



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006121781/13, 21.06.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
21.06.2006

(45) Опубликовано: 20.01.2008 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WU C.-F., et. al. GFP-visualized immobilized enzymes: degradation of paraoxon by organophosphorus hydrolase in a packed column, Biotechn. & Bioeng., 2002, v.77 (2), p.212-218. US 6469145, 22.10.2002. MANSEE AH et. all. Detoxification of the organophosphate nerve agent coumaphos using organophosphorus hydrolase immobilized on cellulose (см. прод.)

Адрес для переписки:

119992, Москва, ГСП-2, Ленинские горы, 1,
стр.3, Химический факультет МГУ им. М.В.
Ломоносова, кафедра химической энзимологии,
Е.Н. Ефременко

(72) Автор(ы):

Ефременко Елена Николаевна (RU),
Лягин Илья Владимирович (RU),
Галаев Игорь Юрьевич (SE),
Плиева Фатима Магомедовна (SE),
Варфоломеев Сергей Дмитриевич (RU),
Маттиассон Бо (SE)

(73) Патентообладатель(и):

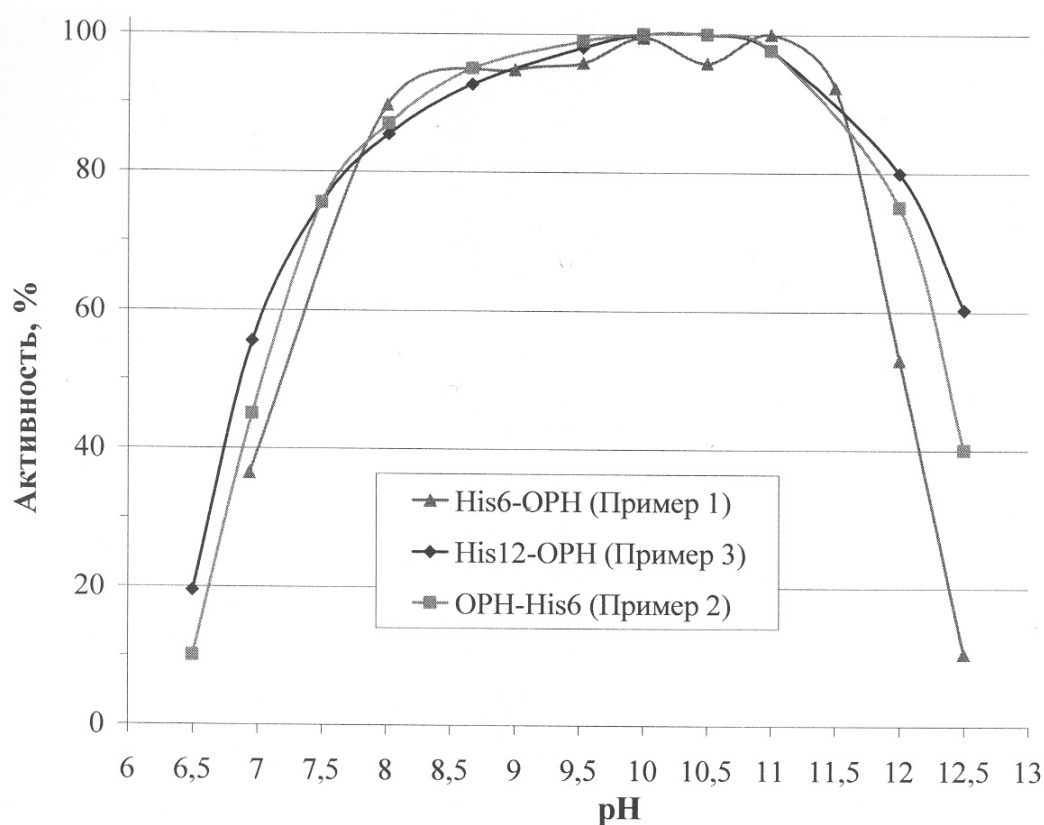
Ефременко Елена Николаевна (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОКАТАЛИЗАТОРА И БИОКАТАЛИЗАТОР ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ НЕЙРОТОКСИЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ПРОТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для деструкции фосфорорганических соединений в проточных системах. Задачей предлагаемого изобретения является создание способа получения эффективного иммобилизованного биокатализатора для разложения ФОС в проточных системах и сам биокатализатор. На пористом носителе, представляющем собой криогель полимера, представляющего собой полиакриламид или его производные, поверхность которого модифицирована металл-хелатирующими

лигандами и заряжена ионами двухвалентных металлов, иммобилизуют полипептид, содержащий полигистидиновую последовательность и проявляющий активность органофосфатгидролазы. Иммобилизацию пептида проводят пропуская его раствор через объем носителя. Способ экономически выгоден, биокатализатор может быть высушен, храниться в таком виде длительный период времени и регидратирован без существенных потерь активности, а также длительно использован в проточных системах. 2 н.п. ф-лы, 10 ил., 4 табл.



Зависимость активности биокатализаторов, полученных согласно заявляемому способу, от pH реакционной среды при детоксикации параоксона (0,2 мМ) в протоке при 25°C.

Фиг. 1

(56) (продолжение):

materials. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005, Dec; 32(11-12), p.554-600, PMID: 16292554 [PubMed - indexed for MEDLINE]. ЕФРЕМЕНКО Е.Н. и др. Органофосфатгидролаза - фермент, катализирующий деградацию фосфорсодержащих отравляющих веществ и пестицидов, Известия Академии наук. Серия химическая, 2001, N10, с.1743-1749.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 11/02 (2006.01)**C02F 3/00** (2006.01)**C02F 101/30** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006121781/13, 21.06.2006**(24) Effective date for property rights: **21.06.2006**(45) Date of publication: **20.01.2008 Bull. 2**

Mail address:

**119992, Moskva, GSP-2, Leninskie gory, 1,
str.3, Khimicheskij fakul'tet MGU im. M.V.
Lomonosova, kafedra khimicheskoi
ehnzimologii, E.N. Efremenko**

(72) Inventor(s):

**Efremenko Elena Nikolaevna (RU),
Ljagin Il'ja Vladimirovich (RU),
Galaev Igor' Jur'evich (SE),
Plieva Fatima Magometovna (SE),
Varfolomeev Sergej Dmitrievich (RU),
Mattiasson Bo (SE)**

(73) Proprietor(s):

Efremenko Elena Nikolaevna (RU)

(54) **BIOCATALYST PREPARATION METHOD AND A BIOCATALYST FOR DETOXIFICATION OF ORGANOPHOSPHORUS NEUROTOXIC COMPOUNDS IN CONTINUOUS-FLOW SYSTEMS**

(57) Abstract:

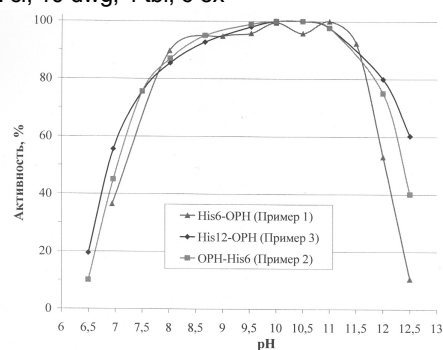
FIELD: waste water treatment.

SUBSTANCE: object of invention is creating a method for preparing effective immobilized biocatalyst to decompose organophosphorus compounds in continuous-flow systems, and biocatalyst itself. Polypeptide containing polyhistidine sequence and manifesting organophosphatohydrolase activity is immobilized on porous support, which is a polymer cryogel, more particularly polyacrylamide or its derivatives, whose surface is modified with metal-chelating agents and charged with bivalent metal ions. Immobilization of peptide is accomplished by passing solution thereof through the bulk of support.

EFFECT: increased economical efficiency of method, enabled drying of biocatalyst and storage of dried form over a long period of time without

loss of activity, and also enabled use of biocatalyst in continuous-flow systems.

2 cl, 10 dwg, 4 tbl, 6 ex



Зависимость активности биокатализаторов, полученных согласно заявляемому способу, от pH реакционной среды при детоксикации параоксона (0,2 мМ) в проточке при 25°C.

Фиг. 1

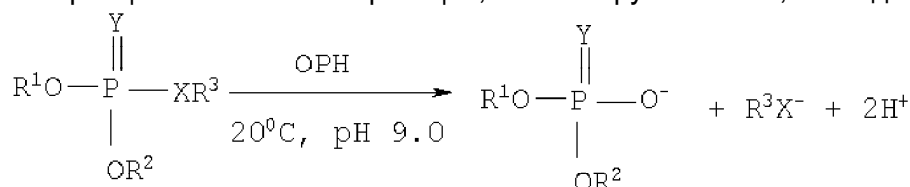
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к способам получения биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов, и может быть использовано для деструкции фосфорорганических соединений (ФОС) в проточных системах, в частности в различных системах очистки воды (муниципальных, сельскохозяйственных, индивидуальных пользователей и т.п.).

