

УДК 577.154.2+542.952+579.22

ИММОБИЛИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА–ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОЙ ЛИПАЗЫ ИЗ *Thermomyces lanuginosus* В НАНОУГЛЕРОД-СИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ И СВОЙСТВА ПРИГОТОВЛЕННЫХ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

© 2013 г. Г. А. Коваленко*, **, А. Б. Беклемишев***, Л. В. Перминова*, Т. В. Чуенко*, А. Л. Мамаев***, И. Д. Иванов***, С. И. Мосеенков*, В. Л. Кузнецов*, **

*Институт катализа СО РАН, Новосибирск 630090

e-mail: galina@catalysis.ru

**Новосибирский государственный университет

***Научно-исследовательский институт биохимии СО РАН, Новосибирск 630117

Поступила в редакцию 11.05.2012 г.

Исследованы многокомпонентные композитные биокатализаторы с липолитической активностью, приготовленные путем включения клеток рекомбинантного штамма-продуцента термостабильной липазы из *Thermomyces lanuginosus* в SiO₂-ксерогеле, содержащем наноуглеродный компонент – многослойные углеродные нанотрубки разного диаметра, а также углеродные наносферы луковичной структуры. Изучены свойства липазы как в клеточных суспензиях рекомбинантного штамма-продуцента, сконструированного на основе *E. coli* BL21(DE3), так и в иммобилизованном состоянии в зависимости от структуры и дисперсности наноуглеродного компонента, вводимого в состав биокатализаторов. Показано, что рекомбинантная внутриклеточная липаза проявляла активность в реакции гидролиза трибутирина, равную в среднем 50 Е/мг сухих клеток, и обладала высокой термостабильностью. При прогревании в оливковом масле при 100°C константа инактивации и время полуинактивации составили, соответственно, 6×10^{-3} мин⁻¹ и 2 ч, что на порядок превышает термостабильность липазы в буфере. Биокатализаторы с введенными в их состав агрегированными “толстыми” нанотрубками диаметром 20–22 нм проявляли максимальную начальную активность – 250 Е/г.

DOI: 10.7868/S0555109913030112

Липазы (триацил-глицерол эфир гидролазы, К.Ф. 3.1.1.3) природных микроорганизмов – бактерий, дрожжей и микроскопических грибов, предназначены для первичной атаки молекул мало- или нерастворимых триглицеридов и осуществляют гидролиз масел и жиров до жирных кислот, диглицеридов, моноглицеридов и глицерина. Эти ферменты являются преимущественно внеклеточными, секретируются в среду при культивировании микроорганизмов. Коммерческие ферментные препараты липаз давно используют в производстве моющих средств как биодобавки. В настоящее время проводятся интенсивные исследования по применению липаз в других областях промышленности, таких, как тонкий органический синтез (разделение рацематов, синтез энантиомеров фармацевтических соединений), биоконверсия масел и жиров (переэтерификация, ацидолиз), производство биодизеля (гидролиз, синтез эфиров жирных кислот) [1, 2]. Внимание уделяется применению липаз в качестве биокатализаторов процессов переэтерификации в смесях растительных масел и жиров для получения ценных продуктов масложировой промышленности – специализированных жиров как важнейших ин-

гредиентов пищевых продуктов, а также заменителей масла какао и молочных жиров [3–6]. Коммерческие биокатализаторы компании Novozymes, предназначенные для этих процессов, приготовлены путем иммобилизации рекомбинантных липаз на различных носителях – силикагеле, ионообменных смолах [5–7].

В настоящее время для иммобилизации липаз исследуют современные силикатные материалы, такие, как синтетические силикаты с контролируемой пористостью, кремниевые аэрогели. На мезопористом диоксиде кремния SBA-15 (с удельной поверхностью 1007 м²/г и диаметром пор 6.7 нм) проводили иммобилизацию липазы из *Mucor javanicus* путем физической адсорбции фермента с последующей кросс-сшивкой глутаровым диальдегидом [8]. Приготовленный биокатализатор проявлял высокую активность в реакции гидролиза трибутирина и очень низкую активность в реакции гидролиза триолеина, после проведения 10 реакционных циклов его активность уменьшалась незначительно. В работе [9] описаны биокатализаторы, приготовленные методом адсорбции липазы из *Mucor miehei* на губчатых мезопористых силикатных материалах MCM-41 с контролируемой пори-

стостью и различными гидрофобно-гидрофильными свойствами поверхности. Для приготовления активных биокатализаторов подбирали оптимальный баланс по гидрофильности-гидрофобности поверхности адсорбентов: гидрофильный носитель – чистый диоксид кремния, гидрофобный – силикагель с привитыми бутил-группами. Было обнаружено, что активность липазы в реакциях гидролиза и переэтерификации растительных масел возрастала при иммобилизации на гидрофобных носителях, что, по-видимому, было связано с массопереносом гидрофобных субстратов к иммобилизованному ферменту [9]. Биокатализатор для гидролиза октил лаурата готовили путем инкапсулирования липазы из *Pseudomonas cepacia* в аэрогель диоксида кремния, полученный при гидролизе производных силанов, затем биокатализаторы сушили в сверхкритических условиях с участием CO₂ [10]. В работе [11] предложен многостадийный способ приготовления биокатализатора путем инкапсулирования липазы из *P. cepacia* в силикатную матрицу, полученную при гидролизе различных производных силанов в водном растворе, содержащем фермент. Сначала к водному раствору фермента добавляли катализатор (NaF) и силан. Образовавшийся гель с включенной липазой сушили и многократно промывали для удаления токсичных примесей (метанол, силиканол). После отмывки высушенный тонкодисперсный биокатализатор использовали в реакции гидролиза соевого масла в периодическом режиме. После завершения реакционного цикла набухший биокатализатор отфильтровывали и использовали в следующем реакционном цикле.

Биокатализатор для этерификации лауриновой кислоты октан-1-олом в среде изо-октана был приготовлен путем иммобилизации липазы из *P. cepacia* внутри силикатной матрицы, которую в свою очередь получали путем сшивки природной глины и силикатного полимера, образующегося при гидролизе тетра-метил-орто-силана в присутствии соли алкиламмония и неорганического катализатора [12]. В работе [13] липазы из *Candida rugosa* были инкапсулированы в аэрогель диоксида кремния, упрочненного кварцевым войлоком. Для этого кварцевый войлок пропитывали золем, содержащим фермент, с последующим переходом золя в гель. Приготовленные биокатализаторы использовали многократно без существенной потери активности.

Как отмечалось выше, большинство коммерческих биокатализаторов приготовлено путем иммобилизации частично очищенных ферментов. Очевидно, что если для приготовления биокатализаторов использовать биомассу микроорганизмов, продуцирующих внутриклеточную липазу, то стадии выделения и очистки ферментов исключаются, и стоимость биокатализаторов существенно снижается, что важно для крупнотон-

нажных процессов, например для получения биодизеля.

