

ՀՀ ԳԱԱ «ՀԱՅԿԵՆՍԱՏԵԽՆՈԼՈԳԻԱ» ԳԱԿ ՊՈԱԿ

Դարբինյան Կարեն Ավագի

ԳԼԻՕՔՍԱԼԻ ԿԵՆՍԱԿԱՏԱԼԻՏԻԿ ՍՏԱՑՈՒՄԸ
ԷԹԻԼԵՆԳԼԻԿՈԼԻՑ

Գ.00.14 - «Կենսատեխնոլոգիա»
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական
աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան - 2014

НПЦ «АРМБИОТЕХНОЛОГИЯ» НАН РА ГНКО

Дарбинян Карен Авагович

БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЕ ПОЛУЧЕНИЕ ГЛИОКСАЛЯ
ИЗ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.14 - «Биотехнология»

Ереван – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում:

Գիտական ղեկավար՝

ՀՀ ԳԱԱ ակադեմիկոս, կ. գ. դ.,
պրոֆեսոր Է.Գ. Աֆրիկյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ, կ. գ. դ.,
պրոֆեսոր Ժ.Ի. Հակոբյան

կ. գ. թ. Լ.Ս. Մարկոսյան

Առաջատար կազմակերպություն՝

Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2014թ. հոկտեմբերի 17 -ին, ժամը 15:00 -ին ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ-ում գործող ՀՀ ԲՈՆՀ-ի Կենսատեխնոլոգիայի 018 մասնագիտական խորհրդի նիստում:

Հասցե՝ 0056, ՀՀ, ք. Երևան, Գյուրջյան փողոց, 14, հեռ/ֆաքս (374 10) 65 41 80:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ «Հայկենսատեխնոլոգիա» ԳԱԿ գրադարանում:

Սեղմագիրն առաքված է 2014թ. սեպտեմբերի 17 - ին:

Մասնագիտական խորհրդի

գիտական քարտուղար, կ. գ. թ.

Գ.Ե. Ավետիսովա

Тема диссертации утверждена в НИЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Научный руководитель:

академик НАН РА, д. б. н.,
профессор Э.Г. Африкян

Официальные оппоненты:

член- корр. НАН РА, д. б. н.,
профессор Ж.И. Акопян

к. б. н. Л. С. Маркосян

Ведущая организация:

Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 17 октября 2014г. в 15:00 часов на заседании специализированного совета 018 Биотехнологии ВАК РА при НИЦ “Армбиотехнология” НАН РА

Адрес: 0056, РА, г. Ереван, ул. Гюрджяна 14, тел/ факс (374 10) 65 41 80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИЦ “Армбиотехнология” НАН РА.

Автореферат разослан 17 сентября 2014г.

Ученый секретарь специализированного
совета, к. б. н.

Г.Е. Аветисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Тема диссертационной работы относится к важным направлениям и современным методам получения глиоксаля из этиленгликоля.

Глиоксаль применяется как исходное вещество для получения различных полифункциональных соединений, ионообменных смол, сшивающих агентов и смолистых соединений, широко применяемых в текстильной и других отраслях промышленности. Глиоксаль обладает выраженным бактерицидным действием и употребляется как противомикробный препарат совместно с формальдегидом и глутаральдегидом, особенно в пищевой промышленности (Choi et al., 1998, 1999; Maquie, 2001; Choi et al., 2002; Xu et al., 2002; Liu et al., 2012). Годовой объем производства глиоксаля в мире составляет более 1,5 млн. тонн и среди альдегидов уступает только производству формальдегида (OECD, 2012).

Современные промышленные методы получения глиоксаля включают окисление ацетальдегида азотной кислотой, каталитическую дегидрогенацию этиленгликоля при 300 °С с применением Pt, Cu, Mo и других металлов в качестве катализаторов. Окисление уксусного альдегида азотной кислотой – это периодический процесс, который требует громоздкого аппаратного оформления и протекает с выделением большого количества токсичного N₂O (Chumbhale, Awasarkar, 2001). Химические методы получения глиоксаля связаны с большими энергозатратами, использованием дорогостоящего оборудования и катализаторов. При этом отмечается сравнительно низкий выход целевого продукта, обусловленный образованием посторонних продуктов. Дальнейшая очистка глиоксаля делает процесс трудоемким и дорогостоящим (Isobe, 1995).

При биокаталитических методах получения глиоксаля и глиоксиловой кислоты используются те же исходные продукты, что и в химических методах, однако при этом технологические процессы осуществляются при более умеренных (мягких) условиях, не связанных с большими энергозатратами, обеспечивая относительно высокий выход конечных продуктов, без каких-либо примесей (Drauz et al, 2012).

Несмотря на то, что имеется много сообщений об использовании бактерий, которые в состоянии метаболизировать этиленгликоль, однако метаболический путь исследован только у небольшого числа микробов. (Mückschel et al., 2012). Установлено, что глицеролоксидаза, выделенная из штамма *Aspergillus japonicus* (AT008), осуществляет окисление этиленгликоля в глиоксаль, и гликолевой кислоты в глиоксиловую. Дальнейшее изучение этих процессов подтвердило приемлемость данного фермента для получения глиоксаля и глиоксиловой кислоты. Глицеролоксидаза не требует экзогенного кофактора, а катализируемая ею оксидазная реакция необратима, что избавляет от многих проблем, связанных с гидрогеназными ферментами, нуждающимся в кофакторах (Isobe, 1995).

Вместе с тем в литературе нет публикаций по вопросам систематической приуроченности глицеролоксидазной активности у разных групп и видов микроорганизмов, видовой специфичности этой активности, эффективных методов скрининга и разработки способов широкого внедрения в производство. Есть разработки биокаталитических методов получения глиоксаля из этиленгликоля с применением глицеролоксидазы и каталазы, а также их иммобилизованных форм, однако данные разработки неконкурентоспособны по сравнению с существующими химическими методами.

Цель и задачи работы. Основной целью настоящей работы являлась разработка метода микробного катализа для получения глиоксаля из этиленгликоля в проточных условиях и разработки путей интенсификации этого процесса.

Для осуществления указанной цели выдвинуты следующие задачи:

- провести скрининг и охарактеризовать штаммы разных родов и видов бактерий и грибов Национальной Коллекции Культур микроорганизмов Армении, для выявления культур, обладающих высокой активностью глицеролоксидазы;
- выявить, охарактеризовать и идентифицировать штаммы активных продуцентов глицеролоксидазы на основе комплекса культурально-морфологических и физиолого-биохимических особенностей;
- изучить и охарактеризовать условия биосинтеза глицеролоксидазы и оптимальные условия трансформации этиленгликоля в глиоксаль;
- изучить условия биотрансформации этиленгликоля в глиоксаль в проточных условиях;
- разработать биокаталитическую систему получения глиоксаля из этиленгликоля, превосходящую по своим показателям существующие биокаталитические методы его производства.

Связь работы с научными планами и темами. Работа выполнена в плане проведения научно-исследовательской, целевой темы 04.10.02, Республиканского Центра Депонирования Микробов НАН РА “Разработка перспективных методов биокатализа для получения глиоксаля, глиоксиловой кислоты и других соединений с созданием опытно-промышленной установки” в период 2005-2007гг., а также в рамках выполнения проекта ANSEF “Continuous Processing of Glyoxal from Ethylene Glycol by Microbial Catalysis” в период 2011-2012гг. Тема в 2011г. удостоилась премии Армянского Национального фонда науки и образования “ANSEF, USA” под шифром “Microbio 2575”.

Научная новизна работы. Впервые проведены целенаправленные исследования распространения глицеролоксидазной активности у разных видов бактерий, грибов в Центре депонирования микробов НАН РА и охарактеризованы наиболее активные виды продуцентов глицеролоксидазы.

Установлены и подробно охарактеризованы штаммы различных родов и видов грибов с высокой глицеролоксидазной активностью.

Показано, что грибы выделенные из биоповрежденных синтетических полимерных материалов космической техники, обладают высокой ферментативной активностью и продуцированием глицеролоксидазы, и их перспективность для биокаталитического получения глиоксаля из этиленгликоля.

Установлена перспективность применения мицелиальных гранул грибов по сравнению с системами нативных и иммобилизованных ферментов для биокаталитического получения глиоксаля из этиленгликоля.

Предложен проточный биокаталитический метод биотрансформации этиленгликоля в глиоксаль с применением мицелиальных гранул грибов, превосходящий существующие биокаталитические методы получения.

Практическая ценность. Практическое значение работы обусловлено перспективами применения культур с глицеролоксидазной активностью для биокаталитического получения глиоксаля из этиленгликоля и для других целей.

Активные продуценты глицеролоксидазы – культуры *Aspergillus versicolor* MDC 12117, *Penicillium aurantiogriseum* MDC 12132, *Aspergillus fumigatus* MDC 12036, *Penicillium melinii* MDC 12046 - могут быть рекомендованы биотехнологической промышленности как ценные продуценты глицеролоксидазы для получения глиоксаля из этиленгликоля.

Выявлен продуцент глицеролоксидазы - штамм *Aspergillus versicolor* MDC 12117 с активностью глицеролоксидазы 0,021 ЕД на мг белка биомассы, который

почти в два раза превосходит по своей активности штамм *Aspergillus japonicus*, описанный в литературе как наиболее активный.

