

УДК 573.6.086.835

ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА ПРОЦЕСС ИММОБИЛИЗАЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК *ERWINIA RHAPONTICI*

Божко О.Ю., Корнеева О.С.

*ГОУ ВПО «Воронежская государственная технологическая академия»,
Воронеж, e-mail: olga_bojko2005@mail.ru*

Разработан метод иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici* – продуцентов фермента изомальтулозосинтазы в структуру поли-N-винилпирролидона. Установлено, что активность иммобилизованных клеток сопоставима со значением таковой нативных клеток. Определены оптимальные параметры процесса иммобилизации.

Ключевые слова: иммобилизация, бактерии *Erwinia rhapontici*, изомальтулоза, изомальтулозосинтаза, поли-N-винилпирролидон

Факультативно-анаэробные бактерии *Erwinia rhapontici* являются продуцентами высокоактивного фермента изомальтулозосинтазы, катализирующего реакцию изомеризации сахарозы в изомальтулозу – природный заменитель сахара [1, 2]. Изомальтулоза отличается рядом преимуществ по сравнению с известными сахарозаменителями, а именно: имеет чистый сладкий вкус, низкую калорийность (2,0 ккал/г), низкий гликемический индекс (32 единицы), некариогенна, обладает пребиотическим действием, устойчива к изменениям температуры и pH. За рубежом изомальтулоза широко применяется в пищевой и фармацевтической промышленности как заменитель сахарозы. В России разработаны концептуальные аспекты биотехнологии изомальтулозы с помощью фермента бактериального происхождения [3, 4].

С целью разработки конкурентоспособной технологии натурального сахарозаменителя целесообразным является исследование процесса иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici*. Известно, что использование иммобилизованных клеток в биокаталитических системах имеет много преимуществ, которые обеспечивают высокую экономичность и эффективность применяемых технологий. Так, разработка метода иммобилизации клеток с целью получения изомальтулозы позволит интенсифицировать процесс трансформации сахарозы, использовать фермент многократно, увеличить его исходную активность, увеличить выход изомальтулозы, а также снизить энергетические затраты процесса.

В настоящей работе представлены результаты исследования условий иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici*

в структуру поли-N-винилпирролидона. Интерес к данному полимеру вызван тем, что поли-N-винилпирролидон способен осаждаться из водных растворов в физиологическом интервале температур (32-37°C). Также следует отметить его биосовместимость, нетоксичность, способность растворяться в воде и большинстве органических растворителей, способность к комплексообразованию. Указанные свойства позволяют применять поли-N-винилпирролидон для иммобилизации ферментов и живых клеток.

Цель исследования – изучение процесса иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapsodica* – продуцентов фермента изомальтулозосинтазы в структуру поли-N-винилпирролидона.

Материал и методы исследования

Объектом для иммобилизации служили факультативно-анаэробные бактерии *Erwinia rhapsodica* штамм В-9292 (ВКПМ, г. Москва). Для поддержания и выращивания *E. rhapsodica* 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°C при рН_{исх} 7,0±0,1. Клетки осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 15 минут, промывали трис-HCl буфером 0,05 M, рН 6,0. Об активности фермента судили по изменению концентрации изомальтуло-

зы, полученной в результате трансформации сахарозы, и выражали в ед/см³. Количество изомальтулозы определяли по методу Сомоджи-Нельсона [5]. За единицу активности принимали количество фермента, которое образует 1 мкМ изомальтулозы за 1 минуту. Для иммобилизации использовали живые клетки бактерий. Процесс иммобилизации проводили следующим образом: в двухгорлую колбу, снабженную механической мешалкой, помещали 50 см³ раствора поли-N-винилпирролидона (0,5 %) в ацетатном буфере и медленно при интенсивном перемешивании и комнатной температуре с помощью перистальтического насоса прибавляли дисперсию бактериальных клеток в количестве 0,05 г. После этого смесь выдерживали при интенсивном перемешивании в течение 3 ч при комнатной температуре. Полученную дисперсию использовали в процессе трансформации сахарозы в изомальтулозу.

Динамику биотрансформации сахарозы изучали при оптимальных условиях для работы фермента изомальтулозосинтазы – рН 6,0, температура 30°C в течение 3-4 ч.

Для изучения влияния рН и температуры на активность изомальтулозосинтазы иммобилизованных клеток трансформацию сахарозы осуществляли в интервале рН 4,0-8,0 и температуры 20-40°C соответственно. Заданное значение рН субстрата поддерживали с помощью ацетатного буфера в зоне рН 4,0-5,0 и фосфатного в зоне рН 6,0-8,0.

