

УДК 579.6

БИОМИМЕТИЧЕСКОЕ ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ И БИОСОВМЕСТИМЫЕ ПОЛИМЕРЫ – ГИДРОГЕЛИ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ**О.Н. Понаморева¹, Д.Г. Лаврова¹, А.Н. Звонарев², Т.Г. Хонина³, В.А. Алферов¹**¹ ФГБОУ ВО Тульский государственный университет, Тула, Россия² ФИЦ ПНЦБИ – Институт физиологии и биохимии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН³ ФГБУ Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского ОС УрО РАН

Создание функциональных материалов на основе инкапсулированных биомолекул и целых клеток без изменения их морфологии или активности является актуальной задачей в области биотехнологии при создании искусственных органов; разработке биосенсоров; стабильных биокатализаторов; биопрепаратов для очистки от стоков и объектов окружающей среды от загрязнений; систем доставки в организм человека лекарств, биологически активных веществ, биомолекул; и других практических приложений. Материалы, основанные на поликремниевых кислотах, способны удерживать воду без значительного набухания, химически и биологически инертны, механически прочны, поэтому обеспечивают комфортное окружение для биомолекул и живых клеток [1]. Инкапсулирование целых клеток микроорганизмов в силикатные матрицы имитирует природные одноклеточные организмы – диатомовые водоросли, способные к формированию на своей поверхности защитного экзо-скелета из наноструктурированного кремнезема. При получении искусственных «живых» биоматериалов со структурой «клетка в оболочке» используют мягкие методы золь-гель химии кремнезема при участии структуроуправляющих соединений. Имобилизация в органосиликатных композитах приводит к стабилизации каталитической активности микроорганизмов и дает возможность многократно или непрерывно использовать биокатализаторы. В качестве исходных соединений (прекурсоров) часто используют тетраэтоксисиланы (ТЭОС), иногда в смеси алкилтриэтоксисиланами (метилтриэтоксисилан, МТЭС) для придания матрице гибкости и увеличения размера пор за счет гидрофильно-гидрофобных взаимодействий в реакционной системе [2]. В процессе гидролиза и конденсации этих прекурсоров выделяется этиловый спирт, который разрушает нативную структуру биомолекул и негативно влияет на жизнеспособность микроорганизмов в реакционной системе. Для инкапсулирования биомакромолекул (полисахаридов, белков) в органосиликатные гели предложено использовать тетраполиэтиленгликоляты кремния, которые не вызывают денатурации биомолекул [3]. Однако информации об использовании этих прекурсоров для имобилизации живых клеток нам не удалось найти. Важно отметить, что конечная структура биогибридного материала (инкапсулированных в органосиликатные матрицы биомолекул или клеток) зависит от многих факторов (соотношение прекурсоров – кремнийорганических соединений, характеристики структуроуправляющих агентов, соотношения реагентов в системе, pH, присутствия в реакционной среде нуклеофильных и амфифильных соединений, в том числе на поверхности биоматериала и т. д.).

Для выяснения влияния клеточных стенок микроорганизмов и типа кремнийорганических прекурсоров на структуру образующегося гибридного материала и жизнеспособность инкапсулированных клеток применили две исходные системы реагентов, в состав которых входил ПЭГ в качестве матрицы композита и ТЭОС как прекурсор в синтезе частиц кремнезема, играющих роль наполнителя (композиты 1 и 2) и различные микроорганизмы (грамположительные бактерии *Bacillus atrophaeus* VKN B-723; аскомицетные дрожжи: метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* VKM Y-2559 и *Pichia pastoris* BG10 и дрожжи – продуценты киллер-токсинов *Wickerhamomyces anomalus* VKM Y-3037; базидиомицетные дрожжи продуценты гиколипидов *Cryptococcus humicola* 9–6; одноклеточные водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* WT (со стенкой и без стенки)). В составе композита 1 кроме ТЭОС использовали МТЭС в соотношении TEOS:MTES 15:85 [4]. В композитах ПЭГ отличался по молекулярной массе (в композите 1 использовали ПЭГ3000, в композите 2 – ПЭГ400), что было обусловлено разными методологическими подходами в синтезе полиэтиленгликолятов кремния [5]. Процессы золь-гель синтеза и инкапсулирования микроорганизмов проводили в Na-K-фосфатном буфере (pH 7,6) в присутствии катализатора фторида натрия. Жизнеспособность иммобилизованных микроорганизмов оценивали методом флуоресцентной микроскопии с использованием системы красителей для идентификации живых и мертвых клеток (Live/Dead Yeast Viability Kit). Структурные особенности биогибридных композитов изучали методом сканирующей электронной микроскопией.

