

ИММОБИЛИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ФЕРМЕНТОВ

Ключевые слова: микроорганизм, фермент, иммобилизация.

Приведен обзор существующих в настоящее время методов иммобилизации микроорганизмов и ферментов.

Keywords: microorganism, enzyme, immobilization.

An overview of the currently existing methods of microorganisms and enzymes immobilization.

Введение

Под иммобилизацией клеток и ферментов понимают любое ограничение свободы их физического движения в пространстве [1, 2], материальный посредник, ограничивающий подвижность, считается носителем, а полученная система клетка-носитель называется иммобилизованным биокатализатором. Иммобилизация клеток и ферментов обеспечивает возможность создания биотехнологических процессов длительного пользования с высоким выходом целевых продуктов, при этом техническое решение таких процессов существенно упрощено по сравнению с процессами на основе свободных (суспензионных) клеток и ферментов.

Иммобилизация клеток и ферментов – это широко распространенный в природе феномен, который играет особую роль в стратегии выживания и сохранения максимального числа каталитических функций [1], а встречающиеся в природе агрегаты клеток можно рассматривать как иммобилизованные клетки [2]. Формирующиеся при этом биопленки с включенными в них клетками представляют собой суперэффективные катализаторы различных негативных процессов, таких как биокоррозия металлических конструкций, деструкция пластиковых материалов, возникновение воспалительных процессов и др. Поэтому часто в качестве носителя используются те нерастворимые материалы, к которым тот или иной тип клеток (ферментов) прикрепляется в реальных условиях (например, древесина, почва, шерсть, минералы и др.). В этом случае функционирование клетки (фермента) в иммобилизованном состоянии происходит естественно [1].

Принцип иммобилизации заключается в стабилизации ферментативной активности клеток (ферментов), принципиальном увеличении объемной продуктивности, расширении значений pH- и температурных оптимумов, удлинении срока действия ферментов внутри и вне клетки, сокращении времени процесса и достижении более эффективного превращения субстрата в продукт вместо биомассы [2-8]. Использование нерастворимых носителей для иммобилизации клеток и ферментов позволяет получать незагрязненный продукт при возможности многократного применения и технически несложного отделения системы от реагентов [9]. Известно, что некоторые факторы влияют на способность клеток и ферментов прикрепляться к твердым носителям, хотя их прямые взаимодействия до сих пор до конца не изучены. Химический состав, заряд и гидрофобность поверхности, возраст фермента и фаза роста клетки оказывают сильное влияние на способность клеток и ферментов прикрепляться к но-

сителю. Другими важными факторами являются физико-химические свойства поверхности носителя, pH и ионная сила среды. Связывание клеток с носителем может быть усилено добавлением молекул, модифицирующих свойства клеточных стенок [5].

Результативность работы биокатализатора во многом определяется эффективностью снабжения иммобилизованных клеток (ферментов) питательными веществами или субстратами, а также легкостью отвода метаболитов. Эти факторы зависят, главным образом, от диффузионных барьеров, создаваемых материалом носителя [10]. Еще одним немаловажным критерием выбора носителя является его стоимость, которая, в совокупности с ценностью и возможностью повторного использования сопродуктов, приводит ко все расширяющемуся поиску дешевых и потенциально доступных носителей [4].

Методы иммобилизации клеток

Одним из способов увеличения продуктивности непрерывных микробиологических процессов и получения высокой плотности клеточной культуры является использование иммобилизованных клеток. Иммобилизованные клетки сохраняют пролиферативную функцию как непосредственно после иммобилизации, так и после длительного использования в биотехнологических процессах. При этом кинетические характеристики роста (удельная скорость роста и время удвоения) иммобилизованных клеток существенно не отличаются от аналогичных характеристик свободных клеток [1].

Другой важной характеристикой иммобилизованных клеток, отличающей их от свободных клеток, является длительная функциональная активность [8]. Существует предположение, что носитель играет роль защитного барьера для иммобилизованных клеток, «экранируя» их от негативного воздействия метаболитов и препятствуя их проникновению в матрицу. Но, согласно полученным Ефременко Е.Н. результатам, матрица носителя не является препятствием для проникновения в клетки даже столь высокомолекулярных соединений, как ДНК [1].

