

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Ю.Г. Максимова^{1,2}, А.С. Зорина¹, Е.М. Мочалова¹, А.Ю. Максимов^{1,2}, В.А. Щетко³

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия

³Государственное научное учреждение «Институт микробиологии НАН Беларуси», Минск, Беларусь

Иммобилизация бактериальных клеток является одним из этапов биотехнологического процесса, направленным на улучшение технических характеристик его протекания, увеличение времени эксплуатации и стабилизацию активности биокатализатора (Eş, Vieira, Amaral, 2015). При этом для каждого процесса существуют свои требования к иммобилизованным клеткам. Такие клетки микроорганизмов используют как биокатализатор трансформации органических веществ, вносят в системы очистки сточных вод для увеличения биодegradационного потенциала микробиоты или вводят в состав биофильтра, а также иммобилизованные на различных носителях микроорганизмы-биодеструкторы интродуцируют в загрязненные почвы или другие среды. В этом случае реализуется биокаталитический потенциал микробной клетки, а с помощью иммобилизации достигаются различные цели: стабилизируется ферментативная активность, увеличивается время эксплуатации биокатализатора, реализуются непрерывные процессы, упрощаются процедуры отделения продукта от реакционной среды, снижается количество отходов в виде отработанного биокатализатора. Иммобилизованные клетки в составе биосенсора служат биоселективным элементом этого устройства, и в этом случае необходимо сохранение ферментативной активности и возможность многократного и долговременного использования этого прибора. Биопрепараты для различных целей: биодegradации загрязнителей, улучшения плодородия почв, как кормовая добавка для сельскохозяйственных животных, также могут содержать в своем составе иммобилизованные микробные клетки. В этом случае важна нетоксичность, биосовместимость и сохранение ферментативной активности.

Создание иммобилизованного препарата на основе бактериальных клеток – процесс эмпирический, требующий подбора методов, носителей, условий иммобилизации, причем в зависимости от процесса, в котором этот препарат будет использоваться, требования могут отличаться. Так, для процессов биокатализа, биодegradации, биосенсорных технологий и получения сельскохозяйственных препаратов важны свои критерии (табл. 1).

Табл. 1. Значимость различных критериев для создания иммобилизованного препарата

Критерии	Биокатализ (синтез органических веществ)	Биодegradация (очистка окружающей среды)	Биосенсорные технологии	Биопрепараты
Низкая стоимость	+	++	+	++
Возможность получения больших объемов	+	++	+	++
Нетоксичность	-	+	+	++
Высокая ферментативная активность клеток	++	++	++	++
Высокая стабильность	++	++	++	+

Примечание: ++ существенно, + желательно, – необязательно

Для создания иммобилизованного биокатализатора необходимо выполнить ряд экспериментов, которые позволят сделать вывод об эффективности полученного препарата (рис. 1). Во-первых, если осуществляется адгезия клеток на носителе, важно, чтобы поверхность носителя совпадала по степени гидрофобности с поверхностью клетки. Кроме того, как было подтверждено нашими данными, величина адгезии клеток бактерий больше на высокодисперсном, макропористом материале с шероховатой поверхностью (Максимова и др., 2019).

Во-вторых, необходимо сохранение ферментативной активности и возможность многократного использования биокатализатора, которая может быть выражена через понятие "операционная стабильность" и оценена по количеству последовательных циклов реакции, в которых сохраняется не менее 50 % ферментативной активности. Для непрерывных процессов это понятие может включать в себя время функционирования реактора без снижения его продуктивности.

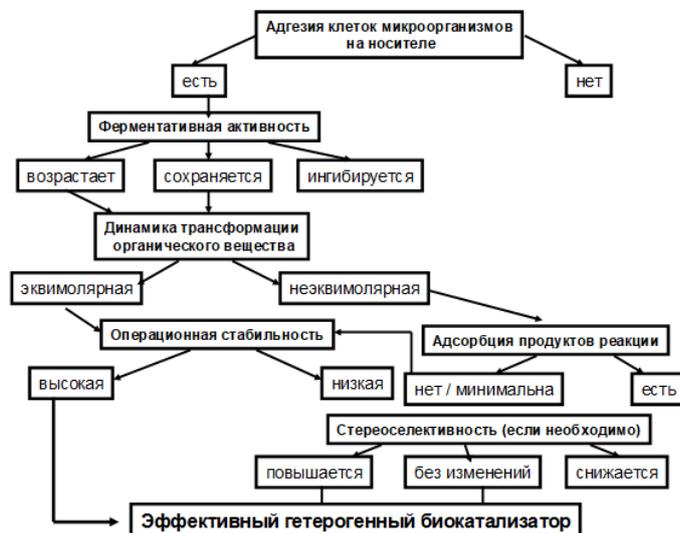


Рис. 1. Алгоритм разработки гетерогенного биокатализатора на основе адгезированных клеток микроорганизмов

