

УДК 577.152.35

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА АКТИВИРОВАННОМ ХИТОЗАНЕ

© 2012 г. Ю. Г. Максимова*, Т. А. Рогожникова**, Г. В. Овечкина*,
А. Ю. Максимов*, В. А. Демаков*

* Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, 614081
e-mail: maks@iegm.ru

** Пермский государственный университет, Пермь, 614990

Поступила в редакцию 29.06.2011 г.

Исследованы каталитические свойства нитрилгидратазы, изолированной из штамма *Rhodococcus ruber* gtl и иммобилизованной методом ковалентной сшивки с хитозаном, активированным 0.1%-ным раствором бензохинона. Определены кинетические параметры реакции гидратации акрилонитрила, катализируемой иммобилизованной нитрилгидратазой и ферментом в растворе. Установлено, что иммобилизация не приводит к снижению максимальной скорости реакции ($V_{\text{макс}}$), тогда как константа Михаэлиса (K_M) уменьшается в 2.4 раза. Показана возможность многократного использования иммобилизованного фермента на протяжении 50 последовательных циклов трансформации акрилонитрила, причем активность нитрилгидратазы в 50 цикле превышала таковую в первом цикле в 3.5 раза. Показано, что влияние температуры на активность зависело от концентрации фермента, что подтверждает диссоциативный характер инактивации нитрилгидратазы. Обнаружено, что иммобилизованная нитрилгидратаза сохраняет активность при pH 3.0–4.0, тогда как фермент в растворе в этих условиях инактивируется. Полученный биокатализатор может эффективно использоваться для получения акриламида из акрилонитрила.

Нитрилгидратаза (КФ 4.2.1.84), катализирующая гидратацию нитрилов до амидов, является ключевым ферментом метаболизма нитрилов у микроорганизмов. Этот фермент применяется в крупномасштабном промышленном производстве из соответствующих нитрилов акриламида и никотинамида, используемых в химической и фармацевтической индустрии [1, 2]. Биотехнологическое производство акриламида в России основано на высокопродуктивном штамме родококков – *Rhodococcus rhodochrous* M8 [3–5], в Японии – *R. rhodochrous* J1. У промышленно значимого штамма *R. rhodochrous* J1 обнаружено два вида нитрилгидратаз – высокомолекулярная (520 кДа) и низкомолекулярная (130 кДа), гены которых экспрессируются в зависимости от индуктора, добавленного в среду культивирования. Оба фермента – гетеромеры, состоящие из α - и β -субъединиц: высокомолекулярный фермент содержит по 8–10, низкомолекулярный – по 2 каждой субъединицы [6]. Нитрилгидратаза штамма *R. rhodochrous* M8, как и *R. rhodochrous* J1, является гетеромером и содержит ионы кобальта в активном центре [4].

Стабилизация ферментов является необходимым этапом на пути их широкого внедрения в производство. Ограничение конформационных перестроек белковой глобулы позволяет сохранить работоспособность активного центра в течение длительного времени [7]. Иммобилизация на

нерастворимом носителе, основанная на физико-химических принципах, дает возможность более длительной эксплуатации ферментов и, как следствие, повышения их продуктивности.

Перспективным носителем для иммобилизации ферментов является хитозан, получаемый при деацетилировании хитина. По химической структуре хитозан – сополимер D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина. В высокомолекулярных линейных цепях полиглюкозамина имеется большое количество реакционноспособных амино- и гидроксильных групп, подверженных химическим модификациям [8]. За счет образования большого количества водородных связей он может функционировать как универсальный сорбент, связывающий различные вещества органической и неорганической природы [9]. Большое количество реакционноспособных групп в молекуле определяет его способность взаимодействовать с бифункциональными реагентами, образующими химические связи как с молекулой хитозана, так и с молекулой белка, что делает возможным ковалентную сшивку фермента с хитозаном. При ковалентном присоединении ферментов к носителю в качестве бифункционального реагента часто используют глутаровый альдегид [10]. В случае иммобилизации нитрилгидратазы этот активатор не является предпочтительным, т.к. ингибирует ее активность [11]. Сведений об активировании но-

сителей бензохиноном для ковалентной сшивки ферментов практически не встречается.

