

ПОЛИ-N-ВИНИЛАМИДЫ КАК НОСИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

В. А. Кузнецов¹, О. С. Корнеева², А. М. Семенов², О. Ю. Божко¹, А. А. Болгов¹

¹ Воронежский государственный университет,

² Воронежская государственная технологическая академия

Поступила в редакцию 07.09.2009 г.

Аннотация. Осуществлена иммобилизация бактериальных клеток *Erwinia rhapontici*, являющихся продуцентами фермента изомальтулозосинтазы, который катализирует процесс биотрансформации сахарозы в изомальтулозу — изомер сахарозы, в структуру ПВП и ПВК. Установлено, что активность иммобилизованных клеток не снижается по сравнению с нативными, по при этом увеличивается скорость трансформации сахарозы в изомальтулозу, а также увеличивается стабильность иммобилизованных клеток с повышением температуры до 65° С.

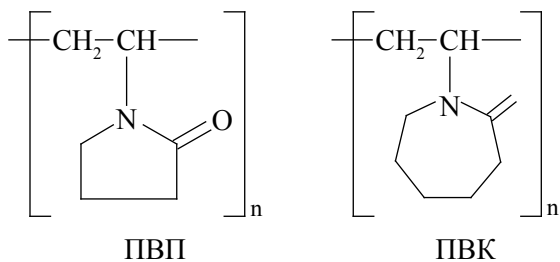
Ключевые слова: Бактерии *Erwinia rhapontici*, поли-N-винилпирролидон, поли-N-винилкапролактан, иммобилизация.

Abstracts. The immobilization of the *Erwinia rhapontici* bacterial cells producents isomaltulosesyntase pherments, which catalised the biotransformation sakharose to isomaltulose proress into structure of the poly-N-vinylpyrrolidone and the poly-N-vinylcaprolactam has been provided.

Keywords: bacteria *Erwinia rhapontici*, poly-N-vinylpyrrolidone, poly-N-vinylcaprolactam, immobilization.

ВВЕДЕНИЕ

Водорастворимые полимеры играют все возрастающую роль в развитии современной медицины, биохимии, фармакологии и других областях жизнедеятельности человека. Среди широкого круга полимеров, относящихся к данному типу, большой интерес представляет поли-N-винилпирролидон (ПВП) и поли-N-винилкапролактан (ПВК) благодаря широкому спектру, проявляемых ими свойств. Среди которых следует выделить их биосовместимость и нетоксичность, способность к комплексообразованию, растворяться в воде и большинстве органических растворителей. Необходимо особо выделить способность ПВК к термоосаждению из водных растворов в физиологическом интервале температур (32—37° С) [1].



Указанные свойства позволяют применять их для иммобилизации ферментов и живых клеток.

© Кузнецов В. А., Корнеева О. С., Семенов А. М., Божко О. Ю., Болгов А. А., 2009

Известно, что использование иммобилизованных клеток в биокаталитических процессах имеет много преимуществ, обеспечивающих высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность применяемых технологий.

В работах [2—4] описано микрокапсулирование ферментов трипсина и химтрипсина в присутствии ПВК, что позволило повысить их термостабильность до 60—70° С. Сделан вывод [4], что повышение термостабильности ферментов, окруженных макромолекулами ПВК, определяется конформационными превращениями полимерной цепи, происходящими при нагревании системы и спецификой гидратного слоя вблизи этих макромолекул.

В данной работе представлены результаты исследования иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici* в структуру ПВП и ПВК. Бактерии *Erwinia rhapontici* являются продуцентами фермента изомальтулозосинтазы, который катализирует процесс биотрансформации сахарозы в изомальтулозу — изомер сахарозы. Изомальтулоза является натуральными сахарозаменителем, который имеет ряд преимуществ перед известными аналогами: не вызывает кариес зубов, имеет низкий гликемический индекс (32 ед), низкую калорийность (2,0 ккал/г), устойчив в кислых растворах, обладает пребиотическим действием [5]. За рубежом изомальтулоза и ее гидрогенизированное производное изомальт широко используются как за-

менитель сахарозы в продуктах диетического и диабетического назначения [6]. В России разработаны концептуальные аспекты биотехнологии изомальтулозы с помощью микроорганизмов бактериального происхождения [7, 8].

