

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о существенном влиянии иммобилизации на физиологические характеристики клеток дрожжей.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии. - М., 1989. Т.2. С.192.
2. Miller J.L. // Anal. Chem. 1959. V.31. - P.426-428.
3. Практикум по биохимии / Под редакцией Северина С.Е. и Соловьевой Г.А. - Изд-во Моск. ун-та, 1989.
4. Мусил Я., Новакова О., Кунц К. Современная биохимия в схемах. - М.: "Мир", 1984. - С.186.
5. Уильямс У.Дж. Определение анионов. - М.: Химия, 1982. - С.49.
6. Духин С.С., Дерягин Б.В. Электрофорез. - М.: Наука, 1976.
7. Квасников Е.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. - Киев: Наукова думка, 1991. - С.55-57.

УДК 573.6.086.83:663.

М.Н.Менча, студент;

И.В.Кузьмичева, аспирант;

В.Н.Леонтьев, доцент

#### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ С НОСИТЕЛЯМИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ

The interactions between microorganism cells and carrier surface during immobilization were investigated. The change of surface properties was achieved by means of dye modification.

Несмотря на то, что иммобилизованные клетки микроорганизмов широко применяются в промышленных процессах, до сих пор подбор носителей для иммобилизации в каждом конкретном случае осуществляется эмпирически. Очевидно, такой подход обусловлен отсутствием четких теоретических представлений о механизмах взаимодействия клеток микроорганизмов с твердой поверхностью носителя. Существующие теории [1-3] не позволяют в полной мере и адекватно описать адгезию микроорганизмов на твердых поверхностях, поскольку клетка - сложный биологический объект, адгезионная способность которого непостоянна, зависит от многих факторов и может меняться на молекулярно-генетическом уровне.

Целью настоящей работы было экспериментально изучить закономерности взаимодействия клеток микроорганизмов с поверхностью носителей для иммобилизации.

В качестве модельного процесса использовали иммобилизацию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на ионообменных полимерных носителях различной химической природы (производные декстрана, целлюлозы и сополимеры стирола и дивинилбензола). Поскольку в экспериментальной практике для выделения белков и нуклеиновых кислот применяются аффинные матрицы, созданные с использованием в качестве лигандов красителей [4], в нашей работе изменение свойств поверхности носителей осуществлялось с помощью катионных и анионных красителей (в основном трифенилметанового ряда).

В связи с тем, что физиолого-биохимический статус клеток существенным образом влияет на свойства клеточной поверхности, а, следовательно, и на адсорбционную способность клеток, была изучена методом микроэлектрофореза зависимость электрокинетических свойств клеток от фазы роста микроорганизмов (рис. 1).

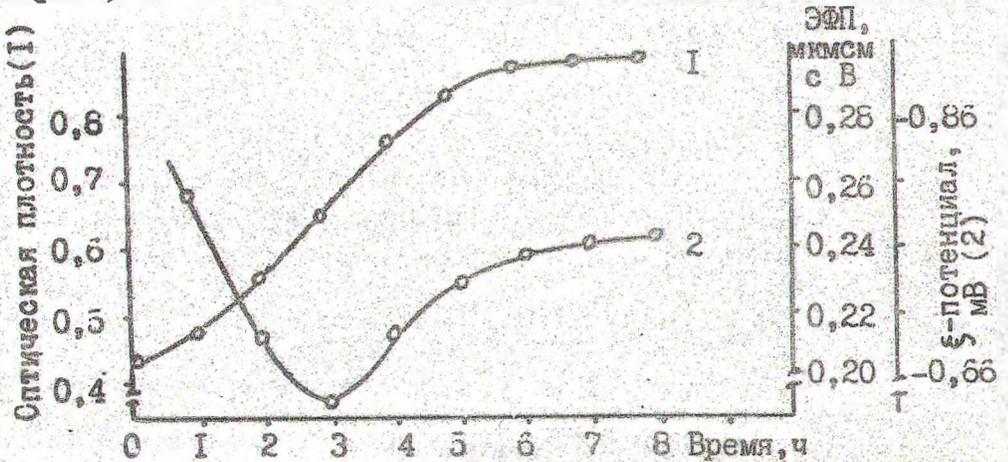


Рис. 1. Электрофоретическая подвижность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в разных фазах роста:

1 - кривая изменения оптической плотности суспензии дрожжей при культивировании по стандартной методике в стандартной среде; 2 - кривая изменения ЭФП клеток в процессе культивирования.

