

УДК 573.6.086.83:663.1

И.В.Кузьмичева, аспирант;

В.Н.Леонтьев, доцент;

Н.В.Гриц, доцент

### ИММОБИЛИЗАЦИЯ ДРОЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В ГЕЛЕ АЛЬГИНАТА КАЛЬЦИЯ

The hydrodynamics of the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in calcium alginate was investigated. The conclusion about the application of the fluidized reactor of the conic shape as the most effective system for this process was made.

Создание и исследование биосистем на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов вызывает значительный интерес [1,2]. Применение таких биосистем в биотехнологических процессах обеспечивает ряд преимуществ по сравнению с традиционными технологиями [3]:

1) возможность проведения непрерывных процессов со скоростями, превышающими скорость вымывания биомассы из реактора;

2) создание высокой концентрации клеток в зоне реакции;

3) возможность локализации в разных зонах биореактора различных видов микроорганизмов и др.

Расширение сферы применения иммобилизованных клеток-продуцентов диктует необходимость детальных исследований возникающих в клетках в результате иммобилизации метаболических и физиологических изменений. Осуществить подобные исследования можно лишь после предварительных экспериментов, направленных на поиск оптимальных условий проведения изучаемого процесса с тем, чтобы свести к минимуму воздействия на клетки неблагоприятных факторов гидродинамики и массопереноса.

Цель нашей работы - исследование формирования гранул альгината кальция и их изменений в процессе образования этанола заключенными в них клетками дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Культуру дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y1334 иммобилизовали в альгинате кальция по методике [4]. Ферментацию осуществляли в проточном лабораторном биореакторе колонного

типа с рабочим объемом 130 мл, диаметром 30 мм и высотой 450 мм. Гидродинамику изучали импульсным введением в реактор индикатора голубого декстрана 2000, выход которого из реактора регистрировали по оптической плотности при 618,8 нм.

Полученные результаты представлены на рис.

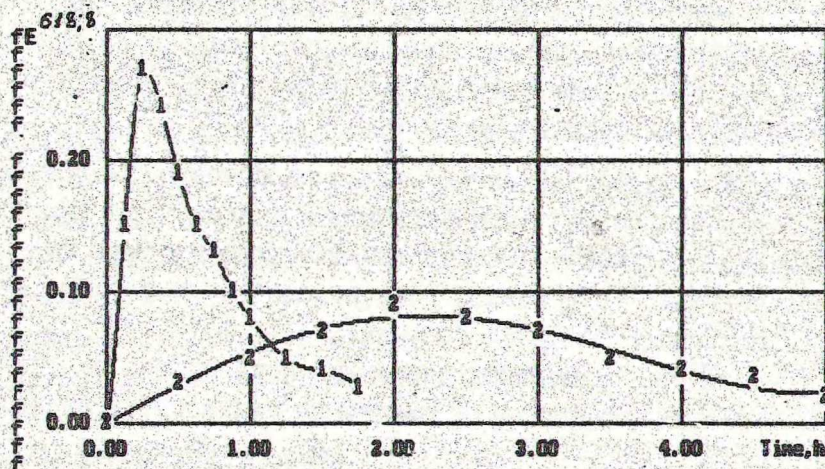


Рис. Кинетические кривые выхода индикатора из реактора в отсутствие ферментации (1) и в ходе ферментации (2).

Вид кривой 1, отражающей гидродинамическую обстановку в реакторе в отсутствие реакции, соответствует в первом приближении поршневому ламинарному потоку жидкости. Ферментация приводит к увеличению времени выхода индикатора из реактора. Это обусловлено возрастанием неоднородности потока за счет газообразования, газовыделения и уменьшения объема бионосителя, наблюдающихся в ходе ферментации.

Так, уже через 12 ч работы системы объем бионосителя уменьшался вдвое, а через сутки составлял примерно 1/3 от первоначального объема. Причиной этого является разрыв части гранул образующимся глекислым газом и уплотнение гранул.