Микроорганизмы, продуцирующие внутриклеточную липазу, встречаются в природе довольно редко. Описан единственный штамм *Geotrichum candidum* 4013, продуцирующий как вне-, так и внутриклеточную липазу [14]. В реакции гидролиза масла, выделенного из черной смородины, было обнаружено различие в специфичности этих двух форм липазы. Целые микробные клетки с активностью липазы, иммобилизованные на гранулированных минералах и синтетических волокнах, использовали в патенте [15] для проведения различных реакций с участием растительных масел. Например, в реакции этерификации кукурузного масла этанолом выход конечных продуктов составил 60–95% [15]. В работе [16] были получены клетки *E. coli* и *P. putida* GM730 с иммобилизованной на клеточной стенке термостабильной липазой из *P. fluorescens*. Иммобилизацию фермента проводили с помощью “якорного” белка (ice-nucleation protein, INP) из *P. syringae*. При таком способе иммобилизации была ликвидирована проблема массопереноса субстрата внутрь клетки. Активность биокатализатора составила 350 ЕА/г сухих клеток. Иммобилизованная таким способом липаза полностью сохранила свою активность в двухфазной реакционной среде “вода–изо-октан” при гидролизе оливкового масла, синтезе триацилглицерида и разделении хиральных изомеров. Несомненно, что поиск природных и конструирование новых штаммов-продуцентов внутриклеточных липаз с заданными свойствами, является интересным и перспективным направлением в молекулярной биологии, микробиологии и гетерогенном биокатализе.

Цель работы – исследование многокомпонентных гетерогенных биокатализаторов с липолитической активностью, приготовленных путем иммобилизации целых клеток рекомбинантного штамма-продуцента термостабильной липазы из *T. lanuginosus*. Исследование свойств (активность, термостабильность) внутриклеточной рекомбинантной липазы как в суспензиях рекомбинантного штамма-продуцента *E. coli* BL21(DE3), так и в иммобилизованном состоянии. Изучение свойств приготовленных многокомпонентных биокатализаторов в зависимости от структуры и дисперсности вводимого в состав наночастицы компонента.

МЕТОДИКА

Рекомбинантный штамм-продуцент был сконструирован методами генетической инженерии путем клонирования химически синтезированного гена зрелой липазы из *Thermomyces lanuginosus* в составе экспрессирующего вектора pJExpress401 в клетках *E. coli* BL21(DE3) (обозначен **rE.coli/lip**).

Кодирующая область гена была оптимизирована для экспрессии в *E. coli* с помощью компьютерной программы Gene Designer2 фирмы DNA2.0 (США) и с учетом частот встречаемости пар кодонов [17] и положения второго аминокислотного остатка с N-конца полипептидной цепи [18]. Штамм *rE.coli/lip* обеспечивал экспрессию гена, индуцируемую изопропил- β -D-1-тиогактопиранозидом (ИПТГ), под контролем промотора бактериофага T5.

Глубинное выращивание клеток *rE.coli/lip* проводили на качалке (150 об/мин) в 2 л колбах Эрленмейера в течение 12 ч при 30°C. Питательная среда имела следующий состав (г/л): пептон ферментативный – 10.0, NaCl – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, канамицин – 0.03, pH 7.5. В качестве посевного материала в колбу вносили 10 мл культуры клеток *rE.coli/lip*, выращенных на описанной выше среде в течение 18–20 ч при 37°C. После внесения посевного материала клетки выращивали до оптической плотности (ОП), равной 1.0 при 600 нм ($l = 1$ см), после чего вносили ИПТГ до конечной концентрации 0.5, 1 или 2 мМ и продолжали культивирование в течение 18 ч при 30°C. По окончании культивирования клетки отделяли центрифугированием (5 000 \times g, 20 мин, +4°C). Для расчета концентрации клеток (мг/мл) и удельной активности (Е/мг) использовали коэффициент, равный 0.32 мг/мл ОП ($l = 1$ см).

Иммобилизацию клеток *rE.coli/lip* и приготовление гетерогенных биокатализаторов проводили методом включения клеточной биомассы в структуру ксерогеля диоксида кремния, как описано в [19–21]. В качестве компонента № 1 и связующего использовали отмытый и отфильтрованный гидрогель диоксида кремния, полученный путем взаимодействия силиката натрия с аммонийными солями азотной кислоты при pH 8.0 и 50°C. Содержание SiO₂ в гидрогеле составило 12 мас. %. Активная биомасса *rE.coli/lip* (компонент № 2) была получена в описанных выше условиях и содержала 20–25 мас. % сухих клеток. В качестве компонента № 3 использовали тонкодисперсные порошки нанокремниевых материалов – многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) разного диаметра и нанокремниевый луковичной структуры (НУЛС). Многослойные углеродные нанотрубки диаметром 9–11 нм (МУНТ-1, “тонкие”) имели удельную поверхность ($S_{уд}$), равную 320 м²/г. Нанотрубки диаметром 20–22 нм (МУНТ-2, “толстые”) имели $S_{уд} = 140$ м²/г, НУЛС с диаметром сферы 5–6 нм (“нанолук”) – 485 м²/г. Для приготовления биокатализаторов использовали МУНТ как в виде агрегатов размером ≥ 150 нм, получаемых в пиролизической установке, так и предварительно диспергированные ультразвуком. Диспергирование “тонких” МУНТ проводили следующим образом: смешивали агрегированные

нанотрубки с SiO₂-гидрогелем, добавляли дистиллированную воду и проводили диспергирование при частоте 22 кГц и мощности излучения 300 Вт в течение 30 мин в водоохлаждаемой емкости. Полученную суспензию МУНТ-1 фильтровали, и использовали для приготовления биокатализаторов. Состав приготовленных биокатализаторов был следующим, в мас. % сухих веществ: биомасса – 35–40, нанокремниевый – 10, SiO₂ – 50–55.

Реакцию гидролиза триглицеридов – триацетина, трибутирина, оливкового масла, проводили в периодическом режиме в замкнутых системах при интенсивном встряхивании и температурах от 0 до 60°C. Реакцию инициировали путем внесения рекомбинантной липазы в реакционную среду следующего состава: 0.2 М трибутирин, 1.2 М глицерин, 0.6% гуммиарабик, 0.02 М фосфатный буфер, pH 7.0. Кинетику реакции гидролиза триглицеридов до жирной кислоты изучали, отбирая пробы. Концентрацию образующейся жирной кислоты определяли титриметрически на установке, состоящей из pH-метра, блока автоматического титрования БАТ-15 и бюретки, заполненной титрантом 0.025 н. NaOH. После завершения каждого реакционного цикла биокатализаторы оставляли в реакционной среде на 1–3 сут, затем среду сливали и заливали свежей эмульсией триглицерида и снова следили за скоростью гидролиза субстрата, периодически отбирая пробы. За единицу ферментативной активности (Е) принимали скорость реакции, равную 1 мкмоль/мин. Активность выражали в Е/мг сухих клеток или в Е/г биокатализатора для клеток в суспензии и в иммобилизованном состоянии соответственно. Поскольку эмульсии триглицеридов не стабильны, и через 15–20 мин наблюдалось укрупнение “масляных” частиц и расслоение реакционной среды на две фазы, то измерения проводили в начальный период времени (1–5 мин) с погрешностью 15–20%.