Нами ранее было изучено влияние адсорбционной иммобилизации на неорганических носителях, включая немодифицированные и углеродсодержащие оксиды алюминия, а также углеродный носитель Сибунит, на активность и стабильность нитрилгидратазы [12]. Активность полученного иммобилизованного фермента не превышала 6–10% исходной в растворе, что обусловило необходимость дальнейших поисков предпочтительных методов иммобилизации нитрилгидратазы.

Цель работы – получение биокатализатора трансформации акрилонитрила в акриламид на основе ферментного препарата, содержащего нитрилгидратазу, ковалентно иммобилизованного на активированном хитозане, и изучение его каталитических свойств.

МЕТОДИКА

Нитрилгидратазу выделяли из штамма бактерий *R. ruber* gt 1, обладающего высокой нитрилгидратазной активностью [13]. Бактериальную культуру выращивали в колбах объемом 1 л на качалке со скоростью вращения 100 об/мин при 30°C до стационарной фазы роста на минимальной солевой среде следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.7, NaCl – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, pH 7.2–7.4. В качестве источника углерода использовали глюкозу в концентрации 0.1%, источник азота – хлористый аммоний в концентрации 10 мМ. Биомассу центрифугировали 20 мин при 10500 g, отмывали клетки от среды и ресуспендировали в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 44 мМ бутират натрия. Клетки разрушали десятикратной обработкой ультразвуком (УЗГ8-0.4/22, ВНИИ ТВЧ г. Санкт-Петербург, Россия) по 15 с при частоте 22 кГц с охлаждением до 0–4°C. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 10500 g и температуре 4°C, затем проводили фракционирование белка сульфатом аммония, последовательно доводя концентрацию до 35 и 60% от насыщающей. В препарате, полученном при 60%-ном насыщении сульфата аммония, содержание фермента составило 72% от общего количества белка. Количество белка в пробе определяли по методу Бредфорд с красителем Кумасси бриллиантовым синим G-250. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин [14].

Нитрилгидратазу иммобилизовали методом ковалентной сшивки с активированным хитозаном. Готовили 2%-ный (вес/об.) раствор хитозана средней вязкости (“Sigma”, Япония) в 2%-ной (об./об.) уксусной кислоте и накапывали с помощью шприца для инъекций объемом 5 мл в 1 М

раствор КОН. После затвердевания в течение 1 ч гранулы отмывали однократно 0.01 М калий-фосфатным буфером, pH 7.2 ± 0.2 . Полученные гранулы активировали 0.1%-ным раствором бензохинона (“Fluka”, Швейцария) в течение 15 мин в соотношении гранул и активатора 1 : 1. Отмывали 3 раза фосфатным буфером, двукратно превышающим объем раствора бензохинона. Активированные гранулы смешивали с ферментным препаратом в соотношении 2.5 : 1, после 40 мин инкубации при 22–25°C отмывали 3 раза фосфатным буфером, пятикратно превышающим объем раствора белка. Количество белка, связанного с активированным хитозаном, определяли по разности концентрации белка в растворе до и после контакта с носителем. Полученный иммобилизованный препарат хранили при температуре от 0 до +10°C.

Нитрилгидратазную активность растворенного и иммобилизованного фермента определяли по концентрации акриламида, образующегося за 10 мин трансформации раствора акрилонитрила (НАК). Удельную активность нитрилгидратазы (Е) выражали в мкмоль амида/мг белка мин.

Концентрацию акриламида определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-10 (“Shimadzu”, Япония) с колонкой Synergi 4u Hydro-RP 80A (250 × 4.6 мм). В качестве подвижной фазы использовали 25 мМ NaH_2PO_4 , скорость потока составляла 0.75 мл/мин при 25°C, детекцию проводили при длине волны 200 нм.

Константу Михаэлиса (K_M) и максимальную скорость ($V_{\text{макс}}$) нитрилгидратазной реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом и ферментом в растворе, вычисляли по графику Лайнуивера–Берка, построенному по методу двойных обратных величин. Для этого проводили реакцию трансформации растворов НАК в диапазоне концентраций от 0.015 до 1.36 М в 1–5 мл калий-фосфатного буфера (pH 7.2 ± 0.2) в течение 10 мин, реакцию останавливали добавлением концентрированной HCl до конечной концентрации 5%, концентрацию образующегося акриламида определяли методом ВЭЖХ.