Поли-N-винилпирролидон использовали производства ОАО «Оргполимерсинтез СПб» (г. Санкт-Петербург). Для проведения иммобилизации клеток были синтезированы полимеры N-винилпирролидона с различной молекулярной массой (500-3000 кДа). Оценку эффективности процесса иммобилизации бактериальных клеток проводили с использованием метода ИК-спектроскопии.

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований разработан метод иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia chrysanthi* в структуру поли-N-винилпирролидона.

Метод основан на взаимодействии раствора полимера в ацетатном буфере (pH 6,0) с водной дисперсией живых клеток.

Из литературных данных следует, что иммобилизацию живых клеток и ферментов на полимерные носители следует проводить при низких концентрациях полимера [6]. Использование концентрированных растворов приводит к блокированию активных центров ферментов и, следовательно, к утрате их активности. Нами проводилось исследование процесса иммобилизации бактериальных клеток в полимерный носитель при концентрациях последнего в области 0,025-0,35 мас. %.

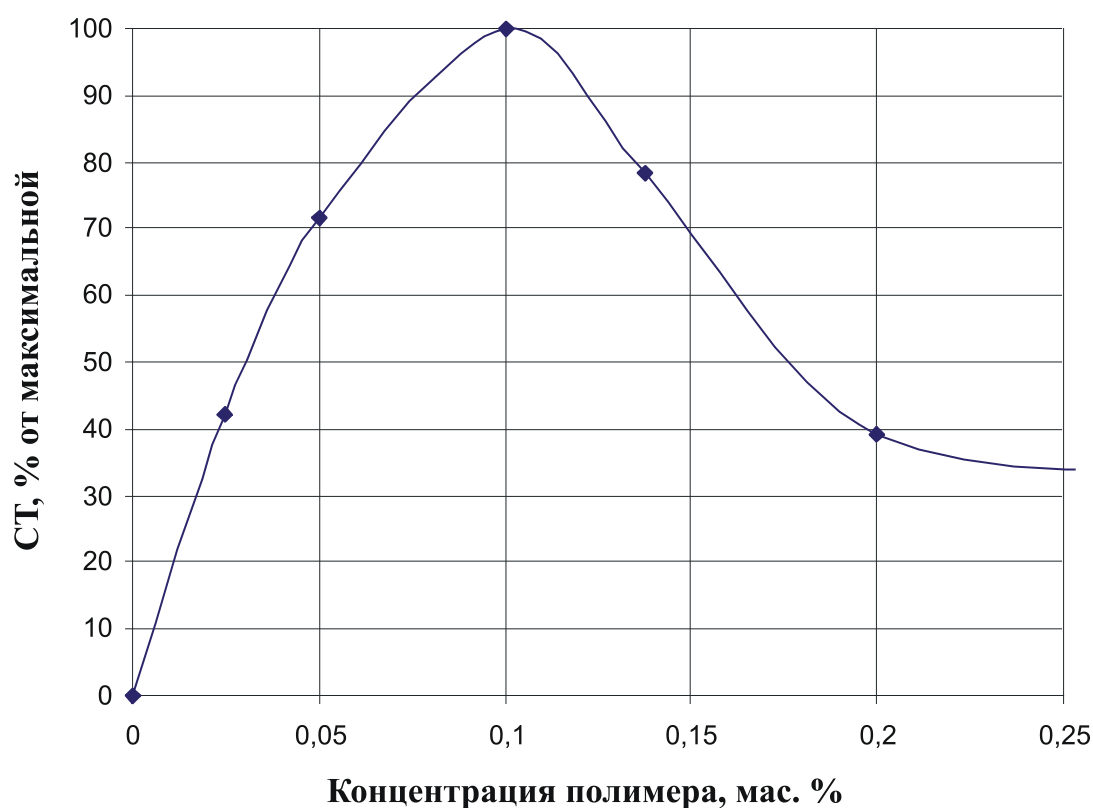


Рис. 1. Эффективность процесса иммобилизации бактериальных клеток в зависимости от концентрации полимера. СТ – степень трансформации сахарозы

Как видно из рис. 1, увеличение концентрации полимера приводило к заметному снижению активности иммобилизованных клеток. Оптимальной концентрацией является 0,1 мас.%. При этой концентрации полимерные клубки находятся в индивидуальном состоянии, что способствует лучшему их взаимодействию с бактериальными клетками. В случае исследования более концентрированных растворов полимера последние находятся в виде агрегатов клубков, и клетка помещается в агрегат. Это приводит к снижению активности фермента изомальтулозосинтазы. Концентрация кле-

ток по отношению к концентрации полимера составляла 1:1 по массе.