Обработку приготовленных биокатализаторов маслом проводили путем выдерживания сухих гранул в оливковом масле (“MP Biomedicals, LLC”, США) в течение 18–20 ч при 20–22°C. Затем масло тщательно удаляли, и биокатализаторы использовали в реакции гидролиза трибутирина.

Определение термостабильности рекомбинантной липазы проводили путем прогревания клеток *rE.coli/lip* в буфере, pH 7.0, и в оливковом масле при 60–100°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантный штамм *rE.coli/lip* продуцировал термостабильную липазу из *T. lanuginosus*, содержащую дополнительную аминокислотную последовательность из 6 гистидиновых остатков на C-конце полипептидной цепи, в количестве

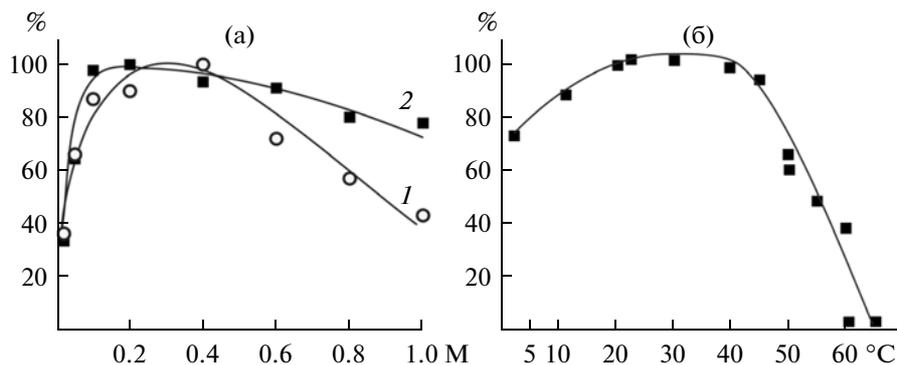


Рис. 1. Изменение относительной скорости реакции гидролиза (%) в зависимости от начальной концентрации трибутирина (М) (а): 1 – с участием гетерогенного биокатализатора, 2 – в суспензии клеток *rE.coli/lip*; и от температуры реакции (б).

~30–40% от суммарного белка клетки. Было показано, что синтезируемая штаммом рекомбинантная липаза локализуется как в цитоплазме в растворимом виде (до 70% от общего количества фермента), так и в ассоциированной с мембранами субклеточной фракции и в тельцах включения в количествах ~10 и ~20 соответственно.

Удельная активность рекомбинантной липазы в реакции гидролиза триацетина (С2), трибутирина (С4) и оливкового масла (преимущественно С18) составила соответственно 0.06, 149 и 2.3 Е/мг сухих клеток, т.е. в одинаковых условиях скорости реакции гидролиза триацетина и оливкового масла в ~1000 и ~100 раз меньше, чем скорость гидролиза трибутирина, поэтому дальнейшие исследования были проведены с использованием эмульсий трибутирина. Проведено сравнение свойств рекомбинантной липазы штамма *rE.coli/lip* со свойствами хроматографически очищенной липазы, впервые выделенной в 80 годы XX века из природного термофильного штамма микроскопических грибов *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* и описанной в работе [22]. В этой работе было найдено, что скорость гидролиза трибутирина была в ~2 раза выше, чем скорость гидролиза триацетина и триолеина.

Кинетика реакции. Изучена реакция гидролиза трибутирина в суспензиях *rE.coli/lip* при различных температурах. В первые 1–5 мин наблюдалось резкое увеличение концентрации выделившейся масляной кислоты, прирост ($C_t - C_0$) являлся положительной величиной, $\Delta C > 0$. При 20 и 30 °C через 10 мин прирост масляной кислоты не происходил, $\Delta C = 0$, скорость реакции $dC/dt = 0$. При 50 и 60 °C через 10 мин концентрация кислоты в реакционной среде достигала максимального значения, затем уменьшалась, $\Delta C < 0$, что могло указывать на возможное протекание обратной реакции с участием масляной кислоты и глицерина. Однако в модельных экспериментах, проведенных в реакционной среде, содержащей масляную

кислоту (0.01 М) и глицерин (0.01 М), при 50 и 60 °C концентрация масляной кислоты не изменялась в течение 30 мин, т.е. химическая связь между жирной кислотой и глицерином под действием липазы не образовывалась. Трибутирин гидролизовался полностью через 2–4 сут при 20 °C. Реакционная среда становилась гомогенной, не содержала “масляных” частиц триглицерида; концентрация масляной кислоты, рассчитанная из предположения полного гидролиза трибутирина в 1,3-положениях, соответствовала анализируемой. Следовательно, процесс гидролиза трибутирина является необратимым, и лимитирующей стадией этого процесса является переход молекул трибутирина из “масляной” частицы в раствор. Именно в микроокружении “масляной” частицы и/или на границе раздела фаз протекает ферментативная реакция. Величина ΔC определяется концентрацией молекулярного триглицерида в реакционной среде и суммарной активностью внесенного фермента. Для корректного расчета удельной липолитической активности в каждом эксперименте подбирали не только количество внесенного фермента/или биомассы/или биокатализатора, но и время отбора первых проб.