Предложен метод биокаталитического получения глиоксаля в проточных условиях с применением мицелиальных гранул штаммов *A. versicolor* MDC 12117, *P. aurantiogriseum* MDC 12132, превосходящий известные биокаталитические методы его получения, протекающий при более высоких концентрациях этиленгликоля, при этом обеспечивая высокий выход (99,3-99,5 %) и чистоту (99,7 %) целевого продукта.

Предлагаемый метод биотрансформации может служить основой для разработки целенаправленного биокаталитического метода получения глиоксаля из этиленгликоля в проточных условиях.

Личный вклад соискателя. Собственный вклад автора заключается в проведении экспериментальных и теоретических исследований, анализ и обобщение литературы по разрабатываемым вопросам, обобщение результатов исследований и оформление диссертации. Постановка основных задач и разработка методологий прорабатывались под руководством Э. Г. Африкяна. Экспериментальная проработка всех вопросов осуществлена лично автором. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы. Основные результаты и положения работы были обсуждены на заседаниях Ученого совета НП Центра “Армбиотехнология” НАН РА (2010-2013), на Международной конференции “3rd International Symposium on Problems of biochemistry, molecular, nuclear, space biology and genetics” (Москва, апрель 2007), на Международной конференции “5th International Congress on Biocatalysis” (Гамбург, сентябрь 2010), на Международной конференции “5th International Young Scientists Biology Conference, From a molecule up to the biosphere ” (Харьков, ноябрь 2010), на Международной конференции “All-Russian School/Conference of Young Scientists with International Participation «Current issues in microbiology, immunology and biotechnology” (Пермь, ноябрь 2011), на Научном семинаре “Modern state of biotechnological developments and ways of commercialization” (Ереван, сентябрь 2012), на Международной конференции “Perspectives for development of molecular and cellular biology3” (Ереван, сентябрь 2012), на Международной конференции “Contribution the young generation in the development of biotechnology” (Ереван, октябрь 2013).

Публикации. Основные результаты исследований представлены 8 опубликованными научными работами.

Место выполнения работы. Работа выполнена на базе Республиканского Центра Депонирования Микробов НАН РА (2006-2012), а с 2012 – в НП Центре “Армбиотехнология” НАН РА и в Национальном Институте Метрологии Армении.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, включающей 5 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы, включающего 197 ссылок и 2 приложения.

Общий объём диссертации 128 страниц, включая 9 таблиц и 31 рисунок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Литературный обзор

Литературный обзор, состоящий из 6 частей, посвящен нынешнему состоянию и перспективам развития микробиологической трансформации и катализа. В частности, в первых пяти частях описываются методы получения, перспективы и применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов, а также применение экстремофильных форм микроорганизмов и их преимущества. Последняя часть обзора посвящена некоторым химическим методам и основным достижениям в области биокаталитического получения глиоксаля из этиленгликоля.

ГЛАВА 2. Материал и методы исследований

Реактивы, используемые для приготовления минеральных сред, были аналитической чистоты (РФ). В работе использовали коммерческие ферментативные препараты и биохимические реактивы фирм “Roche”, “R-Biopharm”, “Merck” (Германия), “P-L Biochemicals”, “Amersham”, “Sekisui Enzymes” (США), хроматографические и аналитические стандартные материалы были получены от фирм “Sigma-Aldrich”, “PerkinElmer”, “AmChemteq Inc.” (США).

Культуры микроорганизмов и изученные субстраты. Объектами исследований являлись культуры микроорганизмов аэробных бактерий рода *Pseudomonas* (28 штаммов), аэробных спорообразующих бактерий *B. subtilis* (25 штаммов), *Bacillus coagulans* (24 штамма), *B. circulans* (20 штаммов), *B. alcalophilus* (18 штаммов), *B. stearothermophilus* (20 штаммов) и 200 культур разных родов и видов микромицетов, депонированных в Центре Депонирования Микробов НАН РА. В качестве приоритетных культур для выявления глицеролоксидазной активности были выбраны экстремофильные формы (термофилы, психрофилы, алкалофилы) и другие виды бактерий и культуры микромицетов, выделенных из биоповрежденных синтетических полимерных материалов орбитального комплекса “МИР” и Международной космической станции “МКС”.

В связи с большим объемом фактического материала в данной работе обобщаются результаты исследований по культурам грибных биодеградантов, проявляющих более высокую приуроченность к глицеролоксидазной активности.

Питательные среды. В наших исследованиях использовали различные среды для изучения культурально-морфологических, физиолого-биохимических особенностей и образования мицелиальных гранул культур микромицетов.

Среда Ср-1 - среда Чапека-Докса, Ср-2 - модифицированная среда Ср-1 с добавлением 0,01 г/л сульфата меди и в качестве единственного источника углерода этиленгликоль 20 г/л, Ср-3 - среда Ср-2 с глицерином в качестве единственного источника углерода 20 г/л, Ср-4 – среда Ср-2 с содержанием 0,02 г/л твин 80, Ср-5- среда Ср-3 с содержанием 0,02 г/л твин 80, Ср-6 – среда Ср-2 с добавлением 0,2 г/л сахарозы.

Культуральные признаки. Культурально-морфологические особенности грибов изучали в основном на агаризованных средах Ср-1 и Ср-2, в динамике роста микромицетов прямой микроскопией живых препаратов.

Отношение культур к температуре определяли по росту в средах Ср-1(без добавления агар-агара) и Ср-2 в диапазоне температур от 15 – 65 °С с интервалом 5° на температурно-градиентном инкубаторе с перемешиванием (Temperature gradient incubator, Toyo Kagaku Sangyo Co LTD., Japan).

Отношение культур к реакции среды определяли в динамике роста культур в средах Ср-1, Ср-2 с рН в пределах 3,0-9,0.

Образование мицелиальных гранул проводили в 250 мл колбах с применением питательных сред Ср-4, Ср-5, толщина слоя 4 см на ротационных качалках при условиях непрерывного перемешивания (50-150 об/мин), в течение 168 ч при оптимальных температурных условиях роста для каждой культуры.

Определение каталазной активности (количественное) проводили спектрофотометрически по методу (Аеву, 1984), основанному на определении скорости разложения перекиси водорода. Активность каталазы определяли по изменению оптического поглощения при длине волны 240 нм ежесекундно в течение 100с. За единицу активности принимали количество фермента, способного к разложению 1кмоль перекиси водорода/мин при заданных условиях.

Супероксиддисмутазную активность (СОД) определяли по способности фермента ингибировать фотохимическое восстановление нитросинего тетразолия (НСТ), согласно методу (Giannopolitis, Ries, 1977). За единицу активности СОД принимали количество фермента, способного подавить реакцию восстановления нитросинего тетразолия на 50% за 1 минуту.

Дегидрогеназную активность (с этиленгликолем в качестве субстрата) определяли спектрофотометрически по методу (Payne, Gunsalus, 1966). За единицу активности принимали количество фермента, приводящего к уменьшению абсорбции на 0,01 ч⁻¹ при 455 нм, что эквивалентно окислению 0,10 мкмоль этиленгликоля.

Алькогольоксидазную активность определяли согласно методу, основанному на окислении метанола алкогольоксидазой и определением образовавшейся перекиси водорода с применением 2,2'-азино-бис-3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты (ABTS) и спектрофотометрическом определении при длине волны 420 нм (Jassen, Ruelius, 1968; Keeseey, 1987).

Гликолатоксидазную активность определяли спектрофотометрически согласно (Furuya, Hayashi, 1963). За единицу активности принимали количество фермента, приводящего к снижению интенсивности поглощения при 620 нм на 0,1 за 1 минуту, что эквивалентно окислению 10 мкмоль гликолата натрия.

Определение глицеролоксидазной активности основано на измерении перекиси водорода образовавшегося в процессе окисления этиленгликоля. Метод основан на реакции перекиси водорода с 4-аминоантипирином и фенолом в присутствии пероксидазы с образованием красителя хинонимина. Количество образовавшегося хинонимина определяли спектрофотометрически при 500 нм (Uwajima, Terada, 1980). За единицу активности принимали количество фермента, способного к образованию 1 мкмоль перекиси водорода/мин при заданных условиях.

Определения глиоксаля проводили методом ВЭЖХ по (Takeda et al., 2006). Метод основан на получении производного глиоксаля с применением 2,4-динитрофенилгидразина и спектрофотометрическом определении при длине волны 360 нм.

Зависимость глицеролоксидазной активности гранул микромицетов от температуры определяли в диапазоне температур 25 - 60 °С с интервалом 5° в температурно-градиентном инкубаторе с перемешиванием.

Термостабильность глицеролоксидазы мицелиальных гранул микромицетов определяли на температурно-градиентном инкубаторе с перемешиванием в диапазоне температур от 55 – 70 °С с интервалом 2° в течение 1ч. После определяли глицеролоксидазную активность гранул микромицетов.

Зависимость глицеролоксидазной активности гранул от реакции среды определяли в пределах 3,0 - 10,0 с шагом 0,5 при оптимальных температурных условиях реакции. К 2,0 г мицелиальным гранулам микромицетов в 20 мл пробирках добавляли 5 мл фосфатного буфера (рН 4,0 - 8,0 с шагом 0,5) или боратного буфера (рН 9,0-11,0 с шагом 0,5), 1 мл 20 мМ водного раствора этиленгликоля. Реакцию проводили

3 ч. Через каждые 30 мин отбирали пробы для количественного определения глиоксала и сопутствующих продуктов реакции по методу ВЭЖХ. Также, исследовали глицеролоксидазу, выделенную и очищенную из штаммов грибов биодеградантов.