Операционную стабильность нитрилгидратазы, иммобилизованной на активированном хитозане, оценивали по сохранению нитрилгидратазной активности при последовательном проведении 10 мин циклов конверсии 0.58 М раствора акрилонитрила. После проведения реакционного цикла гранулы хитозана с иммобилизованным на них ферментом отмывали калий-фосфатным буфером (pH 7.2 ± 0.2) и использовали в следующем цикле.

Зависимость активности иммобилизованной нитрилгидратазы и фермента в растворе от температуры определяли при проведении десятиминутной трансформации 0.58 М раствора акрило-

Каталитические свойства свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы

Нитрилгидратаза	K_M , моль/л	V_{\max} , мкмоль/мг мин	$K_{\text{ин}}$, мин ⁻¹		
			40°C	50°C	60°C
В растворе	0.41 ± 0.15	50	6.6×10^{-3}	2.7×10^{-2}	1.4×10^{-1}
Иммобилизованная	0.17 ± 0.05	50	2.2×10^{-3}	2.4×10^{-2}	1.0×10^{-1}

нитрила при температуре от 10 до 70°C в калий-фосфатном буфере (рН 7.2 ± 0.2) с предварительным нагревом реакционной смеси до внесения субстрата в течение 10 мин. Нагрев и трансформацию субстрата осуществляли в термостате ТС – 1/80 СПУ (“Лабтех”, Россия). Реакцию останавливали, как описано выше. Концентрацию акрил-амида определяли методом ВЭЖХ.

Термостабильность фермента определяли следующим образом: иммобилизованную и нативную нитрилгидратазу в калий-фосфатном буфере (рН 7.2 ± 0.2) прогревали при 40, 50 и 60°C в течение 15, 30, 45 и 60 мин, резко охлаждали на ледяной бане и проводили реакцию трансформации 0.58 М раствора акрилонитрила при 22°C. Определяли нитрилгидратазную активность, как описано выше. Константы термоинактивации фермента ($K_{\text{ин}}$) вычисляли по графику зависимости натурального логарифма активности от времени экспозиции при данной температуре и выражали в обратных минутах (мин⁻¹).

Зависимость активности иммобилизованной нитрилгидратазы и фермента в растворе от рН реакционной среды изучали при проведении десятиминутной трансформации 0.58 М раствора акрилонитрила при 22°C в универсальном буфере Теорелла–Стенхагена [15] при рН от 2 до 10.5.

Результаты представлены средними значениями по трем независимым опытам. Экспериментальная ошибка составляет не более 15%.

