

УДК 571.151

© 1990 г.

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В КАРРАГИНАН КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

*Давиденко Т. И., Бондаренко Г. И.*

Проанализировано современное состояние проблемы использования иммобилизованных клеток микроорганизмов для получения органических веществ. Рассмотрены физико-химические свойства каррагинана и особенности иммобилизации клеток микроорганизмов в каррагинан, систематизированы результаты обработки каррагинана и иммобилизованных препаратов упрочняющими реагентами.

Библиография — 112 ссылок.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	509
II. Физико-химические свойства каррагинана и особенности иммобилизации клеток микроорганизмов в каррагинан	511
III. Применение иммобилизованных в каррагинан клеток микроорганизмов для получения органических веществ	515

### I. ВВЕДЕНИЕ

Общезвестно, что благодаря катализу осуществляются все биохимические реакции в природе и ~80% процессов в промышленности. В последние годы объектами пристального внимания становятся биокатализаторы (особенно клетки микроорганизмов), которые обладают высокой каталитической активностью, специфичностью, способностью осуществлять химические процессы при обычных температурах. Успехи химии стероидов, широко применяющей биокатализаторы, наглядно показали их преимущества перед химическими реакциями. Однако применение биокатализаторов в целях направленной трансформации органических веществ существенно ограничивалось спецификой работы с ними, рассмотрением превращений определенных классов соединений, их лабильностью, трудностью отделения от продуктов реакции и в ряде случаев низкой экономической эффективностью из-за однократного применения.

Использование биокатализаторов приобрело большое развитие в связи с открытием возможности их иммобилизации, в результате чего в последние 10—15 лет началось целенаправленное получение их закрепленных на носителе либо в геле форм [1—15], при этом особое внимание уделяется созданию высокоэффективных биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов.

В настоящее время известно около 100 лабораторных разработок применения иммобилизованных клеток микроорганизмов в тонком органическом синтезе для получения органических кислот, растворителей, метана, водорода, этилового спирта, ферментов, антибиотиков, аминокислот, пантотеновой кислоты, глутатиона, стероидов, а также для очистки сточных вод. Несколько процессов уже нашли практическое воплощение в промышленных масштабах: получение аспарагиновой и яблочной кислот, лизина из капролактама, лейцина и этилового спирта [16], в США с 1984 г. работает завод мощностью 600 т, выпускающий фенилаланин, а в Японии не только аминокислоты, но и этанол, акрилонитрил производят с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Это объясняется целым рядом преимуществ использования иммобилизованных клеток по сравнению с использованием иммобилизованных ферментов и обычных клеток [17—19].

1. Отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов.
2. Более высокая стабильность и активность по сравнению с иммобилизованными ферментами и свободными клетками, так как иммобилизация защищает клетки от внешних воздействий.
3. Уменьшение затрат на выделение и очистку продуктов реакции, так как они изолированы от биомассы и продуктов обмена микроорганизмов.
4. Появление возможности создания непрерывных автоматизированных производств, при этом уменьшается ингибирование как субстратом, так и продуктом реакции.
5. Способность к длительному функционированию полиферментных систем и регенерация кофакторов.
6. Возможность уменьшения объемов реакций, проводимых иммобилизованными клетками по сравнению со свободными.
7. Улучшается возможность контроля за протеканием реакции.
8. Ожидается существенное уменьшение степени загрязнения окружающей среды.
9. Существенное снижение стоимости продуктов реакции.

Однако несмотря на все возрастающее количество публикаций по иммобилизации клеток микроорганизмов, результаты этого процесса и применения иммобилизованных клеток микроорганизмов непредсказуемы, обусловлены прежде всего способностью клетки сохранять при иммобилизации и в иммобилизованном состоянии конкретную активность, стабильно работать в конкретном процессе и зависят от самых разнообразных факторов. Практически все существующие методы иммобилизации обладают определенными положительными моментами и недостатками. Наиболее распространенным методом является включение в гель. Он обеспечивает многократное использование без отделения клеток и повторного засева среды, высокую концентрацию клеток в носителе, использование высокопроизводительных реакторов, но отличается повышенным сопротивлением массопереносу, обусловленным диффузией субстратов и продуктов в гель и обратно. Физико-химические параметры микроокружения (например, pH) в гранулах носителя могут существенно отличаться от соответствующих характеристик среды вне гранул. Возможен выход микроорганизмов из гранул в ходе работы. Ограничивает этот метод и необходимость использования субстратов с низким молекулярным весом. Часто рост клеток микроорганизмов и образование  $\text{CO}_2$  разрушает гели.

Для осуществления включения в гели наиболее подходящими физико-химическими свойствами обладают полиакриламидный гель [4, 20, 21], полиуретан [3], коллаген [6], агар [7, 8], желатин [9, 10], целлюлоза [22], альгинаты [12, 23] и каррагинан [13—15].

Особенностями полиакриламидного геля является трудность получения правильных сферических гранул, низкая активность полученных препаратов, чаще всего из-за токсического воздействия на клетку компонентов геля: акриламида, N,N'-метилен-бис-акриламида,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ . Но хорошие механические свойства, возможность регулирования сетки геля, наряду с данными о размножении клеток в геле обусловили тот повышенный интерес, который проявляют исследователи к его использованию [1, 16, 24—26].

Преимущество агара состоит в быстром росте новых клеток в геле, однако его недостатком является хрупкость. Прочность геля быстро снижается по мере роста клеток и образования  $\text{CO}_2$  [27].

Для альгината кальция проблема состоит в его нестабильности в присутствии фосфатного буфера и некоторых катионов:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  [28, 29]. Гель полностью разрушается в 0,1 М растворе  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  за 15 мин [29], фосфат же является одним из основных питательных веществ для микробных клеток.

До настоящего времени нет универсального носителя для иммобилизации клеток микроорганизмов, равно как и метода иммобилизации. Однако анализ данных по иммобилизации в каррагинан показал перспективность его практического использования, так японская исследовательская лаборатория фирмы Танабэ Сейкю сообщила об успешном включении  $>50$  микроорганизмов в этот гель.

