

УДК 579.222

К.Н. Генералова, А.А. Минькова, В.Ф. Олонцев

Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

АДСОРБЦИЯ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ НА УГЛЕРОДНЫХ СОРБЕНТАХ

Согласно имеющимся литературным данным иммобилизацию биопрепаратов на угольных материалах проводят либо адсорбцией, либо химическим связыванием. Удержание адсорбированной молекулы происходит благодаря ванн-дер-ваальсовой связи. Адсорбцию как метод иммобилизации веществ белковой природы на углеродных материалах применяли довольно часто, что связано с высокими адсорбционными характеристиками последних. Практический интерес к изучению такой возможности обусловлен несколькими причинами. Во-первых, адсорбция – самый простой и наиболее часто используемый метод. Во-вторых, углеродные сорбенты – относительно дешевый и легкодоступный материал. В-третьих, гидрофобная поверхность углеродных материалов позволяет сохранить каталитическую активность ферментов, которые содержат в себе биоорганизмы.

*Рассмотрена возможность применения углеродных сорбентов в качестве носителей для клеток бактерий. Для сравнения выбраны активированный березовый уголь и углеродное волокно. Штамм бактерий *Rhodococcus*, являющийся носителем фермента амидазы, адсорбционно иммобилизован на перечисленные выше сорбенты, отличающиеся по внешней структуре. На основании данных об оценке уровня активности фермента, носителем которого являются выращенные клетки бактерий, сделано заключение о возможности адсорбционной иммобилизации на углеродный носитель. Исследована сорбционная емкость углеродных материалов по отношению к клеткам. Подробно представлена методика эксперимента, а именно условия культивирования, условия иммобилизации, приведены развернутые выводы по полученным в ходе эксперимента данным. По детальным снимкам, полученным в ходе микроскопического анализа, сделаны соответствующие заключения. Полученные снимки подтверждают различие в структуре сорбентов. Сделаны выводы о зависимости сорбции бактерий от структуры и пористости сорбента. Показано, что дробленый активи-*

рованный уголь и углеродные волокнистые материалы обладают примерно одинаковой сорбционной активностью.

Ключевые слова: адсорбция, иммобилизация, штамм бактерии, активированный уголь, углеродное волокно, пористость.

K.N. Generalova, A.A. Minkova, V.F. Olontsev

Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

ADSORPTION OF BACTERIAL CELLS ON CARBON SORBENTS

According to the available literature data, the immobilization of biological products in coal materials is carried out either by adsorption or chemical bonding. Retention of the adsorbed molecules is due to van-der-vaals bonding. Adsorption as a method of immobilizing substances which have protein-based nature on carbon materials are used quite often, due to the high adsorption characteristics of the carbon materials. Practical interest to study this possibility is for several reasons. Firstly, adsorption – the easiest and the most often used method. Secondly, carbon sorbents – relatively cheap and easily accessible material. Thirdly – hydrophobic surface of carbon materials allows to keep the catalytic activity of enzymes which contain a bioorganisms.

The article discusses the possibility of using carbon sorbents as carriers for the bacteria cells. For comparison the activated charcoal and carbon fiber are selected. Bacterial strain Rhodococcus, being a carrier of the enzyme amidase, immobilized due to adsorption on the above sorbents which are characterized by the external structure. Based on assessment of the level of enzyme activity which is carried by the cells are grown bacteria concluded possible adsorption immobilization on the carbon carrier. The sorption capacity of carbon materials to cells are investigated in this article. The article contains details technique of the experiment, namely the culture conditions, the conditions of immobilization, and also gives the detailed conclusions obtained in the course of experimentation data. On the detailed photographs taken during microscopic analysis the appropriate conclusions are made. The photographs confirm the difference in the structure of the sorbent. Conclusions about the dependence of sorption of bacteria from the structure and porosity of the sorbent are made. There are demonstrated that crushed activated carbon and carbon fiber materials exhibit approximately the same sorption activity.

Keywords: adsorption, immobilization, bacterial strain, activated charcoal, carbon fiber, porosity.

Применение ферментов в различных областях человеческой деятельности поистине безгранично. Наиболее частыми источниками ферментов являются клетки микроорганизмов. Преимущество использования иммобилизованных, закрепленных ферментов неоспоримо [1]. Использование ферментов и бактериальных клеток в качестве биокатализаторов для процессов основного органического синтеза – интенсивно развивающееся направление в биотехнологии и биокатализе. Ферментативные процессы синтеза и трансформации органических соединений в отличие от традиционного химического катализа представляют собой высокоспецифичные, малоотходные, экологически безопасные и энергосберегающие производства [2].

