

УДК 663.14.031.

## ИММОБИЛИЗАЦИЯ СПИРТООБРАЗУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ НА ВОЛОКНЕ НИТРОН

С. А. СТЕБАКОВА<sup>+</sup>, Н. С. РУЧАЙ, Н. В. ГРИЦ

Белорусский государственный технологический университет, ул. Свердлова 13а, 220630 г. Минск.

*Исследован процесс сорбционной иммобилизации клеток спиртообразующих дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* на синтетическом волокне нитрон, модифицированном красителями катионного типа. Построены изотермы адсорбции клеток на носителе. Сорбционная емкость носителя по сухой массе клеток составляет 400–500 мг/г. Закреплению клеток на носителе способствует кислая среда ( $\text{pH} = 4$ ), пребывание культуры в состоянии активного роста при отсутствии лимитации субстратом, наличие в среде катионов кальция в концентрации до 400 мг/л. Иммобилизация клеток приводит к увеличению продукции этанола на 10–20%. Биосистема с иммобилизованными клетками *Schizosaccharomyces pombe* апробирована в процессе сбраживания гидролизного сусла в биореакторе проточного типа в течение 45 сут. Полученные результаты по степени конверсии углеводов (66–68%) и скорости образования этанола (1,57 г/л·ч) удовлетворяют требованиям гидролизно-спиртового производства.*

**Введение и постановка задачи.** Новый технологический уровень производства этанола из углеводсодержащего сырья связан с использованием биосистем с иммобилизованными клетками продуцентов. Из известных методов иммобилизации микроорганизмов самым технологичным является адсорбционное закрепление клеток на поверхности носителя. Адсорбированные на носителях микроорганизмы уже применяются в некоторых промышленных производствах и перспективны в производстве этанола. Однако отсутствие конкретных представлений о механизме процесса сорбции клеток и противоречивость имеющихся экспериментальных данных не позволяют осуществить научно обоснованный выбор носителя, который определяет эффективность функционирования биосистемы и возможность ее практического использования. В результате проведенных исследований нами предложено использовать в качестве носителя для иммобилизации спиртообразующих дрожжей синтетическое полиакрилонитрильное волокно нитрон, модифицированное красителями катионного типа.

В настоящей работе исследован процесс сорбционного взаимодействия спиртообразующих дрожжей с поверхностью волокнистого носителя и определена эффективность функционирования биосистемы при сбраживании гидролизатов растительного сырья.

**Объекты и методы исследований.** Объектом исследования являлись дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* из Всесоюзной коллекции промышленных микроорганизмов (ВНИИ «Генетика», г. Москва) и производственный штамм Бобруйского гидролизного завода *Schizosaccharomyces pombe*, иммобилизованные на промышленном полиакрилонитрильном волокне производства Новополоцкого завода «Полмир». Волокно нитрон обладает высокой механической прочностью, устойчиво в кислой среде (до  $\text{pH} = 3$ ) и к повышенной температуре (до  $150^\circ\text{C}$ ).

Биомассу дрожжей накапливали последовательным выращиванием на плотной агаризованной среде в качалочных колбах и в лабораторном ферментаторе с использованием глюкозной синтетической среды Ридера и гидролизного сусла.

Иммобилизацию клеток дрожжей на носителе проводили следующим образом. Промытые стерильной дистиллированной водой образцы волокнистого носителя высушивали под вакуумом до постоянной массы, помещали в качалочные колбы с дрожжевой суспензией и выдерживали при слабом перемешивании и температуре  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 8–20 ч. Скорость иммобилизации и степень насыщения носителя клетками контролировали по оптической плотности дрожжевой суспензии при помощи фотометра КФК-3. После достижения динамического равновесия в системе носитель отмы-

<sup>+</sup> Автор, с которым следует вести переписку.



вали от свободных клеток раствором, из которого проводилась иммобилизация, высушивали до постоянной массы и определяли по дрожжевым клеткам его сорбционную емкость (количество сухой массы клеток, сорбированных единицей массы сухого носителя).