В качестве носителей для иммобилизации микроорганизмов используют как неорганические, так и органические адсорбенты [8]. К преимуществам неорганических носителей относят их широкое распространение и дешевизну, высокую механическую прочность, высокую термостабильность, высокую устойчивость к органическим растворителям и микробному разложению, простоту использования и возобновляемость [11]. Для иммо-

билизации используются такие неорганические носители, как палыгорскит, монтмориллонит, слюда, диатомит, пористый фарфор, размолотая пемза, стеклянные шарики, пористое стекло, керамические носители, древесная щепа, волокна из целлюлозы и ее производных, активированный древесный уголь, искусственные полимеры и др. [2, 4, 12-14]. Кроме того, использование в качестве матриц для иммобилизации таких материалов как альгинат, пектат, каррагинин, к-каррагинин, хитозан, агар и синтетических полимеров (полиакриламида, поливинилхлорида, полиуретана) позволяет провести иммобилизацию в очень мягких условиях, не нарушая целостности живых клеток [4, 15]. Широко используемый для иммобилизации микроорганизмов Сиран представляет собой пористые шарики из силикатного стекла с размерами гранул и пор 2-3 мм и 60-300 мкм соответственно. Сиран выдерживается в течение суток в триметилхлорсилане, в результате чего он становится более гидрофобным. Полученный носитель отрицательно заряжен и имеет рН ниже 5 [5].

В основе интенсификации биокатализа иммобилизованных клеток лежат специфические условия, возникающие на поверхности раздела фаз «жидкость-твердая поверхность». Предполагается, что граница раздела жидкости и твердого тела служит микросредой, в которой клеткам легче изменить условия своей жизнедеятельности в благоприятную для себя сторону. На границе раздела фаз меняются значения рН и окислительно-восстановительного потенциала, происходит концентрирование и выделение углекислого газа. Показано, что здесь иммобилизованные клетки находятся в зоне повышенной концентрации физиологически активных веществ (витамины, ферменты, аминокислоты и другие стимуляторы роста), которые адсорбируются на поверхности носителя [8].

В большинстве исследовательских работ в качестве носителей для иммобилизации клеток предпочтительнее используются природные биополимеры. В качестве носителя для иммобилизации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* можно использовать растительные природные полимеры – подсолнечную лузгу и активированный уголь. Для увеличения их удельной поверхности и реакционной способности необходимо провести предварительное измельчение до фракций 0,5-1 мкм. Установлено, что на активированном угле иммобилизуется 59,6 % дрожжей, на подсолнечной шелухе – 95,3 %. Различия происходят из-за особенностей кристаллической структуры носителей и адсорбции клеток как на поверхности носителя, так и в межволоконных промежутках [7].

В ряде работ показана достаточно высокая эффективность носителей из целлюлозы, а физические и химические характеристики целлюлозных материалов крайне разнообразны [4]. Целлюлозный носитель эффективен благодаря способности к высокой и продолжительной адсорбции клеток, простоте изготовления, возобновляемости и инертной, нетоксичной природе [4, 6, 16]. Целлюлозный носитель неправильной формы, негомогенен по химическому составу, имеет «активные сайты», которые предпочтительнее колонизируются микроорганизмами. На поверхности клеток, в частности *Lactococcus lactis*, имеются связывающие целлюлозу области (CBD – *cellulose binding domains*) –

специфические каталитические единицы, способные прикрепляться к целлюлозе. Клетки, имеющие CBD на своей поверхности, способны к стабильной адсорбции на целлюлозе и могут использоваться в иммобилизованной ферментации [6, 17, 18].

Иммобилизация клеток на магнитные носители позволяет не только контролировать характеристики микроорганизма с помощью магнитного поля разной напряженности, но и быстро отделять иммобилизованные клетки. Способ получения магнитного адсорбента для *Pseudomonas picketti* включает активацию носителя (смесь алюмосиликата с магнитным порошком, модифицированным 0,3-0,4 %-ным раствором полиглюкина) вторичным алкилсульфатом натрия и ковалентное связывание с ним биологического лиганда [19].

Гелевые адсорбенты для иммобилизации клеток получают полимеризацией взаиморастворимых мономеров, каждый из которых является хорошим растворителем для образующегося сополимера. Адсорбенты с гелевой структурой полимерной матрицы обладают невысокой проницаемостью для крупных молекул и необратимостью адсорбции [10]. Основной этап создания монолитных адсорбентов состоит в полимеризации мономера и сшивающего агента при помощи инициатора в присутствии одного или двух порообразующих растворителей, определяющих размер микроглобул адсорбента и структуру пор [20]. Основными мономерами для синтеза широкого круга адсорбентов являются стирол и дивинилбензол, которые легко суспензируются, например, в водно-солевых растворах [10].