Кинетика Михаэлиса–Ментен. Исследование реакции гидролиза трибутирина в суспензиях клеток *rE.coli/lip* показало, что в изученных условиях кинетическая кривая в координатах Михаэлиса–Ментен имеет выраженный максимум (рис. 1а, 2). Известно, что максимум на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен в большинстве случаев обусловлен ингибированием продуктами реакции, в данном случае масляной кислотой и/или глицерином. Было обнаружено, что повышение концентрации масляной кислоты (от 10 до 50 мМ), добавленной в начальный момент в реакционную смесь, содержащую 0.2 М трибутирина, незначительно (на 10–20%) снижает скорость гидролиза. Учитывая погрешности измерения, можно сказать, что масляная кислота практически не ингибирует процесс гидролиза

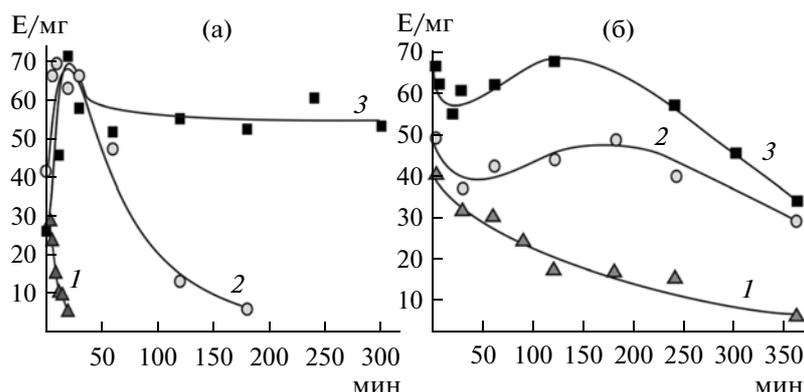


Рис. 2. Изменение удельной активности рекомбинантной липазы (Е/мг) в зависимости от температуры ($^{\circ}\text{C}$) и продолжительности прогрева (мин) клеток *гE.coli/lip* в буферном растворе, рН 7.0 (а: 1 – 70, 2 – 65, 3 – 60) и в оливковом масле (б: 1 – 100, 2 – 80, 3 – 70).

триглицерида. Увеличение концентрации глицерина от 0 до 1.2 М также не приводит к уменьшению скорости реакции гидролиза трибутирина, т.е. глицерин также не является ингибитором.

Максимум на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен, представленной на рис. 1а, может быть обусловлен уменьшением стойкости эмульсий “масло–вода”. Действительно, при повышении концентрации трибутирина, стойкость эмульсий уменьшается, и реакционная среда расслаивается на две фазы. Поверхность раздела фаз, доступная для каталитической атаки липазой, уменьшается обратно пропорционально радиусу “масляной” частицы. Уменьшение скорости реакции, близкое к линейному после прохождения максимума на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен, вероятно, обусловлено именно укрупнением “масляных” частиц эмульгированного триглицерида. Дополнительно было обнаружено, что при уменьшении стойкости эмульсий, например в отсутствие эмульгатора, скорость реакции гидролиза трибутирина падает. Так, если в “стандартной” реакционной среде активность *гE.coli/lip* составила 83.3 Е/мг сухих клеток, то в средах без глицерина или без глицерина + гуммиарабик липолитическая активность клеток была равной 75.8 и 50.8 ЕА/мг соответственно. Таким образом, максимум на кинетической кривой возникает из-за уменьшения стойкости эмульсий трибутирина при повышении его концентрации.

Температурный оптимум. Показано, что $T_{\text{опт}}$ в реакции гидролиза трибутирина в клеточных суспензиях *E. coli/lip* является очень широким (рис. 1б). Так, реакция протекает с достаточной скоростью даже на холоду ($2\text{--}10^{\circ}\text{C}$), а при температурах выше $40\text{--}45^{\circ}\text{C}$ наблюдается резкое падение начальной скорости гидролиза трибутирина; и при $60\text{--}65^{\circ}\text{C}$ скорость реакции равна нулю (рис. 1б). Эта зависимость отличается от температурной кривой для очищенного фермен-

та, описанной в работе [22]; так, в реакции гидролиза оливкового масла $T_{\text{опт}} = 45^{\circ}\text{C}$, а при 70°C начальная скорость реакции составляет $\sim 20\%$ от максимальной скорости.

Термостабильность. Изучена термостабильность рекомбинантной липазы при прогревании клеток *гE.coli/lip* в буферном растворе, рН 7.0. Было обнаружено, что кратковременный прогрев клеток в буфере при 60 и 65°C приводит к активации рекомбинантной липазы в 2.6 и 1.6 раз соответственно (рис. 2а, 2, 3). При 60°C клетки *гE.coli/lip* проявляют сравнительно высокую активность в течение >5 ч прогрева, а при 70°C наблюдается полная потеря активности в течение 1 ч (рис. 2а, 1). Константы инактивации ($k_{\text{ин}}$) рекомбинантной липазы составляют 0.007 и 0.11 мин^{-1} при 65 и 70°C соответственно. Эти результаты совпадают с данными, описанными в работе [22]. Таким образом, рекомбинантная липаза выдерживает продолжительный прогрев при повышенных температурах, тогда как температурный оптимум реакции гидролиза трибутирина лежит в диапазоне $20\text{--}45^{\circ}\text{C}$. В этом случае, можно предположить, что при температурах выше 60°C равновесие смещено в сторону образования триглицеридов (обратная реакция), и скорость прямой реакции гидролиза приближается к нулю.

Исследована термостабильность рекомбинантной липазы в оливковом масле. Клетки *гE.coli/lip* предварительно высушивали, затем помещали в масло и прогревали. При 70 и 80°C термостабильность липазы была практически одинаковой; и время полуинактивации составило 6 ч (рис. 2б, 2, 3). При 100°C константа инактивации $k_{\text{ин}}$ составила 0.006 мин^{-1} , время полуинактивации – 2 ч (рис. 2б, 1). Такая же величина константы инактивации, $k_{\text{ин}} = 0.007 \text{ мин}^{-1}$, наблюдалась при прогреве при 65°C в буфере. Таким образом, термостабильность рекомбинантной липазы в

Таблица 1. Влияние обработки биомассы *rE.coli/lip* на липолитическую активность в реакции гидролиза трибутирина

Условия обработки	Удельная активность, Е/мг сухих клеток
Интактные клетки, без обработки	2.5
Сушка, 22°C, 20 ч	43.5
Обработка толуолом, 1 : 1, 22°C, 20 ч	59.6
Замораживание (–20°C) – размораживание	36.0
Размораживание + сушка	45.0
Лизоцим (3 мг/мл, 0°C, 5 мин) + ультразвук (20 кГц, 3 раза, 30 с)	117.2
Лизоцим + ультразвук + сушка	211.0

масле на порядок выше, чем в водной среде, что является очень важной характеристикой фермента для его успешного практического применения в реакциях переэтерификации масел и жиров, протекающих при 60–70°C.

Исследованы свойства гетерогенных биокатализаторов, приготовленных путем включения клеток *rE.coli/lip* в ксерогель диоксида кремния. При сравнении данного метода с методами, описанными в работах [10–13], видно, что для приготовления биокатализаторов не используются дорогостоящие силаны; и токсичные побочные продукты их гидролиза и конденсации (метанол, силиканол) не образуются. Используемый гидрогель диоксида кремния отличается химической инертностью и микробиологической устойчивостью.