Электрофоретическую подвижность клеток рассчитывали по формуле

$$\text{ЭФП} = \frac{l \cdot h}{t \cdot U},$$

где  $l$  - расстояние между электродами (1,2 см);  $h$  - расстояние, проходимое клеткой (150 мкм);  $t$  - среднее время движения клетки (с);  $U$  - разность потенциалов на электродах (50 В).

Электрокинетический потенциал ( $\xi$ -потенциал) рассчитывали по формуле Гельмгольца-Смолуховского:

$$\xi = \frac{4\pi\eta h \cdot l}{D \cdot t \cdot U},$$

где  $D$  - диэлектрическая постоянная среды;  $\eta$  - вязкость раствора.

Полученная сложная зависимость ЭФП или  $\xi$ -потенциала от фазы роста клеточной популяции (рис. 1) позволяет сделать вывод, что, принимая во внимание только электростатические взаимодействия клеток с поверхностью носителя при иммобилизации, необходимо в случае применения положительно заряженных матриц использовать клетки стационарной фазы или первой половины логарифмической фазы роста, когда клеточная поверхность имеет максимальный отрицательный заряд. Для сорбции на отрицательно заряженных матрицах следует использовать клетки второй половины логарифмической фазы роста, когда отрицательный заряд клеточной поверхности минимален.

Иммобилизацию микроорганизмов на различных носителях проводили в проточной системе, прокачивая клеточную суспензию через слой носителя, с непрерывной регистрацией кинетики процесса.

Измерив степень иммобилизации дрожжей на частицах КМ- и СП-сефадексов, Ф-целлюлозы, катионита КУ-2 8 и анионита - амберлит, а также на этих носителях, модифицированных с помощью красителей метилового зеленого, кристаллического фиолетового, фуксина (кислого и основного), понсо С, тропеолина О и светового зеленого, пришли к выводу о целесообразности дальнейшего исследования процесса иммобилизации на амберлите.

Кинетические характеристики сорбции клеток на амберлите, модифицированном различными красителями, представлены в таблице.

Из данных таблицы следует, что наиболее эффективно иммобилизация протекает на амберлите, поверхность которого модифицирована красителем световой зеленый, имеющим более разветвленную структуру по сравнению с другими использованными красителями.

Табл. Кинетические характеристики сорбции клеток на амберлите, модифицированном различными красителями

Время, мин	Оптическая плотность дрожжевой суспензии	Концентрация суспензии, кл/мл	Степень иммобилизации, кл/мл
1	2	3	4

Краситель - понсо С

Скорость иммобилизации -  $0,78 \cdot 10^6$  кл/мин мл.

0	1,1540	$0,87 \cdot 10^6$	0
10	0,9610	$0,59 \cdot 10^6$	$1,12 \cdot 10^6$
60	0,7641	$0,35 \cdot 10^6$	$2,08 \cdot 10^6$
110	0,6500	$0,26 \cdot 10^6$	$2,44 \cdot 10^6$
160	0,5908	$0,21 \cdot 10^6$	$2,64 \cdot 10^6$
210	0,5835	$0,19 \cdot 10^6$	$2,72 \cdot 10^6$
260	0,5354	$0,17 \cdot 10^6$	$2,80 \cdot 10^6$

