Введение Под иммобилизацией клеток и ферментов понимают любое ограничение свободы их физического движения в пространстве [1], материальный посредник, ограничивающий подвижность, считается носителем, а полученная система клетка-носитель называется иммобилизованным биокатализатором. Биотехнологические процессы, реализуемые при использовании биокатализаторов в виде иммобилизованных микроорганизмов и ферментных препаратов, позволяют получать целевые продукты в результате сложных многостадийных биохимических превращений исходных субстратов [2]. Иммобилизованные биокатализаторы должны быть применимы в достаточно широких диапазонах температур, значений pH, давлений, должны обеспечивать необходимую воспроизводимость в промышленных условиях [3]. Еще одним немаловажным для промышленных целей критерием выбора носителя является его стоимость, которая, в совокупности с ценой и возможностью повторного использования сопродуктов, приводит к все расширяющемуся поиску дешевых и потенциально доступных носителей [4]. Результативность работы биокатализатора во многом определяется эффективностью снабжения иммобилизованной популяции клеток или ферментов питательными веществами или субстратами, а также легкостью отвода метаболитов. Эти факторы зависят главным образом от диффузионных барьеров, создаваемых материалом носителя [5].

Применение иммобилизованных микроорганизмов Человечество уже достаточно давно использует в ряде биотехнологических процессов способность многих природных штаммов микроорганизмов прикрепляться к твердым поверхностям. Например, для детекции и разложения фосфорорганических пестицидов и нейротоксинов используют иммобилизованные штаммы *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas fluorescense*; для разложения метилфосфоновой кислоты и ее эфиров – *Pseudomonas sp.*; для деградации тиодигликоля – продукта разложения горчичного газа (иприта) – *Alcaligenes xylosoxidans*; для получения водорода – *Rhodobacter capsulatus*; для получения метанола посредством биохимического окисления метана – *Methilosynus sporium* и *Methilosynus trichosporium*; для получения молочной кислоты – *Rhizopus oryzae* и *Lactobacillus casei*; для получения высококачественного шампанского – *Saccharomyces cerevisiae*; для очистки стоков предприятий пищевой промышленности – *Rhizopus oryzae*; для получения красного и белого вина – *Saccharomyces vini*; для устранения винных недобродов – *Saccharomyces cerevisiae boyanus*; для получения этанола из молочной сыворотки, отходов сельского хозяйства и промышленности – *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor circinelloides*, *Rhizopus oryzae*, *Fusarium oxysporium*, *Zymomonas mobilis*; для получения гидролитических ферментов – *Aspergillus awamory*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus foetidus*, *Heleococcum alkalinum*; для получения пробиотической композиции – *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*; для получения антибиотика аурантина – *Streptomyces anulatus*; для

получения глюкозо-фруктозных сиропов – *Streptomyces albogriseolus*; для определения присутствия экотоксикантов – *Photobacter phosphoreum*, *Chlorella* sp., *Thalassiosira weissflogii* [2, 6]. Неорганические носители, такие как пористое стекло, керамические носители и размолотая пемза, используются для иммобилизации бактериальных клеток, синтезирующих β -1,3-глюканазу – фермент, гидролизующий глюкановые полимеры посредством гидролиза β -1,3-связи [7]. Этот фермент играет ключевую роль при изготовлении сухофруктов и при механических повреждениях плодов [1]. Начиная с 1980-х использование технологии иммобилизованных клеток в производстве алкогольных напитков приобрело промышленные масштабы. Кальциево-альгинатный гель – наиболее широко используемая матрица для иммобилизации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для получения такого алкогольного напитка, как сидр, на завершающем этапе ферментации яблочного сока. В японской корпорации Ozeki Corporation при производстве сакэ осветленные растворы сахаров, полученные на этапе сахарообразования, помещают в биореактор с иммобилизованными в альгинатный гель клетками дрожжей для получения полностью ферментизированного сакэ. В отличие от обычного сакэ, в таком сакэ содержится 10% этанола вместо 15-20% и имеется приятный фруктовый привкус [8]. В промышленном пивоварении непрерывный иммобилизационный процесс используется совместно с традиционным осветлением, развивается непосредственный процесс ферментации пива с использованием биореакторов с иммобилизованными клетками дрожжей [9]. Целлюлозные носители эффективно применяются в виноделии при иммобилизации клеток дрожжей на делигнифицированных целлюлозных материалах (DCM) [10], в пивоварении широко применяются дрожжи, адсорбированные на DEAE-целлюлозе (диэтиламиноэтил-целлюлозе) или на DCM [8, 11]. Иммобилизованные дрожжи также применяются в кефирном брожении сырых материалов для получения алкогольных напитков. Еще один целлюлозный носитель получают из использованного зерна ячменя – побочного продукта пивоваренной промышленности [4]. Согласно известным публикациям, применение иммобилизованных клеток дрожжей во многих отраслях виноделия может обеспечить повышение рентабельности производства и улучшение качества готовой продукции [12, 13]. В отечественном виноделии для интенсификации процесса брожения используются дрожжи, иммобилизованные на алюмосиликатных минералах, буковой стружке, полиэтилене, полиакриламидном геле [14]. Использование иммобилизованных дрожжей рода *Saccharomyces cerevisiae* на модифицированной подсолнечной шелухе в процессе брожения спирта возможно без снижения бродильной активности в течение 8-10 суток. Отработанный экологичный носитель – подсолнечная лузга с остатками дрожжей после брожения – может быть использован в качестве кормовой добавки в животноводстве [15]. Поскольку иммобилизованные дрожжи