Кислородную потребность биокаталитической системы оценивали методом определения конечных продуктов реакции по методу ВЭЖХ. К реакционной смеси в 250 мл колбах, содержащей 100 мл 100 мМ этиленгликоля в фосфатном буфере (0,1М, рН 8,5) добавляли 10 г мицелиальных гранул микромицетов. Пробирки перемешивали в течение 30 мин на температурно-градиентном инкубаторе, при оптимальных температурных условиях с подачей стерильного воздуха 50-250 мл/мин, шагом 25 мл/мин. На 5, 15, 30 минут отбирали пробы для определения продуктов реакции методом ВЭЖХ.

Выявление оптимального количества мицелиальных гранул для биокаталитической системы устанавливали экспериментально. Для этого в 250 мл колбах взвешивали 1, 2,5, 5,0, 6,0, 11,0г мицелиальных гранул микромицетов, добавляли 10,0 мл фосфатного буфера (0,1 М, рН 8,5), 10,0 мл 0,1 М водного раствора этиленгликоля. Реакцию проводили в течение 2 ч в условиях перемешивания 150 об/мин, при оптимальных условиях реакции. Через каждые 30 мин забирали образцы для количественного определения продуктов реакции методом ВЭЖХ.

Зависимость биокаталитической активности мицелиальных гранул микромицетов от концентрации гликольальдегида проводили количественным определением образовавшегося глиоксала в разных промежутках реакции. На реакционную смесь, содержащую 1,0 г мицелиальных гранул микромицетов, 5 мл фосфатного буфера (0,1 М, рН 8,5), в 20 мл пробирках, добавляли 5 мл 0,1, 0,2, 0,5 0,75, 1,0, 1,5, 2 М водных растворов гликольальдегида. Пробирки перемешивали в течение 2 ч, 150 об/мин при оптимальных температурных условиях реакции. Каждые 15 мин отбирали пробы для определения продуктов реакции методом ВЭЖХ.

Зависимость глицеролоксидазной активности мицелиальных гранул микромицетов от концентрации глиоксала определяли количественным определением глиоксала в результате окисления этиленгликоля мицелиальными гранулами микромицетов в присутствии разных концентраций глиоксала. Для этого к реакционной смеси, содержащей 500 мМ этиленгликоля в 20 мл натрий боратном буфере (0,05, рН 9,0), 10 г мицелиальных гранул микромицетов, добавляли разные количества глиоксала из расчета 0,5, 1,0, 1,5, 1,75, 2,0, 2,25, 2,5, 3,0, 3,25, 3,5М конечных концентраций глиоксала на 20 мл реакционной смеси. Пробирки перемешивали в течение часа, на температурно - градиентном инкубаторе с перемешиванием, при оптимальных условиях реакции (рН, Т °С) с подачей стерильного воздуха 300 мл/мин на каждую пробирку. После завершения проводили анализ продуктов реакции методом ВЭЖХ.

ГЛАВА 3. Характеристика микромицетов и скрининг продуцентов глицеролоксидазы

Распространение глицеролоксидазной активности у микроорганизмов относительно слабо изучено, нет данных о систематической приуроченности данной активности у разных групп и видов, а также видовой специфичности этой активности. Общим недостатком известных способов выявления глицеролоксидазной активности у микроорганизмов из разных таксономических групп, является крайне низкая вероятность обнаружения штаммов, способных синтезировать данный фермент, а, следовательно, и низкая вероятность обнаружения высокоактивных продуцентов. В наших экспериментах предварительным признаком наличия глицеролоксидазной активности служила способность микромицетов к образованию альдегидов в

культуральных жидкостях при росте на среде с этиленгликолем в качестве единственного источника углерода. Данный подход позволяет провести предварительный скрининг на предмет выявления потенциальных продуцентов глицеролоксидазы. Так как способность образования альдегидов может быть обусловлена наличием других ферментативных активностей микроорганизмов, таких как дегидрогеназная, алкогольоксидазная, гликолатоксидазная, то после первоначального отбора существенную важность имеет определение продуктов реакции из этиленгликоля по методу ВЭЖХ. При биокаталитическом окислении этиленгликоля, присутствие глиоксала как доминирующего альдегида в продуктах реакции подтверждает наличие относительно высокой глицеролоксидазной активности у микромицетов. Образец хроматограммы культуральной жидкости штамма *A. fumigatus* MDC 12036 представлен на рис. 1. Результатом хроматографического анализа установлено наличие глиоксала как доминирующего альдегида в культуральной жидкости мицелиальных гранул микромицета *A. fumigatus* MDC 12036, что указывает на наличие относительно высокой глицеролоксидазной активности у штамма.

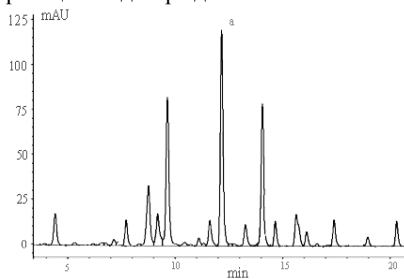


Рис.1. Хроматограммы культуральной жидкости штамма *A. fumigatus* MDC 12036, а- глиоксаль.

3.1. Характеристики микромицетов

Применение мицелиальных гранул в качестве источников ферментов в биокаталитических целях существенно отличается от реакций с применением очищенных ферментов и связано с некоторыми трудностями, что обусловлено наличием множества ферментативных активностей, в том числе и нежелательных для биокаталитической системы.

3.1.1. Ферментативные свойства микромицетов

В процессе окисления этиленгликоля глицеролоксидазой наблюдается накопление образовавшейся перекиси водорода в реакционной среде, что при отсутствии каталазной активности может привести к ингибированию окислительной реакции, путем частичного или полного ингибирования глицеролоксидазы. При воздействии перекиси водорода из глиоксала образуется муравьиная кислота, что приводит к ингибированию глицеролоксидазы.

Немалую значимость для биокаталитической системы имеют также супероксиддисмутазная и алкогольоксидазная активности микромицетов. Результаты опытов показали, что высокие значения супероксиддисмутазной активности подавляют скорость биокаталитической реакции, частичным ингибированием глицеролоксидазы путем образования перекиси водорода.

Алкогольоксидаза, как и глицеролоксидаза окисляет этиленгликоль, однако глиоксаль не является конечным продуктом реакции, что приводит к образованию побочных примесей. Под воздействием алкогольоксидазы из этиленгликоля образуется глиоксаль, однако его дальнейшее окисление алкогольоксидазой приводит к образованию в реакционной смеси глиоксиловой и щавелевой кислот.

Высокая дегидрогеназная активность (этиленгликоль в качестве субстрата) нежелательна для биокаталитической системы. Под воздействием алкогольдегидрогеназной активности из этиленгликоля образуется гликольальдегид, который под воздействием альдегиддегидрогеназ переходит в гликолевую кислоту

затем в глиоксильную и щавелевую. Однако в отличие от глицеролоксидазы этиленгликоль дегидрогеназная активность нуждается в кофакторах (Sigel, et al 2009).

Одним из ключевых ферментов для биокатализа этиленгликоля в глиоксаль является гликолатоксидаза. Опыты показали, что биокаталитическая система с глицеролоксидазной и гликолатоксидазной активностями более эффективна для получения глиоксаля. При наличии высокой гликолатоксидазной активности накопление гликольальдегида в реакционной смеси не наблюдается.

Нами изучено наличие ферментативных активностей у микромицетов с положительным альдегиδοобразованием на среде Cp-2, результаты которых представлены в таблице 1.

Таблица 1. Сводные данные ферментативных активностей микромицетов

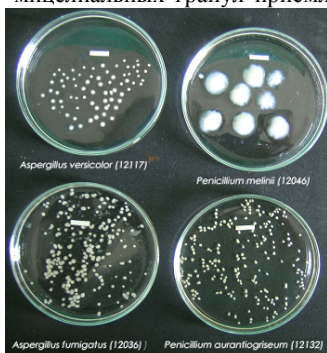
Наименование грибов / Ферментативная активность	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A.versicolor</i>	<i>Cladosporium sp.</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Humicola grisea</i>	<i>Malbranchea pulchella</i>	<i>Paecilomyces variotii</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	<i>P.chrysogenum</i>	<i>P. commune</i>	<i>P. melinii</i>	<i>Ulocladium botrytis</i>
Гликолатоксидазная	-	-	5/5	-	5/5	-	-	3/0	-	-	13/13	-	-	5/5	3/0
Дегидрогеназная	-	-	5/5	-	5/5	-	-	3/0	-	-	13/0	-	-	5/5	3/3
Глицеролоксидазная	15/0	15/0	15/5	15/0	12/5	10/0	13/0	4/3	5/0	9/0	39/13	10/0	6/0	18/5	3/3

* *Примечание: изучено штаммов / обладают активностью*

В качестве перспективных культур для применения в биокатализе этиленгликоля в глиоксаль, были выбраны культуры микромицетов *P. aurantiogriseum* MDC-12132, *A. versicolor* MDC-12117, *Penicillium melinii* MDC-12046, *A.fumigatus* MDC-12036 с относительно высокими активностями глицеролоксидазы, гликолатоксидазы и каталазы.

