

УДК 577.154.2+542.952+579.22

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА–ПРОДУЦЕНТА ГЛЮКОЗОИЗОМЕРАЗЫ В КСЕРОГЕЛЕ ДИОКСИДА КРЕМНИЯ И СВОЙСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

© 2011 г. Г. А. Коваленко*, **, Л. В. Перминова*, Т. В. Чуенко*, Л. И. Сапунова***, Е. А. Шляхотко***, А. Г. Лобанок***

*Институт катализа СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия
e-mail: galina@catalysis.ru

**Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

***Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, 220141 Беларусь

Поступила в редакцию 13.06.2010 г.

Разработан оригинальный способ иммобилизации нерастущих клеток микроорганизмов в ксерогеле диоксида кремния, содержащем нерастворимые гидроксо соединения кобальта(II). На основе *Escherichia coli* с использованием гена *Arthrobacter nicotianae* сконструирован рекомбинантный штамм–продукцент глюкозоизомеразы. Обнаружено, что активность глюкозоизомеразы и стабильность биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма *E. coli*, в 3–5 раз выше по сравнению с биокатализаторами, приготовленными с использованием штамма–донора *A. nicotianae*. В условиях непрерывного гидролиза 3 М фруктозы при 62–65°C в реакторе с неподвижным слоем время полунинактивации биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма и *A. nicotianae*, было ~60 и ~25 сут соответственно.

Глюкозоизомераза (ГИ) (ксилозоизомераза, D-ксилоза кетол-изомераза, КФ 5.3.1.5) – фермент, катализирующий реакцию изомеризации глюкозы во фруктозу. Научные публикации последних лет посвящены целенаправленному изменению свойств этого фермента путем селекции и адаптации соответствующих “диких” штаммов–продукентов [1–4]. В работе [3] описаны свойства ГИ, выделенной из гипертермофилов рода *Thermotoga* sp., которая проявляет активность при температуре выше 100°C; при 90°C продуктивность фермента, выделенного из *Thermotoga neapolitana*, составляет 1000 кг фруктозы на 1 кг фермента. Однако следует учитывать, что при температуре $\geq 65^\circ\text{C}$ в присутствии кислорода протекает побочная реакция разложения фруктозы. В работе [1] описана ГИ из *Streptomyces olivaceoviridis* E-86, которая проявляет высокую активность и стабильна при pH 5.0. Выделенный фермент сохраняет первоначальную активность при 60°C и pH 5.0 в течение 30 ч. Использование кислотоустойчивой ГИ позволит объединить стадию осахаривания крахмала со стадией изомеризации глюкозы. Глюкозо–фруктозные сиропы (ГФС), полученные по такой одностадийной технологии, содержат ~50% фруктозы и менее 1.5% неизвестных олигосахаридов [1]. Методом адаптационной селекции штамма–продукента ГИ *A. nicotianae* БИМ В-5 [2] получен и охарактеризован штамм *A. nicotianae* БИМ В-5-МГ-1 (В-391 Д) [4].

На современном этапе развития молекулярной биологии перспективным направлением является

конструирование рекомбинантных штаммов (табл. 1), в которых на долю продуцируемой глюкозоизомеразы приходится 15–60% суммарного внутриклеточного белка [5–11]. Ген *xyIA*, кодирующий ферментный белок ГИ, выделен, секвенирован и депонирован в базе данных GenBank (код доступа Ay937238), а также клонирован в различных гетерокариотических микроорганизмах, в том числе в *E. coli* BL21 (DE3). Плазмида pET24bxyIA обеспечивает синтез ГИ в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* БИМ В-427 Д [12].

Ранее был разработан оригинальный способ иммобилизации нерастущих микроорганизмов путем включения микробной биомассы в структуру ксерогеля диоксида кремния и проведены исследования свойств гетерогенных биокатализаторов, приготовленных на основе штаммов–продукентов глюкозоизомеразы *A. nicotianae* [13, 14].

Цель работы – сравнительные исследования свойств (ГИ-активность и стабильность) гетерогенных биокатализаторов, приготовленных на основе рекомбинантного штамма–продукента глюкозоизомеразы *E. coli* BL21(DE3)/pET24bxyIA путем включения микробной биомассы в ксерогель диоксида кремния; подбор оптимальных условий приготовления и состава биокатализаторов, включая относительное содержание всех компонентов и сшивающего реагента.

Таблица 1. Рекombинантные штаммы–продуценты глюкозоизомеразы

Штамм–продуцент (организм–реципиент)	Организм–донор гена <i>xyIA</i>	Глюкозоизомеразная активность		Ссылка
		Е/л культуральной среды	Е/мг белка	
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>		0.148	[9]
<i>E. coli</i>	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	40		[6]
<i>E. coli</i>	<i>Thermus thermophilus</i>	450		[7]
<i>Streptomyces lividans</i> ТК 24	<i>Streptomyces lividans</i>	1570–2440		[10]
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Clostridium thermohydrosulfuricum</i>	2100		[8]
<i>E. coli</i> BL21(DE3)/ <i>pET24bxyIA</i>	<i>A. nicotianae</i> БИМ В-5-МГ-1	1600	2.22	[12]

