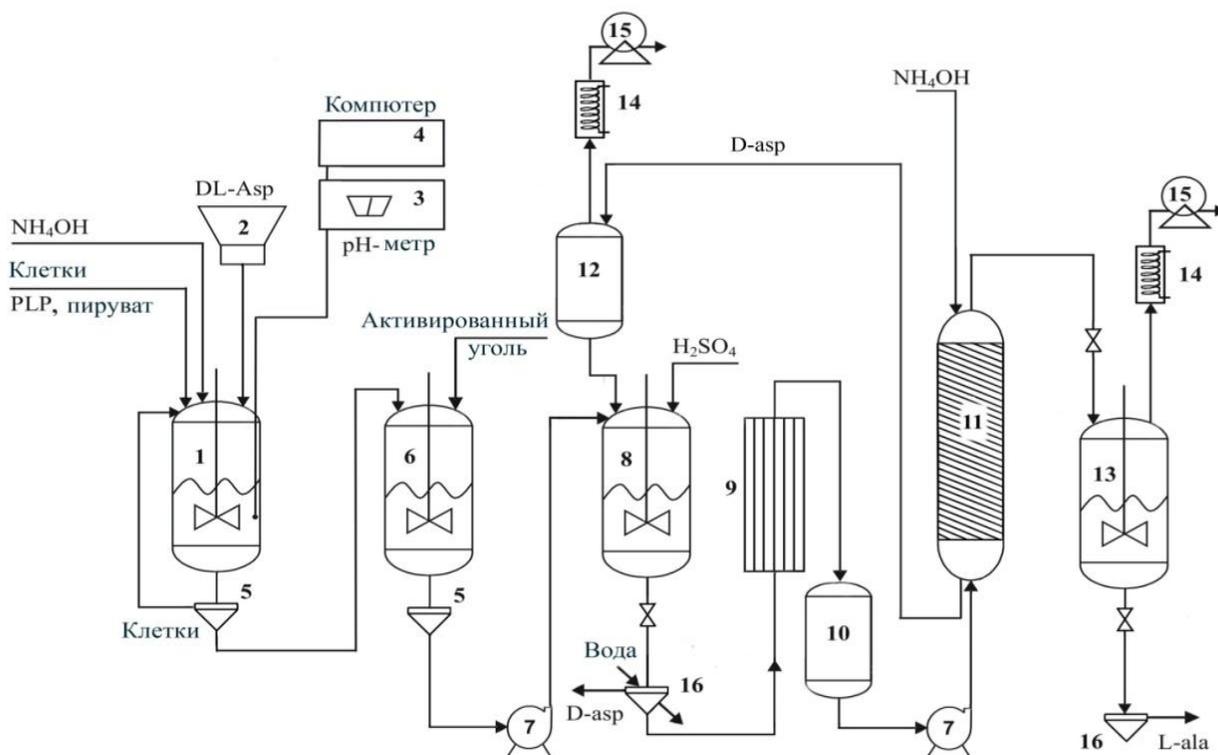


Рис. 9. Технологическая схема получения D-asp и L-ala из D,L-asp. 1- биореактор, снабженный рубашкой и мешалкой; 2- дозатор кристаллической D,L-asp; 3 - pH-метр; 4 - компьютер; 5 - фильтр; 6 - реактор для обработки реакционной смеси активированным углем, снабженный рубашкой и мешалкой; 7 - насосы; 8 - реактор-кристаллизатор D-asp; 9 – электродализатор; 10 - промежуточный реактор; 11 - ионообменная колонна, заполненная анионом; 12 - система для выпаривания; 13 - реактор-кристаллизатор L-ala; 14 - конденсаторы; 15 - вакуумные насосы; 16 - проточные центрифуги.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.

4.1. Оптимизация условий биосинтеза, выделения, очистки и иммобилизации тирозин-фенол-лиазы *S. freundii* - биокатализатора в биотрансформационном получении L-тирозина из фенола, пирувата и ацетата аммония.

