

## ГЕТЕРОГЕННЫЙ БИОКАТАЛИЗ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ



В.А. Демаков,  
доктор медицинских наук,  
член-корреспондент РАН,  
директор Института экологии  
и генетики микроорганизмов  
УрО РАН



Ю.Г. Максимова,  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник,  
Институт экологии и генетики  
микроорганизмов УрО РАН

Разработаны гетерогенные биокатализаторы гидролиза нитрилов и амидов карбоновых кислот на основе иммобилизованных и самоиммобилизованных бактериальных клеток, а также ферментного препарата. Изучено влияние иммобилизации на ферментативную активность и стабильность при многократном использовании и воздействии экстремальных условий реакционной среды (рН, температура). Дана оценка эффективности этих биокатализаторов в гидролитических процессах.

Гетерогенный биокатализ – специфический, высокоэффективный процесс трансформации органических веществ, протекающий на поверхности раздела фаз, катализатором которого является биологическая составляющая (фермент, комплекс ферментов, органеллы, клетки), иммобилизованная на нерастворимом носителе. Биокатализ можно рассматривать в рамках относительно нового направления в науке, получившего название «зеленая химия». Целью этого направления, которое сформировалось в 90-х годах 20-го века, является предотвращение загрязнения окружающей среды при получении химических продуктов или при разработке химических процессов [9]. Синтез и трансформация органических веществ биокаталитическим способом более специфичны, энергетически выгодны и экологически безопасны.

Интерес к биокаталитическим процессам неуклонно возрастает во всем мире. Последние десятилетия активно разрабатываются научные основы биотехноло-

гий, основанных на применении гидролитических ферментов. Среди таких процессов большое внимание уделяется биотрансформации нитрильных и амидных соединений, которая основана на катализе этих органических веществ ферментами метаболизма нитрилов у микроорганизмов. При трансформации алифатических нитрилов могут быть получены такие промышленно значимые соединения, как акриламид и акриловая кислота; ароматических нитрилов (цианопиридинов) – никотинамид, никотиновая кислота и др. Стереоселективный ферментативный гидролиз нитрила миндальной кислоты, фенилглицинонитрила,  $\beta$ -гидроксизамещенных нитрилов позволяет получить продукты с высокой степенью энантиоселективности [8, 10, 14]. Известны два пути гидролиза нитрилов: двустадийный нитрилгидратазный, включающий стадию гидратации нитрила до соответствующего амида с помощью фермента нитрилгидратазы (КФ 4.2.1.84) и стадию гидролиза амида до карбоновой кислоты, осу-

ществляемую амидазой (КФ 3.5.1.4), одностадийный путь прямого гидролиза нитрила в соответствующую карбоновую кислоту катализируется ферментом нитрилазой (КФ 3.5.5.1) [7]. Биокатализаторами данных процессов могут являться либо целые клетки микроорганизмов, либо изолированные ферменты.

По сравнению с гомогенным, протекающим в однородной среде, гетерогенный биокатализ имеет ряд преимуществ, а именно возникает возможность разработки непрерывных процессов, увеличивается срок эксплуатации биокатализатора, снижается количество отходов. Гетерогенные биокатализаторы чаще всего представляют собой изолированные ферменты или целые клетки микроорганизмов, иммобилизованные на поверхности нерастворимого материала-носителя методом адсорбции или ковалентной сшивки, либо в массе носителя путем включения в структуру геля или инкапсуляции (рис. 1).

Среди существующих методов иммобилизации ферментов и клеток особый интерес представляет адсорбция, и не только в силу технологических преимуществ, которые заключаются в легкости

исполнения, дешевизне, большом выборе подходящих биосовместимых инертных носителей, возможности их регенерации и создания непрерывных технологий, но и благодаря фундаментальным аспектам этого метода.

Согласно современным представлениям, микроорганизмы существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих планктонных клеток, а в виде специфически организованных прикрепленных к субстрату биопленок [1]. Адсорбция клеток интересна тем, что бактерии возвращаются в свое естественное прикрепленное состояние, изучение которого позволяет приблизиться к пониманию процессов, происходящих в природе. Экспериментальную адгезию микроорганизмов к нерастворимому носителю можно рассматривать как модель первого этапа образования биопленки в природе, связанного с прикреплением клеток к биотической или абиотической поверхности. В то же время биокатализатор на основе самоиммобилизованных в процессе роста микроорганизмов представляет собой биопленку, изучение которой интересно как с теоретической, так и с практической точки зрения. Принимая во внимание, что



Рис. 1. Методы иммобилизации ферментов и клеток микроорганизмов

внутриклеточные ферменты функционируют не в разбавленном растворе, а в сложной гетерогенной среде, целесообразно изучение их свойств в иммобилизованном состоянии.