МЕТОДИКА

В работе использовали рекombинантный штамм–продуцент глюкозоизомеразы *E. coli* BL21(DE3)/*pET24bxyIA* (рек-*E. coli*), в котором экспрессия гена глюкозоизомеразы из *A. nicotianae* контролируется *lac*-промотором фага Т7. Глубинное выращивание бактерий рекombинантного штамма проводили на качалке (200 об/мин) в 250 мл колбах Эрленмейера, содержащих 50–100 мл питательной среды в течение 6 ч при 37°C. Состав питательной среды (г/л): пептон ферментативный – 10.0, NaCl – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, канамицин – 0.02. Начальное значение рН 6.85. В качестве посевного материала использовали суспензию бактерий, выращенных на описанной выше среде в течение 18–20 ч при 37°C, в количестве 1 об. % к объему питательной среды (100 мл). В качестве индуктора гена глюкозоизомеразы использовали 0.001%-ную лактозу, которую добавляли через 2 ч от начала культивирования при достижении культурой ранней экспоненциальной фазы роста. По окончании культивирования микробную биомассу собирали в стационарной фазе роста, отделяли от культуральной жидкости центрифугированием (~10000 г, 15 мин), ресуспендировали в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, и использовали в реакции изомеризации фруктозы. Мутность суспензии определяли по величине оптической плотности (ОП) при 590 нм в 1 см кювете. Для расчетов концентрации клеток (г/л) и удельной активности (Е/г) использовали коэффициент, равный 0.32 г/л·ОП ($l = 1$ см). Удельная активность клеток в суспензии составляла $\sim 3000 \pm 1000$ Е/г сухих клеток при 70°C.

Иммобилизацию микроорганизмов и приготовление трехкомпонентных гетерогенных биокатализаторов осуществляли путем включения нерастущих клеток рек-*E. coli* в структуру ксерогеля диоксида кремния. Для этого микробную биомассу (компонент 1) тщательно смешивали с гидрогелем диоксида кремния (компонент 2, SiO₂), полученным из жидкого стекла золь-гель методами, и влажным осадком нерастворимых гидроксосоединений кобальта (компонент 3, Co_xO_y), свежесажженных водным раствором аммиака из растворов нитрата кобальта (II).

При проведении поперечной сшивки раствор бифункционального реагента – глутарового диальдегида (ГА) или карбодиимида (1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимид мето-4-толуолсульфонат, КД) добавляли в расчете 20–100 мг реагента на 1 г сухих клеток, но не более 400 мг/г, так как было показано, что ГА уменьшает глюкозоизомеразную активность микробной биомассы. Полученную однородную смесь (1 + 2 + 3) высушивали до суховоздушного состояния (влажность 10–12%), механически размельчали, прессовали при избыточном давлении 150 атм и фракционировали для получения гранул твердого гетерогенного биокатализатора размером от 1 до 4 мм.

Измерения глюкозоизомеразной активности проводили при температурах от 60 до 85°C в среде 0.02 М фосфатного буфера, рН 7.0. В качестве субстрата использовали 0.1–3 М растворы фруктозы. Для определения ферментативной активности в клеточной суспензии в среду добавляли соли Mg²⁺ и Co²⁺ в виде сульфатов в концентрации 1 мМ. При измерении активности гетерогенных биокатализаторов, в состав которых входили нерастворимые гидроксосоединения Со(II), ионы Со²⁺ в реакционную среду не добавляли. Скорость реакции, равную 1 мкмоль/мин, принимали за единицу ферментативной активности (Е). Активность выражали в Е/г сухих клеток или в Е/г биокатализатора для клеток в суспензии и иммобилизованных клеток соответственно. Концентрацию глюкозы, образующейся в реакционной среде при изомеризации фруктозы, определяли с помощью фермента глюкозооксидазы. Экспериментальная ошибка составляла $\leq 15\%$.

Реакцию изомеризации проводили как в периодическом, так и непрерывном режиме.

Периодический процесс. Изомеризацию фруктозы проводили в замкнутой циркуляционной установке, состоящей из: 1) колоночного реактора (высота 5 см и диаметр 1 см), заполненного биокатализатором (масса 0.05–0.2 г), 2) смесителя (объем 20 мл) на магнитной мешалке, 3) термостата, поддерживающего заданную температуру реакционной среды в смесителе и в слое биокатализатора, 4) перистальтического насоса, обеспечивающего циркуля-

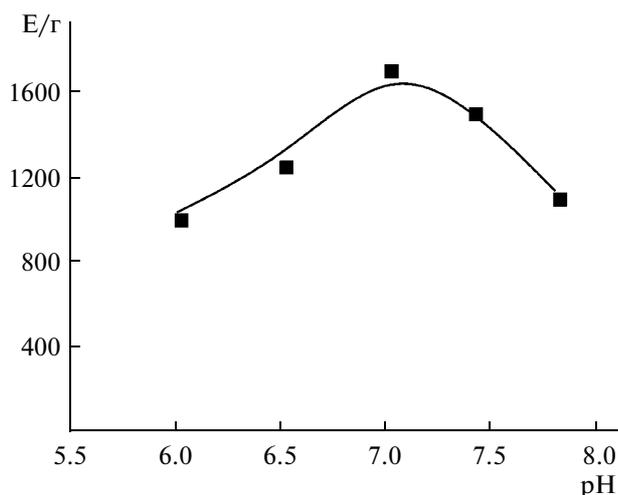


Рис. 1. Зависимость удельной активности (Е/г) рек-*E. coli* в суспензии от рН (70°C, 2 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, 1 мМ Mg²⁺, 1 мМ Co²⁺).