Окончание таблицы

1	2	3	4
Краситель - тропеолин О			
Скорость иммобилизации - $0,97 \cdot 10^5$ кл/мин мл.			
0	1,1540	$0,87 \cdot 10^6$	0
10	0,9385	$0,57 \cdot 10^6$	$1,20 \cdot 10^6$
60	0,8005	$0,40 \cdot 10^6$	$1,88 \cdot 10^6$
110	0,7310	$0,34 \cdot 10^6$	$2,12 \cdot 10^6$
160	0,7041	$0,30 \cdot 10^6$	$2,28 \cdot 10^6$
210	0,6201	$0,23 \cdot 10^6$	$2,56 \cdot 10^6$
260	0,5932	$0,20 \cdot 10^6$	$2,68 \cdot 10^6$
Краситель - фуксин кислый			
Скорость иммобилизации - $1,08 \cdot 10^5$ кл/мин мл.			
0	1,1540	$0,87 \cdot 10^6$	0
10	0,9483	$0,58 \cdot 10^6$	$1,16 \cdot 10^6$
60	0,7661	$0,36 \cdot 10^6$	$2,04 \cdot 10^6$
110	0,6808	$0,29 \cdot 10^6$	$2,32 \cdot 10^6$
160	0,6332	$0,23 \cdot 10^6$	$2,56 \cdot 10^6$
210	0,5934	$0,21 \cdot 10^6$	$2,64 \cdot 10^6$
260	0,5549	$0,19 \cdot 10^6$	$2,72 \cdot 10^6$
Краситель - световой зеленый			
Скорость иммобилизации - $1,29 \cdot 10^5$ кл/мин мл.			
0	1,1540	$0,87 \cdot 10^6$	0
10	0,7923	$0,39 \cdot 10^6$	$1,92 \cdot 10^6$
60	0,5815	$0,19 \cdot 10^6$	$2,72 \cdot 10^6$
110	0,4972	$0,13 \cdot 10^6$	$2,96 \cdot 10^6$
160	0,4347	$0,09 \cdot 10^6$	$3,12 \cdot 10^6$
210	0,3517	$0,02 \cdot 10^6$	$3,40 \cdot 10^6$
260	0,3264	$0,01 \cdot 10^6$	$3,44 \cdot 10^6$

На рис.2 представлена зависимость скорости иммобилизации от степени модификации поверхности амберлита световым зеленым.

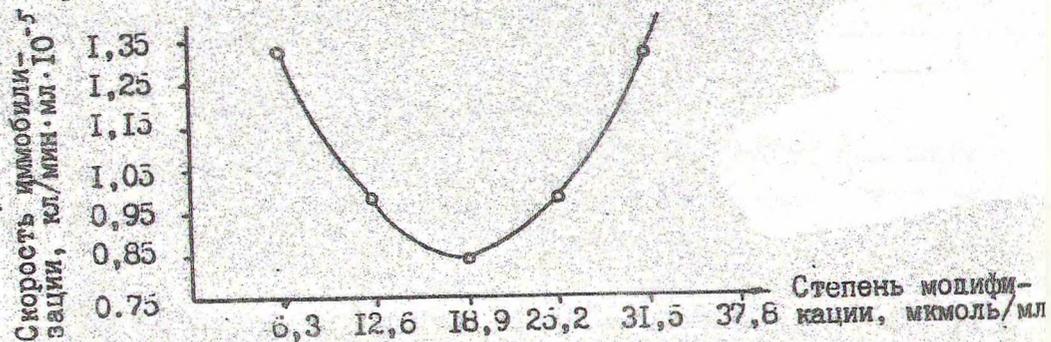


Рис.2. Зависимость скорости иммобилизации клеток от степени модификации амберлита

Характер полученной зависимости может быть обусловлен, на наш взгляд, наличием биоспецифических взаимодействий между поверхностями клеток микроорганизмов и модифицированных носителей.

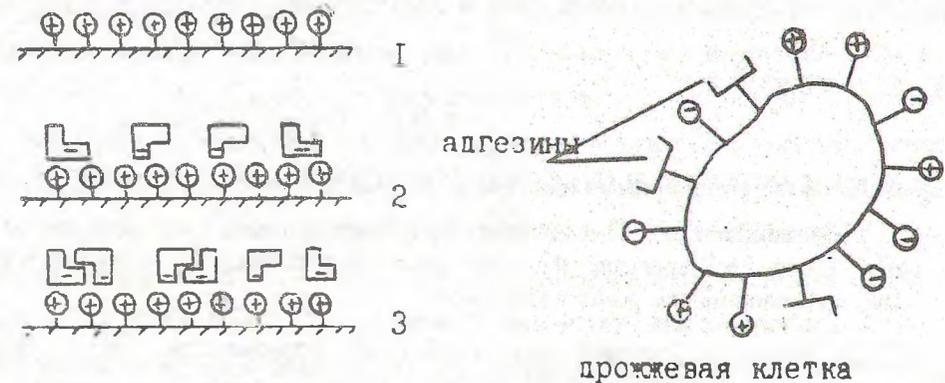


Рис.3. Схема предлагаемого механизма иммобилизации дрожжей на поверхности амберлита

Клеточная поверхность представлена положительно и отрицательно заряженными группами, а также более сложными и развитыми структурами - адгезинами (гликопротеины, полисахариды, белки и т.д.). Суммарный заряд поверхности клетки отрицательный.