Способы иммобилизации бактериальных клеток могут быть разделены условно на 2 большие группы: 1) иммобилизация на поверхности материала носителя, которая может происходить путем адсорбции (адгезии) и ковалентной сшивкой макромолекул поверхности клеток с молекулами материала носителя; 2) иммобилизация в структуре материала носителя, которая может обеспечиваться включением в гель и инкапсуляцией (Кощеенко, 1981; Еф, Vieira, Amaral, 2015). Биопленки как самоиммобилизованные сообщества могут также являться гетерогенным биокатализатором, и использоваться в процессах синтеза органических веществ, например, спиртов и органических кислот (Qureshi et al., 2005; Halan et al., 2012), в системах очистки стоков (Плакунов, Николаев, 2018), в качестве биоселектирующего агента биосенсора, например, для определения показателя биологического потребления кислорода (Chappell, Freemont, 2011; Понаморева и др., 2011).

Биопрепараты тоже могут быть приготовлены в виде иммобилизованных клеток.

Исходя из требований различных процессов, такой способ иммобилизации бактериальных клеток, как включение в материал носителя, пригоден для разработки биоселектирующего агента в биосенсорах, получения биопрепаратов, в некоторых случаях для биокатализа, но за редким исключением мало пригоден для крупномасштабных процессов биоочистки и биodeградации из-за высокой стоимости (табл. 2). Получение биопленок возможно для всех перечисленных процессов, а адгезия из выращенной культуры подходит для биокатализа, биodeградации и получения биопрепаратов, тогда как в биосенсорах этот метод может быть неэффективен из-за потери клеток в процессе многократного использования.

Табл. 2. Наиболее предпочтительные методы иммобилизации микробных клеток в биотехнологических процессах

Методы Процессы	Включение в структуру геля или инкапсуляция	Адгезия выращенных клеток	Биопленки
Биокатализ	+	+	+
Биodeградация	-	+	+
Биосенсоры	+	-	+
Биопрепараты	+	+	+

Иммобилизованные клетки имеют преимущество перед свободными в процессах биокатализа и биodeградации. В лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии "ИЭГМ УрО РАН" были разработаны иммобилизованные биокатализаторы на основе клеток нитрилгидролизующих бактерий для синтеза акриламида и акриловой кислоты из акрилонитрила (Максимова и др., 2010), а также как основа биоселектирующего элемента биосенсора для определения акриламида в виде клеток *Alcaligenes faecalis* 2 и *Rhodococcus erythropolis* 4-1, иммобилизованных в структуре геля альгината бария и агарозы (Мочалова, Максимова, 2020). Начаты разработки бактериальных препаратов на основе клеток *Pseudomonas peli* с липазной активностью, включенных в структуру различных гелей.

Примеры использования иммобилизованных клеток бактерий в очистке окружающей среды разнообразны и отличаются по способу иммобилизации, используемому носителю, очищаемой среде (вода, почва, воздух) и токсичному веществу, от которого производится очистка. Наиболее широкое применение иммобилизованные клетки нашли в очистке вод различных производственных процессов. Для биодegradации поллютантов, присутствующих в сточных водах, в том числе представляющих собой трудноокисляемые и токсичные вещества, применяются клетки микроорганизмов, адсорбированные на нерастворимых носителях и иммобилизованные в структуре гелей (Кобызева и др., 2009; Chen et al., 2010). Для детоксикации паров акрилонитрила, цианидов, цианатов и тиоцианатов используют клетки с нитрилгидролизующей активностью, иммобилизованные в структуре геля (Cantarella et al., 2010). Мембранные технологии достаточно распространены и применяются для удаления из сточных вод загрязняющих веществ: фармацевтических препаратов, стероидных гормонов, фитоэстрогенов, пестицидов, фосфора (Kelly, He, 2014; Wijekoon et al., 2013). Также иммобилизованные микроорганизмы (био пленки) эффективно удаляют азот из сточных вод (Вдовина и др., 2020), используются для детоксикации определенных загрязнителей, например, нитрилов в биофильтрах (Зорина, Максимова, 2015). Известен положительный опыт применения иммобилизованных алканотрофных микроорганизмов для нефтяной ремедиации (Ившина и др., 2018), в анаэробной очистке сточных вод, сопровождающейся метаногенезом (Сенько, Ефременко, 2018).