Эффективность биотехнологических процессов, используемых в промышленности, может быть увеличена путем иммобилизации клеток, применяемых в качестве биокатализаторов. Иммобилизация клеток микроорганизмов дает ряд преимуществ как перед свободно культивируемыми клетками, так и перед иммобилизованными ферментами вследствие изменения условий проведения самих биокаталитических процессов [3].

Метод адсорбции на поверхности материала носителя является одним из наиболее простых и доступных способов иммобилизации микробных клеток. Перспективными сорбентами для иммобилизации являются активированные угли и углеродные волокна, обладающие высокой химической и биологической стойкостью, механической прочностью, достаточной проницаемостью для субстрата, большой удельной поверхностью, возможностью получения в виде удобных в технологическом отношении форм. Система пор активированных углей, формируемая промежутками между отдельными графитоподобными кристаллами, а также наличие свободных валентностей у атомов углерода на поверхности кристаллов обеспечивает их химическое и сорбционное взаимодействие с различными веществами. Однако в настоящее время использованию углеродных материалов для иммобилизации клеток уделяется недостаточно внимания [3].

Цель работы – исследовать сорбционную емкость активированных углей и углеродных волокон по отношению к клеткам *Rhodococcus*.

Материалы эксперимента

Объектом иммобилизации являлся ранее полученный в Институте экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН в результате селекции штамм бактерии *Rhodococcus rhodochrous* 4-1. Штамм является

продуцентом фермента амидазы. Амидазы – ферменты, гидролизующие амиды карбоновых кислот до кислот и аммония. Механизм каталитической активности амидаз заключается в нуклеофильной атаке фермента на карбонильную группу амида, что приводит к образованию промежуточного тетраэдрического комплекса, который с отщеплением аммония превращается в промежуточный ацилферментный комплекс. Этот комплекс гидролизует до карбоновой кислоты и свободного фермента [4].

В качестве носителей использовали углеродные материалы различного происхождения: БАУ-А (березовый активированный уголь (АУ)), древесный уголь, «карбопон β-актив», бусофит (углеродные волокна).

Методика эксперимента

Для выращивания клеток бактерий использовали синтетическую среду N следующего состава: KH_2PO_4 – 0,4 г; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 1,5 г; NaCl – 0,2 г на 400 мл дистиллированной воды (д/в). Отдельно готовили раствор микроэлементов: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 20 г; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,4 г; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2 г на 100 мл д/в. Далее микроорганизмы инокулировали в среду N, содержащую 1 мл глюкозы; микроэлементы – 1 мл; ацетонитрил – 400 мкл. Колба с приготовленной суспензией помещается на качалку 100 об/мин, 22 °С. Чистота культуры (рис. 1) контролировалась с помощью светового микроскопа LEICA DMLS. Клетки рассеивались на плотную агаризованную среду (12 г мясопептонного бульона, 8 г агар-агара разводили в сосуде на 400 мл д/в, затем автоклавировали и переносили в стерильной атмосфере на чашки Петри). Плотная агаризованная среда также используется для хранения микроорганизмов.

Для оценки уровня активности фермента определяли изменение оптической плотности на спектрометре Ultrospec 3300pro при длине волны 230 нм в течение 1 мин реакции. Для этого в кювету вводили 1 мл суспензии, 3 мл калий-фосфатного буферного раствора и 200 мкл акриламида (1М раствор). Из акриламида образуется акриловая кислота; увеличение ее концентрации пропорционально увеличению оптической плотности. Оптическая плотность возрастает, соответственно, фермент амидазы активен.