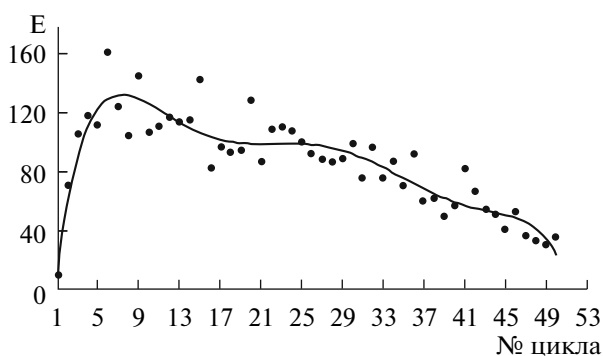


Рис. 1. Операционная стабильность иммобилизованной нитрилгидратазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры реакции гидратации акрилонитрила в акриламид, катализируемой иммобилизованной нитрилгидратазой и ферментом в растворе. Определено, что максимальная скорость нитрилгидратазной реакции (V_{\max}), катализируемой ковалентно иммобилизованным ферментом, может достигать V_{\max} реакции с участием фермента в растворе — 50 мкмоль/мг мин. Сохранение ферментативной активности при иммобилизации указывает на то, что бензохинон в качестве бифункционального реагента эффективно связывает молекулу фермента с хитозаном, не затрагивая ее активный центр. В то же время константа Михаэлиса (K_M) нитрилгидратазы, ковалентно присоединенной к хитозану, снижается в 2.4 раза и составляет 0.17 ± 0.05 моль/л (таблица). Т.к. по определению V_{\max} и K_M — константы уравнения скорости реакции, выведенного для определения ферментативной активности в разбавленном растворе, в случае иммобилизованных ферментов следует говорить о “кажушейся” константе Михаэлиса [16]. Действительно, субстрат ферментативной реакции остается прежним, и в этом случае снижение K_M может являться результатом различных эффектов распределения молекул субстрата и продукта, возникающих при иммобилизации фермента, либо отражать изменение сродства фермента к субстрату в результате конформационных изменений самого активного центра при ковалентном присоединении молекулы фермента к носителю. Эффект снижения K_M описан в работах, касающихся адсорбционной иммобилизации липазы на хитозане [9].

Операционная стабильность иммобилизованной нитрилгидратазы. При проведении последовательных циклов конверсии акрилонитрила была выявлена высокая операционная стабильность иммобилизованной нитрилгидратазы (рис. 1). Во втором и нескольких последующих (до 6) циклах реакций было отмечено возрастание нитрилгидратазной активности в 18 раз по сравнению с первым циклом, затем постепенное снижение активности, которая в 50 цикле была в 3.5 раза выше, чем в первом. Стабильность иммобилизованного фермента при повторном многократном использовании можно объяснить жестким фиксированием его молекулы на носителе, предотвращающим диссоциацию гетеромера и потерю структуры

субъединиц. Вымывание фермента из носителя также не происходило благодаря ковалентным связям, образованным между его молекулой, бифункциональным реагентом и хитозаном. Для объяснения эффекта возрастания нитрилгидратазной активности были проведены эксперименты по адсорбции продукта реакции — акриламида на активированном хитозане с иммобилизованным на нем белком. Определено, что из 1%-ного (вес/об.) раствора акриламида адсорбируется 25% вещества. Из этого можно сделать вывод, что повышение концентрации акриламида во втором цикле реакции в некоторой степени связано не с повышением активности, а со снижением величины адсорбции продукта за счет взаимодействия с амидом части реакционноспособных групп хитозана и активатора в предыдущем цикле. Т.к. для объяснения 18-кратного возрастания активности с 1 по 6 цикл этого недостаточно, можно высказать предположение, что дробное введение субстрата в реакционную среду вызывало адаптацию каталитического центра фермента к данному субстрату, приводя к увеличению скорости фермент-субстратных взаимодействий.

При многоциклового конверсии акрилонитрила определено, что иммобилизованный ферментный препарат в количестве 1.4 мг (по белку) за 8.3 ч образует 60 ммоль акриламида.

Зависимость нитрилгидратазной активности от температуры и термоинактивация свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы. Известно, что в отличие от оптимума рН не существует температурного оптимума активности ферментов, т.к. зависимость активности от температуры является результатом наложения двух различных процессов: ускорения движения молекул при повышении температуры и денатурации белка, зависящей от температуры и времени ее воздействия [15]. По нашим данным, температурный оптимум активности сдвигался в сторону более высоких значений температуры при увеличении концентрации фермента в растворе. Так, при количестве белка в растворе 0.45–0.5 мг максимальная активность наблюдалась при 30–40°C, а при увеличении количества белка в растворе до 1.1 мг — при 50°C. Интересно, что подобная зависимость активности от температуры прослеживалась и у иммобилизованного фермента: при иммобилизации на хитозане от 0.8 до 2 мг белка максимальная активность наблюдалась при 45°C, от 3.8 до 4 мг — при 55°C. Пример зависимости нитрилгидратазной активности свободной и иммобилизованного фермента от температуры показан на рис. 2. Известно, что зависимость кинетики инактивации от концентрации фермента является критерием диссоциативной инактивации [17]. Таким образом, концентрационная зависимость термоинактивации согласуется с данными об олигомерной структуре нитрилгидратазы [6].