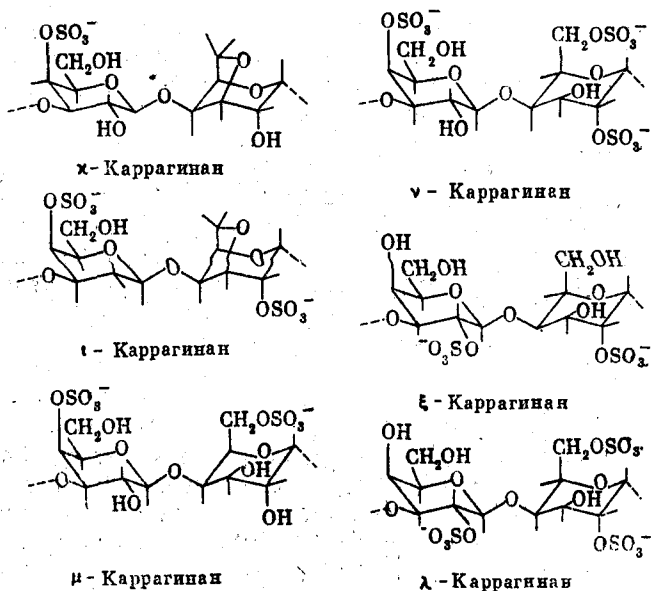
В настоящей работе предпринята попытка обобщить и систематизировать данные экспериментальных исследований, позволяющие обосновать целесообразность использования каррагинана в качестве матрицы для иммобилизации, а также сведения об использовании иммобилизованных в каррагинан микроорганизмов для получения органических веществ.

## II. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАРРАГИНАНА И ОСОБЕННОСТИ ИММОБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ В КАРРАГИНАН

Каррагинаны — сульфатированные полисахариды, полученные из красных водорослей *Phodophyceae*, *Ginartinnaceae* [30].

Ежегодное производство каррагинанов не уступает производству агара. Основной потребитель этих полисахаридов — пищевая промышленность, они используются как гелеобразователи при приготовлении кондитерских изделий, молочных продуктов, теста и мясных консервов [17, 30, 31].

В отличие от агара, в составе каррагинанов находят кроме *D*-галактозы, 3,6-ангидро- $\alpha$ -*D*-галактозу и значительно большие (20—30%) количества сульфатных групп [32—34] (ММ 100 000—800 000). Предельные структуры каррагинанов можно изобразить следующими формулами:



Реальные полисахариды группы каррагинана могут быть весьма близкими к одной из изображенных на схеме формул, но гораздо чаще представляют собой молекулярные гибриды — комбинации двух и более предельных структур. Способностью образовывать гели обладают только биополимеры, характеризующиеся предельными структурами «каппа» и «иота». Причем их характерной способностью является образование термообратимых гелей в определенных условиях. Этим полисахариды группы каррагинана отличаются от нейтральных гелеобразующих полисахаридов группы агарозы.

Согласно современным представлениям, при экстракции каррагинанов из водорослей их упорядоченная структура разрушается с образованием в водных растворах неупорядоченной конформации с последующим восстановлением ее при гелеобразовании и высушивании до твердого со-

стояния. При этом образуются межмолекулярные упакованные структуры, близкие или идентичные таковым *in vivo* [35].

Конкретная природа упорядоченной структуры зависит от геометрии ковалентных связей между каждым из остатков первичной структуры [36]. Каррагинаны образованы 6-членными (пиранозными) циклами, имеющими геометрию типа кресло [37], соединенными экваториальными связями. Однако между углеводными циклами они не параллельны, вследствие чего возникает «изгиб», и упорядоченная конформация в этом случае спиральна [35]. Данные рентгенографии и термозависимости изменения оптического вращения подтверждают образование двойной спирали для  $\kappa$ - и  $\iota$ -каррагинанов. Несмотря на существование гипотез, пытающихся объяснить природу межмолекулярных взаимодействий, вызывающих гелеобразование, в настоящее время этот вопрос не является окончательно решенным. Исследования по выяснению причин повышения прочности гелей каррагинанов показали необходимость оптимального соотношения протяженности и распределения вдоль цепи полимера блоков регулярной структуры, способных к ассоциации, и участков с замаскированной регулярностью [38]. Индукторами гелеобразования являются ионы металлов, для  $\iota$ -каррагинана —  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ , для  $\kappa$ -каррагинана —  $\text{K}^+$  (другие ионы проявляют более слабый эффект). Рентгеновское исследование  $\text{Ca}^{2+}$  соли  $\iota$ -каррагинана показало, что в этом случае двойная спираль более растянута, чем в агарозе, вследствие этого не имеет центральной полости, в которую могла бы внедриться связанная вода. Фактором, стабилизирующим упорядоченную структуру является водородная связь между O(2) и O(6) остатками D-галактозы различных цепей. Поскольку здесь находятся единственные незамещенные гидроксильные группы, двойная спираль  $\iota$ -каррагинана в отличие от  $\kappa$  является структурно полностью связанной водородными связями. Учитывая большое расстояние между цепями, маловероятно, чтобы ван-дер-ваальсовы силы играли важную роль в образовании спирали. Однако ионное взаимодействие несомненно важно, каждый ион  $\text{Ca}^{2+}$  связан с двумя сульфатными группами различных спиралей [39].

В  $\kappa$ -каррагинане, у которого отсутствует вторая сульфатная группа, аналогичная структура может образовываться при замещении  $\text{Ca}^{2+}$  одновалентными катионами. Прямое спектроскопическое доказательство взаимодействия  $\text{K}^+$  с сульфатными группами  $\kappa$ -каррагинана получено при ИК-спектроскопии растворов [35]. Если в жестких условиях образование двойной спирали  $\kappa$ - и  $\iota$ -каррагинанов возможно индуцировать ионами, связывающимися неспецифически, то в норме необходимы катионы подходящего размера. Причина такой катионной специфичности, очевидно, обусловлена конформационными и конфигурационными особенностями  $\iota$ - и  $\kappa$ -каррагинанов, хотя и не объяснима полностью в настоящее время.

Полисахариды черноморской филлофоры также могут быть отнесены к каррагинанам, так как их углеводный скелет образован остатками только  $\beta$ -D-галактозы и 3,6-ангидро- $\alpha$ -D-галактозы, соединенных чередующимися  $\alpha(1) \rightarrow (3)$  и  $\beta(1) \rightarrow (4)$  связями между ними. Содержание сульфатных групп в полисахаридах существенно колеблется в зависимости от вида филлофоры (от 17,8 до 27,2%). Для полисахаридов различного вида филлофоры характерно также различное содержание 3,6-ангидро- $\alpha$ -D-галактозы и расположение сульфатных групп вдоль углеводного скелета [38, 40]. Каррагинаны различных видов филлофоры обладают существенными отличиями в строении и в связи с этим отличаются и по физико-химическим свойствам [41, 42].