Иммобилизацию клеток дрожжей в проточном режиме и сбраживание гидролизного суслу осуществляли на ферментационной установке с термостатированным биореактором, заполненным носителем. Жидкостные потоки дозировали с помощью перистальтических насосов. В исследованиях использовали биореакторы двух типов: колонный биореактор (соотношение высоты и диаметра рабочей зоны  $h:d = 8:1$ ) с линейным расположением волокна носителя по высоте аппарата и биореактор с вращающимся ротором ( $h:d = 2:1$ ), в котором волокно располагалось линейно в жгутах. Частота вращения ротора —  $2 \text{ мин}^{-1}$ . Плотность упаковки носителя в биореакторах составляла  $15\text{--}30 \text{ кг/м}^3$ . Иммобилизацию клеток в биореакторе осуществляли путем циркуляции дрожжевой суспензии через носитель со скоростью протока  $0,1\text{--}0,2 \text{ ч}^{-1}$  в течение  $10\text{--}12 \text{ ч}$ . Затем биореактор переводили на непрерывный процесс сбраживания суслу при протоке  $0,05\text{--}0,3 \text{ ч}^{-1}$ , температуре  $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  и рН среды  $4,2\text{--}4,4$ . Эффективность процесса брожения контролировали путем определения редуцирующих веществ (РВ) в сусле и бражке эбулиостатическим методом и спирта в бражке методом газожидкостной хроматографии.

**Результаты и их обсуждение.** Исследования показали, что высокими адгезионными свойствами обладает волокно нитрон, окрашенное красителями катионного типа. Природа красителя играет решающую роль в способности волокна к адгезии дрожже-

вых клеток. На основании результатов экспериментов произведен выбор типа промышленного волокна, обладающего наибольшей сорбционной емкостью по отношению к дрожжевым клеткам.

В процессе иммобилизации динамическое равновесие в системе носитель — дрожжевая суспензия достигается за  $10\text{--}12 \text{ ч}$  контакта (рис. 1). Причем в первые  $3\text{--}4 \text{ ч}$  происходит быстрая ориентация клеток на активных центрах носителя, а затем наступает более длительная фаза формирования прочно связанного сорбционного слоя. Изотермы адсорбции клеток спиртообразующих дрожжей на исследуемом носителе соответствуют теоретической изотерме Ленгмюра для монослойной адсорбции (рис. 2). Кислая среда ( $\text{pH} = 4$ ) способствует адсорбции клеток на поверхности носи-

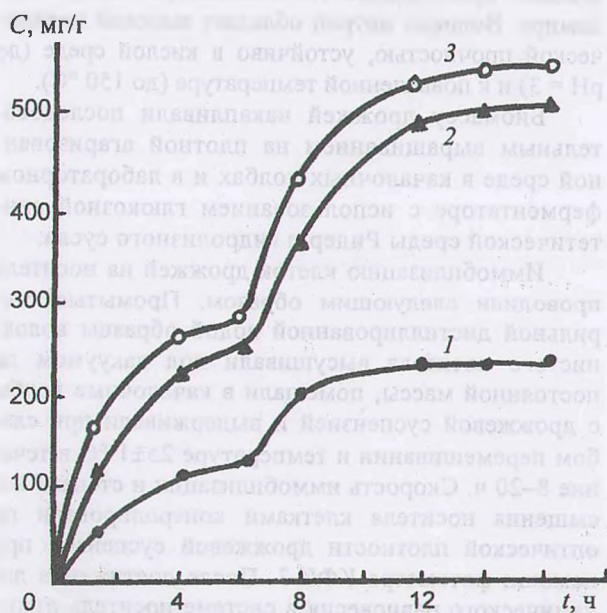


Рис. 1. Динамика сорбции клеток *Saccharomyces cerevisiae* из физиологических растворов ( $\text{pH} = 4,0$ ) с концентрацией дрожжей по сухой массе: 1 —  $1,25 \text{ г/л}$ ; 2 —  $6,25 \text{ г/л}$ ; 3 —  $12,5 \text{ г/л}$