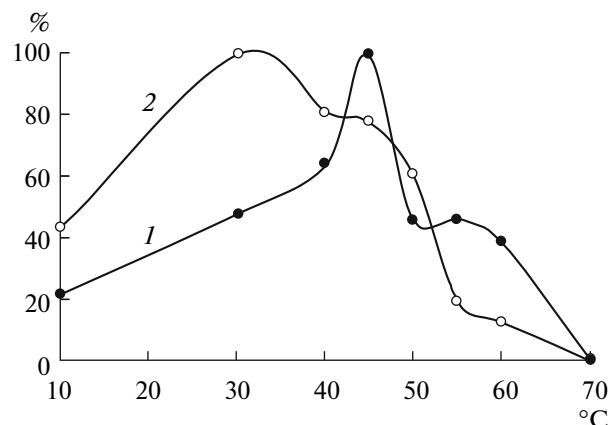


Рис. 2. Зависимость активности (%) нитрилгидратазы от температуры: 1 — иммобилизованной на активированном хитозане; 2 — в растворе. Количество белка в растворе — 0.5, иммобилизованного — 0.8–1.5 мг в 10 мл реакционной смеси. 100% — максимальная активность иммобилизованной и свободной нитрилгидратазы соответственно.

Определены константы термоинактивации иммобилизованной нитрилгидратазы и фермента в растворе (таблица). Показано, что ковалентно иммобилизованная нитрилгидратаза более термостабильна, чем находящаяся в растворе (рис. 3). Наиболее вероятно, что увеличение термостабильности связано с тем, что ковалентная сшивка фермента с носителем предотвращает диссоциацию фермента на субъединицы, происходящую при повышении температуры, а также усиливает общую жесткость молекулы фермента, приводя к его стабилизации [18].

Зависимость активности свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы от рН. Показано, что нитрилгидратаза, иммобилизованная на хитозане, проявляет активность при более низких значениях рН, чем фермент в растворе, который инактивируется при рН < 4.0 (рис. 4). Оптимум рН для нитрилгидратазы в растворе более узкий и находится в нейтральной области, тогда как ковалентно связанный фермент проявляет активность, близкую к максимальной, в более широком диапазоне рН — от 5.0 до 7.0. В щелочном диапазоне рН > 10.0 инактивируется и свободный, и иммобилизованный фермент. Подобный эффект влияния рН на активность иммобилизованной нитрилгидратазы можно объяснить природой носителя — хитозана. В данном случае рН в макроокружении фермента, где происходят измерения, отличается от рН микроокружения фермента, на которое оказывает воздействие носитель. Большое количество свободных аминогрупп в молекуле хитозана определяет его свойство связывать ионы водорода и приобретать избыточный положительный заряд [8, 9]. Т.к. поликатионы обычно отталкивают протоны, то вблизи фермен-

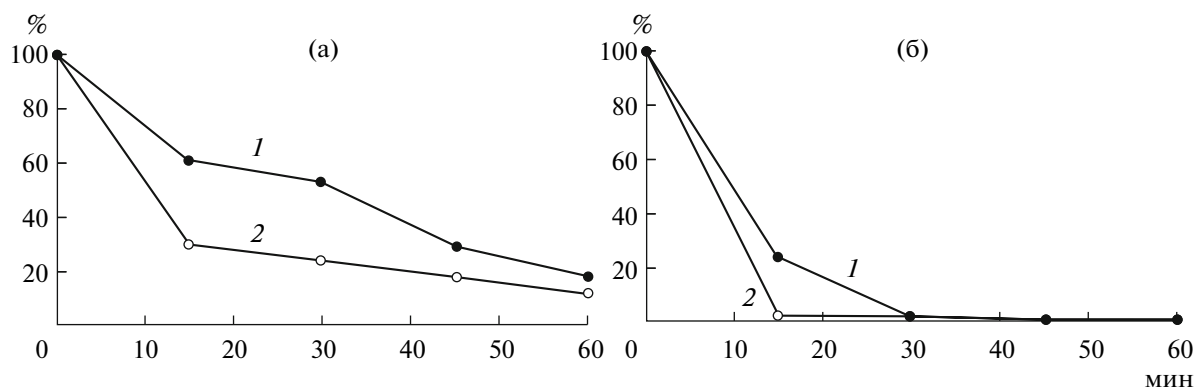


Рис. 3. Термоинактивация (%) нитрилгидратазы при 50 (а) и 60°C (б): 1 – иммобилизованной на активированном хитозане; 2 – в растворе. Количество белка в растворе – 0.3–0.7, иммобилизованного – 1.4–3 мг в 10 мл реакционной смеси. 100% – активность нитрилгидратазы при 22°C.