В лаборатории химического мутагенеза Института экологии и генетики УрО РАН проводятся работы по получению гетерогенных биокатализаторов гидролиза нитрильных и амидных соединений, изучаются их каталитические свойства и оценивается эффективность биотранс-

формации. Исследования проводятся в нескольких направлениях: 1) создание биокатализаторов на основе нерастущих бактериальных клеток, иммобилизованных на различных носителях; 2) получение биопленок нитрилутилизующих бактерий при гетерофазном культивировании; 3) иммобилизация ферментного препарата, содержащего нитрилгидратазу, нитрилазу и/или амидазу, методом адсорбции и ковалентного присоединения.

### ГЕТЕРОГЕННЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР ГИДРОЛИЗА НИТРИЛОВ НА ОСНОВЕ АДСОРБИРОВАННЫХ НЕРАСТУЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Селекционированные в лаборатории химического мутагенеза ИЭГМ УрО РАН штаммы нитрилгидролизующих бактерий *Rhodococcus ruber* gt1, обладающих высокой нитрилгидратазной активностью, и *Pseudomonas fluorescens* C2, содержащих нитрилазу, были адсорбционно иммобилизованы на различных неорганических

носителях (рис. 2). В качестве носителей были выбраны углеродсодержащие адсорбенты: активные дробленые угли (БАУ, Norit РК 1-3), гранулированные (ФТД), активированные углеродные волокна (Карбопон-В-актив), карбонизированные углеродные волокна (Урал ТМ-4, Карбопон), уголь-сырец, Сибунит, Сапро-