ФОС представляют собой эфиры ортофосфорной и алкилфосфоновых кислот, а также их производных, которые широко применяются в качестве пестицидов в сельском хозяйстве и инсектицидов в бытовых условиях, а также к их числу относятся наиболее токсичные боевые отравляющие вещества нервно-паралитического действия зоман, зарин и Vx [Kwong, T.C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. // Ther. Drug. Monit., 2002, V.24 (1), p.144-149; Юфит, С.С. Яды вокруг нас. Вызов человечеству. // М.: Классик Стиль, 2002, 368 с.; Вредные вещества в промышленности. Справочник: Изд. 7-е. В трех томах. Т. III. Неорганические и элементоорганические соединения. Под ред. Н.В.Лазарева, И.Д.Гадаскиной: Л.: Химия, 1977, 608 с].

Ежегодное применение ФОС в объеме сотен тысяч тонн [Gold R.S., Wales M.E., Grimsley, J.K. Green solution for chemical problems. // Disarm. Technol., 2000, V.23, p.263-286] для нужд сельского хозяйства, а также низкие скорости разложения ФОС в условиях окружающей среды приводят к накоплению этих веществ и обнаружению их в почвах, грунтовых и речных водах, продуктах питания, табачных и хлопчатобумажных изделиях, домашней пыли [Obendorf S.K., Lemley A.T., Hedge A., Kline A.A., Tan K., Dokuchaeva T. Distribution of pesticide residues within homes in central New York state. // Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2006, V.50 (1), p.31-44; Lemley A., Hedge A., Obendorf S.K., Hong S., Kim J., Muss T.M., Varner C.J., Selected pesticide residues in house dust from farmers homes in central New York state. // Bull. Environ. Contamin. Toxicol., 2002, V.69 (2), p.155-163]. Токсичное воздействие ФОС на живые организмы может быть острым или кумулятивным, проявляющимся в различного рода расстройствах нервной системы, вплоть до развития паралича со смертельным исходом [Kwong T.C. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. // Ther. Drug. Monit., 2002, V.24 (1), p.144-149]. Также ФОС являются сильными мутагенами, вызывающими появление множественных хромосомных aberrаций и развитию канцерогенеза [Hong M.S., Hong S.J., Barhoumi R., Burghardt R.C., Donnelly K.C., Wild J.R., Venkatraj V., Tiffany-Castiglioni E., Neurotoxicity induced in differentiated SK-N-SH-SY5Y human neuroblastoma cells by organophosphorus compounds. // Toxic. Appl. Pharmac., 2003, V.186 (2), p.110-118; Webster L.R., McKenzie G.H., Moriarty H.T., Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. // Cancer Genetics Cytogen., 2002, V.133, p.112-117]. В связи с этим эффективные и неагрессивные для человека и окружающей среды способы элиминирования угрозы любых контактов с ФОС представляют собой большой практический интерес.

Органофосфатгидролаза (OPH) (арилдиалкилфосфатаза, параоксоназа, фосфотриэстераза, ЕС 3.1.8.1) - фермент, катализирующий гидролиз P-O, P-F и P-S связей в триэфирах фосфорной кислоты [Ефременко Е.Н., Сергеева В.С. Органофосфатгидролаза - фермент, катализирующий деградацию фосфорсодержащих отравляющих веществ и пестицидов. // Известия АН Сер. Хим., 2001, С.1743-1749].

Принципиальная схема реакции, катализируемой OPH, выглядит следующим образом.



где X = O, S и F (R³ в этом случае отсутствует)

Y = O, S

Скорости ферментативного гидролиза ряда ФОС в 10-100 раз выше химического щелочного гидролиза, а продукты гидролиза либо не токсичны, либо относятся к существенно менее токсичному классу соединений. Поскольку ФОС преимущественно

накапливаются в сточных промышленных и сельскохозяйственных водах, то наибольший интерес привлекают системы, в которых ФОС могут разлагаться непосредственно в протоке.

Для получения стабильной формы ОРН, которая может быть использована многократно для гидролиза ФОС, проводят иммобилизацию фермента различными способами.

Одной из главных характеристик любого способа получения биокатализатора на основе иммобилизованного фермента является количество белка, которое может быть иммобилизовано на единице носителя (на 1 г, мл, см²).

Основной характеристикой любого иммобилизованного фермента является его удельная каталитическая активность (ед/мг иммобилизованного белка). За единицу ферментативной активности принимают количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 мкмоль субстрата за одну минуту при 25°C.

Сравнение активности ферментов, гидролизующих ФОС и иммобилизованных разными способами, как правило, проводится по параоксону как самому широко распространенному субстрату, определение продуктов гидролиза которого легко осуществимо спектрофотометрическим методом ($\lambda=405$ нм).

Определение отношения каталитической константы (k_{cat}) к константе Михаэлиса (K_m), отражающей сродство фермента к субстрату, проводится для установления каталитической эффективности действия биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов.

Период полуинактивации - это период времени, в течение которого иммобилизованный фермент теряет 50% своей исходной каталитической активности, является одной из важнейших характеристик биокатализаторов, и, как правило, определяется для условий его хранения и эксплуатации.

Эти основные характеристики способов получения биокатализаторов и самих биокатализаторов используются для их сравнительного анализа.

Известен способ получения биокатализатора для гидролиза ФОС на основе ОРН, иммобилизованной методом физической адсорбции на трифенилметилагарозе [Caldwell S.R., Raushel F.M. Detoxification of organophosphate pesticides using an immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. // Biotechnol. Bioeng., 1991, V.37, p.103-109], согласно которому к 2 мл суспензии трифенилметилагарозы в 125 мМ CHES-буфере (pH 9,0) добавляют предварительно очищенный препарат ОРН и аккуратно, чтобы не повредить носитель, перемешивают в течение как минимум 10 мин. После этого суспензию помещают в колонный реактор и промывают 30 мл 125 мМ CHES-буфера (pH 9,0). Общее время получения биокатализатора составляет 70 мин, способ позволяет максимально ввести 1,84 мг белка/мл носителя. Использование такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 11,5 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 585,7 л/ч·м²) и концентрации субстрата 0,17 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая, согласно расчетам, сделанным на основе данных, приводимых авторами способа, составляет 6,30 ед/мг белка. Период полуинактивации этого биокатализатора при его использовании для детоксикации ФОС в проточной системе составляет 95 мин при 55°C.

Несмотря на простоту иммобилизации фермента методом адсорбции, сам способ обладает рядом существенных недостатков, которые заключаются в том, что адсорбированный фермент быстро смывается с поверхности носителя, а сам носитель, по признанию авторов, принципиально не может быть использован при скоростях потока выше 70 мл/ч из-за его деформации, к тому же носитель дорог и его применение на практике, согласно экономическим расчетам авторов, не целесообразно. К тому же высокое сродство носителя к гидрофобному субстрату, обнаруженное авторами этого способа, приводит к тому, что большая часть субстрата связывается с носителем и остается не гидролизованной.

Существует ряд способов получения биокатализаторов для гидролиза ФОС в проточных системах, основанных на ковалентной иммобилизации ОРН на различных носителях.

Известен способ получения биокатализатора путем иммобилизации ОРН на поверхности гранул пористого стекла (70-400 мкм в диаметре), которую предварительно этерифицируют

при 0°C в течение 2-3 ч и последовательно обрабатывают гидразином и азотистой кислотой (в течение 1-1,5 ч) с целью получения азидных групп на поверхности стекла.

Иммобилизацию белка проводят также при 0°C в течение 30 мин [Munnecke D. Properties of an immobilized pesticide-hydrolyzing enzyme. // Appl. Environ. Microbiol., 1977,

- 5 V.33 (3), p.503-507]. Общее время получения биокатализатора составляет 210-300 мин. Способ позволяет вводить до 0,19 мг белка на 1 г носителя. Использование такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 210 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 1190 л/ч·м²) и концентрации субстрата 21 мкМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая, согласно
10 расчетам, сделанным на основе данных, приводимых авторами способа, составляет 0,92 ед/мг белка. Период полуинактивации этого биокатализатора при его использовании для детоксикации ФОС в периодических и непрерывных условиях в проточной системе составляет соответственно 38 и 280 сут.

- Этот способ получения и биокатализатор обладают рядом существенных недостатков, основными из которых являются крайне низкое количество иммобилизуемого белка и, как
15 следствие, очень низкая активность биокатализатора.

- Известен способ, который предлагает использование для иммобилизации ОРН носителя в виде нейлоновой трубки длиной 3 м и внутренним диаметром 1,6 мм (таким образом, рабочий объем реактора - 6,03 см³), внутреннюю поверхность которой активируют
20 глутаровым альдегидом (12,5% раствор в 0,1 М боратном буфере, pH 8,5) при 0°C в течение 30 мин и далее промывают 50 мл того же буфера в течение 30 мин [Caldwell S.R., Raushel F.M., Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based Immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. // Appl. Biochem. Biotechnol., 1991, V.37, p.59-72]. Иммобилизацию фермента осуществляют путем
25 пропускания раствора частично очищенного препарата ОРН (степень чистоты не указана) в замкнутом цикле через носитель со скоростью 2,5 мл/мин при 0°C в течение 4 ч. Далее носитель отмывают 150 мл раствора 50 мМ триэтаноламина (pH 9,0). Общее время получения биокатализатора составляет 470 мин, способ позволяет максимально ввести 0,036 мг белка/мл носителя. Использование такого биокатализатора в проточном реакторе
30 для гидролиза ФОС при скорости потока 210 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 1857 л/ч·м²) и концентрации субстрата 2 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая согласно расчетам, сделанным на основе данных, приводимых авторами способа, составляет 12,0 ед/мг белка. Период полуинактивации этого биокатализатора при его использовании для детоксикации ФОС не известен и из-за
35 недостатка данных, приводимых авторами, не может быть определен.

