

УДК 543.9:663:664

ВЛИЯНИЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ И ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА НА СВОЙСТВА БИОГИБРИДНЫХ МАТЕРИАЛОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ ИММОБИЛИЗАЦИИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫЕ МАТРИЦЫ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ В УСЛОВИЯХ ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗА**Д.Г. Лаврова, М.С. Тимошина, О.Н. Понаморева***Тульский государственный университет, Тула, Россия*

В биотехнологических процессах в качестве биокатализаторов наиболее предпочтительно использовать иммобилизованные микроорганизмы, применение которых позволяет существенно интенсифицировать производство и повышать его эффективность. Такие микроорганизмы сохраняют свою жизнеспособность в течение длительного времени. В настоящее время интенсивно развивается направление на стыке микробиологии и нанотехнологий – разработка методов получения «живых» гибридных материалов (биогибридных материалов), в которых клетки покрыты искусственными оболочками. Материалы со структурой «клетка в оболочке» являются подобием природных одноклеточных микроорганизмов, таких как, диатомовые водоросли, которые на своей поверхности формируют защитный экзо-скелет из кремнезема. Одним из подходов для создания искусственной силикатной оболочки вокруг клеток является применение методов золь-гель химии. Они основаны на конденсации в водных средах мономеров кремниевой кислоты с образованием полимерных молекул, структурированных в виде частиц золя, которые затем формируют сетчатую структуру геля (силикагеля). Обычно в качестве исходных материалов применяют полностью гидролизующийся тетраэтоксисилан (ТЭОС) с образованием кремнезема с жесткой структурой. Введение в систему различных полимерных молекул или использование в качестве исходных веществ кремнийорганических соединений, которые помимо алкоксильных групп содержат органические радикалы, например, алкильные, позволяет получать органосиликатные материалы. Так, при использовании помимо ТЭОС метилтриэтоксисилана (МТЭС), выполняющего роль гидрофобной добавки, образуются более эластичные материалы [1,2]. Добавление органических полимеров в реакционную смесь придает гибкость конечной структуре материала и обеспечивает возможность варьировать его пористость, поэтому, их можно рассматривать как структуроуправляющие агенты (СА). В качестве СА, в частности, используют полиэтиленгликоль (ПЭГ) и поливиниловый спирт (ПВС) – гидрофильные полимеры, которые в зависимости от своей молекулярной массы и концентрации способны формировать разные трехмерные структуры в водных растворах [3–5].

Ранее в нашем научном коллективе исследовались различные условия иммобилизации микроорганизмов в силикагели, в том числе в органоиммобилизованные силикагели, которые образуются при участии ТЭОС, МТЭС и ПЭГ-3000. Показано, что микроорганизмы активно участвуют в формировании гибридных материалов, что приводит к образованию вокруг клеток органосиликатной оболочки [6]. Однако выявлены не все параметры и условия для направленного формирования материалов с такой архитектурой. В первую очередь это касается влияния гидрофильных полимеров как структуроуправляющих агентов с одной стороны, и как соединений, способных сформировать благоприятное окружение вокруг клеток микроорганизмов. Таким образом, в работе исследовали влияние ПЭГ и ПВС на свойства биокатализаторов, полученных путем иммобилизации метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* в органоиммобилизованные силикагели.

Синтез биокатализаторов проводили по методике, описанной в работе [7]. В качестве исходных соединений для синтеза органосиликатных материалов применяли МТЭС и ТЭОС в различных соотношениях (МТЭС: ТЭОС = 0:100, 50:50, 80:20, 85:15, 100:0 об. %). Золь-гель синтез проводили при нейтральном значении pH, используя в качестве катализатора NaF. ПЭГ с молекулярной массой 3000 Да (далее – ПЭГ-3000) и ПВС с молекулярной массой 78 000 Да (далее – ПВС) выполняли роль структуроуправляющих агентов. Объектом иммобилизации являлись метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559, для которых низкомолекулярные спирты являются природными субстратами. Это обеспечивает сохранение жизнеспособности микроорганизмов в присутствии образующегося спирта в процессе гидролиза и конденсации исходных алкоксисиланов.

Степень конденсации исходных соединений в конечных органосиликатных материалах на основе МТЭС, ТЭОС и СА (ПЭГ-3000 или ПВС) в отсутствии биологического компонента оценивали методом ИК-спектроскопии. Число образующихся Si-O-Si связей определяли по интенсивности сигнала в области 1100 см^{-1} , которая принадлежит валентным колебаниям Si-O-Si групп, которую нормировали по полосе поглощения 1270 см^{-1} , соответствующей колебаниям Si-CH₃, поскольку в процессе формирования геля количество Si-C-связей остается неизменным (I_{1100}/I_{1270}) (рисунки 1 и 2).