цию раствора субстрата (объем 6 мл) через слой биокатализатора (высота 0.1–0.5 см) со скоростью 1.5 мл/мин. Продолжительность одного реакционного цикла составляла от 2 до 8 ч, после чего реакционную смесь удаляли, а биокатализатор промывали дистиллированной водой и буфером, рН 7.0. Для биокатализаторов, в особенности свежеприготовленных, определяли фоновую активность в аликвоте, взятой из смесителя после 2 ч циркуляции реакционной среды через слой биокатализатора. Суммарная скорость реакции (W_{Σ}) складывалась из фоновой активности ($W_{\text{фон}}$) и активности гетерогенного биокатализатора ($W_{\text{ИММ}}$), т.е. $W_{\text{ИММ}} = W_{\Sigma} - W_{\text{фон}}$. Исходя из значения $W_{\text{ИММ}}$, рассчитывали: 1) удельную глюкозоизомеразную активность иммобилизованных клеток, Е/г сухих клеток, 2) активность биокатализатора, Е/г, 3) активность в среде ($W_{\text{среда}} = W_{\text{ИММ}}/V$), которую определяли, как начальную наблюдаемую активность ГИ в расчете на единицу суммарного объема (V) реакционной среды в установке, включая соединения между всеми ее частями (реактор, смеситель, перистальтический насос), Е/мл среды.

Непрерывный процесс. Изомеризацию проводили с использованием реактора идеального вытеснения в виде стеклянной колонки высотой 15 см и диаметром 1 см, заполненной гранулами приготовленного биокатализатора размером 1–4 мм и инертным наполнителем – стеклянными шариками $\varnothing 2$ мм при соотношении их объемов 1 : 1. Использование наполнителя значительно уменьшало гидродинамическое сопротивление слоя в реакторе. Колоночный реактор помещали в термостат с поддерживаемой температурой $62 \pm 2^\circ\text{C}$, и через неподвижный слой объемом 10 см³ прокачивали сверху–вниз 3 М раствор фруктозы со скоростью 0.02 мл/мин. Периоди-

чески (1 раз в сутки) отбирали пробы на выходе из реактора и анализировали их на содержание глюкозы. Непрерывный процесс характеризовали следующими параметрами: 1) конверсия субстрата (x), 2) время работы биокатализатора в условиях постоянства величины конверсии, близкой к 50%, 3) время полуинактивации ($t_{1/2}$), равное времени, в течение которого конверсия субстрата падала в 2 раза.

Стабильность биокатализаторов определяли при хранении в 0.02 М фосфатном буфере, рН 7.0, а также в сухом виде при 20–22°C.

Для сравнения использовали результаты, полученные для биокатализаторов, приготовленных путем иммобилизации микробной биомассы *A. nicoitiana* в ксерогель диоксида кремния [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная характеристика продуктивности штаммов. Было найдено, что выход ферментного белка у рекомбинантного штамма *E. coli* BL21(DE3)/*pET24bxyIA* на порядок выше, чем у *A. nicoitiana* БИМ В-5-МГ-1, и достигает 1.6 Е/мл, при этом в несколько раз сокращается длительность культивирования. Максимальная доля фермента, синтезированного рекомбинантным штаммом в ответ на введение индуктора (лактоза), составила около 50% суммарного белка клеток.

Свойства клеточносвязанной ГИ в суспензиях. Снижение значения рН для проведения процесса изомеризации моносахаридов является важным параметром для практического применения ГИ. Были проведены исследования по определению рН-оптимума реакции изомеризации в суспензиях рекомбинантного штамма-продуцента и было обнаружено, что для рек-*E. coli* значение рН-оптимума составляет 7.0 (рис. 1), то есть сдвинуто в более кислую область по сравнению с *A. nicoitiana*, для которого рН_{опт} 7.5–7.8 [15]. Дальнейшие исследования с участием рек-*E. coli* были проведены в буферной среде со значением рН 7.0.

Сравнительные исследования свойств фермента в суспензиях штамма–донора *A. nicoitiana* и рекомбинантного штамма *E. coli* показали, что характеристики ферментов были близкими. Так, в изученных условиях значения константы Михаэлиса K_m по фруктозе для изученных штаммов были одинаковыми по величине и приблизительно равными 0.5 М (рис. 2). При повышении температуры начальная скорость реакции изомеризации фруктозы ($W_{t \rightarrow 0}$) увеличивалась линейно (рис. 3). Исследование термостабильности ГИ в суспензиях показало, что при 85°C для рек-*E. coli* полная дезактивация фермента происходила в течение 10–15 мин (рН 7.0), тогда как для *A. nicoitiana* – в течение 3–5 мин (рН 7.8).