Биотрансформационный метод получения L-тирозина относится к биотехнологическим процессам, которые предполагают получение оптически активных аминокислот из исходных соединений (предшественников), не содержащих хиральных атомов, таких как: фенол, пируват и ацетат аммония. Анализ, известных на сегодняшний день технологий биокаталитического синтеза L-тирозина, показал, что при использовании растворимой ТФЛ и высоких концентраций предшественников (100 мМ фенола) основной проблемой является низкая растворимость тирозина. В процессе синтеза, при использовании свободных клеток, а также, частично очищенного фермента, в реакционной среде происходит необратимое угнетение ТФЛ фенолом и образование больших скоплений клеточных агрегатов с осадком L-тирозина, что в совокупности приводит к потере активности ТФЛ и постепенному снижению скорости синтеза ($t_{1/2}$ - 12-15 часов). Повторное использование биокатализатора исключается, по причине невозможности отделения его от реакционной смеси.

Все известные иммобилизованные биокатализаторы ТФЛ получены в основном методом включения в гели. Они оказались не технологичными по причине низкой стабильности иммобилизованного фермента, недостаточной механической прочности матрицы, высокого содержания клеток бактерий в носителе, а также, быстрой закупорки гранул геля осадком тирозина. При использовании этих биокатализаторов не был достигнут уровень накопления тирозина в реакционной смеси, равный или превышающий аналогичный показатель для растворимой ТФЛ, что составляет для свободных клеток - 85 г/л (Куплетская 1979), и для частично очищенного фермента 130 г/л (Kim Do Yang, et al. 2007).

Нашей целью было создание биокатализатора, лишённого всех вышеперечисленных недостатков. Для этого нами была исследована возможность получения клеток с высокой ТФЛ активностью в сравнительно доступных и дешевых питательных средах. Изучены, как традиционные полноценные среды, содержащие МПБ, гидролизат БВК и сои, так и полусинтетические и синтетические среды с некоторыми вариациями добавок. Сравнение характеристик показало, что бактерии *S. freundii* обнаруживают высокую ТФЛ активность при выращивании, как на богатых средах, так и на разработанной нами синтетической среде №10, состоящей из доступных и дешевых компонентов с добавлением L-аспарагиновой кислоты, обеспечивающей быстрый рост культуры с высокой удельной ТФЛ активностью. Именно эта среда была нами использована в последующих экспериментах для получения биомассы клеток.

Для исследования физико-химических характеристик фермента и его иммобилизации, была выделена и очищена ТФЛ. Примененный метод очистки ТФЛ из клеток *S. freundii*, позволил получить фермент с высоким выходом при применении минимального числа стадий очистки. Была достигнута удельная активность ТФЛ равная 1,41 Ед/мг, что соответствует показателям значений активности очищенных препаратов ТФЛ, известных из литературы (Kumagai et al. 1970; Демидкина и др. 1984; Сысуев и др.1980). В результате очистки значение

удельной активности фермента увеличилось в 6,1 раз, а общий выход составил 40,2 %. Необходимо отметить, что высокое содержание ТФЛ в клетках, полученных на разработанной нами среде, позволило существенно сократить число стадий очистки по сравнению со способом выделения ТФЛ, описанным в работе (Сысуев и др. 1980). В частности, в предлагаемой нами схеме очистки, для извлечения фермента из клеток, используется простой метод ультразвуковой обработки, тогда как в литературе разрушение клеток проводят на прессе Френча с последующими многочисленными экстракциями дебриса тритоном X 100. Исключен трудоемкий и продолжительный процесс осаждения белка серноокислым аммонием с последующим диализом полученного осадка, предшествующий каждому этапу очистки, а также отсутствует стадия повторной гель-фильтрации.

Полученный гомогенный препарат очищенной ТФЛ, проявлял максимальную активность при температуре 35 °С и рН 8,5. При хранении в глицерине с МЭ период полуинактивации фермента увеличивался многократно, тогда как при хранении в буфере за этот же период времени он инактивировался полностью.

Учитывая отрицательный опыт иммобилизации методом включения в гели, иммобилизация ТФЛ нами была проведена на поверхности твердых носителей. В качестве носителей были использованы силикагель и силохром. Иммобилизация очищенной ТФЛ была проведена ковалентно на поверхности силанизированных носителей модифицированных и не модифицированных, с применением глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Примененные носители имели большую удельную поверхность, и размер пор, намного превышающий размеры как низкомолекулярных продуктов, так и белковой молекулы фермента. Кроме того, указанные носители дешевы, доступны и удобны в применении.