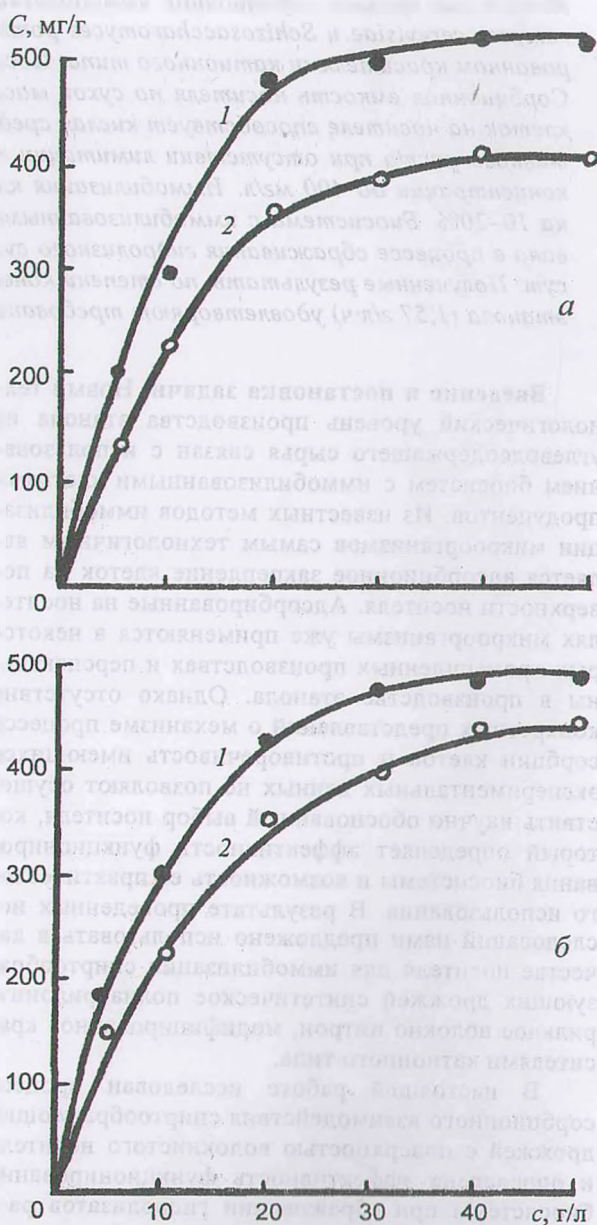


Рис. 2. Изотермы адсорбции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (а) и *Schizosaccharomyces pombe* (б) на носителе: 1 —  $\text{pH}$  среды  $4,0$ ; 2 —  $6,0$



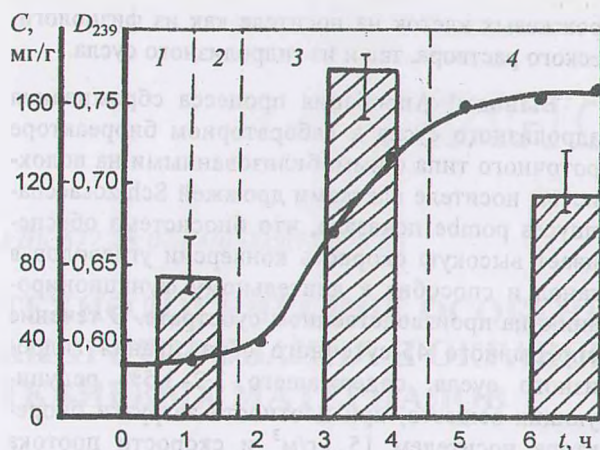


Рис. 3. Эффективность адгезии клеток *Saccharomyces cerevisiae* на носителе в зависимости от фазы роста популяции  $D_{239}$ : 1 – лаг-фаза; 2 – фаза ускорения роста; 3 – логарифмическая фаза; 4 – стационарная фаза

теля, что свидетельствует о значительной роли в адсорбционном процессе сил электростатического взаимодействия между компонентами клеточной стенки и носителя. Сорбционная емкость волокна нитрон достигает 400–500 мг сухой массы дрожжевых клеток на грамм носителя.

Известно, что количество удерживаемых носителем клеток зависит от ряда факторов, в том числе от физиологического состояния культуры, состава и свойств среды, из которой осуществляется иммобилизация [1]. Для оценки влияния на процесс адсорбции клеток фазы роста популяции и физиологического состояния культуры провели серию экспериментов по иммобилизации клеток растущей культуры при идентичных режимных параметрах (концентрация дрожжей в исходной суспензии 5 г/л абсолютно сухой биомассы (АСБ), рН среды 4,4, масса носителя 1 г, объем жидкой фазы 100 мл, непроточный режим иммобилизации в качалочных колбах при амплитуде и числе колебаний 6 мм и 150 мин<sup>-1</sup> соответственно).