3.1.2. Получение мицелиальных гранул микромицетов

В нашей работе важной особенностью применения микромицетов как источников ферментов в биокаталитических системах является способность образования мицелиальных гранул приемлемой формы при условиях глубинного роста. Изучены свойства образования мицелиальных гранул микромицетов в условиях глубинного роста на средах Cp-5, Cp-6 на ротационных качалках, при разных скоростях вращения. Полученные мицелиальные гранулы микромицетов в среде Cp-5, при оптимальных условиях роста и вращения 150 об/мин, представлены на рис. 2.



В результате опытов, при разных скоростях вращения для штамма *P. melinii* MDC-12046 не удалось получить мицелиальные гранулы оптимальной формы для применения в проточных биокаталитических системах, однако, данный штамм не перестает служить ценным источником глицеролоксидазы.

Рис. 2. Гранулы микромицетов на среде Cp.5.

Данные о содержании белка в мицелиальных гранулах микромицетов и ферментативные активности (ЕД.) в перерасчете на грамм мицелиальных гранул представлены в таблице 2.

Таблица. 2. Содержание белка и ферментативные активности мицелиальных гранул микромицетов.

Штаммы	Содержание белка %	Ферментативная активность		
		Каталаза	Гликолатоксидаза	Глицеролоксидаза
<i>P.aurantiogriseum</i> MDC-12132	5,4-5,8	147,9	16,01	0,91
<i>A.versicolor</i> MDC-12117	7,8-8,4	216,3	7,95	2,14
<i>A.fumigatus</i> MDC-12036	8,3-8,6	244,3	5,24	0,88

ГЛАВА 4. Оптимальные условия биотрансформации этиленгликоля в глиоксаль. Окисление этиленгликоля и других субстратов глицеролоксидазой. К реакционным смесям в 20мл пробирках, содержащим глицеролоксидазу выделенную из штамма *A.versicolor* MDC 12117 (15 ЕД.), каталазу (1300 ЕД.) в 10мл 0,2М натрий-фосфатном буфере (рН 8,5), добавляли по 5 мл 0,1М этиленгликоля, гликолевого альдегида, глиоксаля, глиоксильной кислоты и инкубировали на температурно-градиентном инкубаторе, при оптимальных температурных условиях реакции. Образование перекиси водорода наблюдалось только в реакционных смесях с этиленгликолем и гликолевым альдегидом. Полученные данные указывают, что этиленгликоль и гликольальдегид окисляются глицеролоксидазой, а глиоксаль и глиоксильная кислота - нет.

Зависимость глицеролоксидазной активности гранул микромицетов от температуры проводили с применением температурно - градиентного инкубатора с перемешиванием в диапазоне температур от 25 до 70 °С с шагом 5°. Величину глицеролоксидазной активности культур микромицетов определяли по количеству образовавшегося глиоксаля в процессе окисления этиленгликоля в течение 1 ч. Определение продуктов биокаталитической реакции определяли методом ВЭЖХ.

Зависимость глицеролоксидазной активности гранул микромицетов от реакции среды определяли параллельно с температурной зависимостью на температурно-градиентном инкубаторе с перемешиванием в пределах рН - 3,0-10. Величину глицеролоксидазной активности культур микромицетов определяли по количеству образовавшегося глиоксаля в процессе окисления этиленгликоля в течение 1 ч. Зависимость глицеролоксидазной активности гранул микромицетов от температуры реакции среды представлены на рис. 3,4. Для выявления оптимального количества потребляемого кислорода биокаталитической системой, содержащей 10 г гранул микромицетов при биокаталитическом получении глиоксаля из 100 мМ этиленгликоля в 0,2 М Na - фосфатном буфере, реакции проводили с подачей стерильного воздуха 5-50 мл/мин при оптимальных условиях биокаталитических реакций.

Установлено, что потребность воздуха для биокаталитических систем с применением 10 г мицелиальных гранул микромицетов *P. aurantiogriseum* MDC-12132, *A. fumigatus* MDC-12036 и *A. versicolor* MDC-12117 составило 150,165,175 мл/мин соответственно.

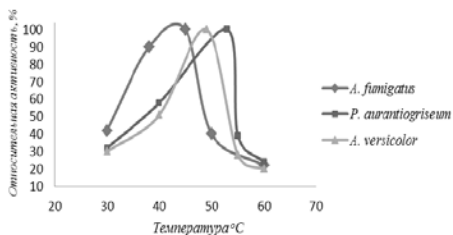


Рис.3. Зависимость глицеролоксидазной активности гранул микромицетов от температуры.

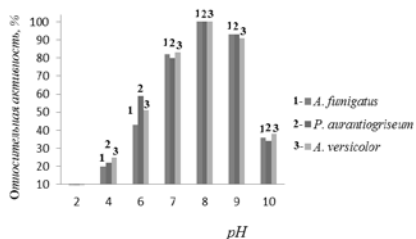


Рис.4. Зависимость глицеролоксидазной активности гранул микромицетов от реакции среды.

Зависимость выхода глиоксали от концентрации этиленгликоля. Выявления зависимости выхода глиоксали от концентрации этиленгликоля проводили в реакционных смесях с разными концентрациями этиленгликоля (0,1, 0,25, 0,5, 1,0М) в 250 мл, 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 8,0), с добавлением глицеролоксидазы из *A.versicolor* MDC 12117 (10 ЕД), каталазы (2000 ЕД.). Реакцию проводили на ротационных качалках при температурных условиях 30 °С в течение 6 часов. Каждый час забирали пробы для количественного определения продуктов реакции при помощи ВЭЖХ. Результаты указаны на рис. 5. Установлено, что для получения глиоксали биокаталитической системой с применением нативных ферментов (глицеролоксидазы и каталазы) оптимальные концентрации этиленгликоля варьируют в пределах 100-150 мМ. При более высоких концентрациях наблюдается накопление гликольальдегида в реакционной среде.

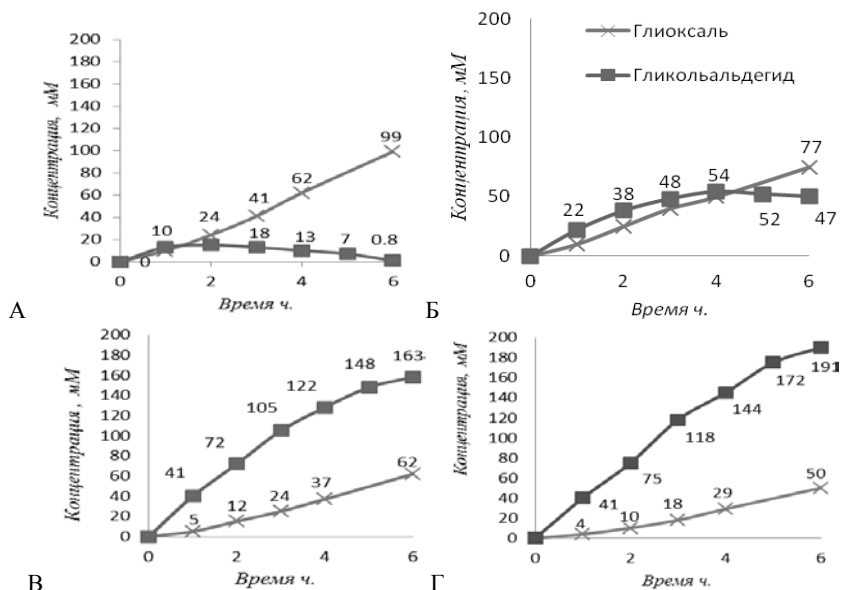


Рис. 5. Временная зависимость образования продуктов реакции от концентрации этиленгликоля (моль) А-0,1, Б-0,25, В-0,5, Г-1,0.

Исходя из этого, при биокаталитическом получении глиоксаля из этиленгликоля с применением глицеролоксидазы и каталазы возможно применение реакционной смеси с содержанием этиленгликоля не более 150 мМ, а количество образовавшегося гликольальдегида можно контролировать периодическим внесением этиленгликоля в реакционную среду. Данный подход делает процесс трудоемким и дорогостоящим в связи с затратами на выделение и очистку глицеролоксидазы и концентрирование раствора глиоксаля до коммерчески реализуемой концентрации – 40 %.

Оптимальные концентрации этиленгликоля в системе с мицелиальными гранулами. Оптимальные концентрации этиленгликоля и гликольальдегида в качестве субстратов для биокаталитической системы, содержащей 10 г гранул микромицетов, установлены экспериментально при оптимальных температурных условиях для каждой культуры (длительность реакции 2ч). Для этого разные концентрации субстратов (50,100, 250, 500 мМ/л) были использованы при оптимальных условиях реакций для каждой культуры. В качестве реакционной среды применяли 0,05 М натрий боратный буфер. Учитывая, что с образованием глиоксаля рН реакционной среды понижается, исходное значение рН было установлено рН -9,0 для гранул микромицетов *A. versicolor* MDC12117, *P. aurantiogriseum* MDC 12132 и рН- 8,5 для *A. fumigatus* MDC 12036. Результаты опытов показали, что в отличие от нативной глицеролоксидазы и каталазы и их иммобилизованных форм в качестве катализаторов, применение мицелиальных гранул микромицетов более эффективно в целях биокаталитического получения глиоксаля из этиленгликоля. В результате опытов установлено, что с применением мицелиальных гранул штамма *A.versicolor* MDC12117 биокаталитическую реакцию можно осуществить при более высоких концентрациях этиленгликоля (0,5-0,75 М), что примерно в 5 раз превышает концентрацию, применяемую в системах с нативной глицеролоксидазой и каталазой, а также их иммобилизованных форм.