Для иммобилизации микроорганизмов наиболее часто используются криогели поливинилового спирта (ПВС), обладающие макропористой структурой, высокими прочностными и массообменными характеристиками и химической стабильностью [21, 22]. Полимерными криогелями называют гелевые материалы, сформированные в неглубоко замороженных растворах полимерных или мономерных предшественников. Неглубоко (умеренно) замороженными считаются системы при температурах не ниже, чем несколько десятков градусов от точки замерзания чистого растворителя. Подобные системы, как правило, являются двухфазными, они содержат поликристаллы твердой фазы (порогены) и небольшой объем незамерзшей жидкой микрофазы, где концентрируются растворенные вещества и происходит формирование криогелевой матрицы [9]. Криогели ПВС формируются в результате замораживания концентрированных растворов ПВС, их выдерживания в замороженном состоянии в течение определенного времени и последующего оттаивания [1]. В основе образования криогеля лежит структурирование полимера за счет образования множественных водородных связей. Иммобилизация дрожжей в криогель ПВС включает в себя: накопление биомассы до глубокой стационарной фазы роста (72 ч) при 15 °С, приготовление суспензии клеток в растворе полимера, замораживание в среде гидрофобной жидкости, размораживание гранул. Такие условия негативно влияют на жизнеспособность иммобилизованных клеток, поскольку появляется необ-

ходимость их дополнительной активации и последующей обработки ауторегуляторным фактором d-1 для устранения активного почкования [21]. Имобилизованные в ПВС клетки *Saccharomyces cerevisiae* становятся почти в 2 раза устойчивее к этанолу, что позволяет повысить его концентрацию в культуральной жидкости. Брожение у иммобилизованных клеток происходит в 1,5 раза быстрее, чем у свободных клеток [23].

В качестве носителя для иммобилизации бактериальных клеток *Gluconobacter oxydans* используют пленку сетчатой структуры, состоящую из ПВС, модифицированного N-винилпирролидоном. Для приготовления пленки раствор, содержащий ПВС, нитрат церия-аммония и N-винилпирролидон, выдерживают в атмосфере азота в течение 3-х часов при температуре 40 °С при постоянном перемешивании [3]. Иммобилизация бактерий *Gluconobacter oxydans* в пленку на основе модифицированного ПВС увеличивает стабильность биосенсоров в 3-4 раза, чувствительность к глюкозе в 9 раз, к этанолу – в 40 раз, также значительно снижается предел обнаружения определяемых субстратов и время проведения анализа по сравнению с аналогичными характеристиками в криогеле ПВС [24]. Биорецепторные элементы при иммобилизации бактериальных клеток в такую пленку сохраняют свои рабочие характеристики при хранении в сухом виде при температуре + 4 °С в течение 3 недель [3].

Непрерывный биосинтез L-аспарагиновой кислоты осуществляется пропусканием раствора fumarата аммония через биокаталитический слой иммобилизованных бактерий с высокой аспартазной активностью. Продуктивность биореактора зависит от аспартазной активности клеток, концентрации раствора fumarата аммония и скорости тока субстрата и должна составлять не менее 90 %. Для иммобилизации клеток *E. coli* с высокой аспартазной активностью в качестве сшивающих реагентов используются гексаметафосфат натрия $(\text{NaPO}_3)_{12-13}\text{Na}_2\text{O}$, ортофосфат натрия, трифосфат пятинатриевый $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$ в различных концентрациях. Клетки ресуспендируются в растворе 5 % хитозана и 2 % уксусной кислоты в соотношении 1:1. Через сутки выдерживания при комнатной температуре смесь вносится в сшивающий реагент. Иммобилизованные клетки (2 г биокатализатора содержат 1 г сырой биомассы) промываются дистиллированной водой и вводятся в питательную среду. Во избежание получения шариков геля неправильной формы и различного диаметра к иммобилизуемым клеткам необходимо добавлять поверхностно-активные вещества (сурфактанты) [25].