В результате иммобилизации сохраненная активность иммобилизованной ТФЛ для разных образцов составила 2 -10 % от активности растворимого фермента. Эта существенная потеря в активности характерна для метода ковалентной иммобилизации и, по всей видимости, является результатом как жесткой фиксации фермента на носителе, так и повреждения структуры каталитического центра фермента при его фиксации на носителе через глутаровый альдегид.

Исследования, проведенные с иммобилизованной ТФЛ, показали, что конверсия фенола для разных образцов биокатализатора колеблется от 48,7 % до 90,6%, а сравнение характеристик полученных биокатализаторов, показывают, что наилучшими показателями обладает образец 2а. Необходимо отметить, что иммобилизованная ТФЛ, по сравнению с растворимой, при той же глубине, конверсии осуществляет синтез тирозина с меньшей скоростью.

Исследования динамики инактивации биокатализаторов в условиях синтеза тирозина в периодическом режиме показали, что все образцы можно использовать многократно, а период полуинактивации биокатализаторов составляет от 190 до 600 ч или от 8 до 25 сут, в то время, как аналогичный показатель для растворимого фермента составляет 12 – 15 часов.

Для исследования свойств иммобилизованной ТФЛ нами был выбран биокатализатор 2а, полученный в результате иммобилизации ТФЛ на поверхности силанизированного силохрома без дополнительной модификации поверхности носителя, который обладал наилучшим сочетанием активности и стабильности.

Иммобилизованная ТФЛ проявляла максимальную активность при температуре 50 °С и рН 9. Наблюдались некоторые смещения в значениях рН и температурного оптимума для иммобилизованной ТФЛ по сравнению с растворимым ферментом, что, в общем, характерно для большинства иммобилизованных ферментов.

При хранении иммобилизованной ТФЛ в 50 мМ К, Na-фосфатном буфере (рН 8) и периодическом использовании для синтеза тирозина, через 6 мес от момента иммобилизации, его активность составила ~8 % от активности свежеприготовленного биокатализатора, в то время, как при хранении растворимой ТФЛ в тех же условиях по истечении 15 суток растворимый фермент полностью инактивируется.

Эксперименты по иммобилизации ТФЛ в присутствии ряда стабилизаторов показали, что присутствие D,L-тирозина в реакционной смеси приводит к двукратному увеличению

сохраненной активности иммобилизованной ТФЛ, за счет того, что, вероятно, D-тирозин обратимо ингибирует ТФЛ, предохраняя ее активный центр от инактивирующего действия сшивающего агента.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно заключить, что из числа исследованных носителей, наиболее эффективным носителем для иммобилизации ТФЛ является силохром. В результате иммобилизации ТФЛ на поверхности силанизированного силохрома, нам удалось стабилизировать ее активность в реакции синтеза тирозина при высоких концентрациях фенола (~100мМ) и разрешить проблему образования агрегатов клеток с осадком тирозина, что привело к значительному увеличению времени полуинактивации полученного биокатализатора и уменьшению расхода фермента. Период полуинактивации ТФЛ, иммобилизованной на силохроме, достигает 25 сут (600 час), что намного (5 - 20 раз) превышает аналогичный показатель для клеток, иммобилизованных в различные гели, свободных клеток и очищенного фермента. Суммарная производительность за 38 циклов составила ~200 г тирозина/г белка, что в 5 - 7 раз превышает суммарную производительность биокатализаторов в виде свободных клеток и частично очищенного фермента (Куплетская 1979, Kim Do Yang et al. 2007). Данный катализатор удобен в применении и легко отделяется от кристаллов продукта, что особенно важно для получения продукта высокой степени чистоты.

С помощью проведенных экспериментов по повторной иммобилизации свежего фермента, показана возможность продления срока службы носителя путем повторной иммобилизации фермента на отработанном биокатализаторе (биокатализатор, отработавший 2 $t_{1/2}$) без процедуры дополнительной активации носителя. Это способствует успешному решению проблемы утилизации носителя как отхода производства.

4.2. Оптимизация условий биотрансформации, выделения и очистки конечных продуктов при декарбоксилировании L-аспарагиновой кислоты в L-аланин из рацемической смеси D,L-аспарагиновой кислоты при участии L-аспартат- β -декарбоксилазы из *Ps. docunhae*.