та рН будет выше, чем в свободном растворе, следовательно, рН-диапазон работы фермента расширится в сторону более низких значений.

Сравнивая два изученных способа иммобилизации нитрилгидратазы – адсорбцию (носители – оксиды алюминия и углеродсодержащие адсорбенты) и ковалентную сшивку (носитель – активированный хитозан), следует отметить преимущества ковалентной иммобилизации – высокую операционную стабильность и сохранение активности нативного фермента. В то же время адсорбция на модифицированных оксидах алюминия позволяла ферменту функционировать при 70°C с сохранением 30% максимальной активности, тогда как фермент, ковалентно сшитый с активированным хитозаном, при этой температуре инактивировался [12]. Следует отметить, что в настоящее время еще не получено достаточно продуктивных препаратов иммобилизованных нитрилгидратаз. По

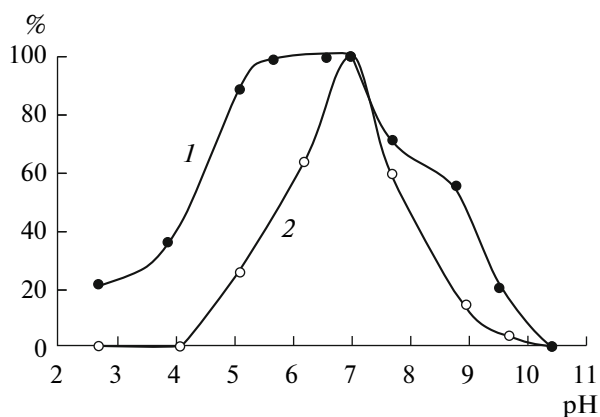


Рис. 4. Зависимость активности (%) свободной и иммобилизованной нитрилгидратазы от рН: 1 – иммобилизованной на активированном хитозане; 2 – в растворе. 100% – максимальная активность иммобилизованной и свободной нитрилгидратазы соответственно.

данным современной научной литературы, касающейся иммобилизации ферментов, широкое распространение получил метод поперечно-сшитых ферментных агрегатов (ПСФА), предложенный Р. Шелдоном [19]. Этот метод иммобилизации без носителя, включающий стадии осаждения частично очищенного фермента и его поперечную сшивку реагентом, был использован и для иммобилизации препарата частично очищенной нитрилгидратазы. ПСФА нитрилгидратазы, сохраняющие 88% активности нативного фермента, трансформировали оксо- и гидроксизамещенные нитрилы в соответствующие амиды [11]. Несмотря на успехи, достигнутые в стабилизации ферментов методом ПСФА, отсутствие носителя лишает иммобилизацию ряда преимуществ, среди которых легкость отделения продукта от реакционной среды и возможность создания непрерывных технологий.

Таким образом, в данной работе было показано влияние ковалентной иммобилизации нитрилгидратазы на хитозане на кинетические параметры реакции гидратации акрилонитрила в акриламид, операционную стабильность и термостабильность фермента, а также рН-зависимость его активности. Было обнаружено, что ковалентное присоединение нитрилгидратазы к активированному хитозану приводит к снижению K_M , в ряде случаев позволяет достичь V_{\max} реакции, катализируемой свободным ферментом, и дает возможность многократного использования биокатализатора с сохранением активности. Было показано, что влияние температуры на активность фермента зависит от его концентрации, что подтверждает диссоциативный характер инактивации нитрилгидратазы. Показано, что иммобилизация дает возможность ферменту функционировать при более низких значениях рН и расширяет диапазон рН, при котором активность близка к максимальной. Использование раствора бензохинона в качестве бифункцио-

