

УДК 579.663

## ИЗУЧЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ РОДОКОККОВ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В МАКРОПОРИСТОМ КРИОГЕЛЕ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА

А. Ю. Гаврин<sup>а</sup>, А.А. Елькин<sup>а</sup>, М. С. Куюкина<sup>а,б</sup>, В.В. Гришко<sup>с</sup>, И. Б. Ившина<sup>а,б</sup>

<sup>а</sup> Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

<sup>б</sup> Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

<sup>с</sup> Институт технической химии УрО РАН, 614000, Пермь, ул. Ленина, 13

Определены оптимальные условия иммобилизации клеток родококков в макропористый криогель поливинилового спирта. На примере биодegradации *n*-гексадекана и биотрансформации тиаоанизола показано, что каталитическая активность иммобилизованных клеток родококков в 2–2.5 раза выше таковой у свободных клеток.

Иммобилизованные клетки микроорганизмов широко используются в биотехнологиях получения целевых веществ (Синицин и др., 1994). Процесс иммобилизации микробных клеток способствует существенному повышению их каталитической активности и устойчивости к действию неблагоприятных факторов внешней среды. Использование криогелей различной

природы для закрепления бактериальных клеток (рис. 1) обеспечивает проведение данного процесса в «мягких» условиях, т. е. при физиологических значениях температуры, pH и без применения токсичных химических веществ. Криогель на основе поливинилового спирта – это макропористый, высокопрочный, по-

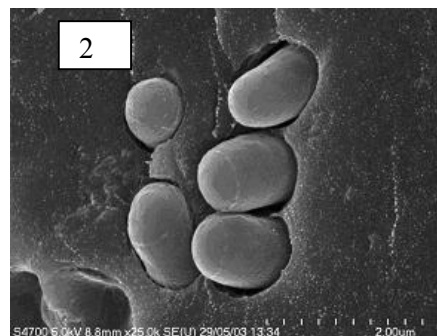
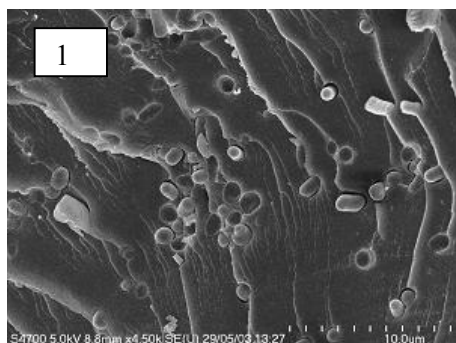
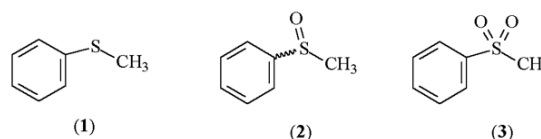


Рис. 1. Клетки *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, иммобилизованные в макропористом криогеле поливинилового спирта, в сканирующем электронном микроскопе: 1 – x 4500; 2 – x 25000

лимерный материал, получаемый в результате замораживания с последующим оттаиванием концентрированных водных растворов данного полимера (Лозинский, Плиева, Зубов, 1995).

В настоящее время наиболее разрабатываемыми в биотехнологическом отношении актинобактериями являются представители рода *Rhodococcus sensu stricto* (Ившина, 1997). В частности показано (Толстиков, Гришко, Ившина, 2003), что родококки катализируют реакции стереоселективного окисления фенилметилового сульфида (тиоанизола) (1) и

его гомологов в соответствующие (R)- или (S)-сульфоксиды (2), широко применяемые в химической и



фармакологической промышленности. Цель настоящей работы – изучение углеводородокисляющей активности иммобилизованных клеток родококков.

## Материалы и методы

В работе использовали штаммы *R. ruber* ИЭГМ 231 и *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, www.iegm.ru/iegmcol). Культуры параллельно выращивали в мясопептонном бульоне и минеральной среде в присутствии *n*-гексадекана (Каталог штаммов..., 1994). В качестве носителя иммобилизованных клеток использовали криогель поливинилового спирта марки 40/2 (ГОСТ 10779-78) производства предприятия «Азот» (Невинномысск). Формирование гранул криогеля с закрепленными в них клетками родококков проводили согласно ранее описанной методике (Куюкина et al., 2006). Для гидрофобизации криогеля использовали *Rhodococcus* биосурфактант (Куюкина et al., 2001). Сравнительное определение жизнеспособности свободных и иммобилизованных клеток родококков осуществляли с помощью специфического окрашивания иодонитротетразолием фиолетовым. Каталитическую активность свободных клеток родококков, а также включенных в матрицу полимерного криогеля определяли в экспериментах по биодеградации *n*-гексадекана и трансформации тиаоизола. Количество остаточного *n*-гексадекана определяли гравиметрически. Анализ продуктов биотрансформации тиаоизола осуществляли методами тонкослойной хроматографии, а также хромато-масс-спектрометрии с использованием