Биотрансформационный метод получения D-аспарагиновой кислоты относится к биотехнологическим процессам, основанным на селективном преобразовании одного из оптических изомеров (L-аспарагиновой кислоты) в рацемической смеси (D,L-аспарагиновой кислоты).

Анализ известных из литературы методов и технологий получения D-аспарагиновой кислоты показал, что для разработки эффективной технологии получения D-asp необходимо разрешить три проблемы: поддержание pH реакционной среды на уровне оптимального значения, устранение помех, вызываемых газовой выделением, а также разделение D-asp и L-ala в виде чистых продуктов. Исходя из вышесказанного, нами были исследованы две стадии: трансформации L-аспарагиновой кислоты в L-аланин из рацемической смеси D,L-аспарагиновой кислоты, а также стадия разделения продуктов реакции.

В качестве исходного сырья, для получения D-asp мы использовали L-asp, по причине того, что в лаборатории Инженерной Энзимологии ГНКО «Армбиотехнология» возможно наладить собственное производство L-asp из фумаровой кислоты методом биотрансформации. Для получения D,L-asp была проведена термо-химическая рацемизация L-asp, с использованием микроволновой радиации. В результате, полученные нами кристаллы имели значения удельного вращения соответствующее D,L-asp $[\alpha]_d^{20} - 0^0$ ($c = 4,6$ в 6N HCl), что дает основание констатировать, что технику микроволновой радиации (MAOS) можно с успехом использовать для ускорения и упрощения процесса рацемизации L-asp. По сравнению с методом рацемизации, описанным в литературе, нам удалось существенно сократить время проведения процесса и свести энергозатраты к минимуму (Патент РА, Дюкова 2007).

Трансформацию L-asp в L-ala из D,L-asp с сохранением D-asp осуществляли с использованием свободных клеток микроорганизмов, обладающих L-аспартат- β -декарбоксилазной активностью. С тем же успехом можно было бы использовать и L-аспартат- α -декарбоксилазу,

однако, в данном случае, мы дополнительно получаем очень ценный продукт L-ala. Конечно, с практической точки зрения, не всегда целесообразно совмещать производства аминокислот, несоизмеримых по потребностям. Однако, тот факт, что L-ala более востребован на рынке, чем D-aspart, делает данный процесс более привлекательным и с коммерческой точки зрения успешным. С другой стороны, следует подчеркнуть, что в распоряжении биотехнологов в настоящее время имеются многочисленные высокопродуктивные и стабильные штаммы-продуценты *L-аспартаг-β-декарбоксилазы*, что в свою очередь стимулирует интерес к процессу в котором принимает участие данный фермент.

Процесс трансформации нами осуществлен с использованием базовой концентрации субстрата (1 М раствор аммониевой соли D,L-aspart) с поддержанием pH реакционной смеси на уровне pH 5,5 -5,7 путем добавления кристаллической D,L-aspart. Сравнение полученных нами результатов на стадии биотрансформации с показателями систем, в которых pH не регулируется (Patent USA, Chibata 1975), или регулируется с помощью избыточного давления (Senuma et al. 1989), показывает значительную эффективность предложенной нами технологии, что, в первую очередь, связано с достижением постоянной и максимальной скорости реакции, и ее сохранением вплоть до полного превращения субстрата. Полученный результат является следствием поддержания pH реакционной среды на оптимальном уровне в течение всего процесса. В описанных в литературе технологиях (Patent USA, Chibata 1975; Senuma et al. 1989) минимальное смещение pH по отношению к оптимальному значению составляет 2 ед., что приводит к резкому снижению эффективности эксплуатации биокатализатора и снижению скорости реакции в 4-4,5 раза (Takamatsu et al. 1988). Важно отметить, что поддержание значений pH биотрансформационного процесса в интервале, оптимальном для активности и стабильности декарбоксилазы, позволяет не только повысить эффективность использования биокатализатора, но и снизить потребность реакционной системы в кофакторах. Благоприятные условия для процесса биотрансформации можно обеспечить регулированием pH реакционной среды минеральной кислотой (Pat. Jap., Kato et al. 1982), однако, этот способ в итоге приводит к дополнительному накоплению большого количества аммониевой соли минеральной кислоты в реакционной среде, что осложняет технологический процесс выделения и очистки продуктов. В предлагаемой нами схеме именно кислые свойства аспарагиновой кислоты (в отличие от других аминокислот) предопределили ее применение в качестве идеального титранта, для поддержания pH на постоянном уровне в течение биотрансформационного процесса.