В отсутствие модификатора матрица имеет определенное количество положительно заряженных активных центров (1). Между клеткой и носителем устанавливается электростатическое взаимодействие.

При обработке амберлита красителем часть положительно заряженных групп нейтрализуется (2), количество потенциально возможных центров прикрепления клеток уменьшается, что приводит к снижению скорости сорбции. При достижении критической степени насыщения (в нашем случае  $18,9$  мкмоль/мл) краситель образует на матрице надмолекулярные структуры, которые могут выступать в качестве специфических центров связывания (3). На данном этапе появляется возможность взаимодействия с матрицей не только отрицательно заряженных групп поверхности клеток, но и более сложных структур адгезинов. При дальнейшем увеличении степени насыщения поверхности амберлита красителем количество образующихся надмолекулярных ассоциатов растет, следовательно, возрастает доля аффинных центров связывания на матрице, и скорость сорбции клеток соответственно снова начинает увеличиваться.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. - М.: Изд-во МГУ, 1973.
2. Гвоздяк П.И. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. - Пушино: ИЦБИ АН СССР, 1978. - С.80-84.

3. Фридрихсберг Д.А. Курс коллоидной химии. - Л.: Химия, 1984.
4. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. - М.: Наука, 1985.

УДК 573.6.086.83;663.1

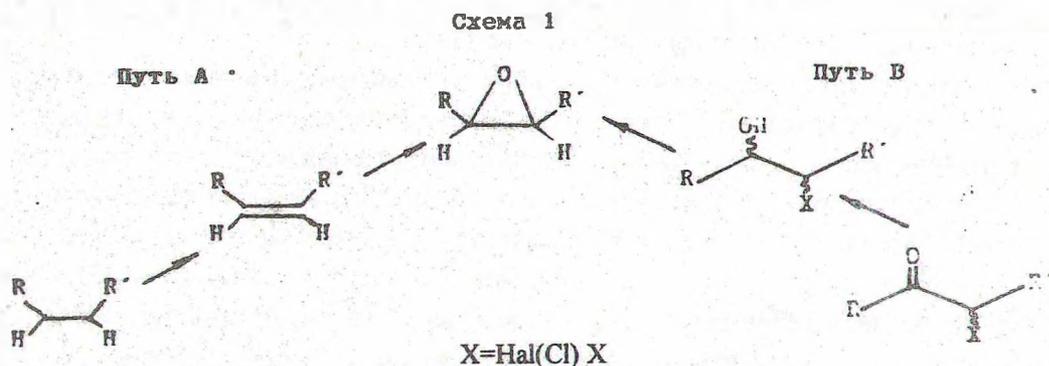
Т.И.Сокольчик, соискатель

### МИКРООРГАНИЗМЫ В ПОЛУЧЕНИИ ЭПОКСИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

The reduction of 5-Cl-4-nonanone by different microorganisms was investigated. Using PMR-spectrum the structure of diastereometric Cl-hydrines was found and enantiometric purity was defined.

Эпоксидные соединения можно получить химическим, химико-ферментативным или ферментативным способами. Причем могут быть использованы как чистые ферменты, так и ферментные системы живых микроорганизмов.

Особенностью ферментативного катализа является высокая стереоспецифичность [1]. Оптически активные эпоксины получают либо микробиологическим окислением углеводородов с участием монооксигеназной ферментной системы (схема 1, путь А) [2], либо с помощью химико-ферментативного способа (схема 1, путь В) [3], первым этапом которого является ферментативная трансформация прохирального субстрата.



Последний метод представляет интерес в синтезе  $\alpha$ -замещенных хиральных спиртов. Эти соединения, содержащие 2 асимметрических атома углерода, представляют собой  $\alpha$ -бихиральные синтоны и могут быть получены микробиологическим восстановлением  $\alpha$ -галогенкетонов. Заместители X выбираются таким образом, чтобы образующиеся галогенгидрины легко превращались в соответствующие оптически активные эпоксины.

Нами было изучено микробиологическое восстановление 5-Cl-4-нонанона. Были использованы следующие микроорганизмы: мицелиальные грибы *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Beauveria sulfurescens* ATCC 7159, *Cunninghamella elegans*