- Несмотря на достаточно высокую активность биокатализатора, получаемого согласно этому способу, сам способ характеризуется существенными недостатками, не позволяющими использовать его на практике: необходимо применение высокотоксичного сшивающего агента для активации носителя в виде растворов достаточно высокой
40 концентрации (12,5%); процедура получения биокатализатора длительна и необходимо соблюдение постоянного низкотемпературного режима проведения процесса (0°C); ковалентная иммобилизация фермента приводит к существенной его инактивации (каталитическая эффективность действия фермента снижается в 160 раз в результате иммобилизации по сравнению с растворимой формой) и делает невозможной регенерацию
45 биокатализатора.

- Существует ряд способов получения биокатализаторов для детоксикации ФОС в проточной системе, основанных на иммобилизации ОРН за счет аффинных взаимодействий между носителем и генетически модифицированным ферментом, при этом генетическая модификация ОРН заключается во введении в структуру молекулы белка
50 дополнительных аминокислотных последовательностей, через которые реализуется специфическая связь белка с носителем. Поскольку после генетической модификации белок имеет полную аминокислотную последовательность, отличную от аминокислотной последовательности ОРН, то принято называть такой белок не ОРН, а полипептидом со

свойствами OPH.

Известен способ получения биокатализатора на основе иммобилизованного на CF11-целлюлозе полипептида со свойствами OPH, содержащего целлюлозосвязывающий домен на N-конце молекулы белка (CBD-OPH) [Richins R. D., Mulchandani A., Chen W.

- 5 Expression, immobilization and enzymatic characterization of cellulose-binding domain-organophosphorus hydrolase fusion enzymes. // Biotech. & Bioeng., 2000, V.69 (6), p.591-596]. Согласно этому способу 30 мл целлюлозной матрицы промывают 60 мл 50 мМ фосфатно-цитратного буфера (pH 8,0), содержащего 100 мкМ CoCl₂, 50 мМ NaCl и 0,1% Triton-X100, после чего инкубируют носитель с CBD-OPH в течение 30-60 мин при
- 10 комнатной температуре при перемешивании на горизонтальном шейкере при 60 об/мин в том же буфере. Далее отмывают носитель от несвязавшегося фермента тем же буфером (120 мл). К биокатализатору добавляют азид натрия до концентрации 0,02%, чтобы предотвратить его микробную контаминацию. Общее время получения биокатализатора составляет 270 мин, способ позволяет максимально ввести 0,5 мг белка/мл носителя.
- 15 Использование такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 100 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 1273 л/ч·м²) и концентрации субстрата 2 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая согласно расчетам, сделанным на основе данных, приводимых авторами способа, составляет 3,0 ед/мг белка. Период полуинактивации этого биокатализатора при его
- 20 использовании для детоксикации ФОС согласно данным авторов составляет 100 сут.

Несмотря на простоту способа иммобилизации, биокатализатор не может быть использован на практике, так как носитель подвержен микробной биodeградации и требует постоянного дополнительного введения в проточный реактор антимикробных веществ, которые необходимо вводить в состав вод, содержащих ФОС и подлежащих обработке. К

25 тому же часть ФОС сорбируется целлюлозным носителем, а при скорости потока выше 100 мл/ч происходит деформация носителя, и эффективность действия биокатализатора снижается.

- Согласно другому способу получения биокатализатора для детоксикации ФОС в проточных системах осуществляется иммобилизация полипептида со свойствами OPH, представляющего собой OPH, у которой на N-конец белковой молекулы генетически
- 30 введены и последовательно соединены гексагистидиновая последовательность (His₆), зеленый флуоресцирующий белок (GFP) и энтерокиназный сайт рестрикции (ЕК). Сокращенно этот полипептид обозначается как His₆-GFP-EK-OPH [Wu C.-F., Cha H.J., Valdes J.J., Bentley W.E. GFP-visualized immobilized enzymes: degradation of paraoxon by organophosphorus hydrolase in a packed column. // Biotechn. & Bioeng., 2002, V.77 (2),
- 35 p.212-218]. В качестве носителя используется HiTrap, представляющий собой 6%-ную агарозу, обработанную высокими концентрациями сшивающего агента (тип агента не указан). Поверхность носителя активируется остатками иминодиуксусной кислоты, далее через 1 мл HiTrap пропускают 0,5 мл 0,1 М раствор сульфата никеля, после чего носитель промывают 5 мл дистиллированной воды и уравнивают 20 мМ Na-
- 40 фосфатным буфером, содержащим 500 мМ NaCl и 0,5 мМ имидазола (pH 8,5). На носитель наносят препарат белка, прокачивая раствор His₆-GFP-EK-OPH (200 мл) через колонку с носителем со скоростью 2 мл/мин, после чего носитель промывают 10 мл того же буфера. Общее время получения биокатализатора составляет 105-110 мин, способ позволяет максимально ввести 0,284 мг белка/мл носителя. Использование такого биокатализатора в
- 45 проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 120 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 1528 л/ч·м²) и концентрации субстрата 0,05 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая согласно расчетам, сделанным на основе данных, приводимых авторами способа, составляет 0,059 ед/мг белка. Период полуинактивации этого биокатализатора при его использовании для детоксикации ФОС не
- 50 известен и из-за недостатка данных, приводимых авторами, не может быть определен.

Подход, лежащий в основе этого способа иммобилизации фермента на носителе, состоит в образовании множественных координационных связей между заряженной ионами металлов поверхностью носителя, активированной металл-хелатирующими лигандами, и

атомами азота имидазольных колец в полигистидиновой последовательности полипептида His₆-GFP-EK-ORN. Такая иммобилизация фермента за счет координационных связей имеет ряд существенных преимуществ перед физической и ковалентной иммобилизацией, так как, с одной стороны, гарантирует высокую прочность связи фермента с носителем без применения сшивающих агентов, а с другой - сохраняет возможность регенерации биокатализатора за счет мягкого удаления инактивированного белка с поверхности носителя при его обработке имидазолом и последующим нанесением новой порции активного фермента.

Несмотря на очевидные преимущества этого подхода к получению биокатализаторов известный способ и биокатализатор обладают рядом недостатков, исключающих возможность их использования на практике: способ позволяет иммобилизовать только очень низкие концентрации белка, и, как следствие этого, биокатализатор обладает крайне низкой активностью и способен эффективно гидролизовать лишь невысокие концентрации ФОС (0,05 мМ). Скорости потока, при которых действие биокатализатора остается эффективным, не превышают 100 мл/ч, что в 5-8 раз ниже тех, которые требуются на практике в проточных системах для детоксикации ФОС в составе речных, сточных вод и т.д. Следует отметить также, что согласно характеристикам самого носителя, максимальная скорость потока, при которой он может быть использован, составляет всего 240 мл/ч, дальнейшее увеличение скорости потока приводит к его разрушению.

Данное техническое решение, как наиболее близкое к заявляемому по способу получения биокатализатора для гидролиза ФОС в проточных системах за счет координационной иммобилизации полипептида со свойствами ORN на пористом носителе, поверхность которого модифицирована металл-хелатирующими лигандами, принято за прототип.

Задачей предлагаемого изобретения является получение на основе иммобилизованного полипептида со свойствами ORN эффективного биокатализатора, предназначенного для гидролиза ФОС в проточных системах.

Поставленная задача решается тем, что на пористом носителе, представляющем собой криогель синтетического полимера взятого из ряда полиакриламид и его аналоги, полученные при полимеризации мономеров, представляющих собой различные производные акриламида (например, поли-N,N-диметилакриламид, полиоксиэтилметакрилат, поли-N,N-изопропилакриламид, поли-2-оксиэтилпропилакриламид), поверхность которого модифицирована металл-хелатирующими лигандами и заряжена ионами двухвалентных металлов, иммобилизуют полипептид, содержащий полигистидиновую последовательность и проявляющий активность органوفосфатгидролазы, путем пропускания его раствора через объем носителя с последующей отмывкой носителя от несвязавшегося белка.