При исследовании кинетики реакции изомеризации фруктозы в суспензиях изученных штаммов была обнаружена следующая закономерность: в тех

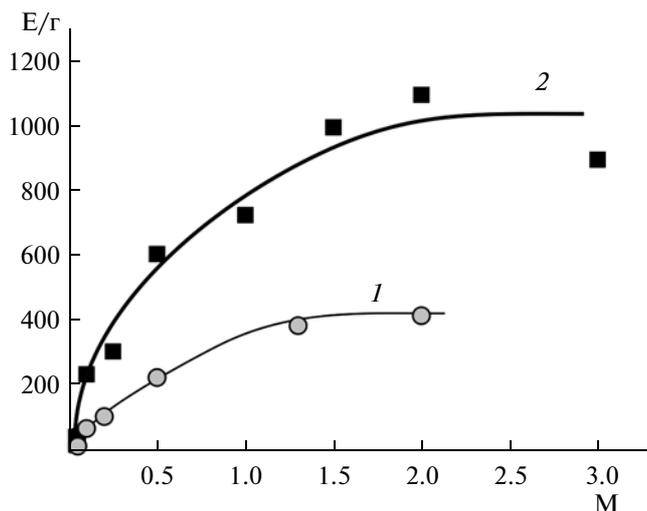


Рис. 2. Кинетика Михаэлиса–Ментен (М) для суспендированных *A. nictotianae* (1) и рек-*E. coli* (2) (70°C, 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.8 и 7.0 для *A. nictotianae* и рек-*E. coli* соответственно, 1 мМ Mg^{2+} , 1 мМ Co^{2+}).

случаях, когда начальная ГИ-активность в расчете на единицу объема реакционной среды была высокой ($W_{\text{среда}} \geq 20$ Е/мл), истинное равновесие в реакции, соответствующее образованию эквимольной смеси моносахаридов, $x = 50 \pm 2\%$, устанавливалось достаточно быстро, в течение 1–4 ч (рис. 4, 2, 3). В тех случаях, когда начальная ГИ-активность в реакционной среде была относительно низкой ($W_{\text{среда}} \sim 10$ Е/мл), в системе устанавливалось стационарное состояние, при этом скорость реакции приближалась к нулю, и величина конверсии практически не изменялась в течение 4–6 ч, не превышая 30–40% (рис. 4, 1). Аналогичные результаты описаны в [14] для *A. nictotianae* в иммобилизованном состоянии, где было показано, что установление стационарного состояния в реакционной среде обусловлено протеканием обратной реакции изомеризации продукта. Следовательно, проведение процесса изомеризации моносахаридов в периодическом режиме требует тщательного контроля за величиной ГИ-активности в единице реакционного объема ($W_{\text{среда}}$), иначе требуемая степень конверсии моносахарида, близкая к 50%, не будет достигнута за реальное время реакции.

Оптимальные условия приготовления и состава гетерогенных биокатализаторов. Обнаружено, что оптимальное соотношение компонентов: 1) микробная биомасса, 2) диоксид кремния (SiO_2), 3) нерастворимые гидроксосоединения кобальта (Co_xO_y), в составе биокатализаторов зависит от таксономической принадлежности штамма–продукента ГИ. В данной работе содержание компонента (3) фиксировалось на уровне ~ 20 вес. %, аналогично найденному оптимальному содержанию Co_xO_y в биокатализаторе, приготовленном на основе *A. nictotianae* [14], а соотношение компонентов (1) и (2) варьиро-

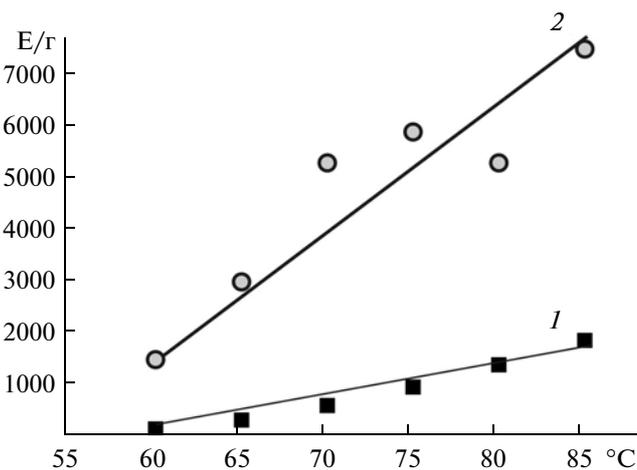


Рис. 3. Зависимость начальной удельной активности (Е/г) в суспензиях *A. nictotianae* (1) и рек-*E. coli* (2) от температуры.

вало в сторону увеличения содержания микробной биомассы рек-*E. coli* для того, чтобы приготовить биокатализатор с максимальной глюкозоизомеразной активностью в виде гранул, устойчивых в реакционной среде, рН 7.0. Обнаружено, что начальная ГИ-активность биокатализаторов не зависела прямо пропорционально от содержания микробной биомассы; так, при увеличении содержания биомассы в 2 и 3 раза ГИ-активность возрастала в 8 и 4 раза соответственно (табл. 2).