Анализ кинетических данных показал, что высокие концентрации D-aspart практически ингибируют фермент, а наблюдаемое снижение скорости реакции при использовании иммобилизованного биокатализатора (Senuma et al. 1989), вероятно, обусловлено эффектом влияния высокой ионной силы реакционной среды.

Использование базовой концентрации субстрата (1 М раствора аммониевой соли D,L-aspart) с применением контроля pH реакционной смеси кристаллической D,L-aspart, позволяет проводить процесс биотрансформации практически с постоянной скоростью до конверсии субстрата ~ 95%. Это означает, что при поддержании pH реакционной среды на заданном оптимальном уровне 5,5-5,7 скорость трансформации в результате исчерпания субстрата и накопления продуктов реакции не уменьшается. В то же время, как показано в экспериментальной части, увеличение концентрации D-aspart оказывает положительное влияние на стабильность *β-декарбоксилазы*, удлиняя срок эксплуатации биокатализатора.

Значительное сокращение количества образующейся аммониевой соли минеральной кислоты на стадии биотрансформации, позволило упростить технологическую схему на стадии выделения L-ala, где традиционная деминерализация, с использованием ионообменной колонны, нами заменена электродиализом, а для эффективного избавления от примеси D-aspart в кристаллах L-ala, предусмотрена колонна с анионитом, которую использовали, до полного насыщения смолы D-аспарагиновой кислотой.

ВЫВОДЫ.

1. Разработаны оптимальные условия культивирования бактериальных клеток *C. freundii* (DM MSU-115) и биосинтеза ТФЛ.
2. Разработан метод выделения и очистки ТФЛ *C. freundii*, позволяющий получить гомогенный препарат фермента с большим выходом и с минимальным числом стадий очистки.
3. Разработан и исследован новый биокатализатор, иммобилизованной на твердой подложке ТФЛ из клеток *C. freundii*. Полученный биокатализатор обладает высокой каталитической стабильностью и способен функционировать при высоких концентрациях фенола.
4. Показана эффективность применения микроволновой радиации для рацемизации L-аспарагиновой кислоты.
5. Проведено детальное изучение физико-химических аспектов реакции ферментативного декарбоксилирования D,L-аспарагиновой кислоты под действием свободных клеток *Ps. doctunhae* (ATCC-21192).
6. На основании этих исследований разработан метод одновременного получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина, который предусматривает применение свободной (кристаллической) D,L-аспарагиновой кислоты одновременно в качестве предшественника и титранта.
7. Метод позволяет проводить процесс практически при фиксированном значении pH, что приводит к повышению эффективности эксплуатации биокатализатора и поддержанию скорости процесса на уровне V_{max} .
8. На основании полученных результатов, разработаны новые, усовершенствованные схемы получения L-тирозина и D-аспарагиновой кислоты с улучшенными экологическими характеристиками.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Dyukova K. G.**, Halebyan M. Gh. An improved technological process of D aspartic acid production. // 5 International Forum „Biotechnology and the present”, Abstracts of reports, St. Petersburg, 2-3 June, 2004, p. 30-31.
2. Hambardzumyan A. A., Halebyan M. Gh., **Dyukova K. G.**, Papoyan A. H., Halebyan Gh. P. The improved method of L-alanine and D-aspartate simultaneous obtaining from fumaric acid. // The International Conference of Young Scientists, Biotechnology of the Future, Affiliated to the International Symposium “EU-Russia: Prospects for Cooperation in Biotechnology in the Seventh Framework Programme”, Book of Papers, Moscow, JSC “Aviaizdat”, St. Petersburg, 5-9 June 2006, p. 29.
3. **Dyukova K. G.**, „Immobilization of *Citrobacter freundii* cells with tyrosine phenol lyase activity on inorganic carriers by covalent binding”. // Proceedings of the International Conference “Advanced Biotechnology. Perspectives of Development in Armenia”, RA, Tsakhkadzor, 12-14 July 2006, p.145.
4. **Դյուկովա Կ.**, Հալեբյան Մ., Համբարձումյան Ա., Հալեբյան Դ., Աղաջանյան Ա. L-ասպարազինաթթվից D-ասպարազինաթթվի և L-ալանինի միաժամանակյա ստացման եղանակ // Արտոնագիր 2045 A2 ՀՀ, ՄԱԴ5. Ա. (AM). - № Հայտի ներկայացման թվական 15.03.2007: Հրապարակման թվական 17.12.2007. - 4 էջ.