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Мономер ВК (Aldrich) с $T_{пл} = 33—34^\circ \text{C}$ был дважды перегнан в вакууме ($T_{кип} = 92—93^\circ \text{C}/1 \text{ мм. рт.ст.}$).

Инициатор 2,2'-азобис(изобутиронитрил) (ДАК) с $T_{пл} = 102—103^\circ \text{C}$ перекристаллизовывали из этанола.

Растворители этанол, изопропанол, бензол, диоксан имели классификацию х.ч.

ПВК получали радикальной полимеризацией при 70°C в растворе изопропанола с концентрацией мономера 3,0 моль/л и содержанием ДАК, равным $3,0 \times 10^{-2}$ моль/л с $M_n = 26,5 \times 10^3$, а с $M_n = 82,0 \times 10^3$ при концентрации мономера 4,5 моль/л и инициатора $1,5 \times 10^{-2}$ моль/л. В растворе бензола с концентрацией мономера 3,0 моль/л и инициатора $1,0 \times 10^{-2}$ моль/л при 40°C получали ПВК с $M_n = 35,0 \times 10^4$. Перед полимеризацией реакционную смесь дегазировали многократным замораживанием жидким азотом. Полимеры из растворов высаживанием с дальнейшим переосаждением гексаном, после чего сушили в вакууме при $55—60^\circ \text{C}$. Значения молекулярных масс M_n рассчитаны с учетом величины характеристической вязкости $[\eta] = 1,5 \times 10^{-4} M_n^{0,68}$ [1].

ПВП использовали производства ОАО «Оргполимерсинтез СПб» (г. Санкт-Петербург).

Объектом для иммобилизации служили факультативно-анаэробные бактерии *Erwinia rhapontici* штамм В-9292 (ВКПМ, г. Москва). Для поддержания и выращивания *E. rhapontici* использовали мясо-пептонный агар. Культивирование бактерий проводили на среде следующего состава (г/дм³): пептон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 10; сахароза — 40. Культуру выращивали в периодических условиях в течение 3 суток при температуре $28—30^\circ \text{C}$ при $\text{pH}_{исх} 7,0 \pm 0,1$.

Клетки осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 15 минут, промывали трис-НСI буфером 0,05 M, pH 6,0. Об активности фермента судили по изменению концентрации изомальтулозы (ИМ), полученной в результате трансформации сахарозы и выражали в Е/см³. Количество изомальтулозы определяли по методу Сомоджи-Нельсона [9]. За единицу активности принимали количество фермента, которое образует 1 мкМ изомальтулозы за 1 минуту.

Для иммобилизации использовали живые клетки бактерий.

В двухгорлую колбу снабженную механической мешалкой помещают 50 мл раствора 0,1 % ПВП в ацетатном буфере и медленно при интенсивном перемешивании и комнатной температуре с помощью перистальтического насоса прибавляют дисперсию клеток в количестве, содержащем 0,05 г клеток. После прибавления всего объема дисперсии клеток смесь выдерживали при интенсивном перемешивании при комнатной температуре в течение трех часов. Полученную дисперсию использовали в процессе трансформации сахарозы в изомальтулозу.

Методика иммобилизации в ПВК аналогично предыдущей. После осуществления процесса, смесь медленно со скоростью $1—2^\circ \text{C}$ нагревали до выпадения осадка. Осадок отделяли фильтрацией.

Динамику биотрансформации сахарозы в изомальтулозу изучали при оптимальных условиях работы фермента — pH 6,0, температура 30°C в течение 3—4 ч.