При проведении изомеризации фруктозы в периодическом режиме на кривых инактивации биокатализаторов наблюдались 2 участка: начальный участок (после первого цикла) – это резкое падение наблюдаемой скорости реакции, затем в течение 3–7 реакционных циклов скорость реакции падала на 10–20%. Было обнаружено, что в первые 2 ч фоновая активность, $W_{\text{фон}}$, по величине сравнима с суммарной скоростью реакции, W_{Σ} (в присутствии биокатализатора), т.е. $W_{\text{имм}} \approx 0$. В следующем реакционном цикле (продолжительность каждого цикла составляет 2–7 ч) фоновая активность была практически равна нулю ($W_{\text{фон}} \approx 0$), при этом $W_{\Sigma} \approx W_{\text{имм}}$, составляла 40–50% от W_{Σ} , измеренной для свежеприготовленного биокатализатора в первом реакционном цикле. Следовательно, основной причиной резкого падения активности свежеприготовленного биокатализатора являлась десорбция активного компонента из SiO_2 -ксерогеля в реакционную среду, причем этот процесс происходил сравнительно быстро (в первые 2 ч). Слабосвязанный с SiO_2 -матрицей активный компонент, вероятно, представляет собой внутриклеточный белок, вышедший из деформированных клеток при прессовании биокатализаторов. При увеличении количества микробной биомассы время полуинактивации биокатализаторов монотонно падало (табл. 2). При содержании

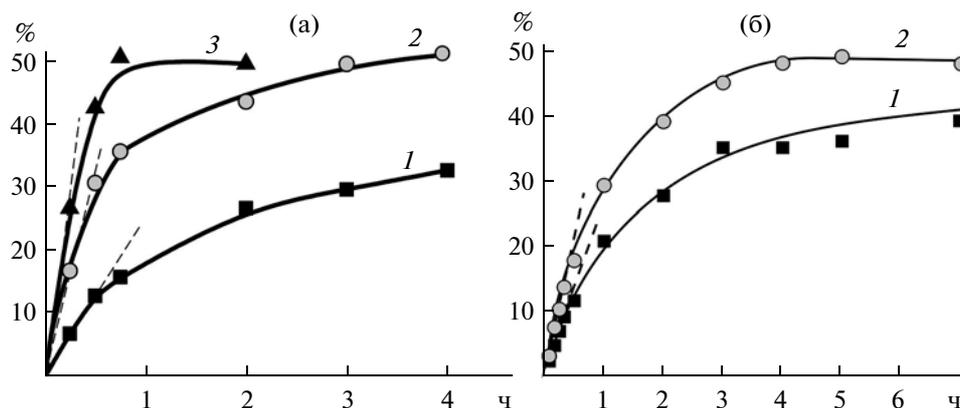


Рис. 4. Зависимость конверсии субстрата (%) от продолжительности реакции изомеризации с участием суспендированных клеток рек-*E. coli* (а) и *A. nictianaе* (б) при различной величине ГИ-активности в среде (Е/мл): а – 1, 2, 3 – 12.6, 26.4 и 60.6 Е/мл соответственно; б – 1, 2 – 13.1 и 19.5 Е/мл соответственно (75°C, 3 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.0 и 7.8 для рек-*E. coli* и *A. nictianaе* соответственно, 1 мМ Mg²⁺, 1 мМ Co²⁺).

биомассы выше 60 вес. % биокатализаторы не устойчивы в реакционной среде, структура гранул разрушается и, как следствие, уменьшается их механическая прочность, при этом слой биокатализатора образует плотную аморфную массу с высоким гидродинамическим сопротивлением потоку сравнительно вязкого раствора субстрата (3 М фруктоза). Таким образом, оптимальное содержание биомассы рек-*E. coli* в биокатализаторе составляет 40–60 вес. % (для *A. nictianaе* не превышает 15 вес. % [14]).

Для того чтобы уменьшить долю слабосвязанного активного компонента и $W_{\text{фон}}$, была предложена поперечная сшивка микробной биомассы бифункциональными реагентами – глутаровым диальдегидом (ГА) или карбодиимидом, причем порядок до-

бавления реагента в процессе приготовления биокатализаторов варьировали. Биокатализаторы готовили следующим образом: смешивали компоненты 2 и 3, добавляли раствор сшивающего реагента, затем компонент 1 – микробную биомассу. Было найдено, что при иммобилизации без сшивающего реагента сохранялось до 100% от ГИ-активности клеток рек-*E. coli* в суспензии, тогда как при использовании сшивающего реагента в концентрации выше 20 мг/г – не более 20–30% (табл. 2). При замене ГА карбодиимидом стабильность биокатализаторов существенно уменьшалась; так, при сшивке КД значение $t_{1/2}$ минимально (табл. 2). Таким образом, в качестве сшивающего реагента целесообразно использовать глутаровый диальдегид, при этом активность

Таблица 2. Активность и стабильность биокатализаторов в зависимости от их состава и сшивки микробной биомассы бифункциональными реагентами

Биомасса, вес. %	SiO ₂ , вес. %	Co _x O _y , вес. %	Сшивающий реагент, мг/г сухих клеток	Начальная ГИ-активность биокатализатора при 70°C, Е/г	Активность ГИ после иммобилизации, %	$t_{1/2}$ при 70°C, ч
20	60	20	–	70	17	8
40	40			570	70	2
60	20			310	25	3
70	10			255	18	<2
40	40	20	20*	300	100	20
			40*	110	17	65
			100*	100	19	25
			160*	81	15	18
			240*	12	6	22
			400**	72	26	8

* Глутаровый диальдегид (ГА).