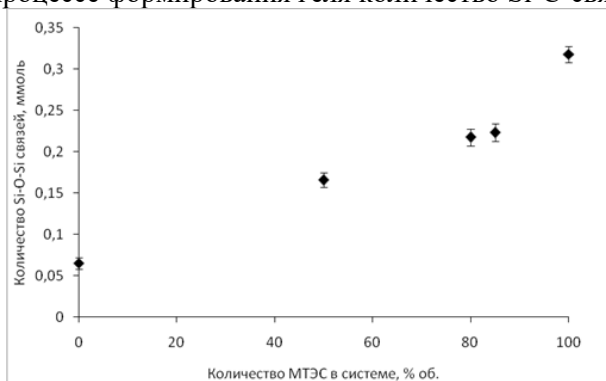


Рисунок 1. Количество образующихся Si-O-Si связей в органосиликатном материале на основе МТЭС, ТЭОС и ПЭГ-3000

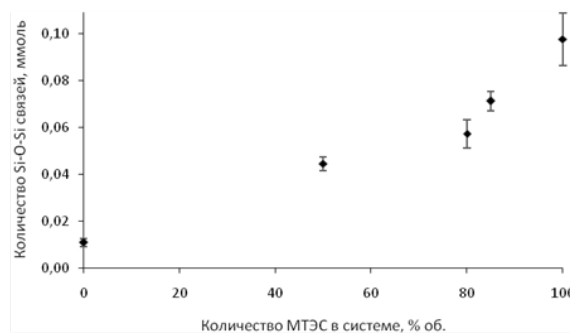


Рисунок 2. Количество образующихся Si-O-Si связей в органосиликатном материале на основе МТЭС, ТЭОС и ПВС

При увеличении содержания гидрофобной добавки МТЭС происходит увеличение количества Si-O-Si связей в органосиликатных матрицах в обоих образцах. При нейтральных значениях pH гидролиз алкоксисиланов лимитирует скорость золь-гель процесса. Известно, что скорость гидролиза МТЭС выше, чем ТЭОС, несмотря на более низкую растворимость МТЭС в воде [8]. Это приводит к формированию не только сетчатой структуры органомодифицированного кремнезема, но и к образованию более гидрофобных олигомеров при взаимодействии гидролизованных молекул МТЭС между собой, что проявляется в увеличении количества силоксановых связей в образцах в целом. Высказанное предположение подтверждается образованием большего количества Si-O-Si связей в образцах, содержащих ПЭГ по сравнению с образцами, содержащими ПВС (рисунки 1 и 2). В составе ПЭГ присутствуют гидрофобные (углеводородные фрагменты) и гидрофильные (кислородные мостики) сегменты, поэтому в водных средах полимер увеличивает растворимость исходных соединений кремния, что обеспечивает более эффективное протекание реакций в этих условиях золь-гель синтеза, в отличие от ПВС.

Морфологию материалов, полученных путем иммобилизации метилотрофных дрожжей в органосиликатные матрицы, представленные выше, изучали методом сканирующей электронной микроскопии. При соотношении исходных соединений кремния МТЭС: ТЭОС = 85:15 об. % вне зависимости от гидрофильного полимера формировалась структура типа «клетка в оболочке» (рисунок 3).

При содержании в материале гидрофобной добавки меньше 85 об. % образовывалась преимущественно монолитная жесткая структура биогибридного материала. Увеличение содержания МТЭС до 100 % об. приводило к неэффективному инкапсулированию метилотрофных дрожжей. Этот результат также можно объяснить увеличением числа олигомерных молекул органосиликатов, образованных из МТЭС, и уменьшением вклада сетчатой структуры в формирование матрицы.

Динамику образования вокруг микроорганизмов органосиликатной оболочки из МТЭС: ТЭОС в соотношении 85:15 и ПВС изучали методом оптической микроскопии. В предложенных нами условиях основного катализа в присутствии ПВС клетки микроорганизмов являются центрами инициации золь-гель реакций, так как на поверхности микроорганизмов наблюдается формирование частиц золя, число которых увеличивается со временем. Через 5 часов все клетки дрожжей покрыты оболочкой. Аналогичная картина наблюдалась ранее при изучении динамики инкапсулирования этих дрожжей в органосиликатные гели в присутствии ПЭГ-3000 [9]. Следует отметить, что получаемые биогибридные материалы различны по макроструктуре – при ПВС формируется пленка, а при ПЭГ фрактальный гель, что можно использовать при разработке биокализаторов разного типа.