значительно устойчивее к воздействию различных ингибирующих веществ, чем свободные клетки, их используют для устранения винных недобродов. Было показано, что в результате дображивания виноматериалов с использованием иммобилизованного биокатализатора концентрация этанола может быть увеличена на 6-28% от исходного уровня [16]. Иммобилизация клеток широко применяется для укорочения процесса производства соевого соуса. Клетки *Pediosoccus helophilus*, *Saccharomyces rouxii*, *Torulopsis versatilis*, иммобилизованные в альгинатный гель, используются в процессе ферментации, в результате весь процесс получения соевого соуса, включая ферментативный гидролиз и перегонку, сокращается до 2 недель вместо 6 месяцев. Полученный продукт обладает схожим составом с соевым соусом, получаемым обычным способом, однако отличается ароматом. Для получения аромата, схожего с ароматом обычного продукта, используют газоотводный биореактор и иммобилизованные в альгинатный гель клетки *Zygosaccharomyces rouxii*, оптимизировав аэрацию, pH и температуру во время ферментации. Из-за нестабильности альгинатного геля в долгосрочном производстве в качестве носителя для иммобилизации используются керамические шарики и проводится непрерывная ферментация в двухсерийном биореакторе с иммобилизованными клетками *Zygosaccharomyces rouxii* в первом и *Candida versatilis* во втором. Общее время ферментации в таком биореакторе сокращается до 6 дней без потери свойств продукта [8]. Альгинатный гель в качестве матрицы для иммобилизации клеток используется в следующих промышленных процессах: - для иммобилизации клеток *Saccharomyces cerevisiae* при ферментации меда для получения медовухи; - для снижения концентрации яблочной кислоты до 20% и ниже в зеленых кофейных бобах перед обжигом используют иммобилизованные клетки *Lactobacillus spp.* или *Leuconostoc spp.* в биореакторе со спиральным ребристым пористым силиконовым носителем; - для удаления горечи цитрусовых соков используют иммобилизованные клетки *Rhodococcus fascians* и *Corynebacterium*; - для получения L-сорбозы (промежуточное соединение при синтезе витамина C) из D-сорбита используют иммобилизованные клетки *Glucanobacter suboxydans*, а совместная иммобилизация носителя кислорода п-додекана и клеток в альгинатном геле позволяет повысить проницаемость геля для кислорода [17]; - для получения рибофлавина используют иммобилизованные клетки *Candida tropicalis*, а единственным источником углеводов служит концентрированное ректифицированное виноградное вино [8]; - для очистки от простых сахаров (глюкозы, фруктозы и сахарозы) при производстве продуктов для диабетиков используют иммобилизованные клетки *Zygomonas mobilis* с узким субстратопределением, которые ферментируют только сахарозу, глюкозу и фруктозу и не синтезируют карбогидролазы для гидролиза других олигосахаридов. Эти бактерии быстро ферментируют глюкозу и фруктозу до этанола и углекислого газа с незначительным образованием