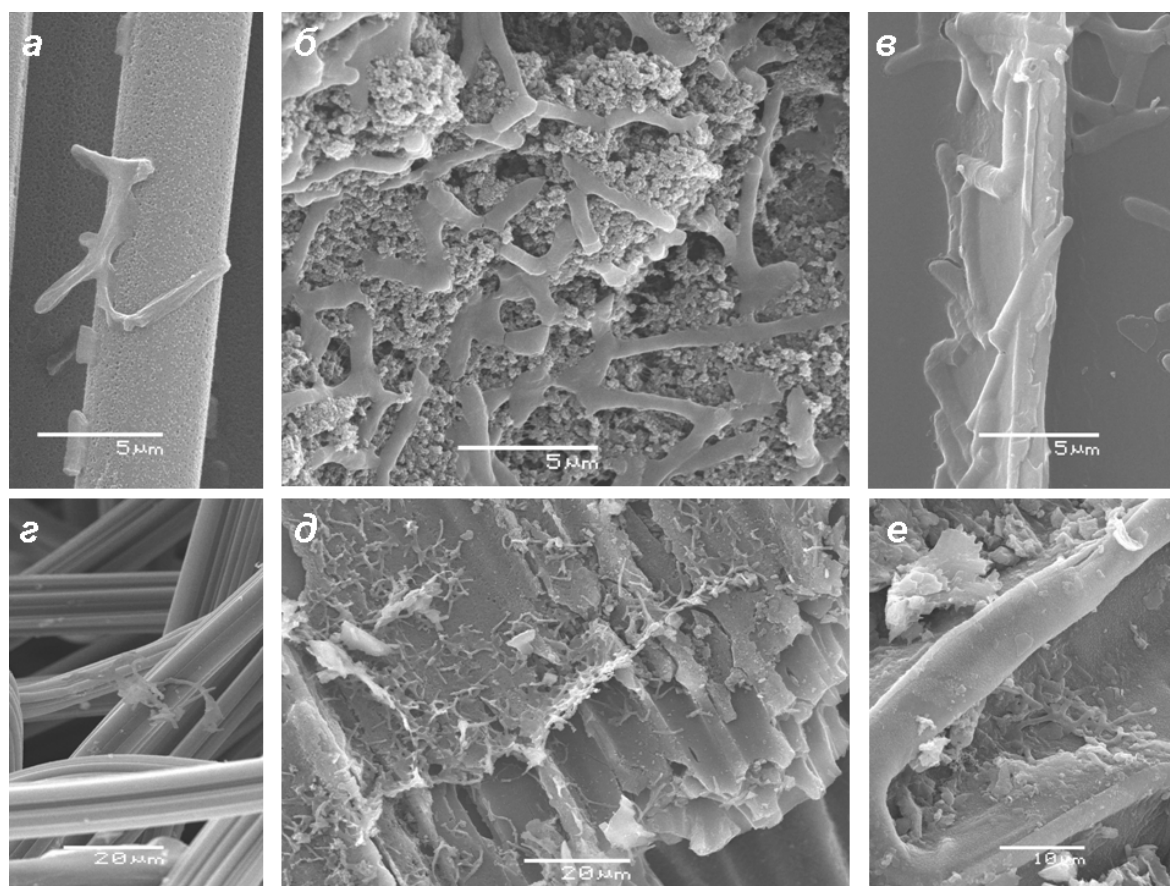


Рис. 2. Клетки *R. ruber* gt1, адсорбированные на углеродсодержащих носителях: а – Урал ТМ-4, б – Сибунит, в – уголь-сырец, г – Карбопон, д – БАУ, е – Сапропель

пели, а также синтезированные в Институте катализа СО РАН носители со слоем графитоподобного и каталитического волокнистого углерода (КВУ) [2, 3]. Все вышперечисленные носители обладали гидрофобной поверхностью и эффективно адсорбировали клетки штамма родококков, также имеющие гидрофобную поверхность. С другой стороны, адсорбция клеток псевдомонад, имеющих гидрофильную клеточную стенку, была значительно ниже на данных носителях. Для адсорбции клеток этого штамма был использован гидрофильный каолин.

Скрининг большого числа адсорбентов, различающихся по своим характеристикам (пористость, дисперсность, удельная площадь доступной поверхности, характер поверхности), как носителей для иммобилизации нерастаущих бактериальных клеток, позволил выявить ряд основных свойств, которыми должен обладать материал для эффективной адгезии клеток. Во-первых, так как размеры клеток

большинства бактерий превышают 1 мкм, носитель должен обладать макропорами, которые увеличивают площадь, доступную для адсорбции клеток. Этому требованию отвечают такие материалы, как БАУ, Norit РК 1-3, уголь-сырец, Сапропель. Во-вторых, площадь доступной поверхности может быть увеличена за счет высокой дисперсности носителя – это может быть порошкообразный уголь-сырец, каолин. В-третьих, шероховатая поверхность носителя более предпочтительна для адгезии клеток, как в случае синтезированного на поверхности носителей слоя КВУ, а также носителя Сибунита. Наличие этих свойств у носителей позволяет увеличить клеточную нагрузку, избежать десорбции клеток в реакционную среду и диффузионных ограничений.

Следует отметить, что при адсорбции нитрилгидратазная и нитрильная активность клеток увеличивается (таблица). У клеток в стационарной фазе роста это может быть связано, скорее всего, не с воз-

**Нитрилгидратазная и нитрильная активность и стабильность гетерогенных биокатализаторов на основе адсорбированных бактериальных клеток**

Штамм бактерий / фермент	Носитель	[S], М	Активность, %	N
<i>R. ruber</i> gt1 / нитрилгидратаза	БАУ	1,04	141	8
	Norit РК 1-3	0,85	135	8
	ФТД	0,97	142	7
	Уголь-сырец	0,77	143	8
	Урал ТМ-4	1,25	115	7
	Карболоп	0,97	128	7
	Карболоп-В-актив	1,13	81	5
	ФАС	1,21	142	7
	Массивный КВУ	0,86	123	7
	Керамзит/графитоподобный слой	1,3	57	2
	Керамзит/КВУ-слой (6,47 вес%)	0,9	228	8
	Керамзит/КВУ-слой (2,84 – 3,63 вес%)	0,9	184	6
	Сибунит	1,13	235	2
Сапропель	0,05	285	3	
<i>P. fluorescens</i> C2 / нитрилаза	Каолин	1,3	198	5
	БАУ	0,6	330	6
	Карболоп-В-актив	0,6	171	5

Примечание: [S] – концентрация раствора акрилонитрила, при которой наблюдается максимальная активность адсорбированных клеток; 100 % – максимальная активность суспензии клеток; N – количество циклов, в которых сохраняется 50 % активности гетерогенного биокатализатора

растением экспрессии генов, кодирующих эти ферменты, а с изменениями в проницаемости мембран, которые происходят при переходе клеток в адгезированное состояние [11]. Кроме того, полученный гетерогенный биокатализатор может использоваться многократно для трансформации высоких концентраций алифатических нитрилов в амиды и соответствующие карбоновые кислоты с сохране-

нием активности в течение ряда последовательных реакций.

