

БИОГИБРИДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ТИПА «КЛЕТКИ В ОРГАНОСИЛИКАТНЫХ МАТРИЦАХ»: ПОЛУЧЕНИЕ, СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПРИМЕНЕНИЕ**Д.Г. Лаврова¹, А.Н. Звонарев², Т.Г. Хонина³**¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия² Пуцинский научный центр биологических исследований РАН, Пуцино, Россия³ Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Инкапсулированные клетки в инертные биосовместимые матрицы предоставляет множество преимуществ для стабилизации микроорганизмов перед использованием свободных клеток или их адгезии на двумерных поверхностях в различных областях биотехнологии, медицины и экологии. Однако для комфортного окружения живых клеток микроорганизмов необходимо тщательно выбирать матрицу для последующего инкапсулирования. Поэтому разработка новых матриц, позволяющих интегрировать целые клетки в архитектуру материала без негативных изменений их биоактивности, является актуальной задачей. Обычно для иммобилизации используют органические природные и синтетические материалы на основе альгината кальция, каррагенана, хитозана, однако в природе микроорганизмы инкапсулированы в неорганические матрицы. Интеграция микроорганизмов в силикатную матрицу с применением методов золь-гель химии представляет собой простой путь для разработки сложных функциональных материалов с биокаталитической активностью – «живых» гибридных материалов. Однако традиционный золь-гель синтез из алкоксидов кремния, например, тетраэтоксисилана (ТЭОС), приводит к образованию плотных и жестких структур кремнезема на поверхности микроорганизмов, повреждению целых клеток под действием спиртовых растворителей и побочных продуктов синтеза, и, как следствие, к лизису клеточных мембран. Это послужило толчком для разработки стратегий, направленных на формирование неорганических частиц у поверхности клеток при участии органических структурообразующих компонентов. Ранее нашей научной группой были изучены аспекты инкапсулирования микроорганизмов в ОРМОСИЛ матрицы на основе ТЭОС и метилтриэтоксисилана (МТЭС) в присутствии органических полимеров полиэтиленгликоля (ПЭГ) или поливинилового спирта (ПВС) в качестве структуроуправляющих агентов методом одностадийного золь-гель синтеза. В качестве биологической части гибридного материала использовали метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559, обладающие эффективной системой окисления короткоцепочечных спиртов. Показано, что при определенных условиях формируется целевая структура биогибридного материала «клетка в ОРМОСИЛ оболочке», обладающая защитными свойствами от воздействия стрессовых факторов окружающей среды [1]. Однако выделяющийся спирт в ходе золь-гель синтеза из ТЭОС и МТЭС ограничивает спектр потенциальных для использования микроорганизмов. Так, для снятия этих ограничений рассматривается возможность использования исходных соединений, не содержащих цитотоксичных побочных продуктов, например, применение органо-неорганических соединений кремния – полиолсилоксанов, которые получили широкое применение в медицине и биоминерализации [2], однако для инкапсулирования целых клеток не применялись.

В работе в качестве матрицы для инкапсулирования модельных дрожжевых клеток *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 в условиях основного (рН 7.6) золь-гель синтеза использовали полиглицеролаты кремния – глицеролат (ГК) и метилглицеролат кремния (МГК), синтезированные из ТЭОС и глицерина согласно методике [3] и любезно предоставлены Институтом органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН. Использование сложных эфиров кремния с глицерином вместо алкоксидов объясняется способностью глицерина, наряду с углеводами и аминокислотами, значительно повышать термостабильность и активность биомолекул [2].

Методами флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопии впервые подтверждено образование оболочки на основе глицеролатов кремния вокруг живых клеток (рисунок 1).