Для иммобилизации клеток микроорганизмов применяются  $\kappa$ - и  $\iota$ -каррагинаны, причем наиболее часто встречается  $\kappa$ -каррагинан [13, 14, 17, 18]. В работах по иммобилизации клеток в СССР каррагинаны используются мало, а отечественные каррагинаны практически не используются [43—47]. Это непонятно, так как этот метод осуществляется в мягких условиях, прост, технологичен. Иммобилизация клеток в каррагинан состоит практически из 2-х этапов: приготовление суспензии клеток

Таблица 1

## Иммобилизация ферментов и клеток микроорганизмов в каррагинаны [48]

Ферменты и микроорганизмы	Ферментативная активность <sup>а</sup>		Выход, %
	до иммобилизации	после иммобилизации	
Аминоацилаза	20	10	50,0
Аспартаза	650	300	46,2
Фумараза	360	260	61,5
<i>E. coli</i> (аспартаза)	65000 <sup>б</sup>	30400	46,8
<i>B. ammoniagenes</i> (фумараза)	9670 <sup>в</sup>	5800 <sup>г</sup>	60,0
<i>S. phaeochromogenes</i> (глюкоизомеразы)	7910	4280	54,1

<sup>а</sup> — фермент: мкмоль/ч/мг белка; микробные клетки: мкмоль/ч/г клеток;<sup>б</sup> — после УЗ-обработки;<sup>в</sup> — в присутствии экстракта желчи;<sup>г</sup> — после обработки экстрактом желчи.

Таблица 2

Влияние условий гелеобразования  $\kappa$ -каррагинана на прочность геля [48]

Условия гелеобразования	Прочность геля
Охлаждение до 10° С	+
Обработка NH <sub>4</sub> Cl	+++
Обработка солями металлов: LiCl, NaCl; KCl, RbCl, CsCl;	—
MgCl <sub>2</sub> , SrCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , FeCl <sub>2</sub> , BaCl <sub>2</sub>	++++
CoCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> , CuCl <sub>2</sub> , ZnCl <sub>2</sub> , Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	++
Обработка аминами: метилендиамин, этилендиамин, <i>n</i> -фенилендиамин, $\delta$ -окси- <i>L</i> -лизин, гидроксамат <i>L</i> -лизина, гидроксамат <i>L</i> -гистидина, <i>S</i> -2-аминоэтил- <i>L</i> -цистеин;	+++
гексаметилендиамин, октаметилендиамин, 4-гуанидинобути- ламин, гистидин, гидразид <i>D</i> , <i>L</i> -гистидина; <i>L</i> -орнитин, <i>L</i> -лизин, гидроксамат <i>L</i> -триптофана	++
Обработка органическими, смешивающимися с водой раство- ри-телями: метанол, этанол, ацетон	++

Примечание: прочность геля: (+) — нагрузка от 100 до 200 г/см<sup>2</sup>; (++) — 200—500 г/см<sup>2</sup>, (+++) — 500—1000 г/см<sup>2</sup>, (+++++) — 1000—1500 г/см<sup>2</sup>, (—) — гелеобразование отсутствует.

в растворе каррагинана и гелеобразование. Если прочность геля недостаточна, то проводится еще упрочнение геля.

Следует отметить, что смешивание микробных клеток с раствором каррагинана осуществляется при температуре 40° С, клетки различных микроорганизмов стабильны в каррагинане при этой температуре; образующаяся смесь легко переходит в гель, гель не разрушается в ходе ферментативной реакции, выдерживает колебания pH, размер пор данного геля достаточно мал, чтобы ферменты и клетки не покидали матрицу геля, в то время как низкомолекулярные субстраты и продукты легко проходят через него. По этому методу возможно иммобилизовать как ферменты, так и целые клетки с высоким сохранением исходной активности (40—60%) (табл. 1) [27, 48].

В работе [27] показана возможность иммобилизации в каррагинан различных микроорганизмов: *Achromobacter aquatilis*, *A. liquidum*, *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *Bacillus megatherium*, *B. subtilis*, *B. succinicum*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *B. flavum*, *Corynebacterium glutamicum*, *Erwinia herbicola*, *Escherichia coli*, *Gluconobacter melanogenus*, *Lactobacillus bulgaris*, *Micrococcus ureae*, *Penicillium vinaceum*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. dacunhae*, *P. putidum*, *Sarcina lutea*, *Streptomyces griseus*, *S. phaeochromogenes*, *Serratia marcescens*.

Для получения более прочных гелей с включенными клетками *S. phaeochromogenes* изучили влияние условий гелеобразования карра-

гинана (табл. 2) и дополнительно влияние анионов солей калия:  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3^{2-}$ ,  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  и  $-\text{OOC}-\text{COO}^-$ . Существенных различий в прочности гелей при использовании различных анионов не получено, тогда как следует из данных табл. 2, более прочные гели образуются при контакте с  $\text{KCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ,  $\text{CsCl}$ , гексаметилендиамином и октаметилендиамином, агматинном, гистамином и гидразидом *D,L*-гистидина. К сожалению, эти данные не позволяют понять причину такого упрочнения геля, равно как не отражают влияния условий гелеобразования на сохранение исходной активности клеток микроорганизмов. Одно несомненно, прочность каррагинанового геля можно регулировать, что обнадедило исследователей в поисках более технологического решения конкретных процессов с участием иммобилизованных в каррагинан клеток микроорганизмов.

Так, обработка упрочняющими реагентами: гексаметилендиамином и глутаровым альдегидом позволила повысить операционную стабильность (время полужизни) иммобилизованных в каррагинан клеток *E. coli* (аспартазная активность) с 50 сут для необработанных клеток до 686 сут [48], в случае *S. phaeochromogenes* (глюкозоизомеразная активность) с 150 до 260 сут, а обработка желатиной и глутаровым альдегидом до 532 сут [49].

Предложенная в работе [50] обработка  $\kappa$ -каррагинана аминами также привела к увеличению операционной стабильности иммобилизованных клеток *Brevibacterium flavum* без уменьшения исходной активности.

Интересные результаты получены при добавлении поликатионных полимеров: фумеразная активность иммобилизованных в  $\kappa$ -каррагинан *B. flavum* в присутствии 0,15% полиэтиленimina отличалась повышенной стабильностью к изменениям внешних факторов и температуры [51].

Учитывая, что температура плавления гелей  $\kappa$ -каррагинана с иммобилизованными клетками *B. flavum* при использовании полиэтиленimina на 20°С выше, чем без него, предполагается наличие взаимодействия между  $\kappa$ -каррагинаном, полиэтиленимином и *B. flavum*.

Увеличение пористости каррагинановой матрицы отмечено при введении в каррагинан трехзамещенного фосфата кальция [52], что улучшает диффузию питательных веществ в гель и его механические свойства.