На рисунке 1 представлены микрофотографии иммобилизованных в композит 2 микроорганизмы на срезе в присутствии флуоресцентных красителей. На основании зеленого свечения можно заключить, что все клетки имели неповрежденную мембрану и были жизнеспособны. Иммобилизованные в композит 1 микроорганизмы частично окрашивались в красный цвет (данные не показаны). Однако высев микроорганизмов из геля позволил заключить, что клетки сохранили жизнеспособность. Мы предполагаем, что этанол, образующийся в реакциях золь-гель синтеза, приводит к премеабиллизации мембраны и диффузии красителя в клетки, но, несмотря на это, жизнеспособность микроорганизмов сохраняется и в композите 1.

В гибридном материале на основе композита 1 клетки разных микроорганизмов покрыты сферическими частицами золя. Иммобилизация микроорганизмов композит 2 приводит к формированию менее объемной пленкоподобной оболочки вокруг клеток (рис. 1 вверху). Подобная структура нами была получена ранее при иммобилизации дрожжей в органосиликатные композиты из ТЭОС, МТЭС и низкомолекулярного ПЭГ1000. Образование такой структуры композита, вероятно, объясняется как меньшим содержанием воды в системе и формированием сети полимера у поверхности клеток дрожжей за счет взаимодействия силанольных групп (-Si-OH), как центров зацепления низкомолекулярных ПЭГ, которые в водных растворах располагаются в виде линейных цепей [6].

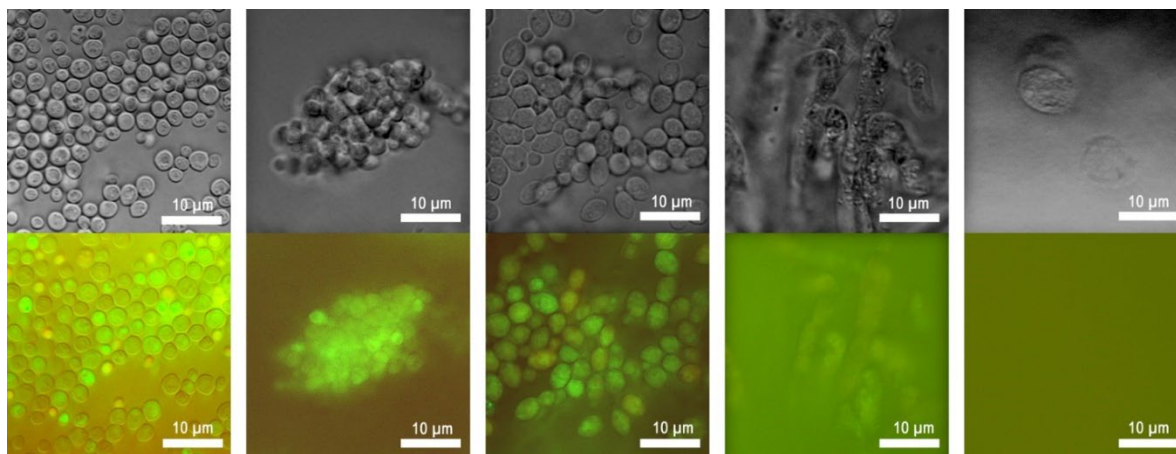


Рисунок 1. Микрофотографии гибридных материалов с инкапсулированными микроорганизмами (слева направо): *Ogataea polymorpha* VKM Y-2559; *Pichia pastoris* BG10; *Wickerhamomyces anomalus* VKM Y-3037; *Cryptococcus humicola* 9-6; *Chlamydomonas reinhardtii* WT (со стенкой). Вверху – СЭМ, внизу – флуоресцентная микроскопия. Бар-метка 5 мкм

Исследования по иммобилизации микроорганизмов с разным строением клеточной поверхности и типом метаболизма в силикатные гели и органосиликатные композиты, проводимые в нашем научном коллективе в последние десять лет, в том числе, представленные в этой работе позволили выявить некоторые закономерности формирования «живых» гибридных материалов определенной архитектуры.

- Жизнеспособность иммобилизованных в кремнезем микроорганизмов обеспечивают гидрофильные полимеры, которые формируют гидрогели не только в растворе, но и на поверхности клеток.
- Этиловый спирт, образующийся в реакциях золь-гель синтеза, увеличивает пермеабиллизацию мембран клеток, но не приводит к гибели микроорганизмов. Применение биосовместимых прекурсоров позволяет убрать негативный эффект спирта на живые клетки.
- Гидрофобно-гидрофильные взаимодействия в системе влияют структуру биогридного материала.
- Инкапсуляция в кремнезем микроорганизмов принципиально не зависит от строения клеточной стенки, а скорее зависит от присутствующих на поверхности функциональных групп.