Кинетика Михаэлиса–Ментен. Исследование кинетики реакции гидролиза трибутирина иммобилизованными клетками *rE.coli/lip* показало, что кинетические кривые в координатах Михаэлиса–Ментен имеют выраженный максимум в диапазоне концентраций субстрата 0.1–0.4 М (рис. 1а, 1), аналогично суспендированным клеткам. Значение константы Михаэлиса (K_M), оцененные в координатах Лайнуивера–Берка, для рекомбинантной липазы в клеточных суспензиях и для гетерогенного биокатализатора составили 0.1 М и 0.08 М соответственно, т.е. при включении биомассы в SiO_2 -ксерогель K_M практически не изменилась.

Температурный оптимум. На температурной кривой для реакции гидролиза трибутирина с участием гетерогенного биокатализатора наблюдается более узкий и выраженный максимум по сравнению с рекомбинантной липазой в суспензиях, $T_{\text{опт}} = 40–45^\circ\text{C}$. При температуре выше 45°C наблюдается резкое падение скорости реакции, аналогичное наблюдаемому в суспензиях; при 60°C скорость гидролиза трибутирина с участием биокатализатора практически равна нулю.

Активность и стабильность гетерогенных биокатализаторов в реакции гидролиза трибутирина. При

включении клеток *rE.coli/lip* в SiO_2 -ксерогель сохраняется не более 1–2% липолитической активности суспендированных клеток. Такая “драматическая” потеря активности при иммобилизации может быть обусловлена разными причинами: (1) инактивацией липазы при приготовлении биокатализаторов – высушивание + прессование, (2) внутридиффузионными ограничениями при массопереносе субстрата внутрь пористой гранулы биокатализатора и отвода продукта, обладающего ингибирующим действием, (3) чрезвычайно малой величиной поверхности раздела фаз “масло–твердый биокатализатор”, на которой протекает реакция гидролиза эмульгированного трибутирина.

Сначала определили, как влияет замораживание-размораживание, а также сушка биомассы *rE.coli/lip* на липолитическую активность, регистрируемую в клеточных суспензиях. Было обнаружено, что удельная липолитическая активность ($A_{\text{уд}}$) интактных клеток *rE.coli/lip*, собранных сразу после глубинного культивирования центрифугированием, была очень низкая, не более 2.5 Е/мг сухих клеток при 20°C (табл. 1). Удельная липолитическая активность размороженной биомассы составила от ~10 до 50 Е/мг (в среднем, ~40), что на порядок выше удельной активности интактных клеток. При высушивании интактных клеток *rE.coli/lip* при 20–22°C и влажности воздуха 20–30% наблюдаемая удельная липолитическая активность также увеличивалась в среднем на порядок. При высушивании размороженной биомассы *rE.coli/lip* удельная липолитическая активность не изменялась даже при многократной сушке. Из табл. 1 видно, что независимо от способа воздействия на биомассу, ее удельная активность повышается на порядок по сравнению с интактными клетками, что указывает на увеличение доступности внутриклеточной липазы для субстрата. Удельная липолитическая активность клеточных лизатов, полученных при обработке биомассы лизоцимом и ультразвуком, является максимальной (табл. 1). Таким образом, стадия сушки не является причиной значительной потери фермента-

Таблица 2. Характеристика и свойства биокатализаторов в зависимости от прессования*

Давление при прессовании, атм	$S_{уд}$, м ² /г	V_{Σ} , см ³ /г	Диаметр пор (средний), нм	Активность (начальная), ЕА/г	Время полуинактивации, ч	Активность после 6 циклов, %
0	92.0	0.58	25	324	72	12
50	88.7	0.51	23	339	84	16
150	81.6	0.30	15	252	48	9

* Состав биокатализаторов (в мас. %): биомасса – 40, SiO₂ – 60.

тивной активности при приготовлении биокатализаторов. Стадия прессования также не оказывала существенного влияния на величину начальной активности биокатализаторов с одинаковым содержанием биомассы (30–45%). Так, начальная липолитическая активность биокатализаторов практически не зависела от того, используют или нет прессование для их приготовления. Для непрессованных биокатализаторов скорость гидролиза, измеренная в 2–3 реакционных циклах, была в ~1.5–2 раза больше, чем скорость гидролиза, измеренная в первом цикле, что, вероятно, было обусловлено частичным разрушением SiO₂-матрицы и выходом рекомбинантной липазы в реакционную среду. Для биокатализаторов, приготовленных путем прессования при 50–150 атм, скорость реакции в течение 6 реакционных циклов монотонно падала на 10–15% в каждом цикле, затем оставалась постоянной. Все приготовленные биокатализаторы после 6 циклов реакции (через 144 ч) сохранили не более 20% первоначальной активности свежеприготовленного биокатализатора. Гранулы биокатализаторов, запрессованные при 150 атм, сохраняли высокую механическую прочность в течение более 10 циклов реакции (каждый по 24–72 ч, т.е. в течение 600 ч) и не разрушались. Таким образом, наблюдаемая потеря липолитической активности на 2 порядка не обусловлена сушкой и прессованием при приготовлении биокатализаторов.

Влияние массопереноса субстрата внутрь пористой гранулы на наблюдаемую скорость гидролиза трибутирина (область внутренней диффузии) оценивали, изучая зависимость скорости реакции от размера гранул и текстурных характеристик биокатализаторов. Известно, что масштаб внутридиффузионного торможения оценивается по величине фактора эффективности f , равного отношению наблюдаемой скорости реакции к скорости реакции в кинетической области. Фактор эффективности приближенно вычисляется по формуле

$$f = \frac{9D_{\text{эф}}[S]V_{\Sigma}}{r^2W},$$

где r – радиус гранулы катализатора, W – скорость реакции в кинетической области, $D_{\text{эф}}$ – эффективный коэффициент диффузии субстрата, $[S]$ – по-

верхностная концентрация субстрата, V_{Σ} – суммарный объем пор. Из формулы следует, что если процесс протекает во внутридиффузионной области, то уменьшение радиуса гранулы в 2 раза, приводит к ~4-кратному увеличению наблюдаемой скорости реакции. Было показано, что при уменьшении размера гранул в 2 раза (1–2 мм до 0.3–0.6 мм) начальная скорость реакции гидролиза и характер инактивации биокатализаторов не изменились.

Методом азотной порометрии было найдено, что в пористой структуре всех приготовленных биокатализаторов преобладают нанопоры диаметром 15–25 нм (табл. 2). При прессовании с увеличением давления удельная поверхность биокатализаторов ($S_{уд}$) уменьшается незначительно (на ~10 м²/г), а суммарный объем пор V_{Σ} , уменьшается в 2 раза (табл. 2). Из формулы, приведенной выше, следует, что при наличии внутридиффузионного торможения при уменьшении V_{Σ} в 2 раза величина f падает также в ~2 раза. Однако, как отмечалось выше и видно из табл. 2, начальная активность биокатализаторов, а также их стабильность в периодическом процессе гидролиза трибутирина, не столь существенно зависят от того, используют или не используют прессование при их приготовлении (табл. 2). Анализируя все полученные результаты, можно сделать вывод о том, что гетерогенный гидролиз трибутирина протекает в области, близкой к кинетической. Наблюдаемые незначительные диффузионные ограничения не могут вызвать потерю активности на 2 порядка при включении клеток *rE.coli/lip* в SiO₂-ксерогель.