Зависимость образования глиоксаля из этиленгликоля от наличия разных концентраций глиоксаля в реакционной среде. Реакции были проведены в оптимальных условиях (рН, Т) для образования глиоксаля из 500 мМ этиленгликоля с применением 10 г мицелиальных гранул штамма *A. versicolor* MDC12117 в качестве

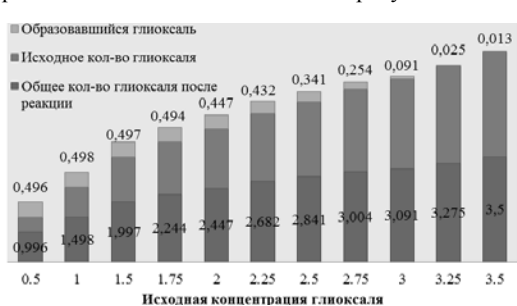


Рис.6. Влияние разных концентраций глиоксаля на образование глиоксаля из этиленгликоля.

При концентрациях глиоксаля 2,5 моль/л и более наблюдается угнетение каталитической реакции. В связи с этим при биокаталитическом получении глиоксаля из этиленгликоля в целях повышения эффективности биокаталитической системы необходимо периодически удалять образовавшийся глиоксаль из реакционной среды.

Зависимость образования глиоксаля от концентрации гликольальдегида.

Реакции были проведены в оптимальных условиях (рН, Т) для образования глиоксаля. К реакционной смеси, содержащей 10 г мицелиальных гранул в фосфатном буфере

P.aurantiigriseum MDC 12132 (рис. 7а), *A. versicolor* MDC12117 (рис.7б), добавляли 0,1-2,0 М гликольальдегида при разных временах удерживания (15, 30, 45, 60, 90,120 мин).

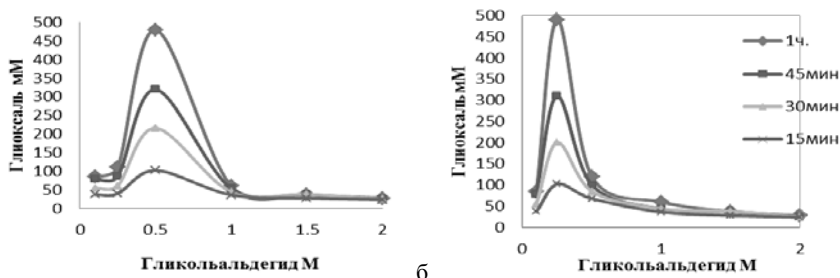


Рис.7. Зависимость образования глиоксала от концентрации гликольальдегида.

Результатами опытов установлено, что высокие концентрации гликольальдегида приводят к ингибированию как глицеролоксидазной, так и гликолатоксидазной активности у гранул микромицетов. Для биокаталитической системы, содержащей гранулы штамма *A.versicolor* MDC12117, оптимальная концентрация гликольальдегида для получения глиоксала составляет примерно 250-300 мМ, при концентрациях гликольальдегида 600 мМ и более, вне зависимости от времени удерживания концентрация образовавшегося глиоксала существенно не меняется. При применении мицелиальных гранул *P. aurantiigriseum* MDC 12132 оптимальная концентрация гликольальдегида составляет 480-550 мМ, что обуславливается более высокой гликолатоксидазной активностью, чем у штамма *A. versicolor* MDC12117.

ГЛАВА 5. Изучение проточной биотрансформации этиленгликоля в глиоксаль

Изучены перспективные штаммы микромицетов с высокой глицеролоксидазной и каталазной активностями, со свойством формирования мицелиальных гранул в

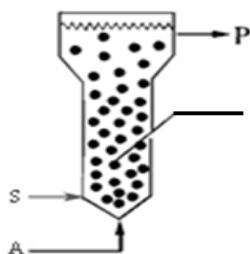


Рис. 8. Система с взвешенным слоем мицелиальных гранул. S - ввод субстрата, P- выход продукта, А- линия стерильного воздуха.

условиях глубинного культивирования для проточного получения глиоксала из этиленгликоля. В целях конструирования системы для биокаталитического получения глиоксала из этиленгликоля нами были испытаны мицелиальные гранулы микромицетов *A. versicolor* MDC 12117, *P. aurantiigriseum* MDC 12132 и *A. fumigatus* MDC 12036 в проточных условиях. Для реализации данной задачи использовали модифицированную систему объемом 550 мл с взвешенным слоем гранул микромицетов рис. 8

Начальная концентрация этиленгликоля 500 мМ в 0,05 М натрий боратном буфере (pH -9,0), температурный режим 54 °С и стерильный поток воздуха 2,5 л/мин, для мицелиальных гранул штаммов *A. versicolor* MDC 12117, *P. aurantiigriseum* MDC 12132 и 250 мМ этиленгликоля в Na-фосфатном буфере (pH 8,0), температурный режим 45 °С и стерильный поток воздуха 2,5 л/мин для мицелиальных гранул штамма *A. fumigatus* MDC 12036 были использованы для образования глиоксала из этиленгликоля в проточной системе с взвешенным слоем гранул микромицетов. В системе было использовано 100 г мицелиальных гранул микромицетов. Для выявления оптимальной скорости прохождения субстрата через реактор реакции проводили при скоростях потока 50-150 мл/мин с шагом 10мл/мин и отбирали пробы для количественного определения продуктов реакции методом ВЭЖХ. Результаты

хроматографического анализа продуктов реакции при скорости потока субстрата 80мл/мин представлены на рис. 9.

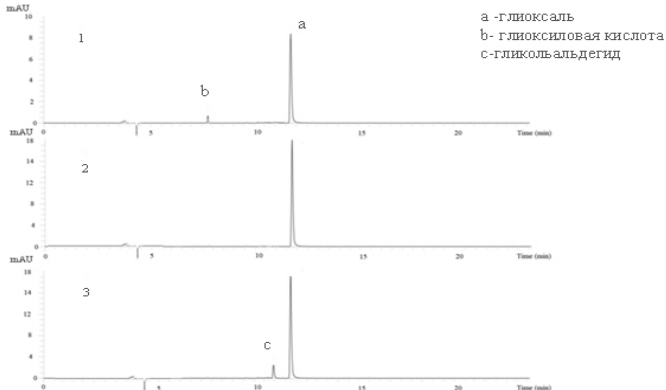


Рис.9. Хроматограммы продуктов биотрансформации этиленгликоля мицелиальными гранулами микромицетов в проточных условиях. 1- *P. aurantiogriseum* MDC 12132, 2- *A. versicolor* MDC 12117, 3- *A. fumigatus* MDC 12036.

Результатами хроматографического анализа установлено, что при применении мицелиальных гранул микромицетов *P. aurantiogriseum* MDC 12132, и *A. versicolor* MDC 12117 выходы глиоксала из 500мМ этиленгликоля в проточных условиях, со скоростью потока 80 мл/мин составили 483,2 и 498,3мМ соответственно, а для мицелиальных гранул штамма *A. fumigatus* MDC 12036 из 250мМ этиленгликоля выход составил 231,2 мМ. Кроме этого, при применении мицелиальных гранул штамма *A. versicolor* MDC 12117 конечным продуктом реакции является глиоксаль, без каких-либо примесей. При применении мицелиальных гранул штамма *P. aurantiogriseum* MDC 12132 в продуктах реакции помимо глиоксала было обнаружено 0,64% глиоксиловой кислоты, что обусловлено наличием алкогольоксидазной активности у гранул микромицета.

При применении мицелиальных гранул штамма *A. fumigatus* MDC 12036 в продуктах реакции помимо глиоксала обнаружено наличие гликольальдегида, что обуславливается недостатком гликолатоксидазной активности мицелиальных гранул. Хроматографическим анализом установлено, что при применении гликольальдегида в качестве субстрата с концентрацией до 500 ммоль/л, в процессе биокаталитического получения глиоксала с применением мицелиальных гранул *P. aurantiogriseum*, глиоксиловая кислота не образуется. Полученные данные открывают перспективу применения мицелиальных гранул микромицета *A. versicolor* MDC 12117 для биокаталитического получения глиоксала из этиленгликоля в проточных условиях.

Установлено, что для биокаталитической системы с мицелиальными гранулами штамма *A. versicolor* MDC 12117 оптимальная концентрация этиленгликоля для получения глиоксала составляет 500 мМ. Применение более высоких концентраций этиленгликоля приводит к накоплению гликольальдегида в реакционной среде, которую можно компенсировать параллельным применением мицелиальных гранул микромицета *P. aurantiogriseum* MDC 12132, обладающего более высокой активностью гликолатоксидазы. Данный подход открывает новые возможности конструирования биокаталитической системы, которая позволит проводить процесс при более высоких концентрациях этиленгликоля, тем самым обеспечивая более высокую экономическую выгоду. Исходя из полученных данных, можно предположить, что чем выше гликолатоксидазная активность системы, тем выше оптимальная концентрация

гликольальдегида, однако гликольальдегид образуется из этиленгликоля под воздействием глицерилоксидазы, которая также окисляет гликольальдегид до глиоксаля, т.е. при высоких значениях гликолатоксидазной активности лимитирующим фактором биокаталитической системы становится глицерилоксидазная активность.