Заявляемый способ предлагает в качестве носителей для иммобилизации белка использовать криогели синтетических полимеров [Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Plieva F.M., Savina I.N., Jungvid H., Mattiasson B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. // Trends Biotechnol., 2003, V.21, p.445-451], которые получают в результате структурирования полимеров или полимеризации мономеров при низких температурах. Замораживание растворов полимеров или мономеров с добавлением сшивающих агентов позволяет получить монолит с трехмерной структурой, для которой характерно наличие большого количества пор размером 10-100 мкм, которые превышают размеры пор, образующиеся при обычной полимеризации [Plieva F.M., Savina I.N., Deraz S., Andersson J., Galaev I.Yu., Mattiasson B., Characterization of supermacroporous monolithic polyacrylamide based matrices designed for chromatography of bioparticles. // J.Chromatog. B, 2004, V.807 (1), p.129-137]. При этом носитель представляет собой единый монолит, а не отдельные гранулы, что снижает диффузионные проблемы при использовании носителя в колоночном реакторе. Большой размер пор, с одной стороны, позволяет увеличивать скорость потока жидкости через носитель, а с другой - образует значительную поверхность, достаточную для модификации лигандами и

необходимую для проведения эффективной иммобилизации белков. Поверхность криогелей полимеров легко модифицируется с помощью различных металл-хелатирующих лигандов (иминодиуксусной кислотой, IDA; N,N,N'-трис-(карбоксиметил)-этилендиамином, TED; нитрилотриуксусной кислотой, NTA), которые могут быть «заряжены» различными ионами металлов [Efremenko E., Votchitseva Yu., Plieva F., Galaev I., Mattiasson B. Purification of His₆-organophosphate hydrolase using monolithic supermacroporous polyacrylamide cryogels developed for immobilized metal affinity chromatography. // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, V.70 (5), p.558-563]. Большой размер пор в структуре криогелей полимеров обеспечивает использование клеточных экстрактов, содержащих целевые белки для непосредственного нанесения на носитель и проведения иммобилизации белка без дополнительных стадий очистки [Arvidsson P., Plieva F.M., Lozinsky V.I., Galaev I.Yu., Mattiasson B. Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent. // J. Chromatog. A, 2003, V.986, p.275-290]. За счет высокоселективного взаимодействия носителя с белком, содержащим полигистидиновую последовательность, возможно одновременно проводить выделение, очистку и иммобилизацию целевого белка.

Использование полипептида, содержащего полигистидиновую последовательность на N-или C-конце молекулы и проявляющего свойства ОРН, при этом не содержащего дополнительных аминокислотных последовательностей между самим белком (ОРН) и вводимой аффинной последовательностью, гарантирует широкий рН-профиль каталитической активности иммобилизуемого фермента и его широкую субстратную специфичность [Вотчицева Ю.А., Ефременко Е.Н., Алиев Т.К., Варфоломеев С.Д. Свойства гексагистидинсодержащей органофосфатгидролазы. // Биохимия, 2006, Т.71 (2), с.216-222; Гудков Д.А., Вотчицева Ю.А., Ефременко Е.Н. Гидролиз параоксона, катализируемый органофосфатгидролазой, содержащей полигистидиновую последовательность на C-конце молекулы белка. // Вестник МГУ, сер. Химия, 2006, Т.47 (1), с.15-19].

Заявляемый способ получения биокатализатора на основе иммобилизованной ОРН осуществляется следующим образом: на пористом носителе, представляющем собой криогель полимера, полученного при полимеризации мономеров, представляющих собой различные производные акриламида (например, поли-N,N-диметилакриламид, полиоксиэтилметакрилат, поли-N,N-изопропилакриламид, поли-2-оксиэтилпропилакриламид), поверхность которого модифицирована металл-хелатирующими лигандами и заряжена ионами двухвалентных металлов, иммобилизуют полипептид, содержащий полигистидиновую последовательность и проявляющий активность органофосфатгидролазы, путем пропускания его раствора через объем носителя и последующей отмывки не связавшегося белка таким образом, что конечная концентрация компонентов в биокатализаторе составляют (мас.% по сух. веществам):

Белок	до 0,25
Нерастворимый носитель	6,0-20,0
Вода (буферный раствор)	Остальное до 100%.

Общее время получения биокатализатора составляет не более 20 мин, способ позволяет вводить до 2,5 мг белка/мл носителя. Использование такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 720 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 9167 л/ч.м²) и концентрации субстрата 2 мМ обеспечивает максимальную активность биокатализатора, которая составляет 48,5 ед/мг иммобилизованного белка. Способ позволяет совместить процесс выделения, очистки и иммобилизации целевого белка на носителе.

Способ получения биокатализатора значительно стабилизирует фермент и позволяет осуществлять высушивание и регидратацию препарата иммобилизованного фермента с сохранением его каталитической активности до 94%, а также длительно хранить его. Это новое свойство (высушивание и регидратация), являющееся существенным отличием биокатализатора, предлагаемого в данном изобретении, от известных аналогов, является результатом комбинирования его компонентов, которое ранее известно не было.

Вторым объектом изобретения является биокатализатор на основе иммобилизованного полипептида с активностью ОРН, который предназначен для детоксикации ФОС в проточных системах, получен по заявляемому способу, и катализирующий гидролиз фосфорорганических соединений в интервале рН 6,5-12,5 и при температуре до 65°C, характеризующийся тем, что обладает высокой стабильностью (период полуинактивации при эксплуатации до 175 сут и при хранении - до 570 сут).

Существенными техническими результатами заявляемого изобретения является высокая концентрация иммобилизованного белка в расчете на 1 мл носителя и высокая каталитическая активность иммобилизованного белка, непродолжительность процесса получения биокатализатора, возможность регенерации биокатализатора (как минимум 20 раз), длительная его эксплуатация для детоксикации ФОС в проточных системах (период полуинактивации до 175 сут) и высокая стабильность при хранении (период полуинактивации до 570 сут).

Ниже приводятся конкретные примеры реализации заявляемого технического решения.

Пример 1. Получение биокатализатора на основе иммобилизованного полипептида, содержащего гексагистидиновую последовательность (His₆) на N-конце белка и проявляющего активность ОРН (His₆-ОРН), при использовании криогеля полиакриламида в качестве нерастворимого носителя

Через криогель полиакриламида (5 мл), поверхность которого модифицирована остатками иминодиуксусной кислоты в качестве металл-хелатирующего лиганда, пропускают 5 мл 0,1 М раствора ионов Co²⁺ со скоростью 300 мл/ч, чтобы зарядить носитель ионами металла, после чего носитель промывают 15 мл 50 мМ К-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащего 300 мМ NaCl, со скоростью 300 мл/ч. Далее через носитель пропускают раствор, содержащий очищенный фермент His₆-ОРН (1 мг/мл) в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 300 мМ NaCl, со скоростью 180 мл/ч. Отмывают носитель от несвязавшегося белка тем же буфером (10 мл), дополнительно содержащим 10 мМ имидазола, со скоростью 180 мл/ч. Общее время получения биокатализатора составляет 15 мин. Таким образом, состав полученного биокатализатора следующий (мас. % по сух. веществам): белок - 0,2%, носитель - 10%, буферный раствор - остальное до 100%. Способ позволяет ввести 2 мг белка/мл носителя. Использование такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 720 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 9167 л/ч.м²) и концентрации субстрата 2 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая составляет 48,5 ед/мг белка. Период полуинактивации биокатализатора при его использовании в этих условиях составляет 175 сут.

Биокатализатор с иммобилизованным ферментом может быть высушен под вакуумом (1 мБар) при 25°C в течение 24 ч до остаточной влажности 4%. Период полуинактивации биокатализатора при хранении во влажном и высушенном состоянии при 4°C составляет соответственно 420 и 570 сут.

Пример 2. Получение биокатализатора на основе иммобилизованного полипептида, содержащего гексагистидиновую последовательность (His₆) на С-конце белка и проявляющего активность ОРН (ОРН-His₆), при использовании криогеля полиоксиптилметакрилата в качестве нерастворимого носителя.

Через криогель полиоксигтилметакрилата (5 мл), поверхность которого модифицирована остатками N,N,N'-трис-(карбоксиметил)-этилендиамина в качестве металл-хелатирующего лиганда, пропускают 5 мл 0,1 М раствора ионов Ni²⁺ со скоростью 300 мл/ч, чтобы зарядить носитель ионами металла, после чего носитель промывают 15 мл 50 мМ К-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащим 300 мМ NaCl, со скоростью 300 мл/ч. Далее через носитель со скоростью 180 мл/ч пропускают клеточный гомогенат, который получают после дезинтеграции клеток E.coli, являющихся продуцентами ОРН-His₆, в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 300 мМ NaCl, и который содержит 1 мг/мл целевого фермента. Отмывают носитель от несвязавшегося белка тем же буфером (10 мл), дополнительно содержащим 10 мМ имидазола, со скоростью 180 мл/ч. Общее время получения биокатализатора составляет 20 мин. Таким образом, состав полученного

биокатализатора следующий (мас.% по сух. веществам): белок - 0,2%, носитель - 12%,
буферный раствор - остальное до 100%. Способ позволяет ввести 2 мг белка/мл носителя.
Использование такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при
скорости потока 480 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 6111 л/ч.м²) и концентрации
субстрата 0,5 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента,
которая составляет 30 ед/мг белка. Период полуинактивации биокатализатора при его
использовании в этих условиях составляет 162 сут.

Биокатализатор с иммобилизованным ферментом может быть высушен, как указано в
Примере 1. Период полуинактивации биокатализатора при его хранении во влажном и
высушенном состоянии при 4°C составляет соответственно 410 и 520 сут.

Пример 3. Получение биокатализатора на основе иммобилизованного полипептида,
содержащего двенадцатигистициновую последовательность (His₁₂) на N-конце белка и
проявляющего активность ОРН (His₁₂-ОРН), при использовании криогеля поли-N,N-
диметилакриламида в качестве нерастворимого носителя.