К положительным результатам приводит и обработка каррагинана эпихлоргидрином и алкиленполиамидами при включении *Aspergillus niger* и *Saccharomyces cerevisiae* [53].

Следует отметить и новый метод упрочнения иммобилизованных в каррагинан клеток микроорганизмов, заключающийся в обработке гелей полиакриламидом, для чего проводят диффузию акриламида, *N,N'*-метилен-бис-ариламида и  $\beta$ -диметиламинопропионитрила в гранулы каррагинана с последующим проведением полимеризации [54].

Предложено также проводить и активационную обработку клеток растворами  $\text{NaCl}$  перед включением в каррагинан [55].

Достоверных физико-химических доказательств, объясняющих результаты по упрочнению каррагинанового геля и повышению операционной стабильности иммобилизованных клеток химической модификацией геля пока не получено и вследствие большого числа критериев, подлежащих учету, и непредсказуемости поведения конкретной ферментативной активности при иммобилизации в настоящее время трудно отдать предпочтение какому-то виду упрочняющих обработок. Попытки привлечь для выбора условий иммобилизаций  $z$ -потенциал клеток также не представляются убедительными [56]. Однако ясно, что матрица геля каррагинана играет важную роль в стабилизации включенных клеток микроорганизмов, тогда как каррагинан в растворенном состоянии не обладает стабилизирующим эффектом [31].

Многочисленные исследования показали, что клетки могут расти в каррагинановом геле с той же скоростью, что и свободные, а в ряде случаев лучше: в стационарной фазе роста число живых клеток дрожжей в геле было в 10 раз больше по сравнению с нативными [57]. Подобные результаты получены для *S. carlsbergensis* [58] и *E. coli* [14]. Рост со-

средоточен в приповерхностном слое геля, вследствие этого диффузионные эффекты незначительны, кислород и питательная среда хорошо потребляются, роста в центре гранул нет.

Так как одной из основных задач иммобилизации является получение их максимально высокой концентрации в носителе, возможность роста клеток в матрице каррагинана используют для их активации и накопления биомассы [59].

Результаты, достигнутые в области получения биокатализаторов на основе микробных клеток, иммобилизованных в  $\kappa$ -каррагинан, позволили применить их для целого ряда процессов [13, 17, 48, 60—66].

### III. ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В КАРРАГИНАН КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

**Синтез L-аспарагиновой кислоты.** В 1969 г. фирмой Танабэ Сейяко (Япония) было осуществлено разделение рацематов D, L-аминокислот в промышленных масштабах с использованием иммобилизованной аминоклаз [67]. Это был первый случай использования иммобилизованных ферментов. Затем предприняли попытку получения L-аспарагиновой кислоты с применением иммобилизованной аспартазы [68]. Однако низкая производительность данного процесса привела к использованию клеток *E. coli*, включенных в полиакриламидный гель [21], что позволило получить чистую L-аспарагиновую кислоту с выходом 95%. Учитывая частичную инактивацию аспартазной активности клеток, полиакриламидную матрицу заменили  $\kappa$ -каррагинаном [21]. Для увеличения операционной стабильности иммобилизованные клетки обрабатывали глутаровым альдегидом и гексаметилендиамином. Если продуктивность иммобилизованных клеток в полиакриламидный гель принять за 100%, то для включенных в  $\kappa$ -каррагинан она составила 1500, что позволило в 1978 г. начать промышленное производство L-аспарагиновой кислоты. Интересно отметить, что несмотря на то, что прочность японского  $\kappa$ -каррагинана 650 г/см<sup>2</sup>, а отечественного — 170 г/см<sup>2</sup>, после 400 ч работы активность иммобилизованных в  $\kappa$ -каррагинан клеток составила 43 ммоль/г, а иммобилизованных в отечественный каррагинан — 54 ммоль/г [45].

**Синтез L-аланина.** Аланин является ценной аминокислотой для нужд медицины и пищевой промышленности. Для ее непрерывного производства использовали иммобилизованные в каррагинан клетки *P. dactiniae*, обработанные глутаровым альдегидом [59, 63, 66] и инкубированные при pH 4,75 и 30°С в течение 1 ч для подавления аланинрацемазной и протеолитической активности. Период полунинактивации такого катализатора повышался до 280 сут.

Более эффективно получить L-аланин из фумарата аммония возможно, используя в одном реакторе иммобилизованные в  $\kappa$ -каррагинан клетки *E. coli*, обладающие аспартазной активностью, и клетки *P. dactiniae* с L-аспартат- $\beta$ -декарбоксилазной активностью [62, 64, 69].

**Получение глутаминовой кислоты.** Клетки *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13058, иммобилизованные в  $\kappa$ -каррагинан, в проточном ферментере стабильно работали 30 сут с продуктивностью 1,08 г глутамата/л/ч [61].

**Синтез L-аргинина.** Реактор с иммобилизованными в  $\kappa$ -каррагинан клетками *Serratia marcescens* позволял получить 10 мг/мл L-аргинина при pH 6,5 в течение длительного времени [70], причем при пропускании в реактор чистого кислорода иммобилизованные клетки растут в 5 раз интенсивнее, чем свободные.

**Синтез L-триптофана.** При иммобилизации клеток *E. coli*, обладающих L-триптофансинтетазной активностью, в полиакриламидный, альгинатный и каррагинановый гели большая активность (80% по сравнению со свободными) наблюдалась для каррагинана [71].

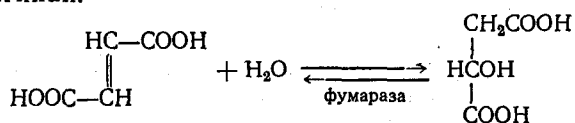
**Синтез L-тирозина.** Сравнение иммобилизации клеток *Citrobacter freundii* с тирозин-фенол-лиазной активностью в гели желатины, агара, агар-агара и  $\kappa$ -каррагинана свидетельствовало о большей эффективности

$\kappa$ -каррагинана, для 2—4% гелей активность составляла 80% активности свободных клеток [72, 73].

**Синтез *L*-изолейцина.** Для производства *L*-изолейцина из *D*-треонина использовалась система с иммобилизованными в каррагинан растущими клетками *Serratia marcescens* Ar130-1. Реактор с иммобилизованными клетками стабильно работал в течение 30 дней с производительностью 0,5 мг *L*-изолейцина/г геля/ч [14].