В настоящее время иммобилизация клеток становится привлекательным способом интеграции цельных клеток в биосенсоры для поддержания долговременной жизнеспособности клеток и повышения воспроизводимости реакции. Также иммобилизация позволяет избежать попадания генетически модифицированных организмов в окружающую среду при использовании аналитических приборов в полевых условиях (Michelini, Roda, 2012). Повышение надежности и чувствительности микробных биосенсоров зависит от способа иммобилизации клеток. Чрезвычайно перспективным является использование новых материалов, в том числе наночастиц золота, углеродных нанотрубок или квантовых точек (Сазыкина, Мирина, Сазыкин, 2015). Микробные биосенсоры могут быть "био пленочного" типа, например, биосенсоры для определения биохимического потребления кислорода в водных образцах. Для них характерно наличие слоя цельноклеточной микробной пленки в качестве биологического распознающего элемента между пористой и газопроницаемой мембранами кислородного электрода (Понаморева и др., 2011; Каманин и др., 2012). Среди методов иммобилизации микробных клеток в биосенсорах и топливных элементах можно упомянуть адсорбцию, ковалентное связывание, перекрестную сшивку, инкапсуляцию и захват в структуре гелей (Решетиллов, Плеханова, 2018; Michelini, Roda, 2012). Несмотря на то, что метод адсорбции считается популярным, простым и дешевым в применении, для него характерно постепенное вымывание клеточной биомассы с матрицы носителя в результате многократного использования биокатализатора (Velkova et al., 2018).

В целом, иммобилизация клеток может быть успешна для трансформации простых субстратов, тогда как конверсия иммобилизованными клетками соединений, обладающих сложной пространственной структурой, имеющих ароматические кольца в своем составе, может быть неэффективной из-за диффузионных затруднений. Таким образом, чем сложнее соединение, тем труднее достичь эффективности трансформации вещества, наблюдаемой для свободных клеток. Так, при конверсии ароматических нитрилов активность иммобилизованных клеток в сравнении с суспензией была в 1,5–4 раза ниже (Максимова и др., 2013), тогда как при конверсии алифатических субстратов активность даже превышала таковую свободных клеток (Максимова и др., 2010). Попытки конверсии сложных в пространственном отношении веществ часто не достигают успеха.

Таким образом, для создания иммобилизованного биокатализатора следует проанализировать ряд параметров, среди которых: величина адгезии клеток на носителе (в случае, если используют метод иммобилизации на поверхности), сохранение ферментативной активности и операционная стабильность биокатализатора. Знание ряда закономерностей получения эффективного иммобилизованного биокатализатора позволяет интенсифицировать процесс и сократить количество экспериментов, необходимых для его оценки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Литература