Через криогель поли-N,N-диметилакриламида (5 мл), поверхность которого
модифицирована остатками нитрилтриуксусной кислоты в качестве металл-
хелатирующего лиганда, пропускают 5 мл 0,1 М раствора ионов Cu²⁺ со скоростью 300
мл/ч, чтобы зарядить носитель ионами металла, после чего носитель промывают 15 мл 50
мМ К-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащим 300 мМ NaCl, со скоростью 300 мл/ч. Далее
через носитель со скоростью 180 мл/ч пропускают супернатант с концентрацией His₁₂-ОРН
1 мг/мл, полученный после дезинтеграции клеток E.coli, являющихся продуцентами
His₁₂-ОРН, в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 300 мМ NaCl, и
последующего центрифугирования полученного гомогената (20 мин, 10000 g). Отмывают
носитель от несвязавшегося белка тем же буфером (10 мл), дополнительно содержащим 10
мМ имидазола, со скоростью 180 мл/ч. Общее время получения биокатализатора
составляет 20 мин. Таким образом, состав полученного биокатализатора следующий
(мас.% по сух. веществам): белок - 0,25%, носитель - 20%, буферный раствор -
остальное до 100%. Способ позволяет ввести 2,5 мг белка/мл носителя. Использование
такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока
500 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 6366 л/ч.м²) и концентрации субстрата 1 мМ
обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая
составляет 20 ед/мг белка. Период полуинактивации биокатализатора при его
использовании в этих условиях составляет 165 сут.

Биокатализатор с иммобилизованным ферментом может быть высушен, как указано в
Примере 1. Период полуинактивации биокатализатора при хранении во влажном и
высушенном состоянии при 4°C составляет соответственно 360 и 500 сут.

Пример 4. Получение биокатализатора на основе иммобилизованного полипептида,
содержащего гексагистициновую последовательность (His₆) на N-конце белка и
проявляющего активность ОРН (His₆-ОРН), при использовании криогеля поли-N,N-
изопропилакриламида в качестве нерастворимого носителя.

Через криогель поли-N,N-изопропилакриламида (5 мл), поверхность которого
модифицирована остатками иминодиуксусной кислоты в качестве металл-хелатирующего
лиганда, пропускают 5 мл 0,1 М раствора ионов Co²⁺ со скоростью 300 мл/ч, чтобы
зарядить носитель ионами металла, после чего носитель промывают 15 мл 50 мМ К-
фосфатного буфера (рН 7,5), содержащим 300 мМ NaCl, со скоростью 300 мл/ч. Далее
через носитель со скоростью 180 мл/ч пропускают супернатант с концентрацией His₆-ОРН 1
мг/мл, полученный после дезинтеграции клеток E.coli, являющихся продуцентами His₆-ОРН,
в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 300 мМ NaCl, и последующего
центрифугирования полученного гомогената (20 мин, 10000 g). Отмывают носитель от
несвязавшегося белка тем же буфером (10 мл), дополнительно содержащим 10 мМ
имидазола, со скоростью 180 мл/ч. Общее время получения биокатализатора составляет 20
мин. Таким образом, состав полученного биокатализатора следующий (мас.% по сух.
веществам): белок - 0,21%, носитель - 6%, буферный раствор - остальное до 100%.
Способ позволяет ввести 2,1 мг белка/мл носителя. Использование такого

биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 630 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 8021 л/ч·м²) и концентрации субстрата 1,2 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая составляет 36 ед/мг белка. Период полуинактивации биокатализатора при его
5 использовании в этих условиях составляет 160 сут.

Биокатализатор с иммобилизованным ферментом может быть высушен, как указано в Примере 1. Период полуинактивации биокатализатора при хранении во влажном и высушенном состоянии при 4°C составляет соответственно 410 и 500 сут.

Пример 5. Получение биокатализатора на основе иммобилизованного полипептида, содержащего гексагистидиновую последовательность (His₆) на N-конце белка и проявляющего активность ОРН (His₆-ОРН), при использовании криогеля поли-2-оксиэтилпропилакриламида в качестве нерастворимого носителя.

Через криогель поли-2-оксиэтилпропилакриламида (5 мл), поверхность которого модифицирована остатками иминодиуксусной кислоты в качестве металл-хелатирующего
15 лиганда, пропускают 5 мл 0,1 М раствора ионов Cu²⁺ со скоростью 300 мл/ч, чтобы зарядить носитель ионами металла, после чего носитель промывают 15 мл 50 мМ К-фосфатного буфера (рН 7,5), содержащим 300 мМ NaCl, со скоростью 300 мл/ч. Далее через носитель со скоростью 180 мл/ч пропускают супернатант с концентрацией His₆-ОРН 1 мг/мл, полученный после дезинтеграции клеток E.coli, являющихся продуцентами His₆-ОРН,
20 в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 7,5), содержащем 300 мМ NaCl, и последующего центрифугирования полученного гомогената (20 мин, 10000 g). Отмывают носитель от несвязавшегося белка тем же буфером (10 мл), дополнительно содержащим 10 мМ имидазола, со скоростью 180 мл/ч. Общее время получения биокатализатора составляет 20 мин. Таким образом, состав полученного биокатализатора следующий (мас.% по сух.
25 веществам): белок - 0,24%, носитель - 12%, буферный раствор - остальное до 100%. Способ позволяет ввести 2,4 мг белка/мл носителя. Использование такого биокатализатора в проточном реакторе для гидролиза ФОС при скорости потока 480 мл/ч (удельная нагрузка на носитель 6111 л/ч·м²) и концентрации субстрата 1 мМ обеспечивает максимальную активность иммобилизованного фермента, которая составляет 27 ед/мг
30 белка. Период полуинактивации биокатализатора при его использовании в этих условиях составляет 156 сут.

Биокатализатор с иммобилизованным ферментом может быть высушен, как указано в Примере 1. Период полуинактивации биокатализатора при хранении во влажном и высушенном состоянии при 4°C составляет соответственно 400 и 510 сут.

Пример 6. Свойства биокатализатора, полученного согласно заявляемому способу.

Константы каталитической эффективности действия биокатализатора, полученного, согласно заявляемому способу, представлены в Таблице 1. Биокатализатор способен осуществлять высокоэффективный гидролиз различных ФОС.

На Фиг.1 представлены рН-зависимость каталитической активности биокатализатора, полученного на основе иммобилизации полипептидов со свойствами ОРН с генетически
40 введенными полигистидиновыми последовательностями различной длины. Диапазон рН, при котором полученный биокатализатор проявляет высокую каталитическую активность, практически не зависит от того, какой длины полигистидиновая последовательность присутствует в структуре белка.

На Фиг.2 приведена зависимость активности полученного биокатализатора от температуры, а на Фиг.3 приведена зависимость остаточной активности биокатализатора от температур, при воздействии которых на биокатализатор проводилась его термоинактивация. Данные подтверждают высокую стабильность биокатализатора вне зависимости от исходных условий его получения.

На Фиг.4 приведена зависимость степени конверсии субстрата от скорости потока, которая свидетельствует о том, что в широком интервале скоростей потока наблюдается постоянная высокая степень гидролиза субстрата под действием биокатализатора, полученного согласно заявляемому способу.

На Фиг.5 показана пористая структура макропористого биокатализатора, получаемого

согласно заявляемому способу. Имеющийся у носителя размер пор, с одной стороны, не создает диффузионных ограничений потоку субстрата, а с другой - обладает достаточно высокой площадью внутренней поверхности, чтобы связывать большое количество белка.

На Фиг.6 приведены фотографии, иллюстрирующие процесс высушивания и последующую регидратацию биокатализатора. Данные операции приводят к 7-8% потерям активности биокатализатора (Таблица 2).

На Фиг.7 показана операционная стабильность биокатализатора при его использовании для дстоксикации ФОС в проточной системе, свидетельствующая о том, что биокатализатор, полученный согласно заявляемому способу, может быть использован для гидролиза ФОС не менее 6 мес.

На Фиг.8 и 9 приведены данные, иллюстрирующие высокую стабильность биокатализаторов, полученных согласно заявляемому способу, при их хранении в сухом и влажном состоянии.

В Таблице 3 и Таблице 4 приведены данные, иллюстрирующие возможность многократного использования носителя путем его регенерации за счет повторного нанесения активного белка без замены металла, а также с его заменой и последующим повторным нанесением белка.

Таким образом, предлагаемое изобретение по сравнению с прототипом обладает рядом существенных преимуществ.

- Способ получения биокатализатора позволяет увеличить концентрацию иммобилизованного белка на единице носителя (мг/мл) в 1,25-8,8 раз (Примеры 1-5).

- Биокатализатор, полученный согласно заявляемому способу, имеет каталитическую активность в 1,7-822 раз выше по сравнению с прототипом (Примеры 1-3).

- Применение разнообразных макропористых криогелей (Примеры 1-5) позволяет использовать высокие скорости протока (до 720 мл/ч).