5. **Дюкова К. Г.**, Агаджанян А. Е., Амбарцумян А. А., Алебян Г. П.. Усовершенствованная технология одновременного получения D-аспарагиновой кислоты и L-аланина путем биотрансформации DL-аспарагиновой кислоты // Биотехнология, 2009, № 4, с. 69-77.
6. **Дюкова К. Г.** Разработка эффективных условий биосинтеза, выделения и очистки тирозин-фенол-лиазы из бактерий *Citrobacter freundii* // Биологический Журнал Армении, 2010, т. LXII, N 2, с. 6-14.
7. **Дюкова К. Г.**, Амбарцумян А.А., Алебян Г. П. Ковалентная иммобилизация очищенной тирозин фенол – лиазы из *Citrobacter freundii* на неорганических носителях // Биотехнология, 2011, № 2 , с. 58-65.

Դյուկովա Կարինե Գեորգիի

ԿԵՆՍԱՏՐԱՆՍՖՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ԵՂԱՆԱԿՈՎ L-ԹԻՐՈՋԻՆԻ և D-ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԹԹՎԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ԿԱՏԱՐԵԼԱԳՈՐԾՎԱԾ ՄԵԹՈԴՆԵՐԻ ՄՇԱԿՈՒՄ

Ամփոփագիր

Հանգուցային բաներ՝ կենսատրանսֆորմացիա, L-թիրոզին, թիրոզին ֆենոլ-լիազ, իմոբիլիզացում, D-ասպարազինաթթու, D,L-ասպարազինաթթու, L-ալանին, L-ասպարտատ-β-դեկարբոքսիլազ:

Որոշ ամինաթթուների ստացման համար ֆումարաթթուն որպես առաջնային հումք օգտագործող կենսափոխակերպման վրա հիմնված հայտնի տեխնոլոգիաները հենակետ են հանդիսանում մի շարք նոր նյութերի արտադրման տեխնոլոգիաների մշակման համար: Վերջին տարիներին ֆումարաթթվից ստացվող նյութերի շրջանակը զգալիորեն լայնացել է: Ֆումարաթթվի հիման վրա կարող են արտադրվել մի շարք կարևոր նշանակություն ունեցող նյութեր՝ L-խնձորաթթու, L- և D-ասպարազինաթթու, L-α-ալանին և β-ալանին, L-ֆենիլալանին, L-թիրոզին և L-ԴՕՖԱ, ասպարկամ (Պանանգին) և ասպարտամ (քաղցրացուցիչ) և այլն:

Ատենախոսական աշխատանքում կատարված է վերը նշված նյութերից L-թիրոզինի և D-ասպարազինաթթվի ստացման կենսափոխակերպման պրոցեսների վերլուծություն: Արդյունքում բացահայտված են դրանց ստացման տեխնոլոգիաների հիմնական թերությունները և առաջարկված են այդ ամինաթթուների ստացման առավել արդյունավետ տեխնոլոգիաներ:

Ֆենոլից, պիրոխաղողաթթվից և ամոնիումի ացետատից L-թիրոզինի սինթեզի կենսափոխակերպման պրոցեսի արդյունավետության բարձրացման համար հիմնավորված և կիրառված է պինդ կրիչի մակերևույթի վրա կովալենտ իմոբիլիզացված տիրոզին ֆենոլ-լիազի (ԹՖԼ) /*C. freundii*-ի (DM MSU-115)/ նոր կատալիզատոր: Նշված կատալիզատորի ստացման համար մշակված է էժան և մատչելի բաղադրիչներից *C. freundii*-ի աճեցման ֆերմենտացիոն միջավայր: Ընդ որում, առաջարկվող աճի միջավայրը, որն իրենից ներկայացնում է L-ասպարազինաթթվի հավելումով սինթետիկ միջավայր, բերում է բարձր ԹՖԼ ակտիվությամբ կուլտուրայի արագ աճի, որն իր տեսակարար ակտիվությամբ մեկ