Латексные пленки используются при иммобилизации микроорганизмов для получения высоких плотностей жизнеспособных клеток после высушивания или замораживания. При получении таких пленок к монодисперсной латексной эмульсии добавляют 5 % глицерин для оптимизации степени слияния и последующей диффузивности пленки относительно субстрата [26-28].

Наибольшую популярность при разработке препаратов для виноделия на основе иммобилизованных дрожжей в качестве носителя приобрел гель альгината кальция, несмотря на низкую механическую прочность

структуры в присутствии компонентов вина (фосфат-ионов и органических кислот). Кроме того, в подобных гелевых системах массообменные процессы внутри массы геля существенно затруднены вследствие мелкопористой структуры матрицы, что неизменно приводит к постепенному отмиранию клеток во внутренних слоях гранул биокатализатора и снижению его продуктивности [21]. Однако альгинат кальция остается одним из наиболее часто используемых носителей для иммобилизации микробных клеток из-за простоты использования, дешевизны и воспроизводимости материала. Для иммобилизации клеток *Erwinia* sp. D12 альгинатом кальция смесь свежееобновленной культуры и стерильного раствора альгината натрия в соотношении 1:2 закачивается с помощью перистальтического насоса в стерильный раствор CaCl_2 . Сформировавшиеся гранулы выдерживаются в течение 12 часов в растворе CaCl_2 при температуре 5 °С, после чего промываются дистиллированной водой для удаления остатков CaCl_2 [29]. Полученный гель наносится на фиксированную подложку, проницаемую для жидкости. При иммобилизации клеток в геле происходит увеличение их устойчивости к воздействию этанола, тяжелых металлов, фенолов, кислотности среды и экстремальным температурам [15].

Для иммобилизации клеток также используется и транскляминаза. При иммобилизации клеток альгинатом кальция и желатин-транскляминазой готовится раствор желатина и альгината в дистиллированной воде при температуре 50 °С и постоянном перемешивании. К охлажденному раствору желатина и альгината добавляется фермент транскляминаза для увеличения сетчатости альгинатного геля. Смесь суспензии клеток и раствора желатин + альгинат + транскляминаза в соотношении 1:2 закачивается с помощью перистальтического насоса в раствор CaCl_2 . Сформировавшиеся маленькие гранулы выдерживаются в растворе CaCl_2 при температуре 5 °С в течение 12 часов, после чего промываются дистиллированной водой для удаления остатков CaCl_2 [29-31].

Методы иммобилизации ферментов

Основой для создания принципиально новых биокаталитических процессов, альтернативных традиционным химическим производствам, могут служить гетерогенные биокатализаторы на основе иммобилизованных ферментов [32]. В качестве носителей для иммобилизации ферментов широко используются как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы. Носители должны быть нерастворимы в реакционной среде, обладать химической и биологической стойкостью (а именно, защищать от действия микроорганизмов и ингибиторов ферментов), механической прочностью, не вызывать неспецифической адсорбции и сильных конформационных изменений молекулы белка, легко гранулироваться и активироваться [9]. Однако при иммобилизации каталитическая активность ферментов может существенно снизиться как в результате неспецифической ассоциации в адсорбционных слоях и образования неактивных олигомеров, так и вследствие изменения струк-

туры белковых глобул при взаимодействии с носителем [32].

Перспективными носителями для иммобилизации ферментов являются криогели ПВС макропористой (от 0,1 до 10 мкм) или сверхмакропористой структуры (от 10 до 1000 мкм) с взаимосвязанными порами, что придает таким материалам уникальный набор физико-химических свойств, а также позволяет использовать их для решения ряда биомедицинских и биотехнологических задач. Характерной особенностью строения криогелей ПВС является наличие протяженных пор со средним сечением 0,18-0,26 мкм. Следствием формирования макропор при расплавлении кристаллов порообразователя (льда), ограничивающих размер друг друга, является примерно одинаковый размер пор в получаемом геле. Полученная таким образом матрица не создает дополнительных диффузионных затруднений для растворимых соединений [9].