**Синтез *N*-ацетил-*L*-метионина.** Иммобилизованные в каррагинан, сшитые глутаровым альдегидом и гексаметилендиамином, клетки *E. carotovora* катализировали стереоселективный гидролиз амида *N*-ацетил-*D,L*-метионина с образованием *N*-ацетил-*L*-метионина с сохранением 61% исходной активности, при этом оптическая чистота составляла 100% [74].

**Синтез *L*-яблочной кислоты.** Совершенствуя процесс получения широко используемой в фармацевтической промышленности *L*-яблочной кислоты из фумаровой, клетки *B. ammoniagenes* и *B. flavum* иммобилизовали в каррагинан.



Если продуктивность *B. ammoniagenes* иммобилизованных в полиакриламидный гель принять за 100%, то для *B. flavum*, включенных в каррагинан, она составила 897% [48, 75—77]. В ряде работ [51, 78, 79] показано, что термо- и операционная стабильность клеток *B. flavum* резко возрастает при иммобилизации их в  $\kappa$ -каррагинан в присутствии полиэтиленimina и китайского галлотанина: в первом случае период полунактивации биокатализатора увеличивался более чем в 2 раза [79], во втором — в 3 раза [78].

**Производство антибиотиков.** Клетки *Penicillium chrysogenum*, иммобилизованные в  $\kappa$ -каррагинан, использовали для получения пенициллина G [80], клетки *Tolypocladium inflatum* синтезируют циклоспорин A, обладающий иммунодепрессантными свойствами и используемый при трансплантации органов [81], клетки *Penicillium urticae* применяли для полунепрерывного и непрерывного производства антибиотиков патулина из глюкозы [82—84], а клетки *Xanthomonas citri*, иммобилизованные в  $\kappa$ -каррагинан с обработкой гексаметилендиамином и глутаровым альдегидом — для синтеза цефалексина [85]. При получении пенициллина G и циклоспорина A установлено существование двух разделенных во времени фаз: роста клеток (при инкубации в питательной среде) и образование антибиотиков.

**Производство этанола.** В связи с ростом цен на нефть в последнее время повысился интерес к изучению спиртового брожения иммобилизованными в  $\kappa$ -каррагинан дрожжами [86—89]. Детально исследовались вопросы повышения количества клеток в геле, концентрации глюкозы и стабилизации гранул геля с иммобилизованными клетками [57, 58, 90—92]. Иммобилизованные в каррагинан клетки дрожжей растут лучше свободных [93], продуктивность иммобилизованных растущих клеток *Saccharomyces carlsbergensis* в 3 раза выше гомогенных клеток [58], наблюдалось непрерывное образование этанола из патоки (свыше 110 мг/мл) на протяжении 6 мес. Упрочнение гранул геля при производстве этанола проводилось полиакриламидом [54, 94], алкиленполиамидом [53], введением в каррагинан трехзамещенного фосфата кальция [52], проводились введение ингибиторов метаболизма: динитрофенола, азиды и арсената [95], продолжают работы по поиску более продуктивных микроорганизмов [8]. При сбраживании сахаров иммобилизованными в каррагинан клетками *Bacillus butacone* получали раствор, содержащий бутанол:ацетон:этанол (8:1:1), перспективный для получения дизельного топлива [96].



**Получение сахаров.** Непрерывное получение *D*-фруктозы из *D*-глюкозы было осуществлено с использованием иммобилизованных в  $\kappa$ -каррагинан клеток *Streptomyces phaeochromogenes* [15]. Глюкозо-изомеразная активность и стабильность иммобилизованных в каррагинан клеток приближалась к таковой для клеток, иммобилизованных в полиакриламидный гель, при этом время полужизни их в колоночном реакторе составляло 289 дней [31].

Клетки *Acetobacter suboxydans*, иммобилизованные в  $\kappa$ -каррагинановый гель, продуцировали *L*-сорбозу в количестве 0,2 мг/мл геля/ч стабильно в течение 15 дней [14].

Клетки *Gluconobacter suboxydans* с высокой алкогольдегидрогеназной активностью иммобилизовали включением в  $\kappa$ -каррагинановый гель и применили для биотрансформации *D*-арабита в *D*-ксилулозу с выходом 80%, активация проводилась предварительным инкубированием в питательной среде, содержащей *D*-глюкозу [97].

**Получение уксусной кислоты.** Клетки *Acetobacter aceti*, иммобилизованные в  $\kappa$ -каррагинан, стабильно в течение длительного времени со скоростью 22,5 мг/мл геля/ч производили уксусную кислоту [98, 99]. Известно использование для этих же целей *Clostridium thermoaceticum*, иммобилизованных в  $\kappa$ -каррагинан [100].

**Получение лимонной кислоты.** Использовали клетки *Aspergillus niger*, иммобилизованные в 2%-ный каррагинан в присутствии 1% NaCl и 1% этилендиаминтетрауксусной кислоты, с последующим диспергированием в минеральном масле при 40°С и обработкой полиэтиленмином либо алкиленполиамидом. Выход лимонной кислоты составил 5,2—5,3 г/20 мл реакционной среды в течение 31 сут [53, 101].

**Получение стероидов и алкалоидов.** Стероиды были одними из первых субстратов, которые трансформировали с помощью иммобилизованных клеток [102]. Примеров использования каррагинана для иммобилизации микроорганизмов, трансформирующих стероиды и алкалоиды, немного [103, 104]: это включение клеток *Arthrobacter globiformis*, обладающих 3-кетостероид- $\Delta'$ -дегидрогеназной активностью, клеток *Claviceps purpurea*, осуществляющих биосинтез фармацевтически важных алкалоидов: ксаноклавина, агроклавина, элимоклавина, эргометрина. Сопоставление полученных результатов с данными по иммобилизации в полиакриламидный гель и альгинат кальция позволили авторам сделать вывод о их преимуществе перед каррагинаном при синтезе стероидов [1].

**Синтез витамина  $B_{12}$ .** Сравнительное изучение синтеза витамина  $B_{12}$ , иммобилизованными в  $\kappa$ -каррагинан, альгинат кальция, агар, уретановые фотополимеры клетками *Propionibacterium shermanii*, *P. freundenreichii* subsp. *shermanii* ATCC 13673, *Propionibacterium* sp. ar I AKU 1251, и *N*, AKU 1253, *Propionibacterium* sp. IAM 1714 свидетельствовало о преимуществе клеток, иммобилизованных в уретановый фотополимер [105].

**Синтез ферментов.** Преимущества производства ферментов с использованием иммобилизованных клеток состоят в возможности поддержания высокой концентрации клеток и быстром их отделении. Однако скорость диффузии питательных веществ в матрицу полимера, в особенности кислорода в аэробных культурах, существенно ограничивает рост и метаболическую активность клеток в геле. При включении клеток *Bacillus amyloliquefaciens* в каррагинан дыхательная активность и скорость роста подавлены до 1/2 и 1/6, соответственно, однако, образование *L*-амилазы было практически аналогичным свободными клетками [106].