- Eş I., Vieira J.D.G., Amaral A.C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015. № 99. P. 2065–2082.
- Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Адгезия бактериальных клеток на углеродных носителях: характеристики процесса и применение в биотехнологии // *Вестник Пермского федерального исследовательского центра.* 2019. № 3. С. 86–93.
- Кощеенко К.А. Живые иммобилизованные клетки как биокатализаторы процессов трансформации и биосинтеза органических соединений // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1981. Т. 17. Вып. 4. С. 477–493.
- Qureshi N., Annous B.A., Ezeji T.C., Karcher P., Maddox I.S. Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates // *Microb Cell Fact.* 2005. V. 4:24.
- Halan B., Buehler K., Schmid A. Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses // *Trends Biotechnol.* 2012. V. 30. N. 9. P. 453–465.
- Плакунов В.К., Николаев Ю.А. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод // *Вода: химия и экология.* 2008. № 2. С. 11–13.
- Chappell J., Freemont P.S. Synthetic biology – a new generation of biofilm biosensors // *In Book: The Science and Applications of Synthetic and System Biology.* The National Academies Press, Washington DC, 2011. P. 159–178.
- Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алфёров В.А., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2011. Т. 47, № 1. С. 5–15.
- Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина Г.В., Олонцев В.Ф. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах // *Биотехнология.* 2010. № 4. С. 51–58.
- Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г. Иммобилизация клеток нитрилгидролизующих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4–1 и *Alcaligenes faecalis* 2 с использованием термотропных и ионотропных гелей // *Вестник Пермского университета. Серия биология.* 2020. Вып. 1. С. 26–32.
- Кобызева Н.В., Гагауллин А.Г., Силищев Н.Н., Логинов О.Н. Разработка технологии очистки сточной воды с использованием иммобилизованной микрофлоры // *Вестник ОГУ.* 2009. № 1. С. 104–107.
- Chen C.Y., Chen S.C., Fingas M., Kao C.M. Biodegradation of propionitrile by *Klebsiella oxytoca* immobilized in alginate and cellulose triacetate gel // *Journal of Hazardous Materials.* 2010. V. 177. P. 856–863.
- Cantarella L., Gallifuoco A., Malandra A., Martinkova L., Pasquarelli F., Spera A., Cantarella M. Application of continuous stirred membrane reactor to 3-цианопиридин биоconversion using the nitrile hydratase–amidase cascade system of *M. imperiale* CBS 498–74 // *Enzyme and Microbial Technology.* 2010. V. 47. P. 64–70.
- Kelly P.T., He Z. Nutrients removal and recovery in bioelectrochemical systems: A review // *Bioresource Technology.* 2014. V. 153. P. 351–360.
- Wijekoon K.C., Hai F.I., Kang J., Price W.E., Guo W., Ngo H.H., Nghiem L.D. The fate of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters and pesticides during MBR treatment // *Bioresource Technology.* 2013. V. 144. P. 247–254.
- Вдовина Т.В., Сироткин А.С., Кобелева Й.В., Горшкова Е.С. Биоаугментация нитрифицирующих микроорганизмов для повышения эффективности окисления соединений азота в процессе биофильтрации сточных вод // *Биотехнология.* 2020. Т. 36, № 2. С. 99–107.
- Зорина А.С., Максимова Ю.Г. Иммобилизованные нитрилгидролизующие бактерии для систем биофильтрации // *Российский иммунологический журнал.* 2015. Т. 9(18), № 2(1). С. 733–735.
- Ившина И.Б., Куюкина М.С., Криворучко А.В. Иммобилизация углеводородокисляющих родококков как фактор усиления нефтяной ремедиации // В книге: *Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы.* Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. С. 409–428.
- Сенько О.В., Ефременко Е.Н. Иммобилизованные биокатализаторы в системах получения биогаза и анаэробной очистки сточных вод // В книге: *Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы.* Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. С. 429–459.
- Michelini E., Roda A. Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. № 402. P. 1785–1797.
- Сазыкина М.А., Мирина Е.А., Сазыкин И.С. Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод // *Вода: Химия и Экология.* 2015. № 10. С. 64–74.
- Каманин С.С., Арляпов В.А., Понаморева О.Н., Алфёров В.А., Решетилов А.Н. БПК-биосенсор на основе ассоциации дрожжевых штаммов // *Вода: Химия и Экология.* 2012. № 3. С. 74–81.
- Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В. Биосенсорные системы и топливные элементы на основе микробных клеток // В книге: *Иммобилизованные клетки: биокатализаторы и процессы.* Под ред. Е.Н. Ефременко. М.: РИОР, 2018. С. 211–256.
- Velkova Z., Kirova G., Stoytcheva M., Kostadinova S., Todorova K., Gochev V. Immobilized microbial biosorbents for heavy metals removal // *Eng. Life Sci.* 2018. V. 18. P. 871–881.
- Максимова Ю.Г., Васильев Д.М., Овечкина Г.В., Максимов А.Ю., Демаков В.А. Трансформация 2- и 4-цианопиридинов свободными и иммобилизованными клетками нитрилгидролизующих бактерий // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2013. Т. 49, № 4. С. 358–363.