- Способ получения биокатализатора позволяет проводить его высушивание без значительных потерь активности (Пример 6), что существенно расширяет возможности применения биокатализатора и является новым свойством биокатализатора, отличающим его от всех известных аналогов и прототипа.

- Высокая стабильность как самих используемых криогелей, так и иммобилизованных на них ферментов позволяет длительно хранить и использовать полученный биокатализатор (Примеры 1-6). Период полуинактивации биокатализатора при эксплуатации в 1,75-4,6 раз больше, чем у известных аналогов и прототипа.

- Способ получения биокатализатора (Примеры 2-5) позволяет получать биокатализатор путем иммобилизации полипептида со свойствами ОРН на носителе без какой-либо его предварительной очистки, в частности непосредственно из клеточного гомогената, полученного после дезинтеграции биомассы клеток, что является невозможным для всех известных аналогов и прототипа.

- Способ получения биокатализатора (Пример 6) позволяет проводить быструю и простую в исполнении, многократную (как минимум 20 раз) реактивацию биокатализатора.

Таблица 1

Каталитическая эффективность действия биокатализаторов, полученных по заявляемому способу (Примеры 1-3), при гидролизе различных субстратов в 0,1 М карбонатном буфере, pH 10,5 и температуре 25°C.

Биокатализатор	$k_{cat}^{эфф}/K_m^{эфф}, M^{-1}c^{-1}$		
	Параоксон	Паратион	Метил-паратион
Пример 1	$2,7 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^5$	$6,9 \cdot 10^4$
Пример 2	$4,3 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^4$
Пример 3	$9,1 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^4$

Таблица 2

Активность биокатализаторов, полученных согласно заявляемому способу, до и после процедуры высушивания и последующей регидратации. Условия определения активности: 1 mM параоксон, 50 mM фосфатный буфер, pH 7,5, 25°C, скорость протока 360 мл/ч.

Характеристики биокатализатора	Пример 1	Пример 2	Пример 3
Активность биокатализатора, ед/мг			
- до высушивания	48,0	30,0	20,0
- после высушивания и регидратации	45,1	28,0	18,4
Остаточная активность, %	94	93,3	92,0

Таблица 3

Количество иммобилизуемого белка (мг/мл) на носителе при проведении регенерации биокатализатора, полученного по заявляемому способу, без дополнительной зарядки носителя ионами металла.

Биокатализатор	1-ая регенерация	2-ая регенерация	3-я регенерация	4-ая регенерация
Пример 1	2,00	2,00	2,00	1,5
Пример 2	2,00	1,98	1,95	1,78
Пример 3	2,49	2,44	2,42	2,10

Таблица 4

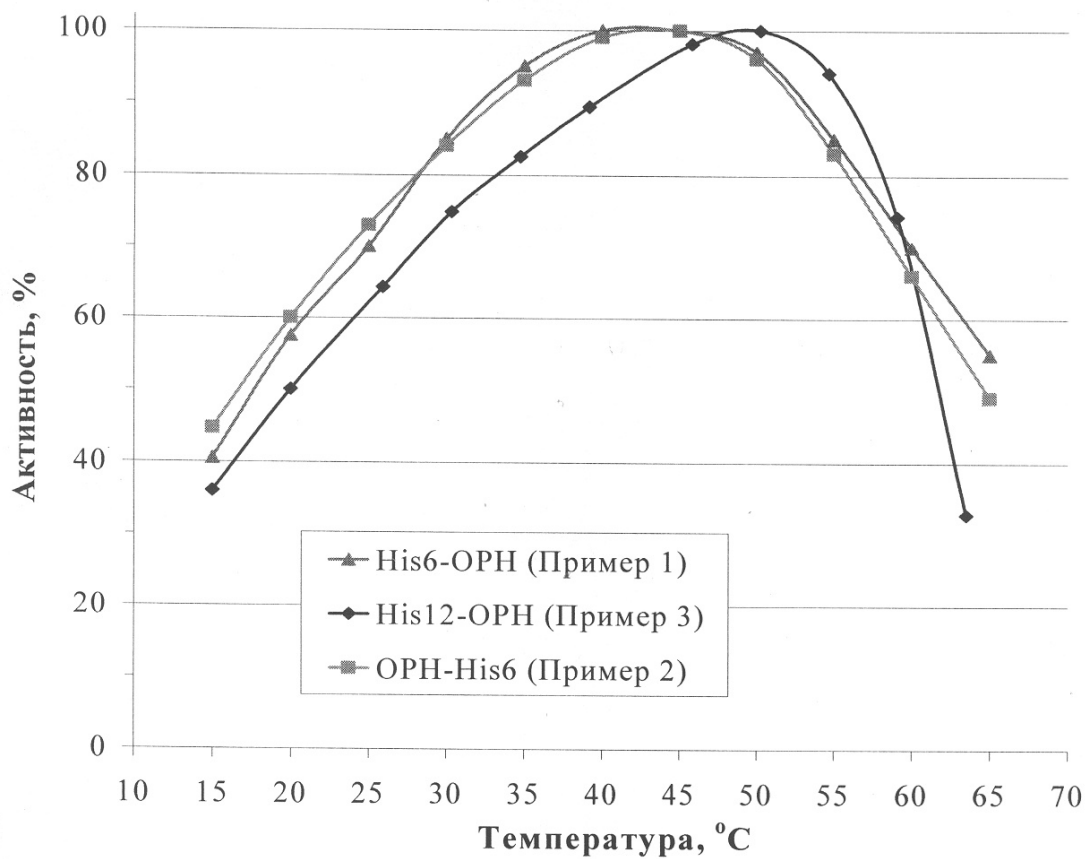
Количество иммобилизуемого белка (мг/мл) на носителе при проведении регенерации биокатализатора, полученного по заявляемому способу, после предварительного элюирования ионов металла с носителя 20 мМ раствором ЭДТА и проведением новой зарядки носителя ионами металла.

Биокатализатор	1-ая регенерация	2-ая регенерация	15-ая регенерация	20-ая регенерация
Пример 1	2,00	2,00	2,00	1,90
Пример 2	2,00	2,00	1,96	1,82
Пример 3	2,49	2,44	2,44	2,34

Формула изобретения

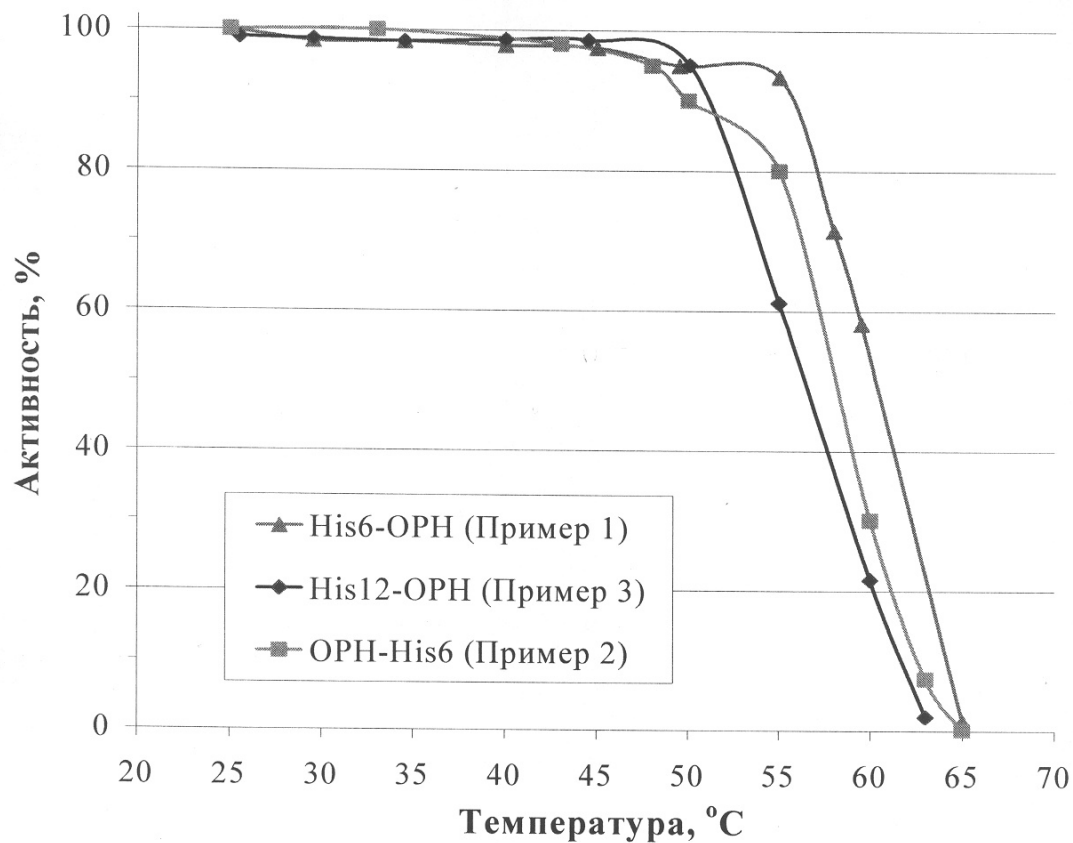
1. Способ получения биокатализатора для детоксикации фосфорорганических соединений в проточных системах, отличающийся тем, что на пористом носителе, представляющем собой криогель полимера, полученного при полимеризации мономеров, представляющих собой акриламид или его производные, поверхность которого модифицирована металл-хелатирующими лигандами и заряжена ионами двухвалентных металлов, иммобилизуют полипептид, содержащий полигистидиновую последовательность и проявляющий активность органофосфатгидролазы, путем пропускания его раствора через объем носителя.