Для изучения влияния pH на активность изомальтулозосинтазы иммобилизованных клеток *E. rhapontici* трансформацию сахарозы осуществляли в интервале pH 4,0—8,0. Заданное значение pH субстрата поддерживали с помощью ацетатного буфера в зоне pH 4,0—5,0 и фосфатного в зоне pH 6,0—8,0.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе проведены исследования по разработке методов иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici* в структуру ПВП и ПВК. Указанные полимеры характеризуются нетоксичностью и биосовместимостью, что обуславливает их использование в пищевой и медицинской промышленности. Благодаря наличию гидрофобной полимерной цепи макромолекулы и гидрофильных карбонильных групп в структуре данных полимеров возможно физическое связывание бактериальных клеток с полимерной матрицей. Связывание носит кооперативный характер и обусловлен как кулоновским взаимодействием отрицательно заряженной мембраны клетки и положительно заряженными протонами в гидратной оболочке макромолекул полимера, образующейся вокруг карбонильной группы бокового лактамного цикла.

Разработан метод иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici* в структуру ПВП. Данный метод основан на взаимодействии раствора ПВП в ацетатном буфере (pH = 6,0) с водной

дисперсией живых клеток. Процесс осуществляется при комнатной температуре. В раствор полимера с концентрацией 1 мг/мл вводится при интенсивном перемешивании с помощью магнитной или механической мешалки дисперсия живых бактериальных клеток с концентрацией 10 %. В этих условиях смесь выдерживалась в течение различного времени. На рис. 1 представлена зависимость выхода изомальтулозы на иммобилизованных клетках от времени иммобилизации, из которого видно, что оптимальной продолжительностью контакта клеток с ПВП является 3 часа. Кроме этого, изучено влияние температуры проведения процесса иммобилизации (рис. 2) на выход на активность иммобилизованных клеток по данным степени трансформации сахарозы в изомальтулозу. Как видно из рис. 2, оптимальной температурой является 22°С. Исследование активности показало, что в результате иммобилизованные клетки существенно повышают степень трансформации сахарозы в изомальтулозу по сравнению с нативными клетками. Следует отметить, что на активность клеток в результате иммобилизации оказывает существенное воздействие молекулярная масса полимера. Исследования показали, что оптимально иммобилизация протекает с ПВП (молекулярная масса 500000). Однако, полученная дисперсия иммобилизованных клеток не позволяет многократное использование в технологическом процессе, что связано со сложностью их выделения после проведения процесса. Использование центрифугирования приводит к удорожанию процесса.

ПВК является аналогом ПВП. Отличие заключается в том, что боковой заместителем — лактамный цикл — содержит на две метиленовые группы больше по сравнению с ПВП. Это обуславливает смещение гидрофобно-гидрофильного баланса в сторону гидрофобизации, что приводит к проявлению им свойства к термоосаждению из водных растворов в физиологическом интервале температур (32—36°С). Указанное свойство способствует выделению иммобилизованных клеток в виде отдельной фазы при нагревании полученной дисперсии. При этом характер взаимодействия клеток с макромолекулами ПВК аналогичен ПВП. На рис. 3 представлена зависимость мутности раствора ПВК от температуры.

Как видно, температура фазового разделения $T_{ф.р.}$ раствора ПВК в ацетатном буфере ниже, чем для системы ПВК-клетка. Это связано с тем, что агрегирование макромолекул затруднено вследствие присутствия в полимерном клубке клеток и как следствие для смещения гидрофобно-гидро-

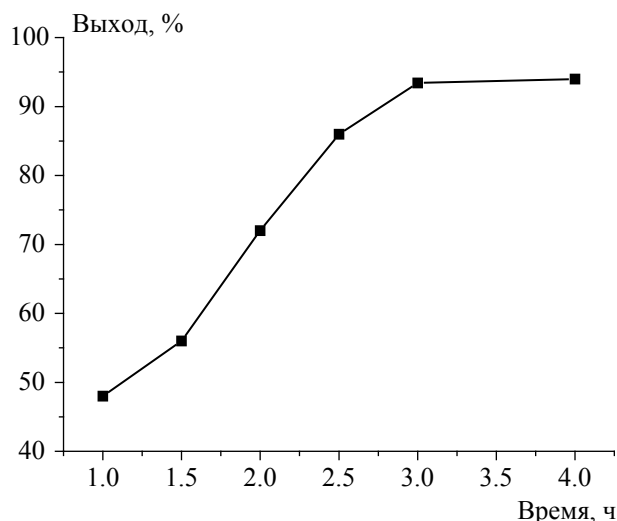


Рис. 1. Зависимость выхода изомальтулозы на иммобилизованных клетках от времени иммобилизации