Таким образом, при соответствии носителей перечисленным требованиям, адсорбционной иммобилизацией нерастущих бактериальных клеток можно получить активный и стабильный гетерогенный биокатализатор, который может быть использован в процессе гидролиза нитрилов.

## ГЕТЕРОГЕННЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР ГИДРОЛИЗА НИТРИЛОВ НА ОСНОВЕ БИОПЛЕНОК НИТРИЛУТИЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Способность микроорганизмов к образованию биопленок может играть не только отрицательную роль (антибиотикоустойчивость патогенных штаммов, биокоррозия), но и положительную – в биологической очистке сточных вод, газообразных выбросов и почв. Кроме того, биопленки промышленно значимых штаммов микроорганизмов могут рассматриваться как самоиммобилизующиеся и саморегенерируемые биокатализаторы, что особенно актуально в тех случаях, когда субстраты и/или продукты биокатализа отрицательно воздействуют на жизнеспособность клетки. Но в то же время целесообразность применения биопленок в биокатализе остается спорным вопросом, так как преимущества, заключающиеся в самоиммобилизации, долговременной активности и высокой устойчивости к токсичным веществам сочетаются с флуктуациями в продуктивности и качестве конечного продукта, обуслов-

ленными сложной и динамичной природой биопленок. Кроме того, возможно образование избытка внеклеточных полимерных веществ, приводящее к ограничениям массопереноса и загрязнению реактора [13].

В процессе гетерофазного культивирования с углеродсодержащими носителями и полиэтиленом высокой плотности был получен биокатализатор гидролиза нитрилов в свободно-сuspended в виде и в виде биопленок (рис. 3, 4). Сравнивали суммарную продуктивность биокатализатора, которая слагалась из продуктивности планктонной культуры и биопленки, с продуктивностью гомогенного биокатализатора, выращенного в виде суспензии. Нами было показано, что при гетерофазном культивировании родококков, а именно штамма *R. ruber* gt1, суммарная продуктивность такого биокатализатора выше контрольной, если в качестве носителей использовались поли-

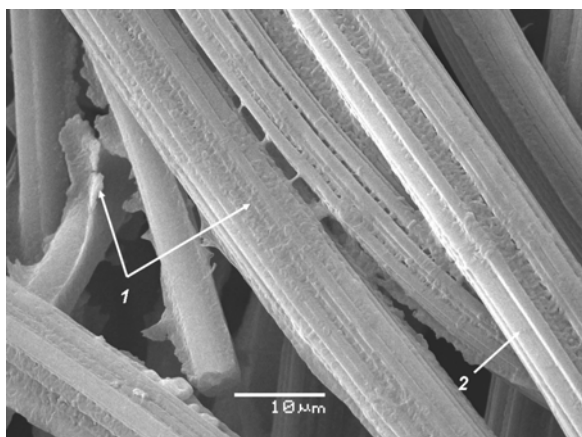


Рис. 3. Биопленка *P. fluorescens* C2 на карбонизированных углеродных волокнах  
Карбопон: 1 – клетки, 2 – волокно



Рис. 4. Биопленка *R. ruber* gt1 на карбонизированных углеродных волокнах  
Карбопон: 1 – волокно, 2 – клетки

этилен и карбонизированная ткань Урал ТМ-4 (рис. 5) [6]. В то же время при культивировании *P. fluorescens* C2 результат был обратный – культивирование с носителями не давало таких преимуществ, более того, суммарная продуктивность в этом случае была ниже контрольной. Это может объясняться особенностями изучаемых бактерий: известно, что псевдомонады при росте в виде биопленок продуцируют большое количество полимерного матрикса, который, вероятно, и снижает гидролитическую способность кле-

ток из-за затруднений массообмена.