Исключая причины (1) и (2), описанные выше, можно прийти к заключению, что “драматическая” потеря липолитической активности при включении биомассы клеток *rE.coli/lip* в SiO₂-ксерогель происходит по причине (3), а именно, из-за чрезвычайно малой величины поверхности раздела фаз “масло–твердый биокатализатор”, на которой протекает реакция гидролиза эмульгированного трибутирина. Очевидно, что в гетерогенных условиях поверхность раздела фаз, доступная для биокатализа, значительно меньше, чем в эмульсиях. Поскольку, как отмечалось выше, при измельчении гранул и соответствующем увеличе-

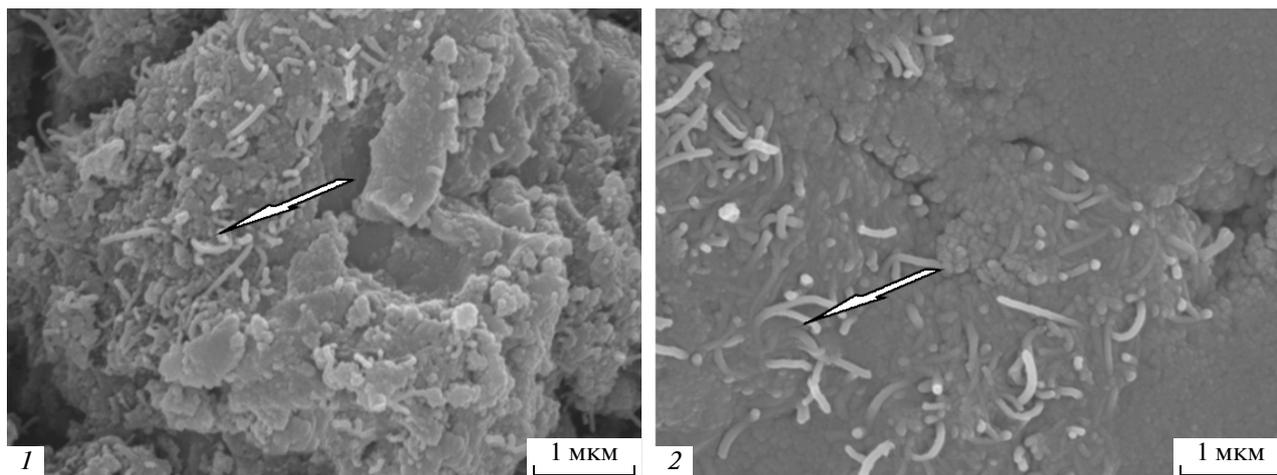


Рис. 3. Электронно-микроскопическое изображение биокатализаторов, приготовленных путем включения клеток *rE.coli/lip* в SiO_2 -ксерогель, содержащий наноуглеродный компонент: 1 – диспергированные МУНТ-1, 2 – МУНТ-2. Стрелками показаны МУНТ.

нии геометрической поверхности, доступной для контакта биокатализаторов с “масляной” частицей, наблюдаемая скорость реакции практически не увеличивается, то определяющую роль, по-видимому, играет размер “масляных” частиц трибутирина, а также их возможное сродство к твердому биокатализатору.

Для увеличения устойчивости эмульсий и сродства частиц трибутирина было предложено дополнительно вводить в SiO_2 -ксерогель гуммиарабик. Известно, что гуммиарабик является эффективным стабилизатором дисперсных систем (эмульсии, пены), а также пленко-образователем. Было обнаружено, что введение гуммиарабика в состав многокомпонентного биокатализатора (в количестве от 2 до 10 мас. %) не изменило активности приготовленных биокатализаторов в реакции гидролиза трибутирина.

Для увеличения сродства “масляных” частиц к биокатализаторам было предложено также вводить в их состав наноуглеродные материалы, которые обладали выраженными гидрофобными свойствами. На электронно-микроскопических изображениях гранул биокатализаторов и их сколов видно, что углеродные нанотрубки включены в структуру SiO_2 -ксерогеля вместе с клетками *rE.coli/lip* (рис. 3), и даже присутствуют на поверхности прессованных биокатализаторов (рис. 3, 2). Следует отметить, что предварительное диспергирование “тонких” МУНТ-1 приводило к более равномерному распределению наноуглеродного компонента в объеме биокатализатора, при этом устойчивость гранул и их механическая прочность в реакционной среде существенно возрастали.

В результате сравнительных исследований липолитической активности наноуглерод-силикатных биокатализаторов было установлено, что увеличение гидрофобности путем введения наноуглеродных компонентов МУНТ-1 и НУЛС приводит к уменьшению начальной активности биокатализаторов по сравнению с исходными образцами (без углерода); причем, чем гидрофобнее наноуглерод, тем меньше начальная активность приготовленных биокатализаторов. По-видимому, в результате гидрофобного взаимодействия трибутирина с углеродными материалами МУНТ-1 и НУЛС концентрация субстрата внутри биокатализатора существенно возрастала, и реакция гидролиза протекала в той области кинетической кривой Михаэлиса–Ментен (рис. 1а, 1), где наблюдается падение активности после прохождения максимума. Как видно из рис. 4а, наиболее активными были биокатализаторы, приготовленные с использованием агрегированных “толстых” МУНТ-2. Очевидно, что внутри данных биокатализаторов концентрация трибутирина также повышается, но неравномерно, образуя локальные депо субстрата, и реакция гидролиза протекает в области максимума на кинетической кривой, представленной на рис. 1, 1. Можно сказать, что в этом случае гидрофильно-гидрофобный баланс внутри приготовленного биокатализатора является оптимальным.