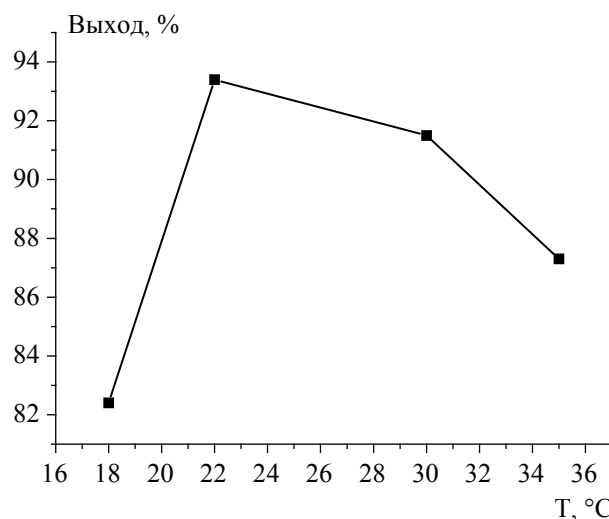


Рис. 2. Зависимость выхода изомальтулозы на иммобилизованных клетках от температуры процесса иммобилизации

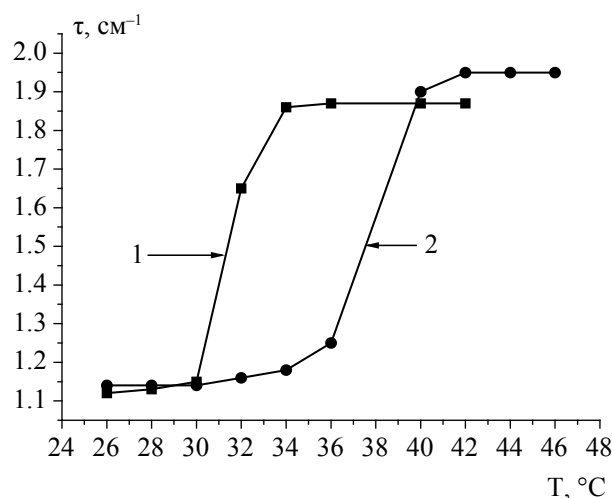


Рис. 3. Зависимость мутности системы от температуры: 1 — раствор ПВК; 2 — дисперсия ПВК-клетка

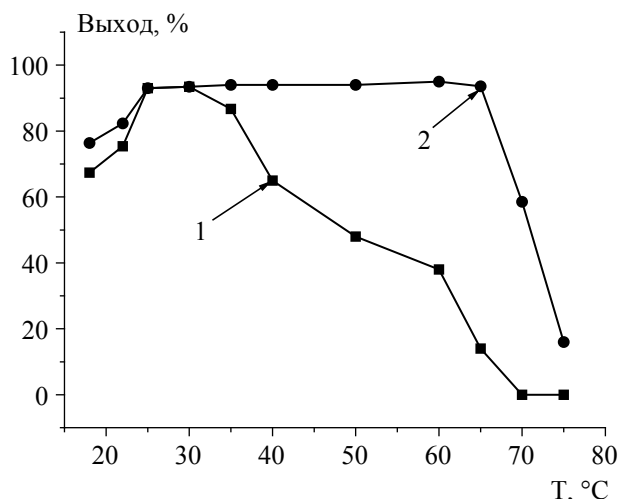


Рис. 4. Зависимость выхода изомальтулозы от температуры нативных клеток (1) и иммобилизованных клеток (2)

фильного баланса в сторону гидрофобизации требуется большая энергия.