Биокаталитический процесс получения глиоксаля из этиленгликоля, катализируемый мицелиальными гранулами микромицетов, схематически представлен на рисунке 10.

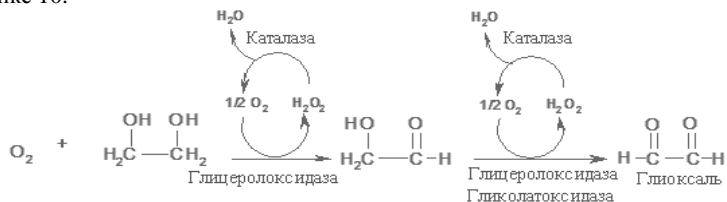


Рис.10. Схема биокатализа этиленгликоля в глиоксаль с применением мицелиальных гранул микромицетов.

В целях создания системы для непрерывного биокаталитического получения глиоксаля из этиленгликоля нами была сконструирована система с двумя модифицированными реакторами с взвешенным слоем мицелиальных гранул микромицетов *A. versicolor* MDC 12117 и *P. aurantiogriseum* MDC 12132 в количестве по 150, 200 г соответственно. Принципиальная схема проточного биокаталитического получения глиоксаля в лабораторных условиях представлена на рисунке 11.

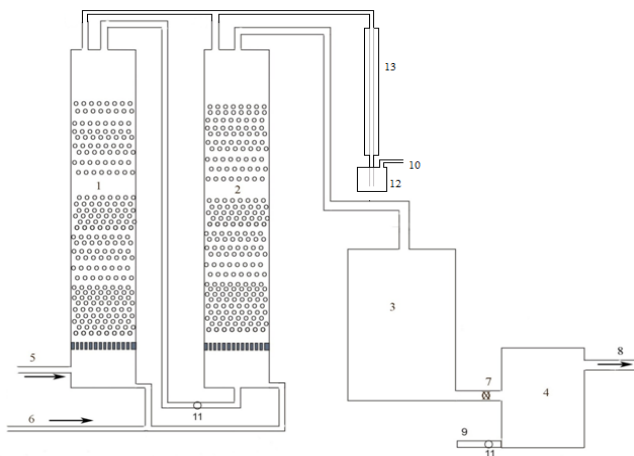


Рис.11. Принципиальная схема установки непрерывного биокаталитического получения глиоксаля из этиленгликоля.

1- колонка с гранулами микромицета *Aspergillus versicolor* MDC 12117, 2 - колонка с гранулами микромицета *Penicillium aurantiogriseum* MDC 12132, 3. Резервуар для накопления продуктов реакции, 4. Резервуар для вакуум-дистилляции глиоксаля, 5. Линия субстрата, 6. Линия стерильного воздуха, 7. Вентиль, 8. Линия вакуум дистилляции глиоксаля, 9. Обратная линия в колонку 1, 10. Выход воздуха, 11. Проточный рН- метр, 12. Ловушка для глиоксаля, 13. Водяной холодильник.

В проточной биокаталитической системе, в первой колонке использовали мицелиальные гранулы микромицета с более высокой глицерилоксидазной, а во второй с более высокой гликолатоксидазной активностями. Данный выбор объясняется тем,

что при применении высоких концентраций этиленгликоля в биокаталитической системе наблюдается накопление гликольальдегида в реакционной среде, обусловленное более высокой специфичностью глицеролоксидазы к этиленгликолю, чем к гликольальдегиду. Исходя из этого, сконструировали биокаталитическую систему и установили гранулы микромицетов *A. versicolor* MDC 12117 и *P. aurantiogriseum* MDC 12132 в первую и вторую колонку соответственно.

Для выявления оптимальной концентрации этиленгликоля для непрерывной биокаталитической системы (рис.11), были использованы разные концентрации этиленгликоля 0,5-3 М при скорости потока субстрата 120 мл/мин. В качестве реакционной среды применяли 0,05 М натрий боратный буфер (pH - 9,0). Температурный режим 54 °С и стерильный поток воздуха не менее 2,5 л/мин для каждой колонки, были использованы для образования глиоксаля из этиленгликоля в системе с взвешенным слоем мицелиальных гранул.

Зависимость образования глиоксаля от концентрации этиленгликоля в непрерывной биокаталитической системе с мицелиальными гранулами микромицетов, при скорости потока субстрата 120 мл/мин представлена на рис. 12

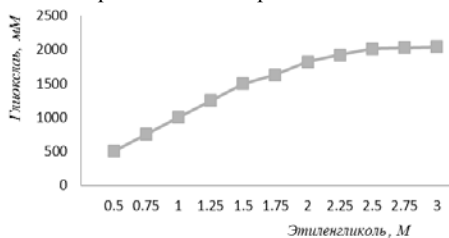


Рис. 12. Зависимость образования глиоксаля от концентрации этиленгликоля.

Оптимальные концентрации этиленгликоля для биокаталитической системы, при скорости потока субстрата 120 мл/мин составили 1,25-1,5 моль/л при более высоких концентрациях этиленгликоля наблюдается снижение выхода глиоксаля за счет накопления гликольальдегида в биокаталитической системе.

Для выявления оптимальной скорости потока субстрата для непрерывной биокаталитической системы были применены разные скорости потока 80-300 мл/мин при температурном режиме 54 °С и в условиях подачи стерильного воздуха не менее 2,5 л/мин для каждой колонки. В качестве реакционной среды применяли 0,05 М натрий боратный буфер (pH - 9,0). В биокаталитической системе (рис.11), при скорости потока ниже 80 мл/мин, хроматографическим анализом продуктов реакции установлено высокое содержание гликольальдегида, после прохождения субстрата через первый реактор (0,74 моль/л), что приводит к ингибированию глицеролоксидазной активности в верхнем слое мицелиальных гранул микромицета *A. versicolor* в первой колонке биокаталитической системы. При более высоких скоростях потока субстрата (140-160 мл/мин) концентрация образовавшегося гликольальдегида уменьшается из-за сокращения времени взаимодействия субстрата и количество гликольальдегида на выходе из первой колонки, при скорости потока субстрата 160мл/мин составило примерно 0,31 моль/л. Зависимость образования продуктов реакции в биокаталитической системе (рис.11) от скорости потока 1,5 М раствора этиленгликоля в 0,05 М натрий боратном буфере (pH - 9,0) представлена на рис. 13.

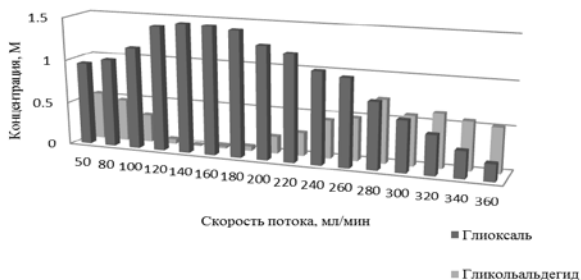


Рис. 13. Зависимость образования продуктов реакции в биокаталитической системе от скорости потока субстрата.

Исходя из этого, оптимальная скорость потока в биокаталитической системе (рис.11) составляет 140-160 мл/мин. Для выявления воздействия высоких концентраций глиоксала на выход глиоксала из этиленгликоля, использовали разные концентрации (0,5-3 моль) глиоксала на литр 1,5 М раствора этиленгликоля в 0,05 М натрий боратном буфере (рН – 9,0), при скорости потока субстрата 150 мл/мин. В биокаталитической системе, при концентрациях глиоксала до 2,75 моль/л угнетение образования глиоксала из этиленгликоля не наблюдалось.

В целях обеспечения максимального выхода глиоксала с применением биокаталитической системы (рис.11), биокаталитическую реакцию проводили с применением 1,5 М раствора этиленгликоля в 0,05 М натрий боратном буфере (рН – 9,0) в качестве субстрата, при скорости потока субстрата 160 мл/мин с подачей стерильного воздуха по 2,0 л/мин на каждую колонку, при температурных условиях 54 °С с применением 150 г мицелиальных гранул микромицетов *A. versicolor* MDC 12117 и 200 г *P. aurantiogriseum* MDC 12132 в первой и второй колонках соответственно.

Во избежание потери образовавшегося глиоксала с потоком выходящего воздуха из биокаталитической системы, на пути выхода воздуха установили водяной холодильник и пропускали воздух через резервуар с деионизированной водой. Установлено, что количество глиоксала в потоке выходящего воздуха составляет 12-14 % от количества, образовавшегося глиоксала в биокаталитической системе.

Увеличение содержания глиоксала в биокаталитической системе приводит к значительному снижению рН реакционной смеси, что в свою очередь приводит к угнетению ферментативных активностей в биокаталитической системе. Для этого в процессе ферментативной реакции периодически каждые 2 цикла удаляли образовавшийся глиоксаль вакуум-дистилляцией, при температуре 45 °С. Через

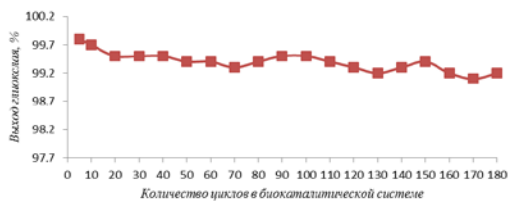
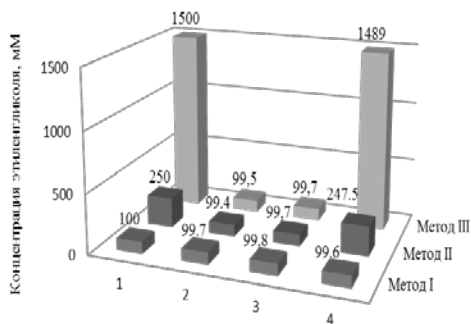


Рис. 14. Зависимость выхода глиоксала от количества циклов в биокаталитической системе.