хромато-масс-спектрометра Agilent 6890N с квадрупольным масс-спектрометром Agilent MSD 5973N в качестве детектора и кварцевой колонкой HP-5 MS SN US 1518974`-1 (Agilent, США). Долговременное хранение гранул биокатализатора осуществляли в высушенном виде при комнатной или пониженной температурах и в физиологическом растворе при комнатной или пониженной температурах. Жизнеспособность иммобилизованных клеток в процессе хранения контролировали еженедельно в течение 10 месяцев.

Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Для статистической обработки полученных данных использовали программу STATISTICA 6.0. Достоверность различий между средними величинами оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

В результате исследований установлено, что для иммобилизации родококков, предварительно выращенных в мясопептонном бульоне, оптимальное объемное соотношение клеточной массы и раствора поливинилового спирта составляет 1 : 3 с добавлением 10% *Rhodococcus*-биосурфактанта (табл. 1). Для клеток, выращенных в присутствии *n*-гексадекана, такое соотношение составляет 1:2, при этом не требуется добавления *Rhodococcus*-биосурфактанта (табл. 2).

Таблица 1

Характеристика биокатализатора на основе иммобилизованных клеток родококков, выращенных на мясопептонном бульоне

| Соотношение клеточная суспензия : криогель, v/v | Количество клеток родококков в 1 грануле криогеля, $\times 10^3$ | Концентрация <i>Rhodococcus</i> -биосурфактанта, % | Распределение гранул криогеля в двухфазной среде | Механическая прочность гранул криогеля |
|---|--|--|--|--|
| 2:1   | 210 ± 1.0  | 3  | Вода   | Низкая                                 |
| 2:1   | 21.0 ± 1.0   | 5  | Углеводород/вода                                 | Низкая                                 |
| 2:1   | 21.0 ± 1.0   | 10   | Углеводород/вода                                 | Низкая                                 |
| 1:1   | 13.5 ± 1.5   | 3  | Вода   | Низкая                                 |
| 1:1   | 13.5 ± 1.5   | 5  | Углеводород/вода                                 | Низкая                                 |
| 1:1   | 13.5 ± 1.5   | 10   | Углеводород/вода                                 | Низкая                                 |
| 1:2   | 8.0 ± 0.6  | 3  | Вода   | Высокая                                |
| 1:2   | 8.0 ± 0.6  | 5  | Вода   | Высокая                                |
| 1:2   | 8.0 ± 0.6  | 10   | Углеводород/вода                                 | Низкая                                 |
| 1:3   | 6.5 ± 0.4  | 3  | Вода   | Высокая                                |
| 1:3   | 6.5 ± 0.4  | 5  | Вода   | Высокая                                |
| 1:3   | 6.5 ± 0.4  | 10   | Углеводород/вода                                 | Высокая                                |
| 1:5   | 3.0 ± 0.2  | 3  | Вода   | Высокая                                |
| 1:5   | 3.0 ± 0.2  | 5  | Вода   | Высокая                                |
| 1:5   | 3.0 ± 0.2  | 10   | Вода   | Высокая                                |

Подобранные условия иммобилизации обеспечивают высокую концентрацию жизнеспособных клеток, заключенных в гель, значительную механическую прочность биокатализатора и распределение гранул криогеля на границе раздела фаз «углеводород–вода». Межфазная локализация приводит к тесному взаимодействию гранул катали-

затора со средой в гидрофильной и гидрофобной фазах, что способствует одновременному поступлению углеводородного субстрата, воды и кислорода к иммобилизованным клеткам.

По нашим данным, углеводородокисляющая активность закрепленных в криогеле клеток существенно выше по сравнению с таковой свободных

клеток. Так, степень биodeградации *n*-гексадекана иммобилизованными клетками родококков достигает 51%, тогда как данный показатель для свободных клеток составляет лишь 21%. Сравнительный анализ данных по окислению тиоанизола свободными и закрепленными бактериальными клетками показал, что при использовании свободных клеток родококков полная конверсия сульфида достигается только через 3 сут после его добавле-

ния, тогда как использование иммобилизованных клеток позволяет исключить двухдневную стадию подготовки биокатализатора и осуществить полную конверсию тиоанизола уже за 24 ч при условии одновременного введения биокатализатора и субстрата. При этом относительное содержание побочного продукта – сульфена тиоанизола (3) – не превышает 9.5% (рис. 2).