В связи с этим, осуществлена иммобилизация бактериальных клеток в структуру ПВК в условиях, аналогичных с ПВП. Отличие заключается в том, что выделение иммобилизованных клеток происходит при нагревании системы до $T_{ф.р.}$, при котором последние претерпевают переход раствор-твердая фаза. Следует отметить, что в случае иммобилизованных клеток в ПВК при уменьшении температуры фазовый переход необратим. Это обстоятельство позволяет организовать полунепрерывный процесс трансформации сахарозы в изомальтулозу.

Кроме того исследована зависимость активности иммобилизованных клеток от pH среды и температуры. Найдено, что при понижении pH среды меньше 5,5 и повышении более 7,0 происходит резкое ее снижение. В интервале 5,5—7,0

активность остается постоянной. Известно, что нативные клетки *Erwinia rhapontici* активны при температуре 30° С. Изучение активности иммобилизованных клеток в зависимости от температуры показало, что их активность сохраняется до 65° С (рис. 4). Указанное обстоятельство позволяет существенно ускорить процесс трансформации сахарозы в изомальтулозу за счет повышения температуры осуществления процесса.

Работа выполнена при поддержке гранта ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007—2012 годы. Госконтракт № 02.513.11340 от 01.06.2009 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kurpi Ю.Э.* Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. М.: Наука, 1998.
2. *Markvicheva E.A., Kuzkina I.F., Pashkin I.I. et al.* // *Biotechnol. Techniques.* 1991. N5. P.223.
3. *Galaev I. Yu., Mattiasson B.* // *Ibid.* 1992. N6. P.353.
4. *Markvicheva E.A., Tkachuk N.E., Kuptsova S.V. et al.* // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1996. V.61. N1/2. P.75.
5. *Cheetham P.S.J.* The extraction and mechanism of a novel isomaltulose-synthesizing enzyme from *Erwinia rhapontici* // *Biochem. J.* 1984. V. 220. P.213.
6. *Li X., Zhao C., An Q., Zhang D.* Substrate induction of isomaltulose synthase in a newly isolated *Klebsiella* sp. LX3 // *Journal of Applied Microbiology.* 2003. V. 95. P.521.
7. *Корнеева О.С., Божко О.Ю., Мангуева З.М.* Физиолого-биохимические свойства бактерий *Erwinia rhapontici* — продуцентов изомальтулозосинтазы // *Прикладная биохимия и микробиология.* — 2008. Т. 44. N.6. С. 626.
8. *Корнеева О.С., Божко О.Ю., Шуваева Г.П.* Биотехнология изомальтулозы — природного заменителя сахара с пребиотическими свойствами // *Биотехнология.* 2008. N2. С. 46.
9. *Somogyi M.J.* Determination of reducing sugar // *J. Biol. Chem.* 1952. V. 195. P. 19.

Кузнецов Вячеслав Алексеевич — доцент кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидов ВГУ; тел.: (4732) 208956

Корнеева Ольга Сергеевна — профессор кафедры биохимии и микробиологии ВГТА; тел.: (4732) 555557

Божко Ольга Юрьевна — ассистент кафедры биохимии и микробиологии ВГТА; тел.: (4732) 555557

Семенов Андрей Михайлович — студент химического факультета ВГУ

Болгов Алексей Александрович — аспирант кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидов ВГУ; тел.: (4732) 208956

Kuznetsov Viacheslav A. — associative professor of the chair of polymer science and colloids VSU; tel.: (4732) 208956

Korneeva Olga S. — professor of the chair of biochemistry and microbiology VGTA; tel.: (4732) 555557

Bozhko Olga Yu. — assistant of the chair of biochemistry and microbiology VGTA; tel.: (4732) 555557

Semenov Andrey M. — student of the chemical department VSU; tel.: (4732) 208956

Bolgov Alexey A. — Phd student of the chair of polymer science and colloids VSU; tel.: (4732) 208956