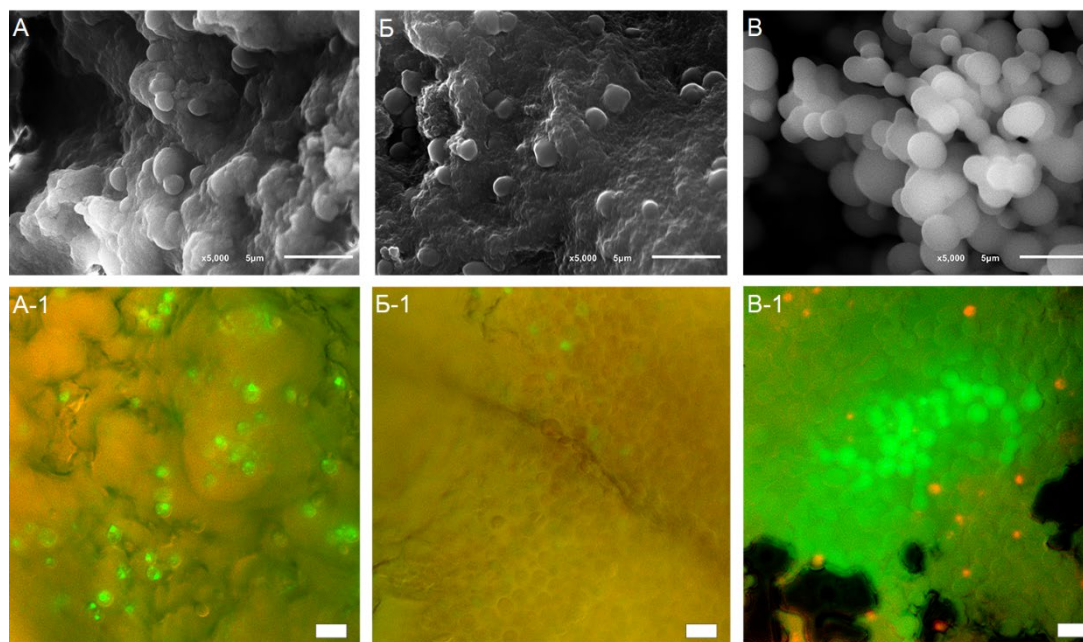


Рисунок 1. А-В – СЭМ-микрофотографии архитектуры биогибридных материалов на основе инкапсулированных клеток *Oogataea polymorpha* VKM Y-2559 в матрицы из полиолатных соединений кремния ГК: МГК в различных объемных соотношениях: А – ГК: МГК 100:0 об.%, Б – ГК: МГК 50:50 об.%, В – ГК: МГК 0:100 об.%; А-1 – С-1 – определение с помощью флуоресцентной микроскопии жизнеспособности инкапсулированных клеток *Oogataea polymorpha* VKM Y-2559 в матрицы из полиолатных соединений кремния ГК: МГК в различных объемных соотношениях: А-1 – ГК: МГК 100:0 об.%, Б-1 – ГК: МГК 50:50 об.%, В-1 – ГК: МГК 0:100 об.%

При увеличении гидрофобной добавки метилглицеролата кремния (МГК) наблюдался переход от оболочки пленочного типа к отдельным частицам золя на поверхности клеток. При этом увеличение МГК приводит к уменьшению степени инкапсулирования, так при использовании 100 об.% гидрофобной добавки при синтезе матрицы, наблюдали свободные как живые, так и мертвые (красное свечение флуоресцентных красителей) микроорганизмы. Определение дыхательной активности с применением биосенсорных технологий показано, что максимальными характеристиками чувствительности и стабильности обладает биокатализатор на основе инкапсулированных дрожжей в матрицы на основе ГК без добавления МГК. Увеличение в системе МГК до 50 об.% приводит к снижению характеристик чувствительности, что может быть связано с увеличением размера частиц золя на поверхности микроорганизмов, их неравномерному распределению и, как следствие, к увеличению диффузии субстратов. Дальнейшее увеличение гидрофобной добавки МГК приводит к увеличению дыхательной активности инкапсулированных клеток ввиду их состояния в свободной форме. Разработанные биогибридные материалы могут стать перспективными биокатализаторами при разработке биочувствительных платформ, биофильтров и биореакторов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-24-20032, <https://rscf.ru/project/24-24-20032> / и правительства Тульской области

Литература

1. Lavrova D.G. et al. Impact of hydrophilic polymers in organosilica matrices on structure, stability, and biocatalytic activity of immobilized methylotrophic yeast used as biofilter bed // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. Vol. 150, P. 109879. DOI 10.1016/j.enzmictec.2021.109879
2. Shchipunov, Y. Biomimetic Sol-Gel Chemistry to Tailor Structure, Properties, and Functionality of Bionanocomposites by Biopolymers and Cells // *Materials*. 2024, Vol. 17, P. 224. DOI 10.3390/ma17010224
3. Khonina T.G., Safronov A.P., Shadrina E.V., Mechanism of structural networking in hydrogels based on silicon and titanium glycerolates // *J. Colloid Interface Sci.* 2012, Vol. 365, P. 81–89, DOI:10.1016/j.jcis.2011.09.018.