Иммобилизовать мембранные белки в их естественных условиях, не снизив значительно их активности, крайне сложно, поскольку эти белки локализованы на очень эластичных и чувствительных биологических мембранах. Гидрогели, состоящие из нановолокон, широко применяются для иммобилизации везикул биологических мембран разного размера и липидного состава. Немаловажно, что мембранные белки, иммобилизованные в гидрогель, сохраняют схожую со свободными белками активность [33]. Гидрогелями называют сшитые полимерные сетки синтетических и природных полимеров, способные к набуханию в воде. Количество сорбируемой воды может быть различным – от 10-20 % до тысячекратно превосходящего массу гидрогеля в сухом состоянии. Гидрогели могут быть химически стабильными, но могут и распадаться, переходя в раствор [34]. Гидрогели, состоящие из органических гелеобразователей, используются для функциональной иммобилизации мембранных белков как в их естественной липидной среде, так и в синтетических липидных средах. Гидрогели состоят из самособирающихся единиц низкомолекулярных гелеобразователей, основанных на 1,3,5-циклогексилтрикарбоксамиде, образуют сети нановолокон, что представляется привлекательным способом иммобилизации мембранных везикул [35]. Применение диэтиленгликоля в качестве гелеобразователя позволяет получить волоконную поверхность, минимально взаимодействующую с биологическими молекулами, т.к. непосредственный контакт белка с поверхностью может привести к иммобилизации и/или даже к инаktivации белка. Кроме того, при слабых межволоконных взаимодействиях размер отдельной ячейки геля задается размерами везикул. Гидрогели, основанные на 1,3,5-циклогексилтрикарбоксамиде, эффективно иммобилизуют инвертированные мембранные везикулы из *E. coli*, протеолипосомы из естественных липидов *E. coli* и даже гигантские однослойные везикулы размером несколько микрон, состоящие из смеси синтетических липидов. Липидный бислой различных везикул остается целостным в течение процедуры иммобилизации. Иммобилизация липосом достигается посредством короткого, но глубокого перемешивания липосомной суспензии с предварительно сформированным гелем в соотношении 1:1 [33].

Среди различных типов носителей, используемых для иммобилизации ферментов, одними из наиболее перспективных с технологической точки зрения представляются ионообменные материалы. Достоинствами таких адсорбентов являются: доступность, легкость регенерации, возможность многократного использования, инертность матрицы по отношению к микроорганизмам. Наиболее изученными адсорбентами, применяемыми для иммобилизации α -амилазы, являются карбоксильные ионообменники. В качестве носителя для иммобилизации α -амилазы используется аминокарбоксильный полиэлектролит АНКБ-2. Подготовка ионообменника к иммобилизации осуществляется путем кондиционирования и перевода ионообменника в нужную ионную форму. Иммобилизацию α -амилазы проводят адсорбционным методом в статических условиях при температуре 293 К при постоянном соотношении раствор/адсорбент 20 мл/0,2 г. Для поддержания определенного значения pH среды используют ацетатный (CH_3COOH , CH_3COONa) буфер. Десорбция белка в буферные растворы составляет не более 5 % [32].

В последнее время растет потребность в хроматографических носителях, обладающих максимально высокой селективностью адсорбции целевых биологически активных веществ (ферментов). В матрице адсорбента для препаративной хроматографии, во-первых, нежелательно присутствие функциональных групп, способных к необратимым взаимодействиям с молекулами целевого фермента и неспецифическим взаимодействиям с примесями; во-вторых, должно быть достаточное количество пор с хорошей кинетической проницаемостью; в-третьих – адсорбенты должны обладать высокой химической и биологической стойкостью. Новый подход к синтезу полимерных носителей для хроматографии был разработан В.А. Даванковым и М.П. Цюрупой [10], которые сшили бифункциональными агентами цепи готового полистирола в растворе или набухом состоянии и получили принципиально новый класс адсорбентов – Стиросорбы.

К настоящему времени созданы монолитные адсорбенты на основе полистирола и дивинилбензола, а также акриловой, метакриловой кислот и глицидилметакрилата и диметакрилата этиленгликоля. В качестве порообразователя чаще всего используется диоксид углерода. Поровый объем сетчатых сополимеров контролируется при помощи температуры полимеризации [20] или температурно-чувствительных полимеров, например, поли(*N*-изопропилакриламида). Наиболее пористые монолитные адсорбенты с размером пор ~ 100 нм получены в настоящее время на основе акриламида и *N,N'*-метиленисакриламида [10]. В последние годы в препаративной хроматографии также используются непористые (пелликулярные) иониты, получаемые нанесением на твердые, инертные, сферические частицы слоя функциональных групп [36].