Результаты экспериментов свидетельствуют, что адгезионные взаимодействия между поверхностью носителя и клеточной стенкой наиболее сильны, когда популяция находится в логарифмической фазе роста (рис. 3). В этот период клеточные стенки имеют высокий отрицательный заряд и, вероятно, содержат в большом количестве способствующие адсорбции компоненты – адгезины (гликопротеины и другие биополимеры). Переход популяции в стационарную фазу роста снижает эффективность адсорбции клеток на носителе. Имеющие место различия в количестве удерживаемых носителем клеток статистически значимы.

Анализ литературы свидетельствует, что в ряде случаев высокая адгезионная способность характерна для клеток голодающей популяции [2]. В связи с этим исследовали эффективность сорбционного взаимодействия с носителем при

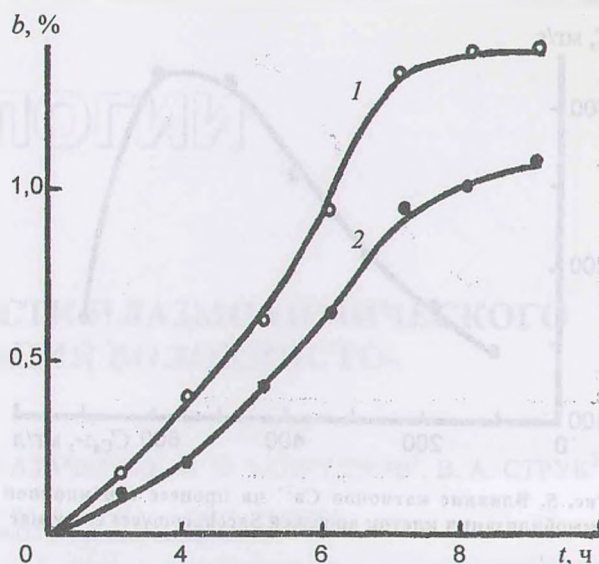


Рис. 4. Накопление этанола дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*: 1 – иммобилизованные клетки; 2 – свободные клетки

иммобилизации клеток, находящихся в состоянии сбалансированного роста, из популяции, лимитированной по субстрату (среда Ридер, содержащая 3,0 г/л глюкозы), из голодающей популяции (среда Ридер) и популяции, выращенной в анаэробных условиях. И в этом случае наибольшей сорбционной способностью обладают клетки культуры, находящейся в состоянии активного роста при отсутствии лимитации субстратом (рис. 3). Самую низкую сорбционную способность имели клетки, выращенные в анаэробных условиях. Следовательно, присутствие кислорода обуславливает формирование клеточных стенок, содержащих большие количества активных адгезинов.

Естественное закрепление клеток на поверхности носителя является не только простым, но и наиболее «мягким» методом иммобилизации, не оказывающим негативного воздействия на жизнедеятельность клеток. Однако метаболическая активность иммобилизованных клеток нередко возрастает [3]. Исследования показали, что продуктивность спиртообразующих дрожжей, иммобилизованных на волокне нитрон, в 1,2 раза выше, чем свободных клеток при идентичных условиях брожения (рис. 4). Большая продуктивность биосистемы с иммобилизованной культурой может быть связана не только с благоприятными условиями для обмена веществ в клетках за счет их распределения в реакционном объеме, но и с некоторыми изменениями метаболического характера [4].

Использование биосистем с иммобилизованными клетками наиболее целесообразно в гидролизно-спиртовом производстве, где применяется энергозатратный сепарационный метод брожения. Исходя из имеющихся литературных данных, на процесс адгезии дрожжевых клеток на носителе при иммобилизации их из гидролизного суслу в