В литературе имеются сведения, свидетельствующие о влиянии на процесс формирования полимерных гранул такого фактора, как количество включенных в гелевую матрицу клеток микроорганизмов. В частности, были осуществлены исследования

этого фактора для гранул полиакриламидного геля [5]. Исходя из этого, нами также был поставлен эксперимент по оценке пространственных изменений гелевых частиц с разным содержанием дрожжевых клеток. До начала и через 48 ч ферментации оценивали геометрические размеры частиц бионосителя с разным содержанием клеток продуцента. Для определения количества клеток в одной грануле 10 гранул растворяли в 2 мл 0,1 М фосфатно-цитратного буфера (рН 5). Подсчет клеток осуществляли в камере Горяева.

Результаты сопоставления количества клеток, включенных в гранулы, с геометрическими параметрами гранул представлены в табл.

Табл. Параметры гелевых частиц в процессе иммобилизации и ферментации

	Среднее число клеток в одной грануле	Средний диаметр гранулы, мм	Уменьшение объема бионосителя, %
	до начала процесса	через 48 ч	за счет уплотнения / за счет разрушения
1	$2,6 \cdot 10^5$	2,3	34
2	$5,6 \cdot 10^5$	2,6	76
3	$8,0 \cdot 10^5$	2,7	46

Анализ полученных результатов свидетельствует, что диаметр гранул альгината кальция возрастает с увеличением концентрации клеток в суспензии. Через 48 ч ферментации объем бионосителя существенно уменьшается. В основном это обусловлено уплотнением частиц и в меньшей степени - разрушением гранул образующимся углекислым газом.

Можно предположить, что уплотнение гранул происходит вследствие возникновения дополнительных ионных связей между  $\text{Al}^+$  и карбоксильными группами альгиновой кислоты. По всей видимости, гранулы, имеющие механические дефекты или содержащие клетки в количестве, превышающем оптимальное значение, в большей степени подвержены разрушению.

Конструкция лабораторного биореактора позволяла визуально наблюдать гидродинамическую обстановку в зоне фермен-

талии. Наиболее активно в процессе были задействованы гранулы, находящиеся в нижней части массы бионосителя. Гранулы верхней части периодически отрывались от массы бионосителя и уносились углекислым газом к поверхности жидкости в реакторе. По нашему мнению, это неблагоприятное явление можно устранить в реакторе конической формы с расширением сверху.

Таким образом, низкая механическая прочность гранул альгината кальция затрудняет осуществление процесса ферментации в биореакторах с механическим перемешиванием. В то же время реакторы колонного типа имеют невысокие массообменные характеристики. По нашему мнению, наиболее эффективной системой для ферментации с помощью гранул альгината кальция является реактор с псевдооживленным слоем, поскольку его конструкция совмещает достоинства реакторов полного смешения и реакторов с неподвижным слоем. К преимуществам следует отнести хорошее перемешивание и эффективный массоперенос. При работе в такой трехфазной системе увеличивается взаимодействие "газ-жидкость" и скорость удаления газа по сравнению с неподвижным слоем, что является важной характеристикой при работе с живыми клетками. Плотность клеток на единицу объема реактора в псевдооживленном слое, из-за упаковки, потенциально ниже, чем в неподвижном слое, однако общая производительность в реакторе с псевдооживленным слоем может быть выше благодаря условиям эксплуатации [6].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Имобилизованные клетки микроорганизмов/Под ред. К.А.Кощеенко и др.-Пушино, 1978.-С.5-36.
2. Имобилизованные клетки в биотехнологии /Под ред. К.А.Кощеенко и др.-Пушино, 1987.
3. Atkinson B. Immobilized cells, their application and potentiation. // Process engineering aspects of immobilized cell systems.-Warwickshire.-1986.-P.3-20.
4. Бейли Дж., Оллис Д. Основы биохимической инженерии.-М.-1989.-С.92.
5. Кестнер А.И. Имобилизованные клетки микроорганизмов/Под ред. К.А.Кощеенко и др.-Пушино, 1978.-С.64-80.
6. Вебб К. Экологическая биотехнология/Под ред. К.Ф.Форстера, Д.А.Дж.Вейза.-Л., 1990.-С.166-189.