** 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодиимид мето-4-толуолсульфонат.

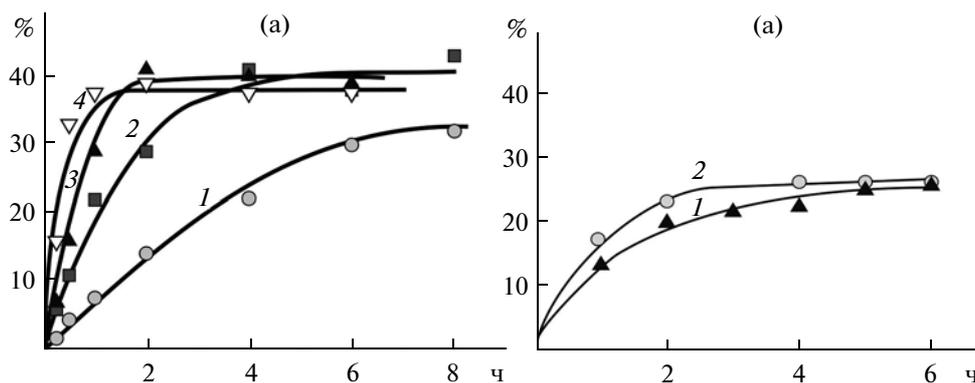


Рис. 5. Зависимость конверсии субстрата (%) от продолжительности реакции изомеризации с участием гетерогенных биокатализаторов на основе рек-*E. coli* (а) и *A. nictotianae* (б) при различной ГИ-активности в среде: а – 1, 2, 3, 4 – 2.7, 8.3, 21.0 и 51.1 Е/мл соответственно; б – 1, 2 – 4.0 и 22.8 Е/мл соответственно (70–75°C, 3 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, рН 7.8 и 7.0 для *A. nictotianae* и рек-*E. coli* соответственно, 1 мМ Mg²⁺).

биокатализатора уменьшалась при повышении концентрации ГА, в то же время зависимость стабильности имела оптимум в диапазоне концентраций 20–100 мг ГА/г сухих клеток (табл. 2).

Порядок смешивания компонентов и сшивки реагентом. Свойства биокатализаторов, приготовленных путем добавления микробной биомассы (1) в последнюю очередь к двухкомпонентной однородной смеси (2 + 3), содержащей ГА в оптимальной концентрации (40 мг/г), приведены в табл. 2. Другая методика приготовления биокатализатора была следующей. Сначала смешивали до однородного состояния все компоненты (1 + 2 + 3), затем в последнюю очередь добавляли раствор ГА в оптимальном количестве (40 мг/г). Активность приготовленного биокатализатора была равной ~120 Е/г при 70°C. Третья методика приготовления биокатализатора была следующей. Сначала смешивали компоненты (2 + 3). Микробную биомассу сшивали ГА (20–40 мг/г) и добавляли в полученную ранее двухкомпонентную смесь. Активность приготовленного биокатализатора была равной ~140 Е/г при 70°C. Обнаружено, что порядок смешивания компонентов и сшивки ГА практически не влияет на ГИ-активность биокатализаторов, но оказывает заметный эффект на стабильность приготовленных биокатализаторов; так, для описанных выше способов $t_{1/2}$ при 70°C принимает значения 65, 100 и 45 ч соответственно. Таким образом, оптимальной является методика приготовления, когда глутаровый диальдегид добавляли в смесь компонентов (1 + 2 + 3) в последнюю очередь. Дальнейшие исследования были проведены с участием биокатализаторов, имеющих оптимальный состав и приготовленных оптимальным способом. Следует напомнить, что поскольку Со присутствовал в составе биокатализатора в виде нерастворимых соединений, то ионы Со²⁺ в реакционную среду не добавляли.

Свойства гетерогенных биокатализаторов. При проведении изомеризации фруктозы в периодическом режиме с участием гетерогенных биокатализаторов было обнаружено, что аналогично кинетике, наблюдаемой в клеточных суспензиях рек-*E. coli* (рис. 4а) и *A. nictotianae* (рис. 4б) время достижения стационарного состояния в реакционной среде зависело от величины ГИ-активности в среде (рис. 5).