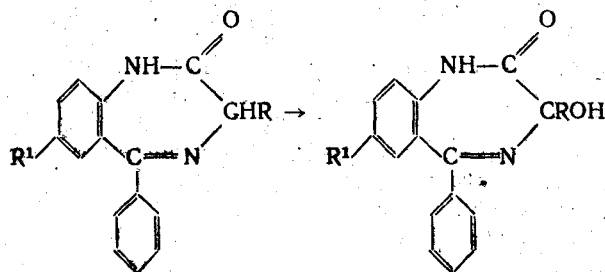
**Синтез диоксиацетона.** Осуществлен синтез диоксиацетона, применяемого в косметической и пищевой промышленности, из глицерина иммобилизованными в  $\kappa$ -каррагинан клетками *Gluconobacter melangenes* [107].

**Синтез 2,3-бутандиола.** Клетки *Enterobacter aerogenes*, иммобилизованные в  $\kappa$ -каррагинан, в течение 10 сут стабильно производили 2,3-бутандиол. При активации, проводимой путем инкубирования в питательной среде, клетки выросли в 200 раз [108].

**Восстановление нитросоединений.** Нитроредуктазная активность клеток *E. coli*, иммобилизованных в филлофорин из черноморской филофоры ширококленистой формы и каррагинан из филофоры шаровидной формы, выше активности клеток, иммобилизованных в  $\kappa$ -каррагинан.

При этом максимальное сохранение нитроредуктазной активности наблюдается при массовом соотношении клетки: каррагинановый гель 1:10. Изучение условий грануляции показало, что оптимальная грануляция в толуоле при 0—4°С. Упрочнение гранул геля с иммобилизованными клетками с большей нитроредуктазной активностью происходит в растворах 0,3—0,4 М КСl. Изучение модификации полученных иммобилизованных препаратов аминами (аммиак, гексаметилендиамин, гидразингидрат, диэтил- и триэтиламин), глутаровым альдегидом, четыреххлористым титаном показало, что нитроредуктазная активность препаратов, обработанных четыреххлористым титаном на уровне немодифицированных, а при обработке диэтил- и триэтиламиноном она повышается до 122 и 145% соответственно. С помощью полученных биокатализаторов проведено восстановление нитрозамещенных бензо-2,1,3-тиадиазолов, 1,4-бенздиазепин-2-онов, замещенных нитробензолов, с образованием соответствующих аминов в колоночном режиме [109, 110].

**Синтез 3-оксипроизводных-1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов.** В работе [111] показано, что при трансформации 1,2-дигидро-3Н-1,4-бенздиазепин-2-онов актиномицетами, иммобилизованными в каррагинан, с выходами 65%, по отношению к активности свободных клеток, образуются оптически активные (+)3-оксипроизводные, обладающие более выраженной активностью по антагонизму с корразолом и по потенцированию гексеналового сна по сравнению с рацематом.



Реализация этого процесса позволит получить соответствующие 3-оксипроизводные в одну стадию вместо шести, проводимых в химическом способе синтеза.

**Очистка сточных вод.** Клетки *Clostridium pasteurianum* и *Alcaligenes eutrophis*, катализирующие превращение  $\text{HT} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2 + \text{НТО}$ , иммобилизовали в альгинат кальция и  $\kappa$ -каррагинан с целью удаления трития из загрязненных радиоактивными примесями вод (например, из систем охлаждения атомных электростанций) [112]. По своей каталитической активности 10 г иммобилизованных в каррагинан клеток эквивалентны 1 г платинового катализатора, но в отличие от него дешевы, легко получают в большом объеме, активны в жидкой фазе.

**Кислотопонижение виноматериалов.** Показано, что иммобилизованные в каррагинан клетки *Leuconostoc oenos* проводят 100%-ную трансформацию L-яблочной кислоты в L-молочную при кислотопонижении виноматериалов.

Таким образом, суммируя приведенные выше данные, можно сделать вывод о перспективности использования иммобилизованных в каррагинан клеток микроорганизмов для получения органических соединений.

\* \* \*

В заключение авторы выражают надежду, что этот обзор послужит отправной точкой для дальнейшего изучения возможностей использования иммобилизованных клеток микроорганизмов в органическом синтезе, что позволит создать новые биокатализаторы для практического исполь-