2. Биокатализатор для детоксикации фосфорорганических соединений в проточных системах на основе иммобилизованного полипептида, содержащего полигистидиновую последовательность и проявляющего свойства органофосфатгидролазы, полученный способом по п. 1.



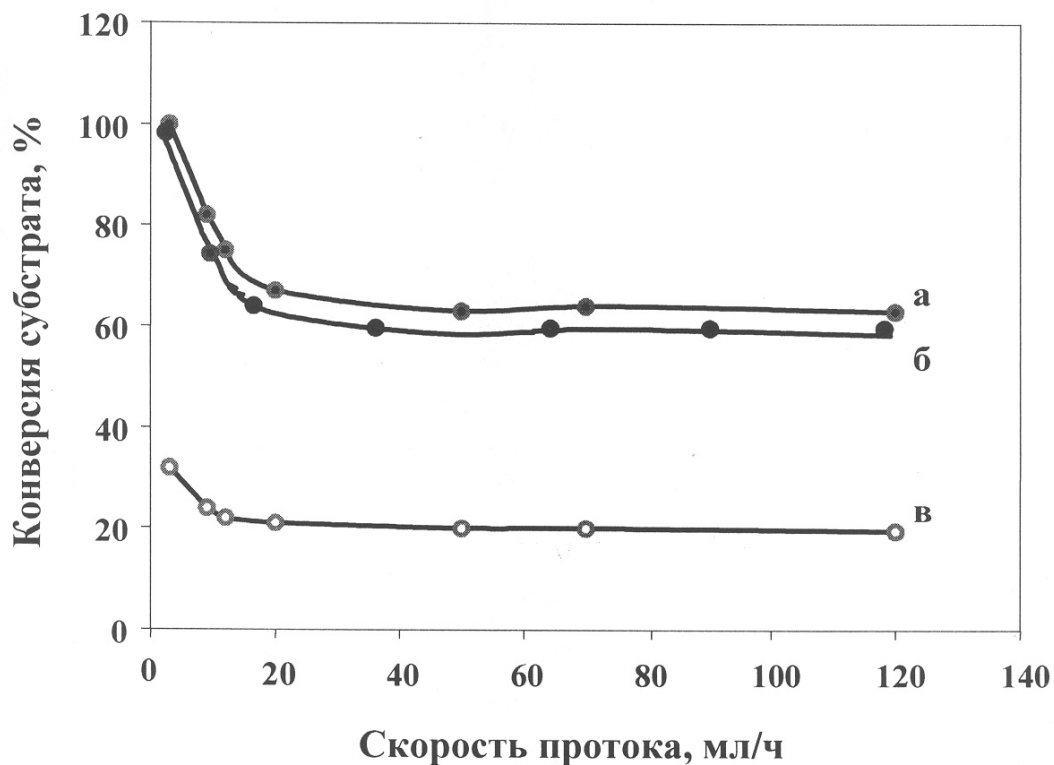
Зависимость активности биокатализаторов, полученных по заявляемому способу, от температуры проведения гидролиза параоксона (1 мМ) в 0,1 М карбонатном буфере (рН 10,5) в протоке.

Фиг. 2



Зависимость остаточной активности биокатализаторов, полученных по заявляемому способу, от температуры их термоинактивации в течение 15 мин в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,5). Условия определения остаточной активности биокатализаторов: 1 мМ параоксон, 50 мМ фосфатный буфер, рН 7,5, скорость потока – 720 мл/ч, 25°C.

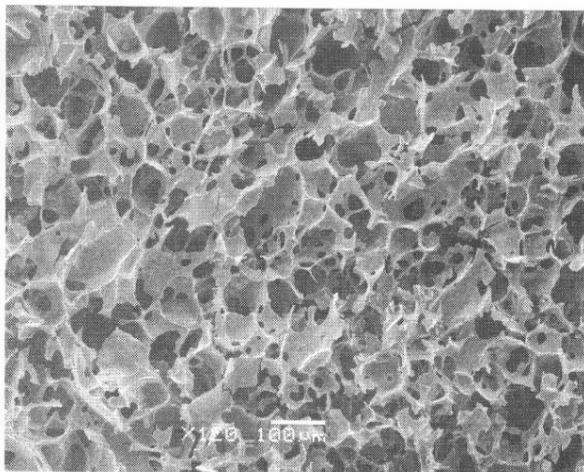
Фиг. 3



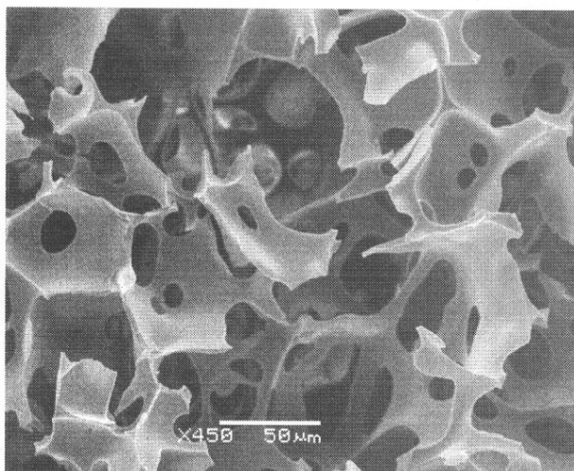
Зависимость степени конверсии 0,2 мМ параоксона в 0,1 М карбонатном буфере (рН 9,5) при 25°C от скорости его протока через биокатализатор, полученный согласно заявляемому способу: а) Пример 1; б) Пример 2; в) Пример 3.