Для контроля плотности культуры клеток измеряли оптическую плотность на фотоэлектроколориметре КФК-3 с использованием кюветы толщиной 0,5 см, длина волны 540 нм. В одну кювету вводили бу-

ферный раствор в качестве контроля, в другую – 0,5 мл суспензии и 3,5 мл буферного раствора. Результаты для двух отдельно приготовленных суспензий имеют следующие значения:

$$d_{\text{исход}} = 1,283;$$

$$d_2 = 0,5813;$$

$$d_{\text{буфера}} = 0.$$

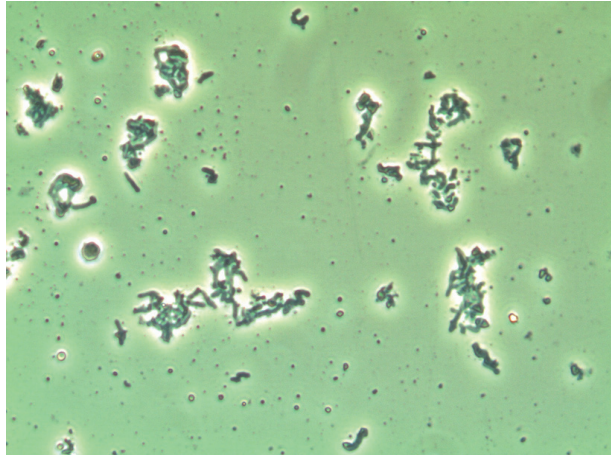


Рис. 1. Клетки Rhodococcus на плотной среде

Для определения количества сухих клеток в 1 мл суспензии три пробирки типа *эппендорф* взвешивали на аналитических весах, среднее значение их массы $m = 1,2956$ г. В пробирки вводили 2 мл суспензии и центрифугировали при 11,8 тыс. об/мин. Клетки осаждаются. Далее эппендорфы с осадком высушивали в термостате при температуре 30 °С до постоянной массы. Затем путем взвешивания на аналитических весах определялась масса пробирки с осадком. Масса « m » = 1,2967 г. Путем вычитания определяется, что оптической плотности d_2 в 0,5813 опт.ед. соответствует 0,55 мг сухих клеток в 1 мл суспензии.

Адсорбцию клеток проводили в течение 30 мин на 10 мл суспензии на изучаемых адсорбентах при перемешивании на качалке со скоростью вращения 100 об/мин. Сорбенты отделяли фильтрацией через бумажный фильтр «красная лента», определяли оптическую плотность жидкости $d_{\text{фильтр}}$ и отмывали калий-фосфатным буфером, с последующей повторной фильтрацией и последующим измерением оптической плотности $d_{\text{промыв}}$. На основании полученных результатов об оптиче-

ской плотности (таблица) вычисляли адсорбцию на носителе. При этом для вычисления количества адсорбированных клеток X (мг/мл) использовалась формула

$$X = \frac{d_{\text{сорб}} \cdot 0,55}{d_2} \cdot 10;$$

$$d_{\text{исход}} - (d_{\text{фильтр}} + d_{\text{промыв}}) = d_{\text{сорб}},$$

где $d_{\text{сорб}}$ – оптическая плотность суспензии, находящейся в контакте с углеродным материалом в течение 30 мин опт. ед.; d_2 – оптическая плотность исходной суспензии, опт. ед.; $d_{\text{исход}}$ – оптическая плотность, значение которой соответствует 1,283 опт. ед. соответственно; $d_{\text{фильтр}}$ – оптическая плотность первоначально профильтрованной жидкости, опт. ед.; $d_{\text{промыв}}$ – оптическая плотность раствора после повторной фильтрации, опт. ед.

Экспериментальные данные по адсорбции клеток штамма *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 на углеродных сорбентах

Сорбент	$d_{\text{фильтр}}$	$d_{\text{промыв}}$	$d_{\text{исход}}$	$d_{\text{сорб}}$	Концентрация клеток X , мг/мл	Адсорбция на носителе, мг/г
БАУ-А	0,0	0,0	1,283	1,283	12,139	24,278
Древесный АУ	0,298	0,076	1,283	0,909	8,607	17,214
Карбопон β -актив	0,048	0	1,283	1,235	11,685	23,370
Бусофит	0,240	0,015	1,283	1,028	9,726	19,452

Примечание. Результаты экспериментов представлены средними значениями, полученными не менее чем в трех независимых опытах.