Таблица 2

**Характеристика полученного биокатализатора на основе клеток родококков, выращенных в жидкой минеральной среде с добавлением *n*-гексадекана**

| Соотношение клеточная суспензия : криогель, v/v | Количество клеток родококков в 1 грануле криогеля, $\times 10^3$ | Распределение гранул криогеля в двухфазной среде | Механическая прочность гранул криогеля |
|---|--|--|--|
| 2 : 1   | $12.3 \pm 2.0$   | Углевodород / вода                               | Низкая                                 |
| 1 : 1   | $9.3 \pm 1.5$  | Углевodород / вода                               | Низкая                                 |
| 1 : 2   | $6.2 \pm 0.4$  | Углевodород / вода                               | Высокая                                |
| 1 : 3   | $4.6 \pm 0.6$  | Вода   | Высокая                                |
| 1 : 5   | $3.1 \pm 0.7$  | Вода   | Высокая                                |

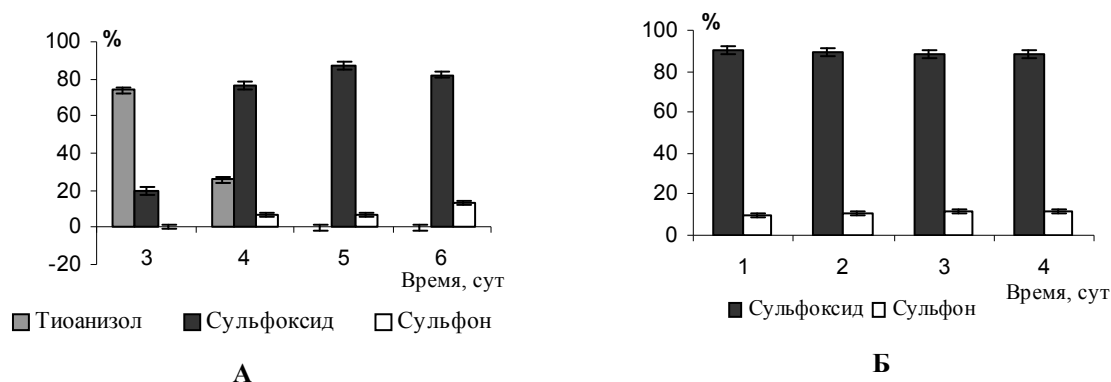


Рис. 2. Динамика накопления продуктов биотрансформации тиоанизола с использованием свободных (А) и иммобилизованных (Б) клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66

Установлено, что оптимальным способом долгосрочного поддержания полученного биокатализатора является его хранение в высушенном виде при комнатной или пониженной температурах. При этом жизнеспособность иммобилизованных клеток родококков сохраняется на уровне 60–80% в течение 10 месяцев.

Исследования поддержаны грантами Программы Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и РФФИ № 04-04-97518-р\_офи; 07-04-97612-р\_офи.

#### Список литературы

Ившина И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: биоразнообразии, детекция, иммунодиагностика: Дис. ...д-ра биол. наук. Пермь, 1997.

Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. И.Б. Ившиной. М.: Наука, 1994. 163 с.

Лозинский В.И., Плиева Ф.М., Зубов А.Л. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. Сверхмакропористые носители для иммобилизации молекул // Биотехнология. 1995. № 1. С. 32–37.

Синицин А.П. и др. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Изд-во МГУ, 1994. 288 с.

Толстикова А.Г., Гришко В.В., Ившина И.Б. Энантиоселективное биокаталитическое окисление органических сульфидов в хиральные сульфоксиды // Современные проблемы асимметрического синтеза / Под ред. А.Г. Толстикова. Екатеринбург, 2003. С. 165–205.

Kuyukina M.S. et al. Immobilization of hydrocarbon-oxidizing bacteria in poly(vinyl alcohol) cryogels

- hydrophobized using a biosurfactant // J. Microbiol. Methods. 2006. Vol. 65. P. 596–603.
- Куюкина М.С. et al. Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl-tertiary butyl ether extraction // J. Microbiol. Methods. 2001. Vol. 46. P. 149–156.
- Поступила в редакцию 18.05.2006

### **Study of hydrocarbon-oxidizing activity of *Rhodococcus* cells immobilized in poly(vinyl alcohol) cryogel**

A.Yu. Gavrin, A.A. Elkin, M.S. Kuyukina, V.V. Grishko, I.B. Ivshina

Optimal conditions for immobilization of *Rhodococcus* cells to macroporous poly(vinyl alcohol) cryogel were developed. It was shown that catalytic activity of immobilized rhodococcal cells, e.g. *n*-hexadecane biodegradation and thioanisol transformation extent, is 2–2.5 times higher than that of free cells.