зования. Особое внимание при этом должно быть уделено рассмотрению каррагинана отечественного производства и его применимости для иммобилизации клеток. Очевидно, более детальное изучение иммобилизации и механизма гелеобразования позволит глубже понять природу межмолекулярных взаимодействий в полисахаридных комплексах, причины повышенной стабильности иммобилизованных в каррагинане клеток микроорганизмов, разработать более эффективные методы получения органических веществ для нужд промышленности, сельского хозяйства и медицины.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кощенко К. А. // Прикл. биохимия и микробиол. 1981. Т. 17. № 4. С. 477.
2. Immobilized gels and organelles/Ed. B. Mattiasson. Boca Raton, Florida: CRG Press, Inc., 1982. V. 1. 143 p; V. 2. 158 p.
3. Ergun F., Atrai P., Dhulster P. et al. // Z. Allg. Mikrobiol. 1982. B. 22. N 9. S. 607.
4. Somerville H. J., Mason I. R., Rufelt R. H. // Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1977. V. 4. N 2. P. 75.
5. Klein J., Kluge M. // Biotechnol. Lett. 1980. V. 3. N 1. P. 65.
6. Constantinides A. // Biotechnol. and Bioeng. 1980. V. 22. N 1. P. 119.
7. Niddelhoven W. J., Bakker Cor M. // Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1982. V. 15. N 4. P. 214.
8. Banerjee M., Chakrabarty A. // Biotechnol. and Bioeng. 1982. V. 24. N 8. P. 1839.
9. Wang Q., Ji X., Yuan Z. // Enzyme Eng. 1982. V. 6. P. 215.
10. Dhulster P., Parascandola P., Scardi V. // Enzyme and Microbiol. Technol. 1983. V. 5. N 1. P. 65.
11. Klein J., Washansen R., Kluge M. et al. // Enzyme Eng. 1980. V. 5. P. 359.
12. Fukushima S., Hanai S. // Ibid. 1982. V. 6. P. 347.
13. Sato T., Nishida Y., Tosa T. et al. // Biochem. Biophys. Acta. 1979. V. 570. N 1. P. 179.
14. Wada M., Kato J., Chibata I. // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1979. V. 8. N 4. P. 241.
15. Chibata I., Tosa T., Sato T. et al. // Enzyme Eng. 1978. V. 4. P. 335.
16. Березин Н. В. // Биотехнология. 1985. № 2. С. 113.
17. Chibata I. // Basis Biol. New Dev. Biotechnol. Proc. Symp. Minneapolis, Minn., 25—28 May. 1982. N. Y.—L. 1983. P. 465.
18. Fukui S., Tanaka A. // Annu. Rev. Microbiol. V. 36. 1982. P. 145.
19. Takata I., Wamamoto K., Tosa T. et al. // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1979. V. 7. N 2. P. 161.
20. Sato T., Mori T., Tosa T. et al. // Biotechnol. and Bioeng. 1975. V. 17. N 12. P. 1797.
21. Tosa T., Sato T., Mori T. et al. // Appl. Microbiol. 1974. V. 27. N 5. P. 886.
22. Jack T. R., Zajic J. E. // Biotechnol. and Bioeng. 1977. V. 19. N 5. P. 631.
23. Szwajces E., Prodelius P., Mosbach K. // Enzyme and Microbiol. Technol. 1982. V. 4. N 6. P. 409.
24. Bang W. G., Lang S., Sahm H. et al. // Biotechnol. and Bioeng. 1983. V. 25. N 4. P. 1013.
25. Para G., Lucciardi P., Haratti J. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. V. 21. N 5. P. 273.
26. Takamatsu S., Umemura J., Yamamoto K. et al. // Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1982. V. 12. N 3. P. 147.
27. Chibata I., Tosa T., Takata I. Пат. 4138292 США/Б. И. 1979. № 19.
28. Cheetman P. S. J., Blunt K. W., Bucke C. // Biotechnol. and Bioeng. 1979. V. 21. N 12. P. 2155.
29. Veliky I. A., Williams R. E. // Biotechnol. Lett. 1981. V. 3. N 6. P. 275.
30. Усов А. И. // Успехи биол. химии. 1979. Т. 20. С. 169.
31. Chibata I. // Enzyme Eng. 1980. V. 5. P. 393.
32. O'Neill A. N. // J. Amer. Chem. Soc. 1955. V. 77. N 23. P. 6324.
33. Painter T. J. // J. Chem. Soc. 1964. N 4. P. 1396.
34. Rees D. A. // Ibid. 1963. N 3. P. 1821.
35. Morris E. R., Norton J. T. Aggregat. Processes Solut. Amsterdam e. a., 1983. P. 549.
36. Rees D. A., Scott W. E. // J. Chem. Soc. 1971. B. N 3. P. 469.
37. Иллиел Э. Конформационный анализ. М.: Мир, 1969. 592 с.
38. Усов А. И. // Прогресс химии углеводов. М.: Наука, 1985. С. 77.
39. Morris E. R., Rees D. A., Robinson C. // J. Mol. Biol. 1980. V. 138. N 2. P. 349.
40. Яроцкий С. В., Шашков А. С., Усов А. И. // Биоорг. химия. 1978. Т. 4. № 6. С. 745.
41. Ставра С. Н. Агарайд. Кишинев, 1981. 49 с. Деп. в ОНИИТЭХИМ № 2872/79.
42. Усов А. И. // Тр. ВНИРО. т. 124. М.: Пищевая пром-сть. 1977. С. 65.
43. Войводов К. И., Зуева Н. Н., Яковлева В. И. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. т. 23, № 2. С. 192.
44. Зуева Н. Н., Веревкин А. Н., Соколова Е. Н. и др. // V Всесоюз. симп. по инженерной энзимологии «Получение и применение биокатализаторов в народном хозяйстве и медицине». Кобулет, 1985. Ч. 1. С. 230.
45. Зуева Н. Н., Яковлева В. И., Веревкин А. И. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 1985. Т. 21. № 4. С. 506.
46. Зуева Н. Н., Яковлева В. И., Веревкин А. И. и др. // Тез. докл. IV Всесоюз. симп.

по инженерной энзимологии (получ. и прим. биокатализаторов в народ. хоз-ве и мед.). М., 1983. Ч. 1. С. 103.