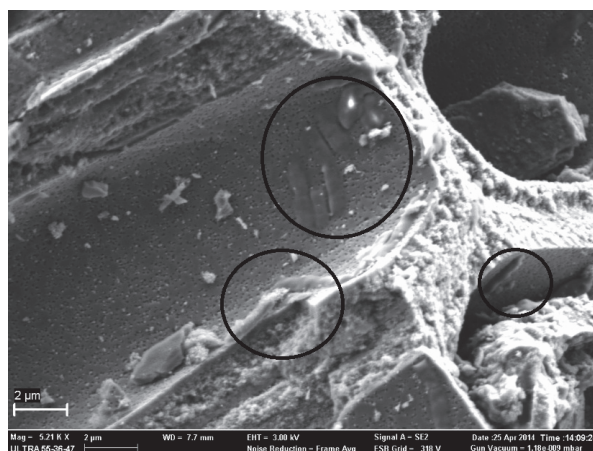


Рис. 2. Адсорбированные клетки бактерий на БАУ-А

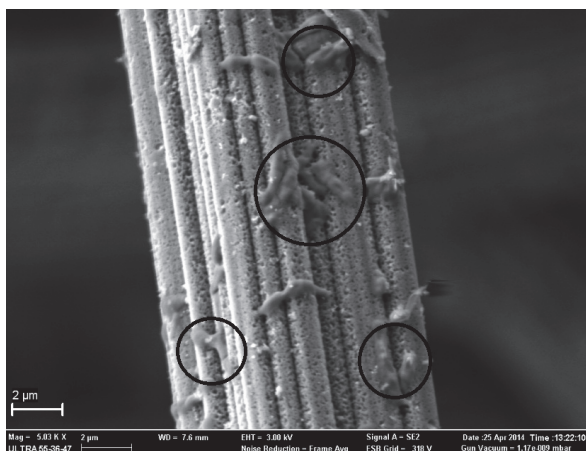


Рис. 3. Адсорбированные клетки бактерий на «карбопон β-актив»

Для визуального анализа использовали снимки, полученные с помощью Carl Zeiss ULTRA 55 – аналитического автоэмиссионного растрового электронного микроскопа для исследования наноструктур. Для исследования углеродных носителей и иммобилизованных клеток (рис. 2, 3) выбирается детектор вторичных электронов In-lens SE для изучения топографии поверхности на предельных разрешениях.

Результаты

Как видно из таблицы, высокой сорбционной емкостью, достигшей 22–24 мг веса сухих клеток на 1 г сорбента, обладали активированный уголь БАУ-А и углеродное волокно «карбопон β-актив». Процесс адсорбции клеток зависит от площади доступной поверхности, которая складывается в основном из макропор, превышающих по своим размерам клетку бактерии (см. рис. 2). Активированный уголь БАУ-А обладает развитой системой макропор (1,35–1,45 см³/г) [3], диаметр которых составляет примерно 2–40 мкм. Размер клетки соответственно равен 1–7 мкм (на рисунках выделены черной областью). Дисперсное состояние углеродного волокна «карбопон β-актив» имеет важное значение, так как обеспечивает связывание клеток родококков. Полученные результаты показывают, что применение АУ и углеродного волокна в качестве носителей для иммобилизации штамма *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 эффективно в равной степени.

Выводы

1. Оптимальными адсорбентами для нерастущих клеток *Rhodococcus rhodochrous* 4-1 (штамма – продуцента амидазы) являются макропористый углеродный носитель БАУ-А и волокнистый углеродный матери-

ал «карбопон β-актив». Величина адсорбции на носителях достигает 22–24 мг сухих клеток на 1 г носителя (см. таблицу). Максимальной адсорбционной способностью по отношению к клеткам бактерий обладают гранулированные активированные угли.

2. При адсорбции нерастаущих клеток бактерий на различных углеродных носителях сохраняется ферментативная активность клеток, вследствие чего можно рекомендовать сорбенты в качестве носителей для биокатализаторов.

3. Биокатализаторы, приготовленные путем адсорбции нерастаущих клеток амидосодержащих бактерий на углеродных носителях (БАУ-А и «карбопон β-актив»), могут быть рекомендованы для практического применения в процессе получения акриловой кислоты из акрилонитрила. Актуально дальнейшее исследование по приготовлению гетерогенных катализаторов.

4. По данным анализа СЭМ видно, что на БАУ-А и волокнистых сорбентах родококки адсорбируются благодаря наличию макропор (см. рис. 2), а также шероховатой поверхности в случае углеродного волокна (см. рис. 3). Известно, что процесс адсорбции клеток зависит от площади доступной поверхности, которая состоит из макропор. БАУ-А обладает развитой системой макропор, что сказывается на большей адсорбции клеток бактерий.

5. Практическое применение биокатализатора на основе иммобилизованных на углеродных сорбентах клеток бактерий может заключаться в создании колоночного реактора, заполненного слоями этих материалов, что позволит проводить синтезы карбоновых кислот и амидов в проточном режиме [5].