Основное различие в кинетике, наблюдаемой в суспензиях бактериальных клеток (рис. 4) и в замкнутой циркуляционной установке с реактором, заполненным приготовленными биокатализаторами, заключалось в том, что в гетерогенном режиме не удалось подобрать условий, при которых конверсия субстрата была близкой к 50% (рис. 5). Можно предположить, что из-за изменения локальной концентрации продукта прямой реакции изомеризации (в данной работе глюкоза) в микроокружении клеточносвязанной ГИ истинное равновесие устанавливается только вблизи иммобилизованного фермента. Локальное изменение концентрации глюкозы как продукта реакции изомеризации фруктозы может быть связано либо с диффузионными ограничениями, либо с адсорбцией моносахарида в матрице SiO₂. Физико-химическое исследование текстурных параметров показало, что сухие биокатализаторы, приготовленные на основе *A. nictotianae* и рек-*E. coli*, нанопористые; так, в их структуре поры размером 13 и 19 нм составляют 63 и 46% от общего объема пор соответственно. Было показано, что в изученных условиях для биокатализаторов на основе *A. nictotianae* диффузионные ограничения реакции изомеризации отсутствовали [14]. Следовательно, повышение концентрации продукта реакции в микроокружении клеточносвязанной ГИ обусловлено адсорбцией моносахарида на SiO₂. Действительно, биокатализаторы на основе рек-*E. coli* и *A. nictotianae* отличаются между собой составом – содержанием SiO₂, ~10–20 и ~40–60 вес. % соответственно. Как

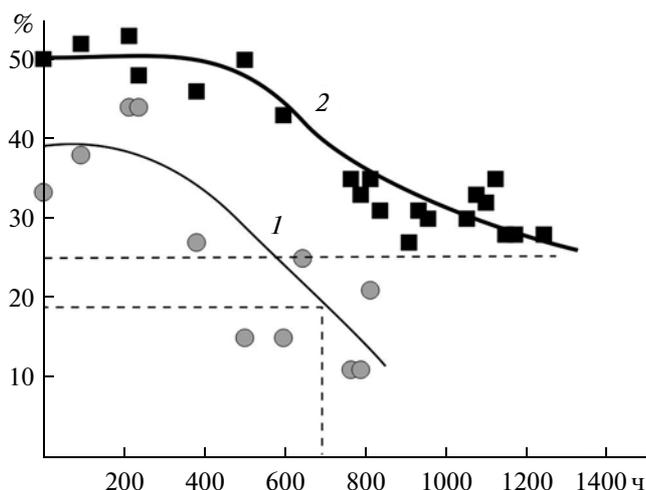


Рис. 6. Изменение конверсии субстрата (%) от продолжительности непрерывного процесса изомеризации с участием биокатализаторов на основе *A. nictianaе* (1) и рек-*E. coli* (2) (62–65°C, 3 М фруктоза, 0.02 М фосфатный буфер, pH 7.8 и 7.0 для *A. nictianaе* и рек-*E. coli* соответственно, 1 мМ Mg²⁺).

видно из рис. 5, для данных биокатализаторов независимо от величины $W_{\text{среда}}$ конверсия субстрата составляет 44 ± 3 и $30 \pm 2\%$ соответственно. При работе с биокатализатором типа Sweetzyme, который представляет сшитую ГА и экстрадированную биомассу (отсутствует SiO₂), были найдены условия для достижения конверсии субстрата, равной $50 \pm 3\%$ [14, 15]. Наблюдаемая корреляция между величиной конверсии субстрата и содержанием SiO₂ в различных биокатализаторах указывают на то, что продукт реакции накапливается вблизи клеточносвязанной ГИ за счет адсорбции на кремнегеле. Глюкоза в заметных количествах (~0.1%) была определена в буферном растворе при хранении биокатализатора, тщательно отмытого после проведения реакционного цикла, что также указывало на ее адсорбцию на SiO₂.

Были проведены исследования непрерывного процесса изомеризации фруктозы в колоночном реакторе идеального вытеснения с неподвижным слоем гетерогенного биокатализатора, приготовленного на основе рек-*E. coli* и имеющего оптимальный состав (без сшивки ГА). Из литературы известно, что проведение изомеризации в непрерывном режиме, сопровождающееся удалением продукта из зоны реакции, увеличивает стабильность биокатализаторов, приготовленных иммобилизацией глюкозоизомеразы [16]. В работах [17, 18] также установлено, что субстрат (глюкоза, ГФС) проявлял защитное действие при термоинактивации коммерческих биокатализаторов (Sweetase и Sweetzyme) при 65–80°C.

При непрерывной изомеризации фруктозы в изученных условиях наблюдалась максимальная величина конверсии субстрата, равная $50 \pm 2\%$. Анализ

состава ГФС на выходе из реактора показал, что в течение 30 сут биокатализатор работает без потери первоначальной активности; степень конверсии субстрата остается постоянной (рис. 6). Время полуинактивации для биокатализаторов, приготовленных на основе рек-*E. coli* и *A. nictianaе*, составляет ~60 и ~25 сут при 62–65°C соответственно (рис. 6).

При хранении биокатализаторов в сухом виде при 20–22°C в течение 8–10 мес обнаружено, что биокатализаторы сохранили 42–56% от их первоначальной активности.

Таким образом, было найдено, что каталитические свойства клеточносвязанной глюкозоизомеразы в суспензиях штаммов-продуцентов — *A. nictianaе* и рекомбинантного штамма *E. coli*, различаются незначительно. Константы Михаэлиса по фруктозе имеют близкие значения (0.5 М), а pH-оптимум активности ГИ из рекомбинантного штамма сдвигнут в область более кислых pH и составляет 7.0.