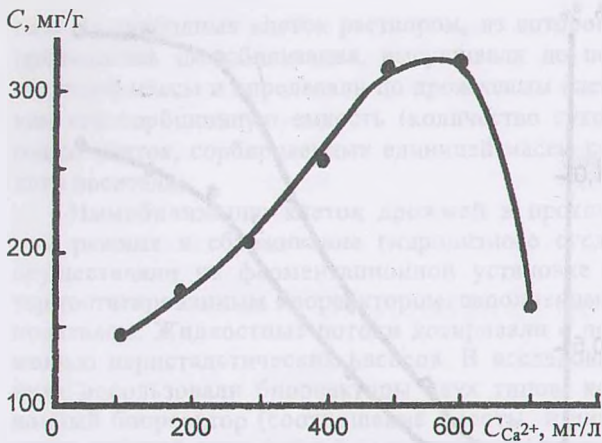


Рис. 5. Влияние катионов  $Ca^{2+}$  на процесс сорбционной иммобилизации клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

наибольшей степени могут оказать влияние катионы кальция и лигногуминовые коллоидные вещества. Наличие в среде многовалентных катионов металлов может привести к снижению электрокинетического потенциала клеток и изменению заряда их поверхности. Из проведенных экспериментов следует, что катионы кальция, присутствующие в среде для иммобилизации в концентрации до 400 мг/л способствуют сорбционному закреплению дрожжевых клеток на носителе. Дальнейшее увеличение содержания кальция в среде снижает емкость носителя по удерживаемым клеткам (рис. 5).

Коллоидные вещества гидролизного сусла в отсутствие дрожжевых клеток сорбируются на носителе в количестве до 68% от исходных. Однако присутствие в среде дрожжевых клеток приводит к тому, что этот показатель снижается до 23%. Следовательно, в условиях конкурентной сорбции дрожжевые клетки более активно взаимодействуют с поверхностью носителя, чем частицы коллоидных веществ. На практике это подтверждается высокой эффективностью иммобилизации

дрожжевых клеток на носителе как из физиологического раствора, так и из гидролизного сусла.

**Выводы.** Апробация процесса сбраживания гидролизного сусла в лабораторном биореакторе проточного типа с иммобилизованными на волокнистом носителе клетками дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* показала, что биосистема обеспечивает высокую скорость конверсии углеводов в этанол и способна к длительному функционированию на производственном субстрате. В течение непрерывного 45-суточного сбраживания гидролизного сусла, содержащего 3,2–3,5% редуцирующих веществ, при плотности загрузки биореактора носителем 15 кг/м<sup>3</sup> и скорости протока среды 0,15 ч<sup>-1</sup> степень конверсии углеводов в этанол составила 66–68%, а скорость образования этанола 1,57 г/л·ч, что удовлетворяет технологическим требованиям гидролизно-спиртового производства.

#### ОБОЗНАЧЕНИЯ

$h$  – высота;  $d$  – диаметр;  $C$  – количество сорбированных клеток;  $c$  – концентрация клеток в суспензии;  $D_{239}$  – оптическая плотность при  $\lambda = 239 \text{ см}^{-1}$ ;  $t$  – время;  $b$  – концентрация этанола в бражке;  $Ca^{2+}$  – концентрация катиона.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. Москва: Изд-во МГУ (1986)
2. Bringi V., Dale B. E. // *Biotechnol. Lett.*, 7 (1985), № 12, 905–908
3. Scott C. D. // *Enzyme and microbial technol.*, 9 (1987), № 2, 66–73
4. Иваницкая Л. П., Бибикина М. В., Шаройко Е. С., Никитина В. Г. // *Антибиотики и медицинская биотехнология* (1985), вып.10, 726–728

Stebakova S. A., Ruchai N. S., Grits N. V.

Immobilization of ethanol producing yeast on synthetic fiber nitron.

The process of sorption immobilization of ethanol-producing yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* on synthetic fibre nitron modified by cationic dyes was investigated. The isotherms of cell adsorption on carrier were constructed. The sorption capacity of carrier by dry cell mass was 400–500 mg/g. The acid medium (pH 4), stay of culture in active growth state, in absence of calcium cations in concentration up to 400 mg/l in the medium promoted cell immobilization on the carrier. The cell immobilization lead to the increase of ethanol production by 10–20%. The biosystem with immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells was approved in the process of wood hyrolysate fermentation using flow bioreactor during 45 days. The obtained results on carbohydrates conversion degree (66–68%) and on the rate of ethanol formation (1,57 g/l·h) meet the demands for hydrolysis-alcoholic production.

Поступила в редакцию 06.02.98.

© С. А. Стебакова, Н. С. Ручай, Н. В. Гриц, 1998.