Список литературы

1. Кощеенко К.А. Живые иммобилизованные клетки как биокатализаторы процессов трансформации и биосинтеза органических соединений // Прикладная биохимия и микробиология. – 1981. – Т. 17, № 4. – С. 477–493.

2. Иммобилизованные нерастаущие клетки *Rhodococcus Ruber* как гетерогенные биокатализаторы для процесса гидратации акрилонитрила в акриламид / Ю.Г. Максимова, Г.А. Коваленко, А.Ю. Максимов [и др.] // Катализ в промышленности. – 2008. – № 1. – С. 44–50.

3. Иммобилизация на углеродных сорбентах клеток штамма *Rhodococcus Ruber* gt1, обладающего нитрилгидратазной активностью / А.Ю. Максимов, Ю.Г. Максимова, М.В. Кузнецова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – № 2. – С. 193–198.

4. Дебабов В.Г., Яненко А.С. Биокаталитический гидролиз нитрилов // Обзорный журнал по химии. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 376–394.

5. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах / Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов, В.А. Демаков [и др.] // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 51–58.

References

1. Koscheenko K.A. Zhivye immobilizovannye kletki kak biokatalizatory protsessov transformatsii i biosinteza organicheskikh soedineniy [Living immobilized cells as biocatalysts and processes of transformation biosinteza of organic compounds]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1981, vol. 17, no. 4, pp. 477-493.

2. Maksimova Yu.G., Kovalenko G.A., Maksimov A.Yu. [et al.]. Immobilizovannye nerastuschie kletki Rhodococcus Ruber kak geterogennye biokatalizatory dlya protsessa gidratatsii akrilonitrila v akrilamid [Immobilized Non-Growing Cells Rhodococcus ruber as Heterogeneous Biocatalysts for Hydration of Acrylonitrile to Acrylamide]. *Kataliz v promyshlennosti*, 2008, no. 1, pp. 44-50.

3. Maksimov A.Yu., Maksimova Yu.G., Kuznetsova M.V. Immobilizatsiya na uglerodnykh sorbentakh kletok shtamma Rhodococcus Ruber gt1, obladayshchego nitrilgidrataznoy aktivnostyu [Immobilization of Rhodococcus Ruber Strain gt1, possessing nitrile hydratase activity, on carbon support]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2007, no. 2, pp. 193-198.

4. Debabov V.G., Yanenko A.S. Biokataliticheskiy gidroliz nitrilov [Biocatalytic hydrolysis of nitriles]. *Obzornyy zhurnal po khimii*, 2011, vol. 1, no. 4, pp. 376-394.

5. Maksimova Yu.G., Maksimov A.Yu., Demakov V.A. Gidroliz akrilonitrila kletkami nitrilkonvertiruyuchikh bakteriy, immobilizovannyimi na voloknistykh uglerodnykh sorbentakh [Acrylonitrile hydrolysis by nitrile utilizing Rhodococcus ruber gt1 and Pseudomonas fluorescens C2 bacteria cells immobilized in agarose gel structure]. *Biotekhnologiya*, 2010, no. 4, pp. 51-58.

Об авторах

Генералова Ксения Николаевна (Пермь, Россия) – магистрант кафедры порошкового материаловедения Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: generalovakn_21_1992@mail.ru).

Минькова Анфиса Андреевна (Пермь, Россия) – магистрант кафедры порошкового материаловедения Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: minkova20@gmail.com).

Олонцев Валентин Федорович (Пермь, Россия) – доктор технических наук, профессор кафедры порошкового материаловедения Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: olontsevvf@gmail.com).

About the authors

Kseniya N. Generalova (Perm, Russian Federation) – master student, department of powdered materials, Perm National Research Polytechnic University (Komsomolsky av., 29, Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: generalovakn_21_1992@mail.ru).

Anfisa A. Minkova (Perm, Russian Federation) – master student, department of powdered materials, Perm National Research Polytechnic University (Komsomolsky av., 29, Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: minkova20@gmail.com).

Valentin F. Olontsev (Perm, Russian Federation) – doctor of technical science, professor, department of powdered materials, Perm National Research Polytechnic University (Komsomolsky av., 29, Perm, 614990, Russian Federation; e-mail: olontsevvf@gmail.com).

Получено 09.07.2014