сопродуктов (минорные количества сорбита и фрукто-олигосахаридов) [18]. Мицелий иммобилизованного в клейковину *Aspergillus japonicus* используется при производстве фруктоолигосахаридов из сахарозы. Эти олигомеры фруктозы используются в качестве неусвояемых, но физиологически полезных подсластителей пищи, поскольку они увеличивают популяцию бифидобактерий в кишечнике [19]. Для гидролиза жира молока и оливкового масла используется биокатализатор на основе иммобилизованных в полиуретановую пену клеток *Rhizopus delemar*, поскольку его липазная активность в 3,3 раза выше, чем у свободных клеток. Оптически чистый L-аланин из N-ацетил-DL-аланина получают при использовании иммобилизованных на к-каррагенане клеток *Pseudomonas* sp. BA2 с L-аминоацилазной активностью (штамм не имеет D-аминоацилазной активности) [8]. Некоторые аминокислоты могут использоваться в качестве предшественников в синтезе других аминокислот. Например, L-аспарагиновая кислота является субстратом при производстве L-аланина. Иммобилизованные в к-каррагенановом геле штаммы *E. coli* и *P. dacinhae* культивируются в одном реакторе при высоком давлении для получения L-аланина из фумарата аммония по следующей схеме [20]: Иммобилизованные клетки также используются при производстве ряда органических кислот для пищевой промышленности, включая уксусную, лимонную, фумаровую, молочную, яблочную, глюконовую, койевую и пропионовую кислоты [21]. Показано, что при использовании спор штамма мицелиального гриба *Rhizopus oryzae* F-814, включенных в криогель ПВС, и сред определенного состава может быть сформирован высокоактивный иммобилизованный мицелий, продуцирующий: - L(+)-молочную кислоту – при формировании мицелия в среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода; - амилолитические ферменты – при его формировании в среде, содержащей крахмал; - липолитические ферменты – при его формировании в среде, содержащей триацилглицериды [2]. В молочной промышленности для иммобилизации лактобактерий используют смешанный гель из деионизированного к-каррагенана и смолы бобов рожкового дерева. Гель обладает высокой механической прочностью при непрерывной ферментации в молоке и сыворотке в течение более чем 7 недель [8]. Для получения пробиотических желированных мясных продуктов также используют иммобилизованные клетки пробиотиков. Молочнокислые бактерии вводятся в мясные продукты с использованием природного полимера (желатин, агар), образующего термотропный гель, который, с одной стороны, служит желирующей основой для функциональных мясных продуктов, а с другой стороны – выполняет функцию носителя для клеток, совместная иммобилизация которых осуществляется включением клеток смешанных культур (*Lactobacillus acidophilus* и *Streptococcus thermophilus*) в гелевую матрицу [2, 21, 22]. Такие ферменты как глюкоамилаза, α -амилаза, β -амилаза, пуллуланаза (конвертирует крахмал в глюкозу и мальтозу) получают с помощью иммобилизованных клеток

[23, 24]. Эти ферменты используются в пивоварении при разложении крахмала до сахаров, которые ассимилируются дрожжами. Также иммобилизованные микроорганизмы используются при производстве каталазы, целлюлазы, инвертазы, лактазы, липаз, протеаз и хитинолитических ферментов (используются в биоконверсии богатых хитином материалов, таких как панцири ракообразных при производстве хитиноолигосахаридов и N-ацетил- β -D-глюкозамина для пищевой промышленности, в производстве кормов и для фармацевтических и химических нужд). Для получения хитинолитических ферментов используются иммобилизованные на макропористом целлюлозном носителе клетки гриба *Penicillium janthinellum* P9 [8]. Изомальтозу из сахарозы получают в больших количествах с помощью микробной трансформации при использовании стабильных постоянных колоннок иммобилизованных клеток [24-26]. Для очистки сточных вод часто используются микроорганизмы, иммобилизованные на магнитные носители [27]. Показана возможность многократного использования (около 25 циклов) биокатализатора на основе иммобилизованных клеток *E.coli* DH5 α с органфосфатгидролазной активностью (ОРН-активностью) для прямой детекции ФОС (фосфорорганические соединения) в водных средах на примере пестицида Параоксона. Биокатализаторы на основе клеток бактерии *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* (SH91), иммобилизованных в криогель ПВС, способны утилизировать в качестве единственного источника углерода тиодигликоль (ТДГ), являющийся продуктом разложения иприта (отравляющего вещества кожно-нарывного действия). Было установлено, что применение биокатализатора на основе иммобилизованных клеток позволяет увеличить скорость разложения ТДГ в 5,5 раз и в концентрации в 1,5 раза выше по сравнению со свободными клетками [2].

Иммобилизация – это ключевой момент в получении стабильного распознающего элемента биосенсора, от которого зависит сама возможность измерения сигнала, операционные характеристики сенсора, чувствительность и селективность определения биологических компонентов в смесях сложного состава [3].

Применяют клеточные биосенсоры для селективного определения фенолов, пролина, глутамина, тирозина, молочной и аскорбиновой кислот, глюкозы, для анализа сульфат-иона, аммония, монометилсульфата, для экспресс-анализа качества воды и сточных вод. Существует метод определения биологического потребления кислорода, позволяющий получать результат в течение нескольких минут – анализ на определение совокупности органических соединений, которые могут быть использованы микроорганизмами. Появляются биосенсоры, позволяющие получать и перерабатывать информацию о химическом составе объектов [28]. Существует, по крайней мере, три безусловно работоспособных процесса, в которых используется явление биоэлектрокатализа, - это процесс биофотолиза воды микроорганизмами, процесс конверсии метанола и других спиртов в водород дегидрогеназами, а также гидролиз целлюлозосодержащего

сырья с помощью ферментов до низкомолекулярных веществ. Очень важным аспектом направления, называемого биоконверсией, является открывшаяся возможность разработки систем, работающих на принципах замкнутых биологических циклов, в которых технологические процессы используют вещества биологического происхождения. На этой основе можно получить источник энергии, например, для долговременной работы искусственного органа [29]. Латексные пленки используются в строго бескислородных условиях в качестве носителей для анаэробных микроорганизмов. Латексные пленки также применяются для иммобилизации клеток в слое латекса непосредственно на электроде в биоэлектрохимических системах [30].