կարգով գերազանցում է գրականության մեջ հայտնի տվյալները: ԹՖԼ-ի մաքրման նկարագրված եղանակի կիրառման արդյունքում հնարավոր է դարձել ֆերմենտային պրեպարատի տեսակարար ակտիվությունը բարձրացնել մոտ 6 անգամ, իսկ էլքը հասցնել 40%-ի: Անօրգանական կրիճի վրա ԹՖԼ կովալենտ իմոբիլիզացումը հանգեցրել է կենսակատալիզատորի կիսահնակտիվացման պարբերությունը հասցնել մոտ 25 օրվա, ինչը զգալիորեն մոտ 20 անգամ գերազանցում է տարբեր գելերում իմոբիլիզացված բջիջների, ինտակտ բջիջների ինչպես նաև մաքրած ֆերմենտների համար հայտնի համանման պարամետրերը: Իմոբիլիզացված կենսակատալիզատորի ինտեգրալ արդյունավետությունը (38 օրում սինթեզված պրոդուկտի ընդհանուր քանակը) 1 գ սպիտակուցի հաշվով կազմել է մոտ 200 գ L-թիրոզին, ինչը 5 անգամ գերազանցում է ինտակտ բջիջների արդյունավետությանը: Մշակված կենսակատալիզատորը հարմար է բազմակի օգտագործման համար, քանի որ այն դյուրին է առանձնացնել պրոդուկտի բյուրեղներից:

D,L-ասպարագինաթթվից D-ասպարագինաթթվի ստացման համար որպես ելանյութ է օգտագործված L-ասպարագինաթթուն: Այդ նպատակով Ֆումարաթթվից ստացված L-ասպարագինաթթուն ենթարկվել է ռացեմիզացման: Ցույց է տրվել, որ L-ասպարագինաթթվի ռացեմիզացման համար բարձր արդյունավետությամբ կարելի է կիրառել միկրոալիքային ճառագայթման եղանակը: Ուսումնասիրվել է L-ասպարտատ-β-դեկարբօքսիլազային ակտիվությամբ *Ps. docunhae*-ի բջիջների կիրառմամբ կենսակերպափոխմամբ D,L-ասպարագինաթթվից D-ասպարագինաթթվի և L-ալանինի միաժամանակյա ստացման պրոցեսը: Կինետիկական տվյալների վերլուծությունը ցույց է տվել, որ D-ասպարագինաթթվի և L-ալանինի բարձր կոնցենտրացիաները գործնականում չեն նվազեցնում դեկարբօքսիլազման արագությունը: Կիրառված տեխնոլոգիական նոր մոտեցումների համաձայն ռեակցիոն միջավայրի տիտրումը կատարվում է բյուրեղական DL-ասպարագինաթթվով, ինչը թույլ է տալիս կենսափոխակերպման պրոցեսը տանել մինչև սուբստրատի 95% կոնվերսիան պրակտիկորեն հաստատուն pH-ի պայմաններում և հետևաբար նաև հաստատուն արագությամբ:

Ցույց է տրվել, որ D-ասպարագինաթթվի բարձր կոնցենտրացիաները դրական ազդեցություն ունեն և զգալիորեն երկարացնում են կենսակատալիզատորի շահագործման ժամանակը: Այլ տեխնոլոգիաների հետ համեմատած, հանքային թթվի ամոնիումային աղի քանակի զգալի կրճատումը թույլ է տալիս L-ալանինի անջատման փուլում իոնափոխանակային քրոմատոգրաֆիան փոխարինել էլեկտրոդիալիզով:

Ստացված արդյունքների հիման վրա բարելավված էկոլոգիական բնութագրերով L-տիրոզինի և D-ասպարագինաթթվի ստացման նոր, կատարելագործված տեխնոլոգիական սխեմա է մշակվել:

Dyukova Karine

DEVELOPMENT OF IMPROVED METHODS OF L-TYROSINE AND D-ASPARTIC ACID PRODUCTION BY BIOTRANSFORMATION

Summary

Key words: biotransformation, L-tyrosine, tyrosine phenol-lyase, immobilization, D-aspartic acid, D,L-aspartic acid, L-alanine, L-aspartate β-decarboxylase.