47. Тысячная И. В., Родригес М. Х., Яковлева В. И. и др.//Прикл. биохимия и микробиология. 1984. т. 20. № 1. С. 79.
48. Tosa T., Sato T., Mori T. et al.//Biotechnol. and Bioeng. 1979. V. 21. N 10. P. 1697.
49. Takata I., Tosa T., Chibata I.//J. Solid Phase Biochem. 1977. V. 2. N 3. P. 225.
50. Takata I., Kayashima K., Tosa T. et al.//J. Appl. Biochem. 1982. V. 4. N 4. P. 371.
51. Takata I., Kayashima K., Tosa T. et al.//J. Ferment. Technol. 1982. V. 60. N 5. P. 431.
52. Wang H. Y., Hettwer D. J.//Biotechnol. and Bioeng. 1982. V. 24. N 8. P. 1827.
53. Borglum G. B. Пат. 4347320 США/РЖФиз.-хим. биол. и биотехнол. 1984, 2Е378.
54. Kuu W. V., Polack J. A.//Biotechnol. and Bioeng. 1983. V. 25. N 8. P. 1995.
55. Мурина Е. Г., Нахапетян Л. А., Площина И. Г. А. с. 1060675 СССР//Б. И. 1983. № 46. С. 98.
56. Michaux M., Paquot M., Baijot B. et al.//Biotechnol. and Bioeng. Symp. 1982. N 12. P. 475.
57. Wada M., Kato J., Chibata I.//Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1981. V. 11. N 1. P. 67.
58. Wada M., Kato J., Chibata I.//Ibid. 1980. V. 10. N 4. P. 275.
59. Takamatsu S., Yamamoto K., Tosa T. et al.//J. Ferment. Technol. 1981. V. 59. N 6. P. 489.
60. Hultin H. O.//Food Technol. 1983. V. 37. N 10. P. 66.
61. Kim H. S., Ryu Dewey D. Y.//Biotechnol. and Bioeng. 1982. V. 24. N 10. P. 2167.
62. Sato T., Takamatsu S., Yamamoto K. et al.//Enzyme Eng. 1982. V. 6. P. 271.
63. Takamatsu S., Tosa T., Chibata I.//J. Chem. Soc. Jap., Chem. and Ind. Chem. 1983. N 9. P. 1369.
64. Takamatsu S., Yamashita K.//J. Chem. Eng. Jap. 1984. V. 17. N 4. P. 406.
65. Thonart Ph., Paquot M., Baijot B. et al.//Ann. Gembloux. 1983. V. 89. N 4. P. 2221.
66. Yamamoto K., Tosa T., Chibata I.//Biotechnol. and Bioeng. 1980. V. 22. N 10. P. 2045.
67. Mori T., Sato T., Tosa T. et al.//Enzymologia. 1972. V. 43. N 1. P. 213.
68. Tosa T., Sato T., Mori T. et al.//Biotechnol. and Bioeng. 1973. V. 15. N 1. P. 69.
69. Takamatsu S., Tosa T., Chibata I.//J. Chem. Eng. Jap. 1985. V. 18. N 1. P. 66.
70. Fujimura M., Kato J., Tosa T.//Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1984. V. 19. N 2. P. 79.
71. Langrene S., Le Goffic F.//Enzyme and Microb. Technol. 1984. V. 6. N 2. P. 81.
72. Мартинес Х. Р., Тысячная И. В., Яковлева В. И.//Тез. докл. IV Всесоюз. симпоз. по инженерной энзимологии (получение и применение биокатализаторов в народ. хоз-ве и мед.). М., 1983. Ч. 1. С. 113.
73. Тысячная И. В., Яковлева В. И., Арен А. К.//Прикл. биохимия и микробиология. 1981. Т. 17. № 5. С. 645.
74. Nishida Y., Nabe K., Yamada S. et al.//Enzyme and Microb. Technol. 1984. V. 6. N 2. P. 85.
75. Takata I., Tosa T., Chibata I.//Appl. Biochem. Biotechnol. 1983. V. 8. N 1. P. 31.
76. Takata I., Tosa T., Chibata I.//Agric. Biol. Chem. 1983. V. 47. N 6. P. 1289.
77. Takata I., Yamamoto K., Tosa T. et al.//Enzyme Microbiol. Technol. 1980. V. 2. N 1. P. 30.
78. Takata I., Tosa T., Chibata I.//Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1984. V. 19. N 2. P. 85.
79. Tosa T., Takata I., Chibata I.//Enzyme Eng. 1982. V. 6. P. 237.
80. Deo Y. M., Haucher G. M.//Biotechnol. and Bioeng. 1984. V. 26. N 3. P. 285.
81. Foster B. C., Coutts R. T., Pasutto F. M. et al.//Biotechnol. Lett. 1983. V. 5. N 10. P. 693.
82. Deo Y. M., Gaucher G. M.//Ibid 1983. V. 5. N 2. P. 125.
83. Deo Y. M., Gaucher G. M.//Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1985. V. 21. N 3—4. P. 220.
84. Jones A., Berk D., Lesser B. H. et al.//Biotechnol. Lett. 1983. V. 5. N 12. P. 785.
85. Kim Jk. H., Nam D. H., Ryu Dewey D. Y.//Appl. Biochem. Biotechnol. 1983. V. 8. N 3. P. 195.
86. Argyrios M., Gerald R. E.//Dev. Ind. Microbiol. 1983. V. 24. P. 329.
87. Klein J., Kressdorf B.//III Eur. Congr. Biotechnol., München, 10—14 Septl. 1984. V. 2. Weinheim e. a. 1984. P. 375.
88. Luong J. H. T., Tseng M. C.//Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1984. V. 19. N 4. P. 207.
89. Marwaha S. S., Kennedy J. F.//Enzyme and Microb. Technol. 1984. V. 6. N 1. P. 18.
90. Linko P., Linko Y. Y.//Enzyme Eng. 1982. V. 6. P. 335.
91. Luong J. H. T.//Biotechnol. and Bioeng. 1985. V. 27. N 12. P. 1652.
92. Nojima Shogo//CEER Chem. Econ. and Eng. Rev. 1983. V. 15. N 4. P. 17.
93. Nilsson K., Birnbaum S., Flygare S. et al.//Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1983. V. 17. N 6. P. 319.
94. Sturgeon C. M., Kennedy J. F.//Enzyme and Microb. Technol. 1984. V. 6. N 3. P. 140.
95. Amin G., Standaert P., Verachtert H.//Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1984. V. 19. N 2. P. 91.
96. Pierce S. M., Wayman M. Пат. 4368056 США/РЖФиз.-хим. биол. и биотехнол. 1984, 2Е490.
97. Ohmoto S., Tazawa Y., Ueda R.//J. Ferment. Technol. 1983. V. 61. N 4. P. 373.
98. Mori A.//Process Biochem. 1985. V. 20. N 3. P. 67.
99. Osuga J., Mori A., Kato J.//J. Ferment. Technol. 1984. V. 62. N 2. P. 139.
100. Wang G., Wang D. J. C.//Appl. Biochem. Biotechnol. 1983. V. 8. N 6. P. 491.

101. *Borglum G. B.* Заявка № 52829 Европа//С. А. V. 97, 90398.
102. *Mosbach K., Larsson P. O.*//Biotechnol. and Bioeng. 1970. V. 12. N 1. P. 19.
103. *Суходольская Г. В., Борман Е. А., Коцеев К. А.*//Тез. докл. IV Всесоюз. симп. по инженерной энзимологии (получение и применение биокатализаторов в народ. хоз-ве и мед.). М., 1983. Ч. 2. С. 24.
104. *Kopp Bettina, Rehm H. J.*//Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol. 1983. V. 18. N 5. P. 257.
105. *Yongsmith B., Sonomoto K., Tanaka A. et al.*//Ibid. 1982. V. 16. N 2—3. P. 70.
106. *Shimyo A., Kimura H., Okada H.*//Ibid. 1982. V. 14. N 1. P. 7.
107. *Nabe K., Izno M., Yamada S. et al.*//Appl. Environmental Microbiol. 1979. V. 38. P. 1056.
108. *Wei Chua J., Erarslan A., Kinoshita S. et al.*//J. Ferment. Technol. 1980. V. 58. N 2. P. 123.
109. *Давиденко Т. И., Котляр И. И., Бондаренко Г. И. и др.*//Хим.-фарм. журн. 1984. № 9. С. 1105.
110. *Давиденко Т. И., Милиенко Н. П., Бондаренко Г. И. и др.*//Тез. докл. XVI конференции федерации Европейского биохим. о-ва. М., 1984. С. 403.
111. *Давиденко Т. И., Заболотская Н. Н., Милиенко Н. П. и др.*//Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. № 4. С. 878.
112. *Klibanov A. M.*//Enzyme Eng. 1982. V. 6. P. 319.

Физико-химический институт  
им. А. В. Богатского АН УССР,  
Одесса