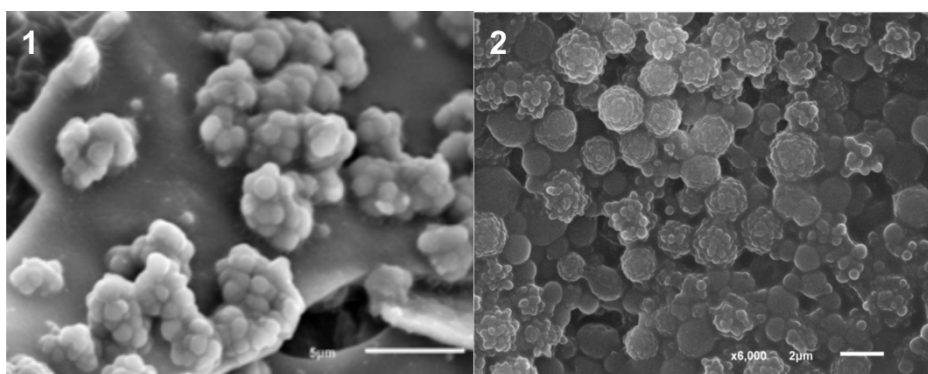


Рисунок 3. СЭМ изображение: 1 – биогибридные материалы на основе инкапсулированных метилотрофных дрожжей в органосиликатные матрицы из МТЭС, ТЭОС в соотношении 85:15 и ПЭГ-3000; 2 – биогибридные материалы на основе инкапсулированных метилотрофных дрожжей в органосиликатные матрицы из МТЭС, ТЭОС в соотношении 85:15 и ПВС

Биокаталитическую активность биогибридного материала оценивали по дыхательной активности иммобилизованных микроорганизмов в присутствии метанола. Инкапсулированные метилотрофные дрожжи эффективно окисляют метанол в течение 15 дней функционирования. Биокатализатор хранится при -18°C в течении года без потери активности. Биогибридный материал на основе инкапсулированных микроорганизмов в органосиликатные матрицы являются перспективным биокатализатором окисления метанола, что можно использовать при разработке биосенсоров и биофильтров для очистки метанолсодержащих стоков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (Госзадание № FEWG-2020–008)

ЛИТЕРАТУРА

1. Putz A.M. et al. Mesoporous silica obtained with methyltriethoxysilane as co-precursor in alkaline medium // Appl. Surf. Sci. 2017. Vol. 424. P. 275–281.
2. Ma Y., Kanazashi M., Tsuru T. Preparation of organic/inorganic hybrid silica using methyltriethoxysilane and tetraethoxysilane as co-precursors // J. Sol-Gel Sci. Technol. 2010. Vol. 53, № 1. P. 93–99.
3. S. Liu, Z. Zhang, H. Zhang, Y. Zhang, S. Wei, L. Ren, C. Wang, Y. He, F. Li F. – S.X. Phase separation of organic/inorganic hybrids induced by calcination: A novel route for synthesizing mesoporous silica and carbon materials // J. Colloid Interface Sci. 2010. Vol. 345. P. 257–261.
4. W. Guo, G.S. Luo Y.J.W. A new emulsion method to synthesize well-defined mesoporous particles // J. Colloid Interface Sci. 2004. Vol. 271. P. 400–406.
5. S. Shen, W. Wu, K. Guo J.C. Low-cost preparation of mesoporous silica with high pore volume // J. Univ. Sci. Technol. Beijing. 2007. Vol. 14. P. 369–372.
6. Lavrova D.G. et al. Effect of polyethylene glycol additives on structure, stability, and biocatalytic activity of ormosil sol-gel encapsulated yeast cells // J. Sol-Gel Sci. Technol. 2018. Vol. 88, № 1. P. 1–5.
7. Каманина О.А., Лаврова Д.Г., Арляпов В.А., Понаморева О.Н. Биосенсор на основе иммобилизованных в модифицированные силикагели метилотрофных дрожжей для мониторинга процесса брожения // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2017. Т. 13, № 4. С. 40–45.
8. Schmidt H., Scholze H., Kaiser A. Principles of hydrolysis and condensation reaction of alkoxysilanes // J. Non. Cryst. Solids. 1984. Vol. 63, № 1–2. P. 1–11.
9. Kamanina O.A. et al. Synthesis of organosilicon sol-gel matrices and preparation of heterogeneous biocatalysts based on them // Russ. J. Appl. Chem. Pleiades Publishing, 2014. Vol. 87, № 6. P. 761–766.