Исследование влияния дисперсности углеродных нанотрубок, вводимых в состав биокатализаторов, на их активность и стабильность показало, что предварительное диспергирование агрегатов “тонких” МУНТ-1 и, как отмечалось выше, их более равномерное распределение в силикатной матрице приводит к 4-кратному падению начальной активности биокатализаторов. Агрегаты МУНТ-1, аналогично агрегатам МУНТ-2, рас-

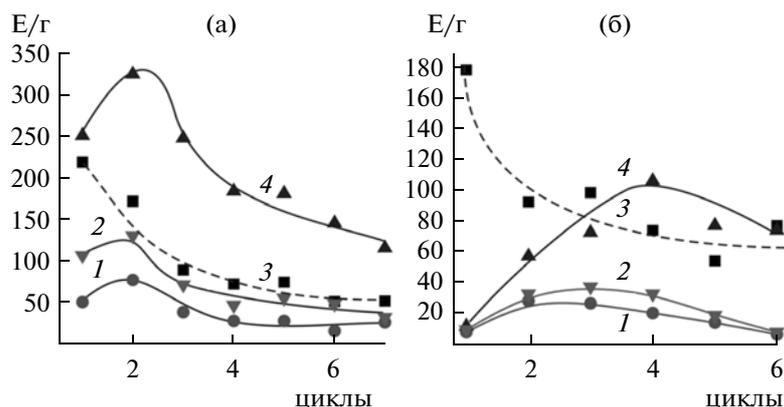


Рис. 4. Зависимость активности приготовленных биокатализаторов (Е/г) от количества реакционных циклов и типа введенного наноуглеродного компонента в состав биокатализаторов (а): 1 – диспергированные МУНТ-1, 2 – “нанолук”, 3 – без наноуглерода (контрольный биокатализатор), 4 – МУНТ-2; а также биокатализаторов, обработанных в оливковом масле (б): 1 – диспергированные МУНТ-1, 2 – “нанолук”, 3 – контрольный биокатализатор (без наноуглерода и без обработки в масле), 4 – МУНТ-2.

пределены внутри биокатализатора неравномерно, и значительная доля объема гранул приходится на SiO_2 . Введение агрегированных МУНТ-1 не изменяет величину начальной активности биокатализаторов (~ 220 Е/г) по сравнению с исходным, контрольным образцом (без углерода, ~ 220 Е/г). Таким образом, увеличение гидрофобности биокатализаторов путем введения в их состав наноуглеродных материалов по-разному влияет на их липолитическую активность, что определяется типом и дисперсностью вводимого наноуглерода. По влиянию введенного наноуглеродного компонента на активность свежеприготовленных биокатализаторов (A_0) изученные материалы можно расположить в следующий ряд: агрегаты МУНТ-2 ($A_0 \sim 250$ ЕА/г) > агрегаты МУНТ-1 и без углерода (~ 220 ЕА/г) > “нанолук” (106 ЕА/г) > диспергирован. МУНТ-1 (~ 50 ЕА/г) (рис. 4а). Анализируя эти результаты, можно сделать вывод о необходимости оптимального соотношения гидрофильности–гидрофобности внутри биокатализаторов, учитывая особенности ферментативной реакции – гидролиза эмульгированного триглицерида. Более гидрофобные материалы – “тонкие” МУНТ-1 и “нанолук”, обладающие удельной поверхностью выше $300 \text{ м}^2/\text{г}$, значительно повышают концентрацию трибутирина внутри матрицы SiO_2 -ксерогеля, и реакция переходит в область кинетической кривой Михаэлиса–Ментен после прохождения максимума. Как отмечалось выше, агрегаты МУНТ-1 и МУНТ-2 распределены в SiO_2 -ксерогеля неравномерно, формируя локальные депо субстрата внутри биокатализатора, и реакция протекает в области максимума на кинетической кривой Михаэлиса–Ментен.

Характерной особенностью наноуглерод-силикатных биокатализаторов являлось увеличение

их активности после проведения первого реакционного цикла (рис. 4а). Масштаб такого увеличения, равный отношению максимально наблюдаемой активности ($A_{\text{макс}}$) к начальной активности свежеприготовленного биокатализатора (A_0), составил 1.2–1.5. Стабильность МУНТ-содержащих биокатализаторов была сравнительно высокой: после проведения 7 циклов реакции (по 24 ч каждый) биокатализаторы сохранили $\geq 50\%$ активности свежеприготовленных биокатализаторов (рис. 4а). Ранее в работе [21] было показано, что стабильность биокатализаторов увеличивается за счет адсорбции/адгезии ферментативно-активного компонента на наноуглеродном материале и его удерживания внутри силикатной матрицы биокатализатора. Биокатализаторы, содержащие диспергированные МУНТ-1, после 4 реакционного цикла достигали стационарного состояния с активностью 26 ЕА/г (рис. 4а, 1), по-видимому, из-за сравнительно прочной адсорбции рекомбинантной липазы на “тонких” МУНТ-1. Биокатализаторы, содержащие агрегаты МУНТ-2 и “нанолук”, а также контрольные (без углерода), монотонно теряли активность в последующих циклах периодического процесса гидролиза (рис. 4а, 2–4).

Были изучены биокаталитические свойства иммобилизованных клеток *rE.coli/lip* после обработки оливковым маслом. Как отмечалось выше, термостабильность рекомбинантной липазы в масле на порядок выше, чем в буферном растворе. Было обнаружено, что биокатализаторы, выдержанные в оливковом масле, в реакции гидролиза эмульгированного трибутирина проявляют активность, на порядок меньшую, чем контрольные образцы, не обработанные маслом. По-видимому, масло блокировало доступ субстратов – трибутина и, в особенности, воды, к иммобилизованной

рекомбинантной липазе. Для наноуглерод-силикатных биокатализаторов, обработанных в масле, наблюдался суммарный эффект как от негативного влияния масла, так и от введенного наноуглерода (рис. 4б), причем все зависимости, описанные для наноуглеродного компонента ранее, сохранились. Так, максимальной активностью обладали биокатализаторы, в состав которых были введены агрегаты “толстых” МУНТ-2, минимальной – диспергированные “тонкие” МУНТ-1 (рис. 4б). Характерной особенностью наноуглерод-силикатных биокатализаторов, обработанных в масле, являлось продолжительное увеличение активности после проведения 1 реакционного цикла в течение 3–4 последующих циклов (рис. 4б). Наблюдаемое увеличение активности свежеприготовленных биокатализаторов, по-видимому, происходило из-за вымывания оливкового масла из матрицы и оптимизации гидрофильно–гидрофобного баланса внутри биокатализатора. Величина отношения $A_{\text{макс}}/A_0$ определялась структурой наноуглеродного компонента. Так, для агрегатов МУНТ-2 $A_{\text{макс}}/A_0 = 9.6$, для агрегатов МУНТ-1 и “нанолука” $A_{\text{макс}}/A_0 = 4.1–4.5$, для диспергированных МУНТ-1 – $A_{\text{макс}}/A_0 = 3.4$, без углерода – $A_{\text{макс}}/A_0 = 1.8$. После проведения 6 реакционных циклов реакции активность биокатализаторов, содержащих агрегаты МУНТ-2 и МУНТ-1, была соответственно в 6.5 и 2 раза выше активности свежеприготовленных биокатализаторов. Видно, что введение в состав биокатализаторов агрегатов МУНТ оказывает наиболее выраженный положительный эффект.