С целью определения продолжительности процесса иммобилизации клеток смесь выдерживали в течение 4-5 ч и контролировали активность фермента изомальтулозосинтазы через определенные промежутки времени. Установлено, что максимальный выход изомальтулозы (92-95%) наблюдался при условии продолжительности контакта бактериальных клеток с носителем в течение 3 ч. Кроме этого, изучено влияние температуры и pH на процесс иммобилизации (рис. 2 а, б).

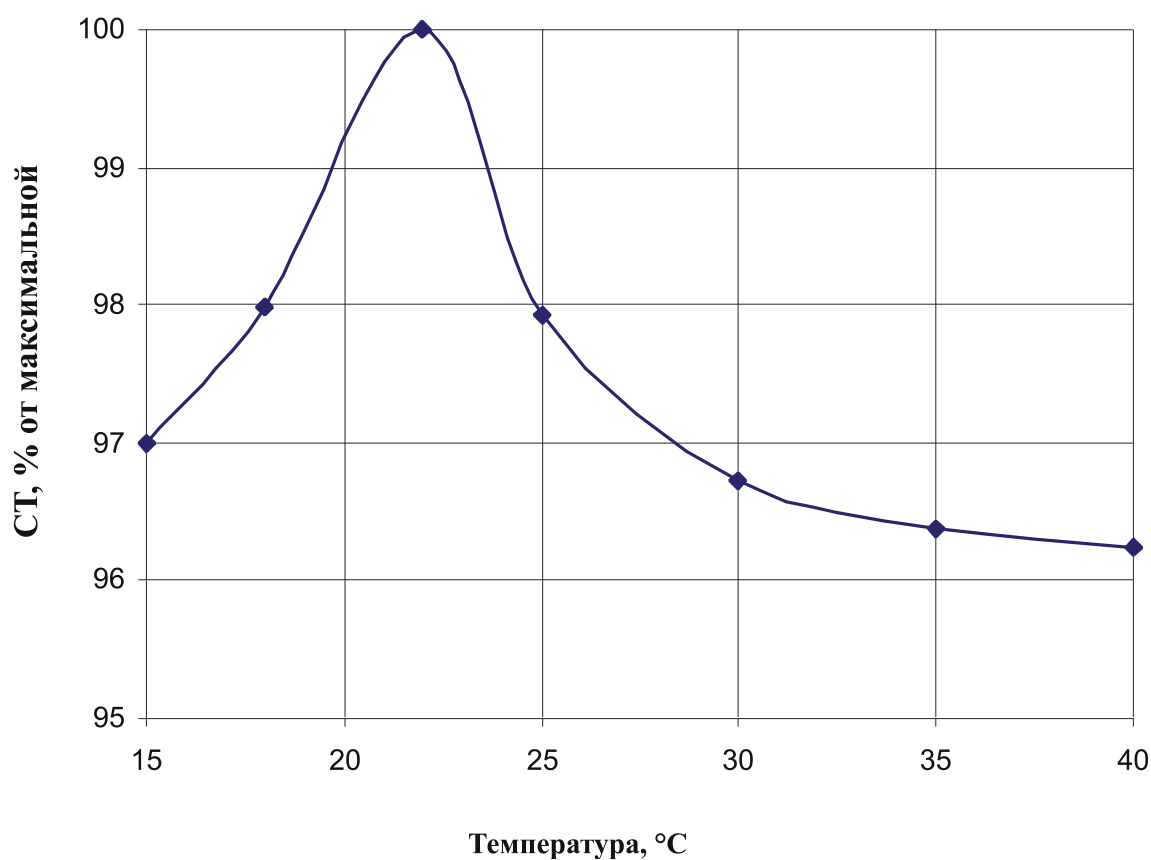


Рис. 2 а. Зависимость эффективности процесса иммобилизации от температуры

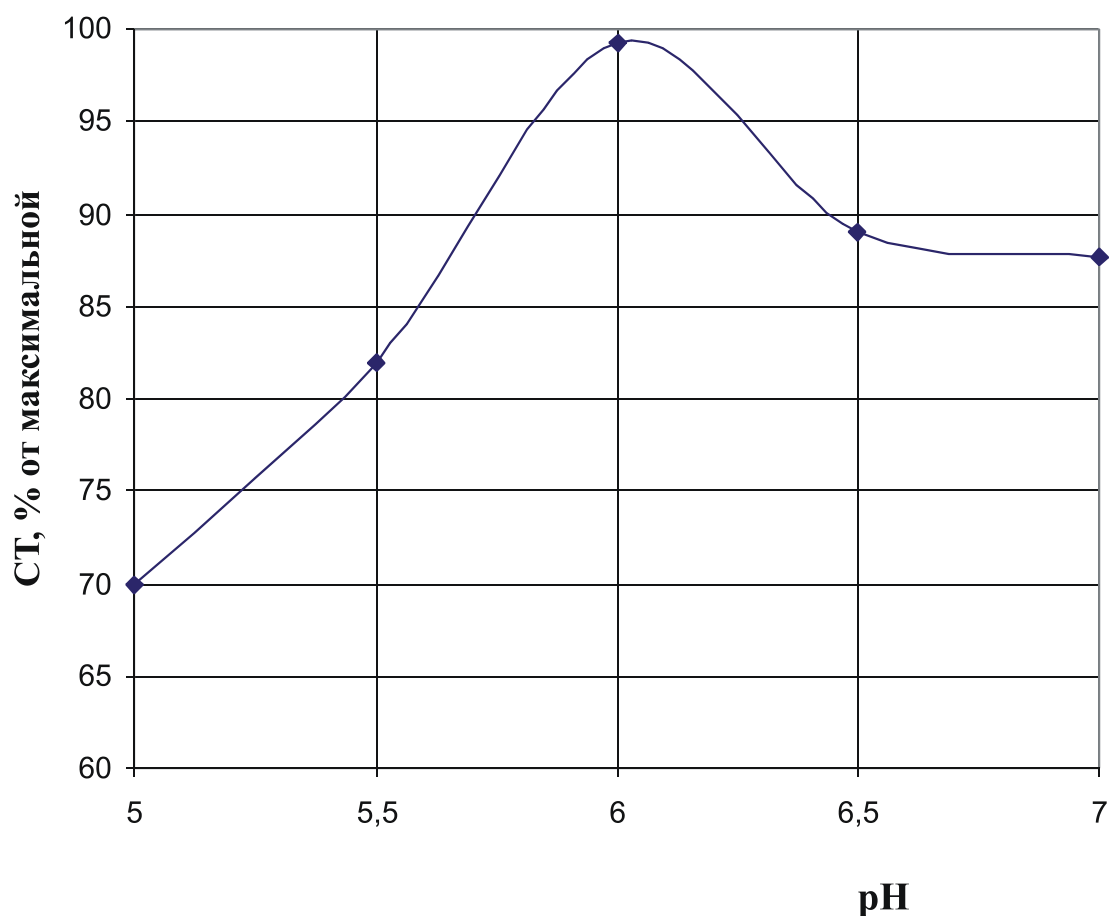


Рис. 2 б. Влияние кислотности среды на процесс иммобилизации бактериальных клеток

Как видно из рисунков, оптимальными условиями являются температура 22°C и pH 6,0 соответственно. Исследование активности фермента показало, что при данных значениях температуры и pH выход изомальтулозы был максимальным.

Следующим этапом работы явилось изучение влияния молекулярной массы поли-N-винилпирролидона на процесс иммобилизации бактериальных клеток. Ис-

следования показали, что оптимально иммобилизация протекает при молекулярном весе полимера 500 кДа (рис. 3). Предположительно, именно при данном значении молекулярной массы поли-N-винилпирролидона происходит взаимодействие отрицательно заряженной мембраны клетки и положительно заряженных протонов в гидратной оболочке макромолекулы полимера.