нального реагента для ковалентной сшивки фермента с хитозаном позволяет получить активный и стабильный иммобилизованный препарат нитрилгидратазы. Полученный биокатализатор может быть использован в процессах трансформации акрилонитрила в акриламид с достаточной степенью эффективности.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг., государственный контракт 02.740.11.0078.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H. // Trends Biotechnol. 1992. V. 10. P. 402–408.
2. Kobayashi M., Shimizu S. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2000. V. 4. P. 95–102.
3. Астаурова О.Б., Погорелова Т.Е., Фомина О.Р., Полякова И.Н., Яненко А.С. // Биотехнология. 1991. № 5. С. 10–14.
4. Вейко В.П., Яненко А.С., Алексеева М.Г., Синтин А.А., Гулько Л.Б., Ратманова К.И., Овчарова И.В., Андреева Л.Б., Астаурова О.Б., Полякова И.Н., Пауков В.Н., Воронин С.П., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 1995. № 5–6. С. 3–5.
5. Астаурова О.Б., Леонова Т.Е., Полякова К.Н., Синюк И.В., Гордеев В.К., Яненко А.С. // Прикл. биохимия и микробиология. 2000. Т. 36. № 1. С. 21–25.
6. Kobayashi M., Shimizu S. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 261. P. 1–9.
7. Мартинек К., Березин И.Б. // Успехи химии. 1980. № 5. С. 737–770.
8. Krajewska B. // Enzyme Microb. Technol. 2004. V. 35. P. 125–139.
9. Ковалева Т.А., Беленова А.С., Сливкин А.И., Лапенко В.Л. // Биотехнология. 2010. № 4. С. 59–64.
10. Betancor L., López-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Dellamora-Ortiz G., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. // Enzyme Microb. Technol. 2006. V. 39. P. 877–882.
11. Kubác D., Kaplan O., Elišáková V., Pátek M., Vejvoda V., Slámová K., Tóthová A., Lemaire M., Gallienne E., Lutz-Wahl S., Fischer L., Kuzma M., Pelantová H., van Pelt S., Bolte J., Křen V., Martínková L. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2008. V. 50. P. 107–113.
12. Максимова Ю.Г., Демаков В.А., Максимов А.Ю., Овечкина Г.В., Коваленко Г.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 4. С. 416–421.
13. Патент РФ. 2004. № 2223316.
14. Практическая химия белка / Ред. А.М. Дарбре. М.: Мир, 1989. С. 297–298.
15. Биссвангер Х. Практическая энзимология. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. С. 96.
16. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983. 213 с.
17. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. 720 с.
18. Fernández-Lafuente R. // Enzyme Microb. Technol. 2009. V. 45. P. 405–418.
19. Sheldon R.A. // Biochem. Soc. Trans. 2007. V. 35. P. 1583–1587.

Catalytic Properties of a Nitrile Hydratase Immobilized on Activated Chitosan

Yu. G. Maksimova^a, T. A. Rogozhnikova^b, G. V. Ovechkina^a, A. Yu. Maksimov^a, and V. A. Demakov^a

^a Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

^b Perm State University, Perm, 614990

e-mail: maks@iegm.ru

Received June 29, 2011

Abstract—The catalytic properties of a nitrile hydratase, isolated from a strain of *Rhodococcus ruber* gt1 and immobilized by covalent cross-linking with chitosan activated with 0.1% benzoquinone solution, have been investigated. The kinetic parameters of acrylonitrile hydration catalyzed by immobilized nitrile hydratase and the enzyme in a solution have been determined. It is found that the immobilization does not lead to a decrease in the maximum reaction rate (V_{\max}), whereas the Michaelis constant (K_M) is reduced by a factor of 2.4. The possibility of reusing an immobilized enzyme for 50 consecutive cycles of acrylonitrile transformation was shown, and the nitrile hydratase activity in the 50th cycle exceeded that in the first cycle by 3.5 times. It is shown that the effect of temperature on activity depended on the concentration of the enzyme, which confirms the dissociative nature of nitrile hydratase inactivation. It was found that immobilized nitrile hydratases remain active at pH 3.0–4.0, whereas the enzyme is inactivated in a solution under these conditions. The resulting biocatalyst can be effectively used to receive acrylamide from acrylonitrile.