Известно, что биологически активные молекулы при попадании внутрь полимерного адсорбента могут легко изменить конформацию и, как следствие, потерять биологическую активность. Именно

поэтому в настоящее время широкое распространение получил метод синтеза адсорбентов, «настроенных» на целевой объект [37, 38]. Связующие центры в таких адсорбентах формируются в присутствии «шаблона» – целевого вещества. Метод включает в себя образование как ковалентно, так и нековалентно связанного комплекса шаблон-мономер с последующей полимеризацией его в присутствии достаточно большого количества кроссагента. На следующей стадии комплекс шаблон-мономер разрушается обработкой соответствующим реагентом, шаблон удаляется из сетчатой структуры, а образовавшиеся в ней пустоты соответствуют размерам и конфигурации целевой молекулы. Такая технология достаточно проста, эффективна и позволяет получать химически устойчивые, механически прочные адсорбенты, выдерживающие повышенные температуры. Так были синтезированы аналоги высокопроницаемых гетеросетчатых биосорбентов на основе метакриловой кислоты и диметакрилата этиленгликоля, настроенные на молекулу эритромицина А – антибиотика класса макролидов [10].

При исследовании поведения ферментов на границе раздела фаз «электронный проводник – ионный проводник» («электрод – раствор электролита») было обнаружено явление биоэлектрокатализа, основанное на свойстве ферментов ускорять электрохимические реакции при организации «электрического контакта» между проводником и активным центром фермента, т.е. наличие быстрого и эффективного электронного транспорта между проводником и активным центром фермента. Установлено, что некоторые окислительно-восстановительные ферменты после их адсорбции (или хемосорбции) на поверхности проводника значительно увеличивают скорость электрохимических реакций. В список ферментов, которые могут быть изучены таким образом, входят и такие жизненно важные ферменты, как ферменты электрон-транспортной цепи, расположенные в митохондриях эукариот или цитоплазматической мембране прокариот, которые позволяют запасать энергию окисления углеродсодержащих веществ в молекулах АТФ; ферменты, участвующие в фотосинтезе и т.д. [39].

Техника иммобилизации играет крайне важную роль в локализации фермента на поверхности различных электродов для получения биосенсоров различных соединений [40]. Биосенсоры – это аналитические устройства, использующие биологические материалы для «узнавания» определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала. Биосенсор состоит из двух функциональных элементов: биоселектирующей мембраны с различными биологическими структурами и физического преобразователя сигнала, трансформирующего концентрационный сигнал в электрический. В качестве биоселектирующего материала используют все типы биологических структур: ферменты, антитела, рецепторы, нуклеиновые кислоты и живые клетки. Фермент в составе биосенсора ускоряет процесс обмена электронами между субстратом и электродом. Преобразователями сигнала могут быть электрохимические преобразователи (электроды), включая амперометрические (детекторы кислорода, пероксида водорода, медиаторы),

потенциометрические (рН-чувствительные и ионселективные электроды, рН-чувствительные полевые транзисторы), кондуктометрические, оптические, акустические преобразователи, гравитационные, калориметрические, резонансные системы, которые можно комбинировать со всеми видами биоселектирующих элементов. Развитие получили биосенсоры с использованием техники LAPS (*light-addressable potentiometric sensor* – светоадресуемые потенциометрические сенсоры). LAPS-система достаточно чувствительна, на ее основе были созданы системы слежения за физиологическим состоянием отдельных клеток (микрофизиометры). Сопряжение ферментативно-каталитических и электрохимических реакций, происходящих на электропроводящих материалах, погруженных в раствор электролита, позволило разработать множество биосенсоров для определения глюкозы, молочного сахара, пирувата, мочевины и других метаболитов [41-43].

В биосенсорах широко применяются электропроводящие полимеры, представляющие собой стабильные пористые матрицы для биокомпонентной иммобилизации и облегчающие процесс переноса электронов. Наиболее широко применяются для иммобилизации ферментов следующие электропроводящие полимеры: полианилин, полипиррол, политиофен и др. [40]. Большинство электрохимических биосенсоров глюкозы основаны на ферменте глюкозооксидазе, катализирующей окисление глюкозы до глюконолактона, который в свою очередь гидролизует до глюконовой кислоты и перекиси водорода [44, 45].