Биокаталитическая система, содержащая 350 г гранул микромицетов, функционировала в течение 180 циклов почти без потери каталитической активности. Выход глиоксала из 1,5 М этиленгликоля за 180 циклов в биокаталитической системе составил в среднем 99,47 %.

Для определения чистоты глиоксаля, полученного в биокаталитической системе перед дистилляцией глиоксаля, проводили дериватизацию продуктов реакции с применением 2,4 - динитрофенилгидразина с последующим анализом на жидкостном хроматографе высокого давления с тандемным масс-спектрометрическим детектором в режимах позитивной и негативной электроспрей ионизацией проб. В результате скрининга методом SIM в диапазоне m/z 180-420, обнаружены ионы значениями m/z 419 и 198, которые соответствуют производному глиоксаля с 2,4 - динитрофенилгидразином, и нереагировавшему 2,4 - динитрофенилгидразину соответственно. Скринингом по методу SIM в диапазоне 60-100 m/z , обнаружено незначительное количество этиленгликоля (0.4г/л), значением m/z 62, однако, после вакуум дистилляции глиоксаля при температурном режиме 45 °С содержание этиленгликоля в продуктах реакции не обнаружено. Результатом масс-спектрометрии, установленная чистота конечного продукта составила 99,7 %, что не уступает существующим биокаталитическим методам получения глиоксаля из этиленгликоля. Что касается концентрации полученного глиоксаля, то она во много раз превосходит существующие биокаталитические методы получения, что делает процесс экономически рентабельным с точки зрения концентрирования глиоксаля до коммерчески реализуемой концентрации 40 %.



Для сравнения полученных результатов с существующими биокаталитическими методами биокатализа этиленгликоля в глиоксаль провели сравнение данных. Сравнительные данные о применении оптимальных концентраций этиленгликоля и выходы глиоксаля, а также чистота конечного продукта в различных биокаталитических системах при получении глиоксаля из этиленгликоля представлены на рис. 16.

Рис. 15. Сравнительные данные различных биокаталитических систем для получения глиоксаля из этиленгликоля.

Метод I - биокаталитическое получение глиоксаля из этиленгликоля с применением нативной глицеролоксидазы из *A. japonicus* и каталазы (Isobe, 1995). Метод II - биокаталитическое получение глиоксаля в системе с иммобилизованной глицеролоксидазой и каталазой (Drauz et al, 2012). Метод III - биокаталитическое получение глиоксаля из этиленгликоля в биокаталитической системе с взвешенным слоем гранул микромицетов *A. versicolor* MDC 12117 и *P. aurantiogriseum* MDC 12132. 1 - оптимальная концентрация этиленгликоля в биокаталитических системах для получения глиоксаля, 2 - выход глиоксаля из этиленгликоля в биокаталитических системах. 3 - чистота глиоксаля, 4 - максимальная концентрация продукта (глиоксаля) в биокаталитических системах.

Выводы

1. Изучено распространение глицеролоксидазной активности штаммов различных систематических категорий микроорганизмов – бактерий и микромицетов, включая их экстремофильные группы. В число исследованных культур были включены 200 штаммов микромицетов, в том числе 108 штаммов биодеградантов полимерных материалов из космических станций (ОК МИР - 74, МКС - 34 штаммов), природных субстратов (82) и коллекционных культур (10), 135 культур неспороносных бактерий рода *Pseudomonas* (28 штаммов) и аэробных спорообразующих бактерий *B. subtilis*, *B. circulans*, *B.coagulans*, *B.alcalophilus*, *B. stearothermophilus* (107 штаммов).
2. Глицеролоксидазная активность выявлена у 33 штаммов, установлено наличие определенной приуроченности этой активности родами микромицетов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Humicola*, *Ulocladium*, и охарактеризованы 4 штамма наиболее активных продуцентов глицеролоксидазы.
3. С учетом предпочтительного выбора иммобилизованных форм активных продуцентов глицеролоксидазы подробно изучены штаммы микромицетов, образующие при выращивании на жидких средах мицелиальные гранулы приемлемой формы для применения в проточных биокаталитических системах.
4. Выявлен активный продуцент глицеролоксидазы - штамм *A. versicolor* MDC 12117 с активностью глицеролоксидазы 0,021 ЕД на мг белка биомассы, который почти в два раза превосходит по своей активности штамм *A. japonicus* описанный в литературе как наиболее перспективный по этой активности.
5. Изучены кинетические параметры, субстратная специфичность для биокаталитической реакции, установлены оптимальные условия биокатализа: концентрация субстрата 0,25 М в 0,5 М натрий фосфатном буфере, температура 45 °С, pH - 8,5 для штамма *A. fumigatus* MDC 12036, концентрация субстрата - 0,45-0,5М в 0,05М натрий боратном буфере, температура -54 °С, pH - 9,0 для штаммов *P.aurantiogriseum* MDC 12132, *A.versicolor* MDC 12117, соответственно.
6. Установлены оптимальные условия получения глиоксала из этиленгликоля в проточных условиях с применением мицелиальных гранул штаммов *A. versicolor* MDC 12117 и *P.aurantiogriseum* MDC 12132, концентрация этиленгликоля - 1,4-1,5 М в 0,05 М натрий боратном буфере, температура колонок - 54 °С, стерильная подача воздуха не менее 2,0 л/мин на каждую колонку, скорость потока субстрата – 160 мл/мин.
7. Разработана схема проточного биокаталитического получения глиоксала в лабораторных условиях с применением гранул штаммов *A. versicolor* MDC 12117 и *P.aurantiogriseum* MDC 12132, превосходящая все известные биокаталитические методы получения, с обеспечением высокого выхода (99,5 %) и чистоты (99,7 %) конечного продукта.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Дарбинян К.А., Антонян Л.Г., Айрапетян С.С. Микробиологическая трансформация этиленгликоля и уксусной кислоты в глиоксильную кислоту. Международный симпозиум “Проблемы биохимии, молекулярной и радиационной биологии и генетики”, Ереван - Аштарак, 2-4 апреля 2007, С. 69.
2. Darbinyan K.A. Continuous microbial transformation of ethylene glycol to glyoxal by application of immobilized glycerol oxidase. Biol. J. of Armenia, LXII appendix 1(62), 2010, P.141.
3. Darbinyan K.A. Microbial catalysis of ethylene glycol to glyoxal. Proc. of 5th International Congress on Biocatalysis, Hamburg, Germany, August 29 - September 2, 2010, P.91.

4. Дарбинян К.А., Африкян Э.К. Микробный биокатализ и биотрансформация с использованием безносительной иммобилизации клеток. V Международная конференция молодых ученых “Биология: от молекулы до биосферы” Харьков, Украина, 22-25 сентября 2010, С. 218-219.
5. Darbinyan K.A. Continuous biotransformation of ethylene glycol to glyoxal by application of fungal enzymes. Вестник уральской медецинской академической науки. N 4/1 (38), 2011, P.192-193.
6. Darbinyan K., Gevorgyan S. Continuous Biocatalytic: Production of Glyoxal from Ethylene Glycol with *Aspergillus versicolor*. Scientific Seminar “Modern state of biotechnological developments and ways of commercialization”, Yerevan, Armenia, September 11-12, 2012, P.45.
7. Darbinyan K.A. Production of glyoxal from ethylene glycol by fungal glycerol oxidase and catalase. Electronic Journal of Natural Sciences, NAS RA, 1(20), 2013, P. 49-52.
8. Darbinyan K., S. Gevorgyan, L. Antonyan, E. Afrikyan. Optimization of biocatalytic system for production of glyoxal from ethylene glycol. 2nd International Scientific Conference of Young Researcher “Contribution of young generation in the development of biotechnology” October 1-4, Yerevan, Armenia, 2013, P.179-184.