СТ, %

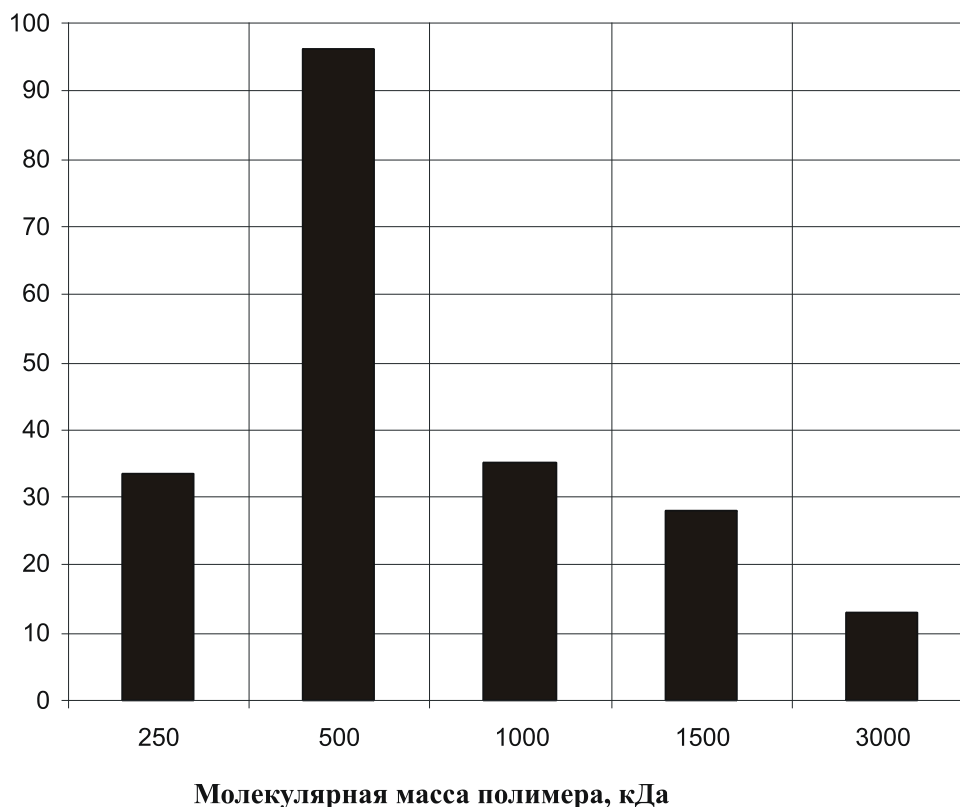


Рис. 3. Влияние молекулярной массы поли-*N*-винилпирролидона на процесс

биотрансформации. СТ – степень трансформации сахарозы

Выводы и заключение

В результате проведенных исследований изучено влияние физико-химических параметров на процесс иммобилизации бактериальных клеток *Erwinia rhapontici* с целью получения природного сахарозаменителя. Установлено, что выход изомальтулозы достигает максимального значения при концентрации полимера 1 мг/см³, молекулярном весе 500 кДа, температуре 22 °С, рН 6,0, продолжительности 3,0 ч.

Полученные данные в дальнейшем будут положены в основу биотехнологии изомальтулозы в промышленных масштабах.

Работа выполнялась в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, государственный контракт № П1333 от 11.06.2010 г.

Список литературы

1. Kawaguti H.Y. Application of response surface methodology for glucosyltransferase production and conversion of sucrose into isomaltulose using free *Erwinia* sp. cells / H.Y. Kawaguti, E. Manrich, H.H. Sato // Electronic J. Biotechnology. – 2006. – V. 9, №5. – P. 482-493.
2. *Klebsiella singaporensis* sp. a novel isomaltulose-producing bacterium / X. Li [et al.] //

Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – V. 54. – P. 2131-2136.

3. Корнеева О.С. Биотехнология изомальтулозы – природного заменителя сахара с пребиотическими свойствами / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, Г.П. Шуваева // Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 46-50.

4. Корнеева О.С. Физиолого-биохимические свойства бактерий *Erwinia rhapontici* – продуцентов изомальтулозосинтазы / О.С. Корнеева, О.Ю. Божко, З.М. Мангуева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 6. – С. 626-631.

5. Somogyi M.J. Determination of reducing sugar // J. Biol. Chem. – 1952. – V. 195. – P. 19-23.

6. Кирш Э.Ю. Поли-N-винилпирролидон и другие поли-N-виниламиды. Синтез и физико-химические свойства. – М.: Наука, 1998. – 252 с.

Рецензенты:

Грабович Маргарита Юрьевна, д.б.н., доцент, профессор кафедры биохимии и физиологии клетки ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет» Минобразования и науки РФ;

Полянский Константин Константинович, д.т.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры технологии производства и переработки продукции животноводства ФГОУ ВПО «Воронежский аграрный университет имени К.Д. Глинки» Минсельхоза РФ.

INFLUENCE OF PHYSICAL AND CHEMICAL PARAMETERS ON PROCESS OF THE IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CELLS *ERWINIA RHAPONTICI*

Bozhko O.U., Korneyeva O.S.

*Voronezh State Technological Academy, Voronezh,
e-mail: olga_bojko2005@mail.ru*

The immobilization of the *Erwinia rhapontici* bacterial cells producents isomaltulosesyntase pherments, which catalised the biotransformation sucrose to isomaltulose process into structure of the poly-N-vinylpyrrolidone. It is established that activity of immobilizational cells is comparable to value that native cells. Optimum conditions of immobilization was determine.

Keywords: immobilization, bacteria *Erwinia rhapontici* isomaltulose, isomaltulosesynthase, poly-N-vinylpyrrolidone