Для иммобилизации глюкозооксидазы платиновый электрод, поверхность которого покрыта полианилин-поливинилсульфонатной (Pani-Pvs) пленкой, погружается в раствор 0,2 М анилина и 25 % натриевой соли поливинилсульфоната. Затем в раствор добавляется глюкозооксидаза в концентрации 10 нг/мл, кислород из раствора удаляется с помощью аргона. Полимеризация проводится при постоянном напряжении 0,75 В в течение 60 мин. После закрепления глюкозооксидазы на Pani-Pvs пленке, электрод промывается деионизированной водой для удаления непрореагировавшего мономера анилина и свободной глюкозооксидазы. Электроды с иммобилизованными ферментами хранятся в фосфатном буфере при 4°C [40].

Таким образом, использование иммобилизованных микроорганизмов и ферментов позволяет увеличить выход целевого продукта в результате сложных многостадийных биохимических превращений исходных субстратов [46].

Литература

1. Е.Н. Ефременко. Автореф. дисс. докт. биол. наук, Инст. биохим. физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 2009. 53 с.
2. U. Beshay, H. El-Enshasy, I.M.K. Ismail, H. Moawad, S. ABD-El-Ghany, *Pol. J. Microbiol.*, **60**, 2, 133-138 (2011).
3. О.В. Коптилова, Н.М. Филатова, Л.Д. Асулян, *Успехи современного естествознания*, 2011. №8. С. 44-45.