The well-known biotransformation-based technologies for obtaining some amino acids with fumaric acid used as raw material became launch pad for realization of technologies for production of a series of new compounds. The range of compounds produced from fumaric acid has significantly enlarged for the past few years that open vast possibilities in future. On the base of fumaric acid the following compounds can be produced: L-malic acid, L- and D-aspartic acids, L- α -alanine and β -alanine, L-phenylalanine, L-tyrosine and L-DOPA, asparcam and aspartame, etc.

This thesis is devoted to investigation of biotransformation processes for production of L-tyrosine and D-aspartic acid that, pursuant to the developed by us approach, constitute a list of products for which fumaric acid may be considered as raw material. Thorough review of biotransformation methods for production of L-tyrosine and D-aspartic acid was performed and their main shortcomings were revealed. To increase efficiency of biotransformation process for L-tyrosine synthesis from phenol, pyruvic acid and ammonium acetate, a new immobilized on solid substrate catalyst – tyrosine phenol-lyase (TPL) from *C. freundii* (DM MSU-115) has been developed and investigated. The following investigations have been carried out for elaboration of optimal conditions: a) cultivation of *C. freundii* bacterial cells and biosynthesis of TFL; b) isolation and purification of TPL from *C. freundii*. To simplify and improve ecological characteristics of the technology of simultaneous production of D-aspartic acid and L-alanine, the process of decarboxylation of D,L-aspartic acid by L-aspartat β -decarboxylase from *Ps. docunhae* (ATCC-21192) has been studied.

In this study the fermentation medium for growing *C. freundii*, consisting of cheap and available components, was developed. Suggested synthetic growth medium with addition of L-aspartic acid provides the rapid culture growth with high tyrosine phenol-lyase activity, which by order exceeds the analogous index for TPL known from literature. An efficient method for TPL purification from *C. freundii* has been offered, which allows obtaining the purified enzyme in high yield using minimum purification steps. As a result of described purification procedure, the specific activity of preparation arises by 6,1 times, and the yield of activity makes up 40.2 %. The obtained purified enzyme preparation exhibits maximum activity at 35 °C and pH 8.5. It was shown, that in case of keeping in glycerol in presence of mercaptoethanol the enzyme half lifetime increased by many times making up 25 days. Immobilization of a purified preparation of TPL from *C. freundii* on silica gel- or silochrom-based inorganic carriers by the method of covalent binding has been carried out, and the properties of the immobilized preparation were investigated. To bind the purified enzyme to the carrier, modified by γ -aminopropyltriethoxysilane, glutaraldehyde was used as a cross-linking reagent. As a result of the above-mentioned immobilization, the half-life of TPL was prolonged up to 25 days that considerably exceeds (by 5-20 times) the similar parameters for the cells immobilized into various gels, intact cells and also for the purified enzyme. The integral productivity of immobilized biocatalyst (the total amount of product synthesized within 38 days) was ~200 g of tyrosine per 1 g protein that is 5 fold higher than the productivity of the intact cells. The biocatalyst was convenient in operation due to the opportunity of its easy separation from the product crystals.

The efficacy of microwave radiation for racemization of L-aspartic acid was shown. A process of simultaneous production of D-asp and L-ala from D,L-aspartic acid (D,L-asp) by biotransformation using free *Ps. docunhae* cells possessing L-aspartate- β -decarboxylase activity has been investigated. Analysis of kinetic data showed that high D-asp concentrations did not reduce the rate of decarboxylation, i.e. did not have inhibiting effect on the enzyme. The use of the 1 M basic substrate concentration together with titration of the reaction medium by crystalline D,L-asp allows to carry out the biotransformation process up to ~ 95% substrate conversion at a practically constant rate. It was shown that high concentrations of D-asp had positive effect prolonging the time of biocatalyst exploiting. The considerable reduction of the amount of the formed mineral acid ammonium salt at the biotransformation stage allowed to simplify the technological scheme of L-ala isolation by substitution of electro dialysis with the additional ion-exchange chromatography procedure.

Based on the obtained results new improved technological schemes for production of L-tyrosine and D-aspartic acid with the improved ecological characteristics have been elaborated.