Таким образом, для приготовления гетерогенных биокатализаторов с липолитической активностью был сконструирован рекомбинантный штамм *rE.coli/lip*, продуцирующий термостабильную липазу из *Thermomyces lanuginosus* в количестве ~30–40% от суммарного белка. Многокомпонентные биокатализаторы с липолитической активностью были приготовлены путем включения клеток штамма-продуцента *rE.coli/lip* в наноуглеродсодержащий SiO_2 -ксерогель. В качестве наноуглеродного компонента использовали многослойные углеродные нанотрубки (МУНТ) разного диаметра, а также “нанолук”.

Активность рекомбинантной липазы в клеточных суспензиях *rE.coli/lip*, измеренная в реакции гидролиза трибутирина, составила в среднем 50 Е/мг сухих клеток при 20°C. Термостабильность рекомбинантной липазы при прогревании в оливковом масле на порядок выше, чем в буфере; и при 100°C константа инактивации в масле составила 6×10^{-3} мин⁻¹, время полуинактивации – 2 ч. С другой стороны, после обработки оливковым маслом липолитическая активность многоком-

понентных биокатализаторов уменьшалась на порядок.

Исследование эффектов от введения наноуглеродного компонента в состав многокомпонентных биокатализаторов показало, что использование агрегатов “толстых” МУНТ диаметром 20–22 нм приводило к получению биокатализатора с максимальной величиной начальной активности (250 Е/г). При введении диспергированных “тонких” МУНТ-1 диаметром 9–11 нм активность биокатализаторов была минимальной (50 Е/г).

Полученные результаты позволили сделать вывод о необходимости оптимального баланса гидрофильно–гидрофобных свойств внутри биокатализаторов с учетом особенностей ферментативной реакции гидролиза гидрофобного субстрата – трибутирина. Так, увеличение гидрофобности за счет введения диспергированных МУНТ-1 и “нанолука” приводит к многократной потере активности наноуглерод-силикатных биокатализаторов по сравнению с силикатными биокатализаторами (без углерода). Оптимальный баланс гидрофильности–гидрофобности был достигнут при введении агрегатов “толстых” МУНТ-2, что привело к увеличению липолитической активности в 1.3–1.5 раз по сравнению с биокатализаторами без углерода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2000. V. 9. № 4–6. P. 113–148.
2. Akhil Bajaj, Purva Lohan, Prabhat N. Jha, Rajesh Mehrotra // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 62. № 1. P. 9–14.
3. Aravindan R., Anbumathi P., Viruthagiri T. // Ind. J. Biotechnol. 2007. V. 6. № 2. P. 141–158.
4. Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. V. 66. № 1. P. 15–32.
5. Зайцева Л.В. // Пищ. промышл. 2011. № 5. С. 22–25.
6. Nese S., Casimir C.A., Artemis K. // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 14. P. 5779–5783.
7. Christensen M.W., Andersen L., Tommy L.H., Ole K. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2003. V. 105. № 4. P. 318–321.
8. Salis A., Meloni D., Ligas S., Casula M.F., Monduzzi M., Solinas V., Dumitriu E. // Langmuir. 2005. V. 21. № 12. P. 5511–5516.
9. Galarneau A., Muresanu M., Aiger S., Renard G., Fajula F. // New J. Chem. 2006. V. 30. № 4. P. 562–571.
10. Maury S., Pierre A.C. // Macromol. Biosci. 2001 V. 1. № 4. P. 119–125.
11. Nouredini H., Gao X., Joshi S., Wagner P.R. // J. Amer. Oil Chem. Soc. 2002. V. 79. № 1. P. 33–40.
12. Hsu An-Fe, Foglia T.A., Shen Siyan // Biotechnol. Appl. Biochem. 2000. V. 31. № 3. P. 179–183.
13. Buisson P., Pierre A.C. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2006. V. 39. № 1–4. P. 77–82.

14. Hlavsova K., Zarevucka M., Wimmer Z., Mackova M., Sovova H. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009. V. 61. № 3–4. P. 188–193.
15. Патент Италии. 2007. № 0858 A1.
16. Jung Heung-Chae, Ko Sumin, Ju Suk-Ja, Kim Eui-Joong, Kim Mi-Kyung, Pan Jae-Gu // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2003. V. 26. № 3–6. P. 177–184.
17. Hatfield G.W., Roth D.A. // Biotechnol. Annu. Rev. 2007. V. 13. № 1. P. 27–42.
18. Bivona L., Zou Z., Stutzman N., Sun P.D. // Protein Expr. Purif. 2010. V. 74. № 2. P. 248–256.
19. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Сапунова Л.И., Шляхотко Е.А., Лобанок А.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 2. С. 168–175.
20. Перминова Л.В., Коваленко Г.А., Чуенко Т.В., Рудина Н.А. // Кинет. Катал. 2012. Т. 53. № 1. С. 150–159.
21. Kovalenko G.A., Perminova L.V., Rudina N.A., Mazov I.N., Moseenkov S.I., Kuznetsov V.L. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2012. V. 76. № 2. P. 116–124.
22. Ibrahim Che Omar, Mitsunori Hayash, Shiro Nagai // Agric. Biol. Chem. 1987. V. 51. № 1. P. 37–45.

Recombinant Strain Producing Thermostable Lipase from *Thermomyces lanuginosus* Immobilized into Nanocarbon Silica Matrices and Properties of the Prepared Biocatalyzers

G. A. Kovalenko^{a, b}, A. B. Beklemishev^c, L. V. Perminova^a, T. V. Chuenko^a, A. L. Mamaev^c, I. D. Ivanov^c, S. I. Moseenkov^a, and V. L. Kuznetsov^{a, b}

^a Borekov Institute of Catalysis, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, pr. akademika Lavrent'eva 5, Novosibirsk, 630090 Russia

^b Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

^c Institute of Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630117 Russia
e-mail: galina@catalysis.ru

Received May 11, 2012

Abstract—Multicomponent composite biocatalyzers with lipolytic activity have been studied. These biocatalyzers were prepared through the immobilization of a recombinant producer strain of thermostable lipase from *Thermomyces lanuginosus* into SiO₂ xerogel, which contains a nanocarbon component, i.e., multilayered carbon nanotubes with varying diameters, and also bulblike structured carbon nanospheres (“nanobulb”). The properties of lipase were studied both in cell suspensions of a recombinant producer strain constructed based on *E. coli* BL21(DE3) and in the immobilized state with regard to the structure and dispersibility of the nanocarbon component used in the composition of the biocatalyzers. It was shown that the recombinant intracellular lipase exerted its activity in a reaction of tributirin hydrolysis on average comprising 50 U/mg of dried cells and had a high level of thermostability. Upon heating in olive oil at 100°C, the inactivation constant and the period of semi-inactivation comprised $6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ and 2 h, respectively, exceeding by one order the thermostability of lipase in a buffer solution. Biocatalyzers that contained aggregated “thick” nanotubes with a diameter of 20–22 nm had the maximum initial activity—250 U/g.