Для приготовления стабильных гетерогенных биокатализаторов с глюкозоизомеразной активностью были использованы: 1) оригинальный метод включения нерастущих бактериальных клеток в ксерогель диоксида кремния, 2) рекомбинантный штамм-продуцент ГИ *E. coli* BL21(DE3)/pET24bxy1A. Были подобраны оптимальные условия приготовления и состав биокатализаторов, включая относительно содержание всех компонентов; состав биокатализаторов при соотношении: микробная биомасса : SiO₂ : Co_xO_y, близким к 40 : 40 : 20, является оптимальным; сшивка глутаровым диальдегидом (20–100 мг/г) повышает стабильность биокатализаторов. Глюкозоизомеразная активность биокатализаторов, приготовленных на основе рек-*E. coli*, составила ~100 ± 30 Е/г, что в 4–5 раз выше, чем для биокатализаторов, приготовленных на основе *A. nictianaе*; стабильность биокатализаторов в 2–3 раза соответственно выше в условиях непрерывной изомеризации фруктозы при 62–65°C.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Интеграционного проекта № 96 СО РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lobanok A.G., Sapunova L.I., Dikhtievski Ya.O., Kazakevich I.O. // World J. Microbiol. Biotechnol. 1998. V. 14. № 2. P. 259–262.
2. Kaneko T., Takahashi S., Saito K. // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2000. V. 64. № 5. P. 940–947.
3. Bandlish R.K., Hess J.M., Epting K.L., Vieille C., Kelly R.M. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 80. № 2. P. 185–194.
4. Sapunova L.I., Lobanok A.G., Kazakevich I.O., Parakhnya E.V. // Bul. Polish Acad. Sci. 2002. V. 50. № 4. P. 213–222.
5. Шляхотко Е.А., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Коржук А.М., Евтушенков А.Н. // Докл. НАН Беларуси. 2007. Т. 51. № 4. С. 52.

6. Dekker K.H., Yamagata H., Sakaguchi K., Udaka S. // *Agric. Biol. Chem.* 1991. V. 55. № 2. P. 221–227.
7. Dekker K.H., Yamagata H., Sakaguchi K., Udaka S. // *J. Bacteriol.* 1991. V. 173. № 12. P. 3078–3083.
8. Dekker K.H., Yamagata H., Sakaguchi K., Udaka S. // *Agric. Biol. Chem.* 1991. V. 55. № 12. P. 2993–2998.
9. Bhosale S.H., Rao M.B., Deshpande V.V. // *Microbiol. Rev.* 1996. V. 60. № 2. P. 280–300.
10. Wang F., Whitaker R.D., Batt C.A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998. V. 50. № 1. P. 65–70.
11. Kern F., Tilley E., Hunter I.S., Legisa M., Glieder A. // *J. Biotechnol.* 2007. V. 129. № 1. P. 6–29.
12. Патент РБ. 2009. № 12214.
13. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Терентьева Т.Г., Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Чуенко Т.В., Рудина Н.А., Черняк Е.И. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2008. Т. 44. № 2. С. 193–201.
14. Перминова Л.В., Коваленко Г.А., Рудина Н.А., Сапунова Л.И., Тамкович И.О., Лобанок А.Г. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2009. Т. 45. № 4. С. 432–438.
15. Сапунова Л.И., Лобанок А.Г., Казакевич И.О., Шляхотко Е.А., Евтушенко А.Н. // *Прикл. биохимия и микробиология.* 2006. Т. 42. № 3. С. 279–284.
16. Strandberg G.W., Smiley K.L. // *Biotechnol. Bioeng.* 1972. V. 14. № 3. P. 509–513.
17. Chen K.-Ch., Wu J.-Y. // *Biotechnol. Bioeng.* 1987. V. 30. № 7. P. 817–824.
18. Converti A., Borghi M.D. // *Enzyme Microbiol. Technol.* 1997. V. 21. № 4. P. 511–517.

Immobilization of a Recombinant Strain Producing Glucose Isomerase on SiO₂-Xerogel and Properties of Prepared Biocatalysts

G. A. Kovalenko^{a, b}, L. V. Perminova^a, T. V. Chuenko^a, L. I. Sapunova^c,
Ye. A. Shlyakhotko^c, and A. G. Lobanok^c

^a *Institute of Catalysis, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*
e-mail: galina@catalysis.ru

^b *Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

^c *Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, 220141 Belarus*

Received June 6, 2010

Abstract—An original method of immobilization of nongrowing microorganism cells on xerogel of silicon dioxide containing insoluble hydroxyl compounds of cobalt(II) has been developed. A recombinant strain producing glucose isomerase has been constructed on the basis of *Escherichia coli* with the use of a gene of *Arthrobacter nicotianae*. It was revealed that glucose isomerase activity and stability of biocatalysts prepared on the basis of the recombinant *E. coli* strain was 3–5 times greater compared with the biocatalysts prepared with the use of the donor strain *A. nicotianae*. Under conditions of continuous hydrolysis of 3 M fructose at 62–65°C in a fixed bed reactor, time of half-inactivation of the biocatalysts prepared from the recombinant strain and *A. nicotianae* was ~60 and ~25 days, respectively.