При разработке биокатализатора на основе биопленок бактерий следует учитывать свойства бактериальных культур, а именно их особенности при росте в прикрепленном состоянии. Так, скорее всего, бактерии, продуцирующие избыток внеклеточных полимеров в биопленке, будут в этом состоянии менее предпочтительны для использования в качестве биокатализатора трансформаций органических веществ.

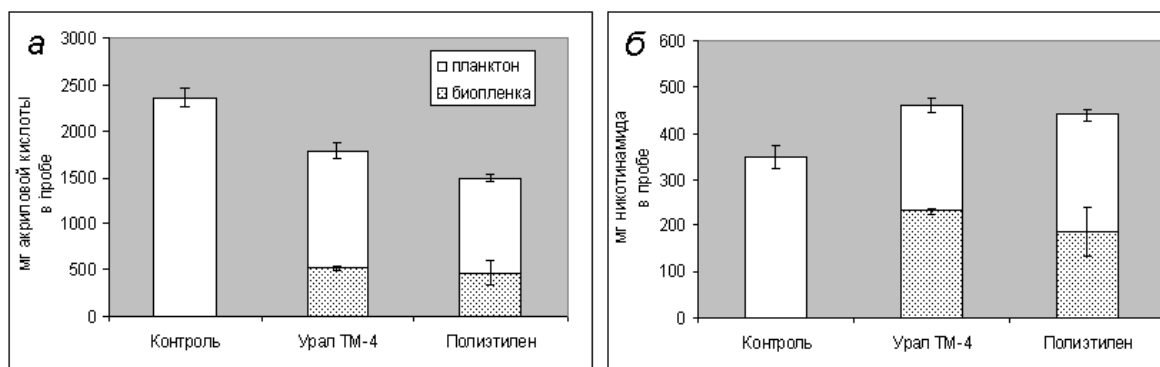


Рис. 5. Образование суспендированными клетками и биопленкой *P. fluorescens* C2 акриловой кислоты (а) и суспендированными клетками и биопленкой *R. ruber* *gt1* никотинамида (б).

Контроль – суспензия, выращенная без носителя

## ГЕТЕРОГЕННЫЙ БИОКАТАЛИЗАТОР НА ОСНОВЕ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА

Известно, что ферменты метаболизма нитрилов – внутриклеточные. В этом случае, конечно, биокатализатором может служить и целая клетка, что имеет свои преимущества: отсутствуют дорогостоящие операции по выделению и очистке фермента, упрощается и удешевляется процесс приготовления биокатализатора. Но в ряде случаев имеет смысл получение ферментного препарата. Поскольку в клетке функционирует весь комплекс ферментов, для увеличения специфичности процесса и количества биокатализатора на единицу объема реактора можно использовать выделенный фермент. Так, нитрилгидратаза в клетке находится в комплексе с амидазой, поэтому очищенный фермент может оказаться более предпочтительным для производства амидов, не загрязненных карбоновыми кислотами. При этом сильного удорожа-

ния биокатализатора можно избежать, если использовать ферментный препарат грубой очистки.

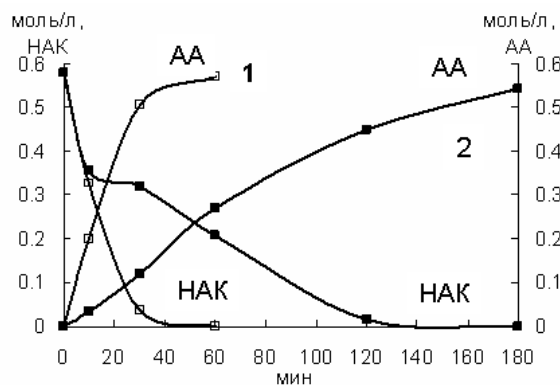
Нами был получен ферментный препарат нитрилгидратазы и нитрилазы, который был иммобилизован методом адсорбции и ковалентного связывания с носителем. Изучали каталитические свойства иммобилизованных ферментных препаратов. Препарат нитрилгидратазы, адсорбированный на оксидах алюминия и углеродсодержащих носителях, полученных на их основе (Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН), осуществлял гидратацию акрилонитрила до акриламида [5]. Однако при этом сохранялось не более 10 % первоначальной активности фермента в растворе, хотя иммобилизованный препарат проявлял операционную стабильность при проведении последовательных реакций трансформации суб-

страта и полностью не инактивировался в процессе гидратации акрилонитрила при высоких (до 70 °С) температурах. Также было показано, что повышение содержания углерода приводило к возрастанию количества адсорбированного фермента, но одновременно и к снижению его активности (рис. 6).