Фиг. 4

а

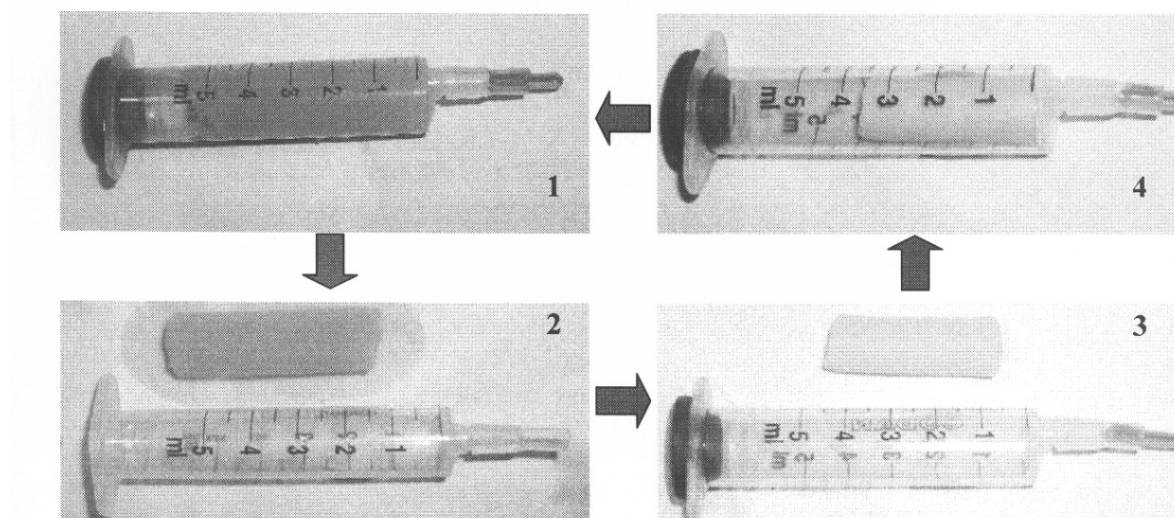


б



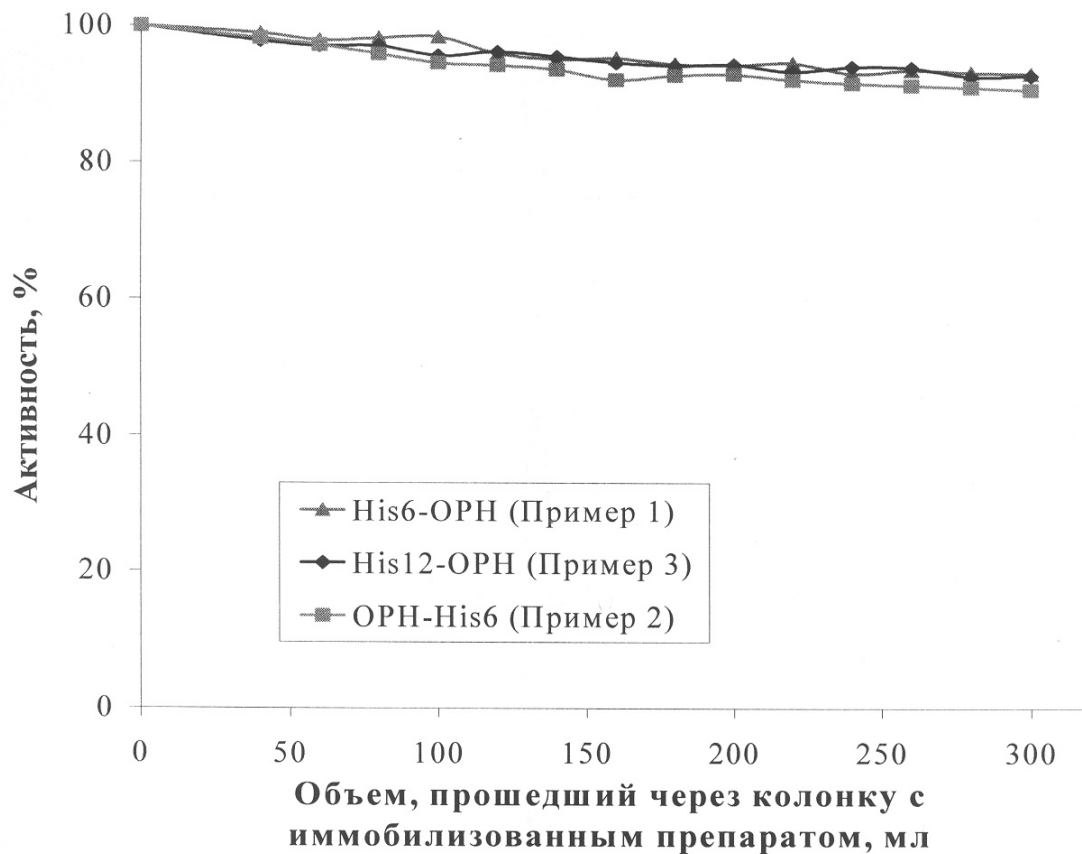
Микрофотографии поверхности биокатализаторов, приготовленных согласно заявляемому способу, полученные с помощью электронной микроскопии: а) Пример 1; б) Пример 2.

Фиг. 5



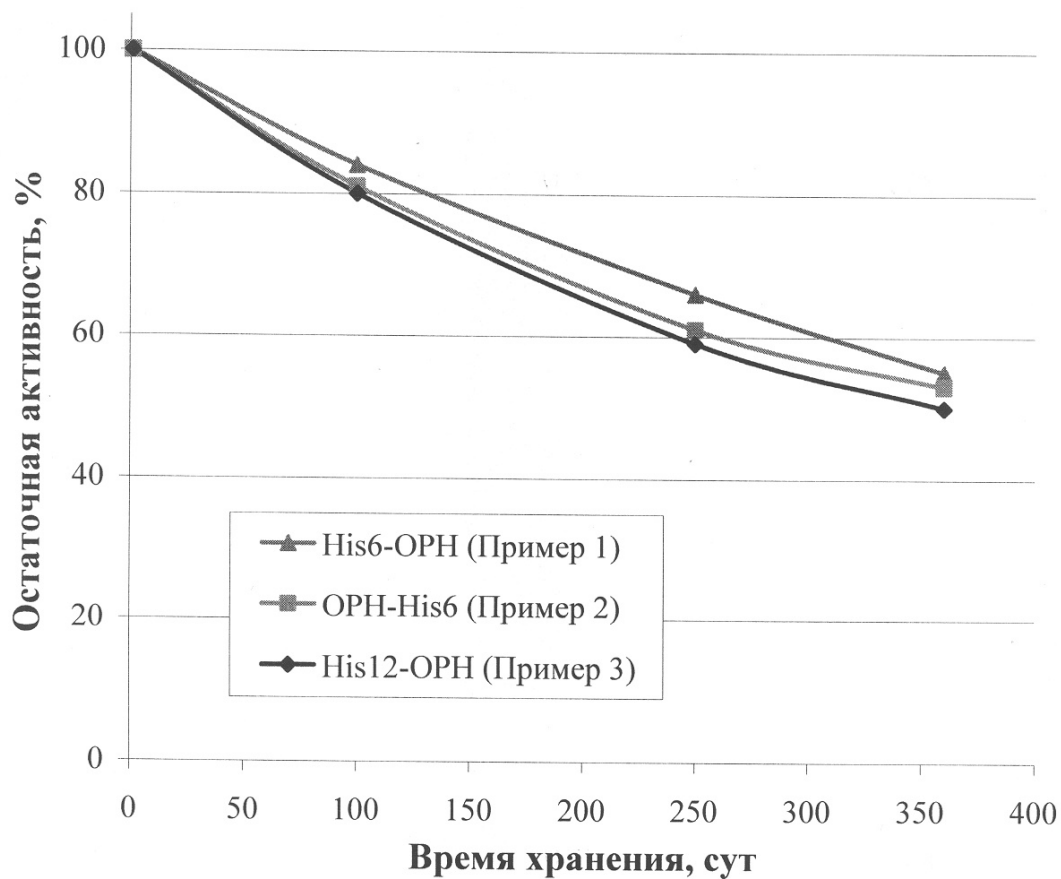
Фотографии, иллюстрирующие процесс высушивания и последующей регидратации биокатализатора, полученного по заявляемому способу (Пример 1): **1, 2** – миниколонка (5 мл) с влажным биокатализатором; **3** – миниколонка и высушенный биокатализатор; **4** – биокатализатор в миниколонке перед регидратацией.

Фиг. 6



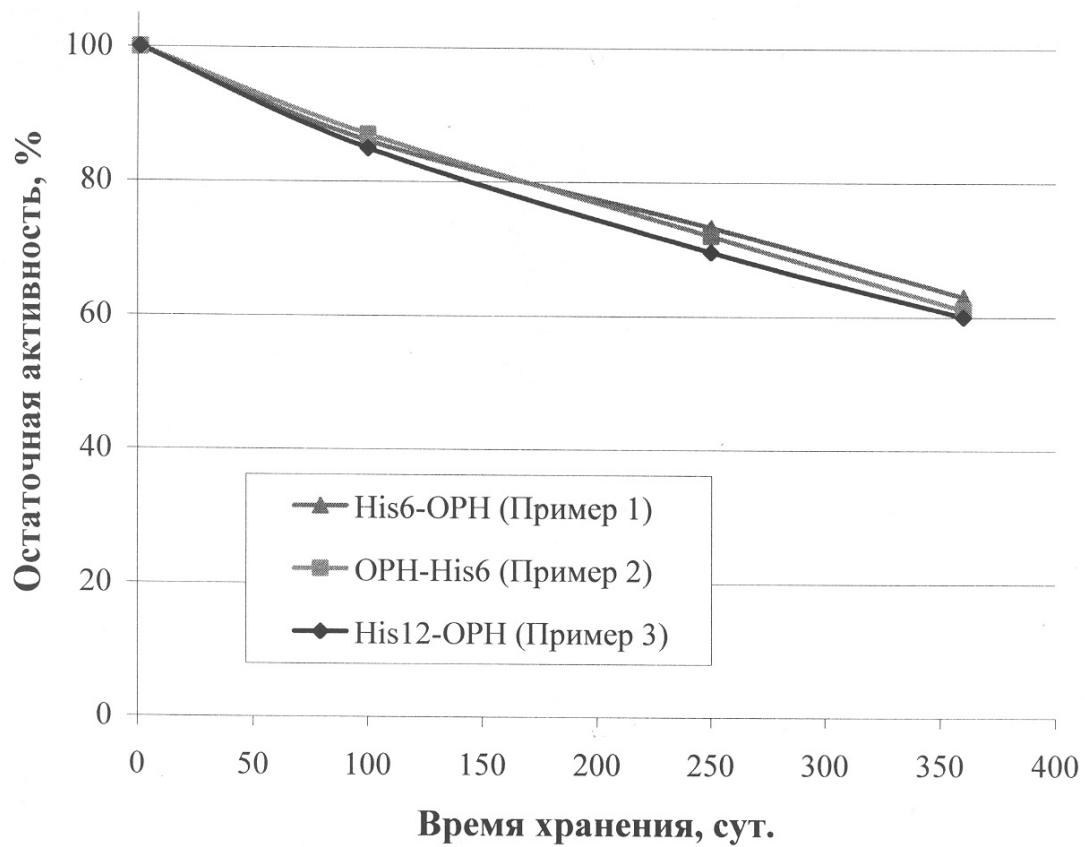
Зависимость остаточной активности биокатализаторов, полученных по заявляемому способу, катализирующих гидролиз 0,5 мМ параоксона в 0,1 М карбонатном буфере (рН 10,5) при 25°C от объема раствора субстрата, прошедшего через биокатализатор со скоростью 420 мл/ч.

Фиг. 7



Остаточная активность биокатализаторов, полученных согласно заявляемому способу, после их хранения во влажном состоянии при 4°C. Условия определения активности: 2 мМ параоксон, 0,1 М карбонатный буфер, рН 10,5, 25°C, скорость потока 480 мл/ч.

Фиг. 8



Остаточная активность биокатализаторов, полученных согласно заявляемому способу, после их хранения в высушенном состоянии при 4°C и последующей регидратации. Условия определения активности: 2 мМ параоксон, 0,1 М карбонатный буфер, pH 10,5, 25°C, скорость потока 480 мл/ч.

Фиг. 9