4. C. Almeida, T. Branyik, P. Moradas-Ferreira, J. Teixeira, *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 6, 513-518 (2003).
5. T. Nakari-Setälä, J. Azeredo, M. Henriques, R. Oliveira, J. Teixeira, M. Linder, M. Penttilä, *Appl. Environm. Microbiol.*, **68**, 7, 3385-3391 (2002).
6. S. Liu, K. Kylä-Nikkilä, P.E.J. Saris, *Bioeng. Bugs*, **2**, 3, 160-162 (2011).
7. А.В. Бабченко, Н.Б. Мітіна, Г.І. Науменко, О.П. Кулик, IV Міжнародна науково-практична конференція «Біотехнологія. Наука. Освіта. Практика» (Дніпропетровськ, 11-13 листопада, 2008). Дніпропетровськ, 2008. С. 7.
8. А.Л. Панасюк, Л.И. Розина, Л.А. Пелих, И.М. Шур, Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной и винодельческой промышленности. 2012 (<http://eurowine.com.ua/>).
9. Б.Л. Шаскольский. Автореф. дисс. канд. хим. наук, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва, 2009. 22 с.
10. О.А. Писарев, Н.М. Ежова, *Сорбционные и хроматографические процессы*, **8**, 4, 535-552 (2008).
11. Y. Kourkoutas, A. Bekatorou, I.M. Banat, R. Marchant, A.A. Koutinas, *Food Microbiol.*, **21**, 377-397 (2004).
12. M. Ikonomopoulou, M. Kanellaki, M. Soupioni, A.A. Koutinas, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **104**, 1, 23-36 (2003).
13. M. Navrátil, P. Gemeiner, J. Klein, E. Sturdik, A. Malovikova, J. Nahalka, A. Vikartovska, Z. Dövény, D. Šmogroviová, *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.*, **30**, 5-6, 199-218 (2002).
14. A. Bekatorou, M.J. Soupioni, A.A. Koutinas, M.E. Kanelaki, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **97**, 2, 105-121 (2002).
15. V. Nedović, R. Willaert, *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*. Springer, 2005. 573 p.
16. T. Brányik, A.A. Vicente, J.M. Machado Cruz, J.A. Teixeira, *J. Inst. Brew.*, **108**, 410-415 (2002).
17. М.В. Харина, Р.Т. Валеева, С.Г. Мухачев, В.М. Емельянов, *Вестн. Каз. Техн. Ун-та*, **13**, 210-212 (2012).
18. Р.М. Нуртдинов, Р.Т. Валеева, В.М. Емельянов, С.Г. Мухачев, М.В. Харина, *Вестн. Каз. Техн. Ун-та*, **14**, 211-214 (2011).
19. Л.В. Потапова, И.В. Владимцева, О.В. Колотова, *Современные наукоемкие технологии*, 2005. № 9. С 69-70.
20. F. Gritti, W. Piatkowski, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A.*, **983**, 1, 51-71 (2003).
21. Н.А. Степанов. Автореф. дисс. канд. техн. наук, Моск. гос. унив. пищ. произв., Москва, 2007. 27 с.
22. V.I. Lozinsky, L.G. Damshkaln, I.N. Kurochkin, I.I. Kurochkin, *Colloid J.*, **70**, 2, 189-198 (2008).
23. В.В. Волков, А.Г. Фадеев, В.С. Хотимский, О.И. Бузин, М.В. Цодиков, Ф.А. Яндиева, И.И. Моисеев, *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Менделеева)*, **XLVII**, 6, 71-82 (2003).
24. Л.Д. Асулян, *Изв. ТулГУ. Сер. Химия*, **6**, 137-144 (2006).
25. G. Szymanska, B. Sobierajski, A. Chmiel, *Pol. J. Microbiol.*, **60**, 2, 105-112 (2011).
26. J.L. Gosse, B.J. Engel, F.E. Rey, C.S. Harwood, L.E. Scriven, M.C. Flickinger, *Biotechnol. Prog.*, **23**, 1, 124-130 (2007).
27. M.C. Flickinger, J.L. Schottel, D.R. Bond, A. Aksan, L.E. Scriven, *Biotechnol. Prog.*, **23**, 1, 2-17 (2007).
28. R.C. Wagner, S. Porter-Gill, B.E. Logan, *AMB Express.*, **2**, 2, 1-6 (2012).
29. H.Y. Kawaguti, P.H. Carvalho, J.A. Figueira, H.H. Sato, *SAGE-Hindawi Access to Research, Enzyme Research*, Article ID 791269, 8 p. (2011).
30. J. Synowiecki, S. Wolosowska, *Enzyme Microb Technol.*, **39**, 7, 1417-1422 (2006).
31. J. Tominaga, N. Kamiya, S. Doi, H. Ichinose, M. Goto, *Enzyme Microb Technol.*, **35**, 6-7, 613-618 (2004).
32. И.В. Шкутина, О.Ф. Стоянова, В.В. Лунина, *Сорбционные и хроматографические процессы*, **9**, 2, 247-253 (2009).
33. I. Kusters, N. Mukherjee, M.R. de Jong, S.J. Tans, A. Koçer, A.J.M. Driessen, *PLoS One*, **6**, e20435, 1-8 (2011).
34. С.И. Хмельницкий, Д.Е. Лесовой, *Медицина сегодня*, **234**, 3, 38-44 (2008).
35. A. Brizard, M. Stuart, K. van Bommel, A. Friggeri, M. de Jong, J. van Esch, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47**, 11, 2063-2066 (2008).
36. T. Adachi, E. Isobe, *J. Chromatogr.*, **1036**, 1, 33-44 (2004).
37. D.A. Spivak, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 10, 1779-1794 (2005).
38. J.L. Urraca, M.D. Marazuela, E.R. Merino, G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, *J. Chromatogr.*, **1117**, 1, 74-80 (2006).
39. С.Д. Варфоломеев, *Химическая энзимология*. Академия, Москва, 2005. 480 с.
40. F. Arslan, S. Ustabaş, H. Arslan, *Sensors*, **11**, 8, 8152-8163 (2011).
41. С.Д. Варфоломеев, *Соровский образовательный журнал. Химия*, 1, 45-49 (1997).
42. Р.Э. Хабибуллин, Х.Р. Хусаинова, Э.И. Минивалеева, О.А. Решетник, *Вестн. Каз. Техн. Ун-та*, **16**, 187-194 (2011).
43. В.Я. Пономарев, *Вестн. Каз. Техн. Ун-та*, **9**, 616-620 (2010).
44. E.H. Yoo, S.Y. Lee, *Sensors*, **10**, 5, 4558-4576 (2010).
45. P. Norouzi, F. Faridbod, B. Larijani, M.R. Ganjali, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **5**, 1213-1224 (2010).
46. И.А. Хусаинов, А.В. Канарский, З.А. Канарская, М.А. Поливанов, *Вестн. Каз. Техн. Ун-та*, **3**, 174-179 (2011).

© **Е. В. Крякунова** – канд. биол. наук, асс. каф. пищевой инженерии малых предприятий КНИТУ, Oscillatoria@rambler.ru;
А. В. Канарский – д-р техн. наук, проф. той же кафедры, alb46@mail.ru.