Недостаточная активность адсорбированной нитрилгидратазы обусловила необходимость дальнейших поисков предпочтительных методов иммобилизации этого ферментного препарата. Нитрилгидратаза была иммобилизована методом ковалентной сшивки с гранулами хитозана, активированного раствором бензохинона [4]. При изучении каталитических свойств иммобилизованного фермента

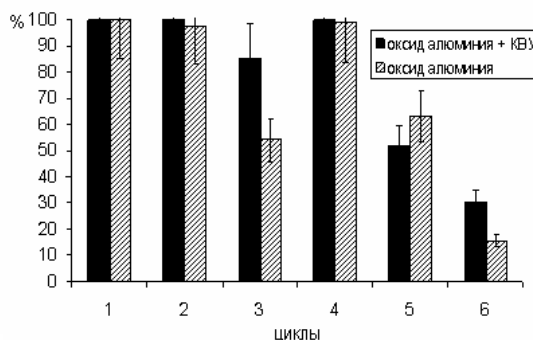
было выявлено, что ковалентное присоединение нитрилгидратазы к активированному хитозану позволяет достичь максимальной скорости реакции, катализируемой свободным ферментом, и дает возможность многократного использования биокатализатора с сохранением активности (рис. 7). Также иммобилизация на хитозане дает возможность ферменту функционировать при более низких значениях рН и расширяет диапазон рН, при котором активность близка к максимальной. Полученный биокатализатор может быть использован в процессах трансформации акрилонитрила в акриламид с достаточной степенью эффективности.

Таким образом, в зависимости от поставленных целей, особенностей гидро-



**Динамика трансформации НАК:**

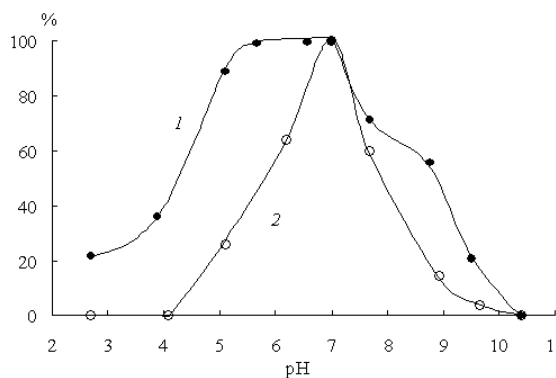
- 1 – фермент на оксидах алюминия;
- 2 – оксид алюминия + слой углерода (КВУ)
- АА – акриламид, НАК – акрилонитрил



**Операционная стабильность**

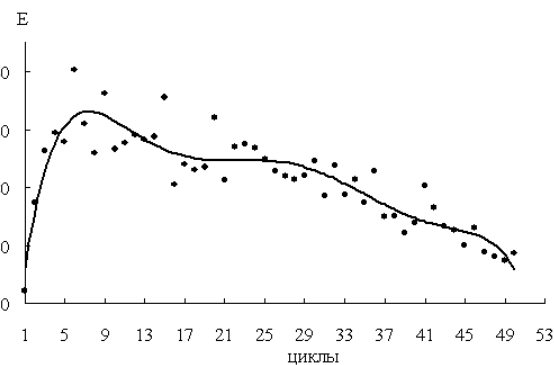
иммобилизованных биокатализаторов

Рис. 6. Трансформация нитрила акриловой кислоты (НАК) нитрилгидратазой, иммобилизованной на оксидах алюминия и углеродсодержащих носителях, полученных на их основе



**рН-зависимость активности нитрилгидратазы :**

- 1 – иммобилизованной на хитозане; 2 – в растворе;
- 100% - максимальная активность фермента



**Операционная стабильность препарата**

нитрилгидратазы, иммобилизованного на хитозане.  
Е – активность, мкмоль/мл/мин

Рис. 7. Каталитические свойства нитрилгидратазы, иммобилизованной на активированном хитозане [4]

литической трансформации и используемых субстратов нами разрабатываются различные направления гетерогенного биокатализа нитрилов и амидов: катализ бактериальными клетками, иммобилизованными из предварительно выращенной до стационарной фазы роста культуры; биопленками нитрил утилизирующих бактерий; изолированными иммобилизованными ферментами метаболизма нитрилов. Несмотря на то, что даже в рамках одного типа изучаемых биокаталитиче-

ских процессов существует немало вопросов, которые требуют решения, переход от гомогенного биокатализа к гетерогенному означает переход от экстенсивных способов проведения биотехнологических процессов к интенсивным.