Դարբինյան Կարեն Ավագի

ԳԼԻՕՔՍԱԼԻ ԿԵՆՍԱԿԱՏԱԼԻՏԻԿ ՍՏԱՅՈՒՄԸ ԷԹԻԼԵՆԳԼԻԿՈԼԻՑ

ԱՍՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ կենսակատալիզ, գլիոքսալ, էթիլենգլիկոլ, գլիցերոլօքսիդազ, գլիկոլատօքսիդազ, անընդհատ հոսքային պրոցեսներ

Ատենախոսական աշխատանքը նվիրված է մանրէաբանության և կենսատեխնոլոգիայի արագ զարգացող բնագավառներին՝ մանրէաբանական կատալիզի և կենսատրանսֆորմացիայի կիրառմամբ արժեքավոր նյութերի ստացմանը: Այս հետազոտությունում ներկայացված են անընդհատ հոսքային պայմաններում, մանրէաբանական կատալիզի եղանակով էթիլենգլիկոլից գլիոքսալի կեսակատալիտիկ ստացման արդյունավետ մեթոդների մշակումը և այդ պրոցեսի օպտիմալացման որոշ ուղիներ:

Կոմերցիոն գլիոքսալը ստացվում է կամ էթիլենգլիկոլի գազաֆազային օքսիդացմամբ՝ կիրառելով արծաթի, պղնձի և այլ մետաղների համաձուլվածքները՝ որպես կատալիզատորներ, կամ ացետալդեհիդի հեղուկ ֆազային օքսիդացմամբ ազոտական թթվով: Գլիոքսալի համալսարհային տարեկան արտադրական ծավալները կազմում են մոտ 1,5 մլն տոննա՝ պայմանավորված խոշոր արտադրական օբյեկտների գործարկմամբ, հիմնականում Ասիայում: Ներկայումս գլիոքսալը հիմնականում ստացվում է գազային ֆազայում էթիլենգլիկոլի պարցիալ օքսիդացմամբ:

Որպես այլընտրանք գլիոքսալի ստացման առկա քիմիական մեթոդներին, մենք մշակել ենք կենսակատալիտիկ պրոցես գլիցերոլօքսիդազի և կատալազի կիրառմամբ, որն ընթանում է համեմատաբար անվտանգ պայմաններում: Բացի այդ, կենսակատալիտիկ պրոցեսը ապահովում է գլիոքսալի առավել բարձր ելք կողմանկի խառնուրդների նվազագույն պարունակությամբ, քան գլիոքսալի ստացման առկա մեթոդները:

107 բակտերալ կուլտուրաների և 200 ցածրակարգ սնկերի գլիցերոլօքսիդազային ակտիվության ուսումնասիրման արդյունքում նշված ակտիվության առկայությունը հաստատվել է *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* և *Humicola* ցեղերի ցածրակարգ սնկերի մոտ:

Գլիցերոլօքսիդազի բարձր ակտիվություն (0,021 միավ/մգ սպիտակուց) գրացվել է *A. versicolor* MDC 12117 շտամի մոտ, որն իր ակտիվությամբ, մոտ երկու անգամ գերազանցում է գրականությունում նկարագրված որպես առավել հեռանկարային *A. japonicus* շտամի ակտիվությանը:

Հաշվի առնելով միկրոմիցետների գրանուլների նախընտրելի ձևերի ստացումը գլիցերոլօքսիդազի ակտիվ արտադրիչների իմոբիլիզացված ձևերի նկատմամբ և անընհատ հոսքային պայմաններում կիրառման նպատակով, մանրամասն ուսումնասիրվել են միկրոմիցետների աճը և գրանուլների ստացումը հեղուկ սննդամիջավայրերում:

Ուսումնասիրված է բարձր գլիցերոլօքսիդազային և կատալազային ակտիվությամբ օժտված ցածրակարգ սնկերի գրանուլների կիրառմամբ էթիլենգլիկոլից գլիոքսալի ստացման պրոցեսը: Կատալազի ակտիվությանը կարևորվում է նրանով, որ այն հանդես է գալիս որպես միջնորդ՝ քայքայելով օքսիդացման պրոցեսում առաջացած ջրածնի պերօքսիդը՝ այդ ճանապարհով կանխելով պերօքսիդ կախյալ մրջնաթթվի առաջացումը և գլիցերոլօքսիդազի ինակտիվացումը:

Ցույց են տրվել էթիլենգլիկոլից գլիոքսալի ստացման պրոցեսում բարձր գլիցերոլօքսիդազային և կատալազային ակտիվությամբ ցածրակարգ սնկերի գրանուլների կիրառման առավելությունները նույն ֆերմենտների ազատ և իմոբիլիզացված ձևերի նկատմամբ:

Միցելիալ գրանուլների կիրառումը որպես կատալիզատորներ գերծ է պահում խնդիրներից՝ կապված ֆերմենտների անջատման, մաքրման և իմոբիլիզացման հետ, ինչպես նաև հնարավորություն ընձեռում կենսակատալիտիկ ռեակցիան իրականացնել սուբստրատի առավել բարձր կոնցենտրացիների կիրառմամբ:

Էթիլենգլիկոլի օքսիդացման օպտիմալ պայմաններն են՝ 54 °C, pH – 9,0 համապատասխանաբար, էթիլենգլիկոլի և գլիկոլալդեհիդի օքսիդացման ռեակցիայի մաքսիմալ արագությունները համաձայն (*Drauz et al*, 2012), տվյալների 142,2 միավ., 1 գ սպիտակուցի հաշվարկով ֆերմենտային ակտիվության համար կազմում է համապատասխանաբար 89,1 և 62,2, իսկ *A.*

versicolor MDC 12117 շտամի դեպքում՝ 94,2 և 66,1 մկմոլ/ր/մգ սպիտակուց: *A. versicolor* MDC 12117 շտամի համար ստացված արդյունքը 20 և 65 անգամ գերազանցում են *Candida sp.* միկրոօրգանիզմի ալկոհոլօքսիդազայի և գերազանցում *A. japonicus* միկրոօրգանիզմից ստացված գլիցերոլօքսիդազի կիրառման արդյունավետությանը: Ստացված արդյունքները ցուցեն տալիս, որ էթիլենգլիկոլի օքսիդացումը *A. versicolor* MDC 12117 շտամի կիրառմամբ ընթանում է առավել արագ, քան *A. japonicus* շտամից անջատված ֆերմենտի կիրառման դեպքում:

Մշակվել և օպտիմիզացվել են *A. versicolor* MDC 12117, և *P. aurantiogriseum* MDC 12132 միցելաիլ գրանուլների կիրառմամբ, անընդհատ հոսքային պայմաններում էթիլենգլիկոլից գլիօքսալի ստացման պայմանները, 1,5 Մ սուբստրատի կոնցենտրացիայի, 54 °C ջերմաստիճանային պայմանների, pH - 9,0, և 160մլ/ր հոսքային պայմանների կիրառմամբ գլիօքսալի ելքը և մաքրությունը կազմել են 99,5 և 99,7 % համապատասխանաբար:

Karen A. Darbinyan

BIOCATALYTIC PRODUCTION OF GLYOXAL FROM ETHYLENE GLYCOL

SUMMARY

Keywords: *biocatalysis, glyoxal, ethylene glycol, glycerol oxidase, glycolate oxidase, continuous flow processes.*

The thesis is devoted to the rapidly developing fields of microbiology and biotechnology, such as microbial catalysis, biotransformation and biocatalytic production of valuable substances. This research describes some characterizations of the oxidative reactions of ethylene glycol to glyoxal and ways for optimization of the process for creation of cost effective method for production of glyoxal by microbial catalysis in continuous flow conditions.

Commercial glyoxal is prepared either by gas phase oxidation of ethylene glycol in the presence of silver, copper or other metals as catalysts or by the liquid phase oxidation acetaldehyde with nitric acid. Global productive capacity is 1.5 million tons with producton rates less, due to over-capacity mostly in Asia. Most production is done via the gas-phase partial oxidation route.

As an alternative for current chemical processes, we developed the biocatalytic process, which uses glyceroloxidase and catalase as catalysts, under the comparatively safe reaction conditions. Additionally, this biocatalytic process produces a higher yield of glyoxal and fewer undesirable waste streams than the existing methods for manufacture.

Based on the screening of 107 strains of bacteria and 200 strains of fungi, the glycerol oxidase activity has been revealed within the genera of fungi: *Aspergillus, Cladosporium, Penicillium* and *Humicola*.

The high glycerol oxidase activity (0.021 unit/mg of protein) at the strain *A. versicolor* MDC 12117 has been revealed, which is almost twice higher than the *A. japonicus* strain, described in the literature as one of the most prospective strain for this activity.

In view of the preferred choice of immobilized forms for active producers of glycerol oxidase, strains of micromycetes studied in detail during growth in liquid media for formation of mycelial granules suitable form for use in flow biocatalytic systems.

The production of glyoxal from ethylene glycol with the use of mycelial granules of fungi with high glycerol oxidase and catalase activity was studied. Catalase activity is essentially important as co-catalyst to decompose by-product hydrogen peroxide, thus limiting peroxide-dependent methanoate production and glycerol oxidase deactivation. The advantages of mycelial granules of fungi compared with systems with native glycerol oxidase and catalase and their immobilized forms for biocatalytic production glyoxal from ethylene glycol were demonstrated.

An application mycelial granule as catalysts relieve from the problems associated with separation, purification and immobilization of enzymes as well as provides the ability to implement biocatalytic process at higher substrate concentrations.

The optimum pH and temperature for the oxidation of ethylene glycol were around 9.0 and 54 °C, respectively. The maximum velocities for ethylene glycol and glycolaldehyde, estimated on the basis of the data by (Drauz *et al*, 2012), 1,42 units of glycerol oxidase activity for one g of protein, were 89.1 and 62.2 and our results for MDC 12117 strains were 94.2 and 66.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$ of protein, respectively.

These values are 20 and 65 times higher than those of alcohol oxidase from *Candida sp.* and higher than glycerol oxidase from *Aspergillus japonicus*. These results indicate that the conversion of ethylene glycol to glyoxal by glycerol oxidase from *A. versicolor* MDC 12117 might proceed more rapidly than by glycerol oxidase from *A. japonicus*.

The continuous flow system with the mycelial granules of *A. versicolor* MDC 12117, and *P. aurantiogriseum* MDC 12132 for production of glyoxal from ethylene glycol was constricted and optimization of the process was done, substrate concentration 1.5 M, temperature 54°C, pH -9.0 and 160 ml/min substrate flow rate were used. The yield and purity of glyoxal obtained were 99.5, 99.7 % respectively.