Иммобилизованные ферменты

Как известно, выделенные из клетки и помещенные в раствор внутриклеточные ферменты могут использоваться только в одном реакционном цикле. Подобный недостаток может быть устранен при помощи иммобилизации ферментов. Однако, такие препараты часто недостаточно стабильны, а их продуктивность обычно недостаточна для применения в промышленных масштабах. Эта проблема может быть решена посредством иммобилизации целых клеток, что приводит к развитию более дешевой и менее трудоемкой биотехнологии [31]. Однако иммобилизованные ферменты также находят свое применение. Криогели ПВС используются в качестве носителей для ковалентного связывания белков и ферментов при получении макропористых иммуносорбентов и ряда иммобилизованных биокатализаторов, предназначенных для ферментативного катализа сверхвысокомолекулярных субстратов или для работы в маловодных средах. В этом случае емкость криогеля ПВС как носителя, то есть содержание фермента в расчете на единицу массы или объема, составляет порядка 1-10 мг/г(мл), что характерно для крупнопористых матриц, существенная часть объема которых приходится на поры, а количество реакционноспособных группировок полимера, расположенных в стенках этих макропор, относительно невелико [6].

В настоящее время полимерные адсорбенты успешно используются в биотехнологии для разработки аналитических и препаративных методов анализа, выделения, очистки и иммобилизации БАВ, а также в процессах водоподготовки [5, 32]. Стоит упомянуть возможность использования иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья [33, 34]. Иммобилизованные ферменты используются и как усилители слабых сигналов. На активный центр иммобилизованного фермента воздействуют через носитель, подвергая последний ультразвуковой обработке, механическим нагрузкам или фотохимическим превращениям. Это позволяет регулировать каталитическую активность системы фермент-носитель под действием механических, ультразвуковых и световых сигналов. На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии [35]. Промышленные процессы с применением

иммобилизованных ферментов внедрены, прежде всего, в пищевую и фармацевтическую промышленность. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L-аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др. На сегодняшний день в промышленности реализованы некоторые крупномасштабные технологии на основе иммобилизованных ферментов (глюкозоизомеразы, аминоксилазы, пенициллинацилазы и лактазы). Последняя иммобилизуется на частицах кремнезема и применяется для конверсии лактозы сыворотки в глюкозу и галактозу [21, 22, 36].

Иммобилизованные ферменты используются для определения содержания токсических веществ. Так, например, холинэстеразу применяют для определения содержания пестицидов (степень ингибирования этого фермента в присутствии пестицидов оценивают электрохимическими или колориметрическими методами), карбоангидраза очень чувствительна даже к малым концентрациям хлорпроизводных углеводов, гексокиназа – к хлордану, линдану и токсафену. Установлено, что иммобилизованная диизопропилфторфосфатаза нервных клеток кальмара может применяться для обезвреживания фосфоорганических нервных газов (зомана, зарина) [2].

В медицине иммобилизованные ферменты используются и в качестве лекарственных препаратов, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие. Кроме того, биокатализаторы широко используются в различных аппаратах для перфузионной очистки различных биологических жидкостей. Применение иммобилизованных ферментов микробного происхождения перспективно для лечения воспалительных заболеваний. КСИ-сефароза – иммобилизованный на сефарозе кислотостабильный ингибитор протеиназ сорбирует эластазу, трипсин, химотрипсин и активатор плазминогена у больных с острыми послеоперационными паротитами. Иммобилизованная гепариназа, в свою очередь, может применяться для предотвращения тромбообразования в аппаратах искусственного кровообращения, а иммобилизованная билирубиноксидаза может использоваться для удаления билирубина из крови новорожденных, страдающих желтухой. Предложен новый способ применения иммобилизованного гемоглобина. Суть его состоит в том, что включенный в полиуретановую матрицу белок образует «гемогубку», способную поглощать кислород прямо из воды с эффективностью 80 %. Далее кислород высвобождается из полимера под действием слабого электрического разряда или в вакууме. Предполагается, что такая система может снабжать кислородом водолазов либо работающие под водой двигатели [35].

Таким образом, как следует из вышесказанного, иммобилизованные клетки и ферменты наиболее широко применяются в тонком органическом синтезе, в анализе, в медицине, в процессах конверсии энергии, в пищевой и фармацевтической

промышленностях.