Электронная сканирующая микроскопия выполнена в Институте катализа им. Г.К. Борескова СО РАН в рамках совместного интеграционного проекта.

### Библиографический список

1. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. – 2004. – Т. 40. – № 11. – С. 1445–1456.
2. Иммобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью / А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова, М.В. Кузнецова, В.Ф. Олонцев, В.А. Демаков // Прикладная биохимия и микробиология. – Т.43. – №2. – 2007. – С. 193–198.
3. Иммобилизованные нерастущие клетки *Rhodococcus ruber* как гетерогенные биокатализаторы для процесса гидратации акрилонитрила в акриламид / Ю.Г. Максимова, Г.А. Коваленко, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков, Т.В. Чуенко, Н.А. Рудина // Катализ в промышленности. – № 1. – 2008. – С. 44–50.
4. Каталитические свойства нитрилгидратазы, иммобилизованной на активированном хитозане / Ю.Г. Максимова, Т.А. Рогожникова, Г.В. Овечкина, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – № 3 (В печати)
5. Каталитические свойства нитрилгидратазы, иммобилизованной на оксидах алюминия и углеродсодержащих адсорбентах / Ю.Г. Максимова, В.А. Демаков, А.Ю. Максимов, Г.В. Овечкина, Г.А. Коваленко // Прикладная биохимия и микробиология. – 2010. – Т. 46. – № 4. – С. 416–421.
6. Оленева М.А., Максимова Ю.Г. Гетерофазное культивирование *Rhodococcus ruber* GT1 как способ получения иммобилизованного биокатализатора гидролиза нитрилов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – № 4/1 (38). – 2011. – С. 200–201.
7. Регуляция биосинтеза ферментов биодegradации нитрилов у *Rhodococcus rhodochrous* M0 / О.Б. Астаурова, Т.Е. Погорелова, О.Р. Фомина, И.Н. Полякова, А.С. Яненко // Биотехнология. – 1991. – № 5. – С. 10–14.
8. Alonso F.O.M., Oestreicher E.G., Antunes O.A.C. Production of enantiomerically pure D-phenylglycine using *Pseudomonas aeruginosa* 10145 as biocatalyst // Brazilian Journal of Chemical Engineering. – 2008. – Vol. 25. – N. 01. – P. 1–8.
9. Anastas P.T., Warner J.C. Green Chemistry: Theory and Practice. New York: Oxford University Press, 1998. – P. 30.
10. Enantioselective hydrolysis of  $\beta$ -hydroxy nitriles using the whole cell biocatalyst *Rhodococcus rhodochrous* ATCC BAA-870 / H.H. Kinfe, V. Chhiba, J. Frederick, M.L. Bode, K. Mathiba, P.A. Steenkamp, D. Brady // J. Mol. Catal. B: Enzym. – 2009. – Vol. 59. – P.231–236.
11. Immobilized yeast cell system for continuous fermentation applications / P.J. Verbelen, D.P. De Schutter, F. Delvaux, K.J. Verstrepen, F.R. Delvaux // Biotechnol. Lett. – 2006. – Vol. 28. – P. 1515–1525.
12. Kobayashi M., Nagasawa T., Yamada H. Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over... // Trends Biotechnol. – 1992. – Vol. 10. – P. 402–408.
13. Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? / B. Rosche, X.Z. Li, B. Hauer, A. Schmid, K. Buehler // Trends Biotechnol. – 2009. – Vol. 27. – N. 11. – P. 636–643.
14. Screening for enantioselective nitrilases: kinetic resolution of racemic mandelonitrile to (R)-(-)-mandelic acid by new bacterial isolates / P. Kaul, A. Banerjee, S. Mayilraj, U.C. Banerjee // Tetrahedron: Assymetry. – 2004. – Vol. 15. – P. 207–211.