

Министерство образования и науки РФ

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования

Пермский национальный исследовательский политехнический университет

Кафедра охраны окружающей среды

Курсовая работа

Иммобилизованные микроорганизмы и их применение

Выполнила

студентка группы ООС-08

Константинова М. С

Проверил: проф. кафедры ООС

Зайцева Т. А

Пермь, 2011г.

Содержание

Введение

1. Процесс иммобилизации

1.1 Культуры, применяемые для иммобилизации

2. Виды носителей для иммобилизации клеток и ферментов

2.1 Органические полимерные носители

2.2 Синтетические полимерные носители

2.3 Носители неорганической природы

3. Способы иммобилизации

3.1 Прикрепление

3.2 Внедрение

3.3 Включение

3.4 Агрегация

4. Применение иммобилизованных микроорганизмов

4.1 Очистка сточных вод с помощью иммобилизованных культур

4.2 Промышленные процессы с использованием иммобилизованных клеток и ферментов

4.3 Биосенсоры на основе иммобилизованных культур

4.4 Иммобилизованные ферменты в медицине

5. Типы реакторов с использованием иммобилизованных культур

5.1. Проточный аппарат с мешалкой, заполненный гранулами биокатализатора

5.2. Аппарат с упакованной насадкой биокатализатора

5.3 Аппарат с псевдооживленной насадкой

5.4 Аппарат с внутренним контейнером биокатализатора

5.5 Реакторы с трубками, заполненными биокатализатором

5.6 Реакторы с трубками, имеющими диффузионно-проницаемые стенки

5.7 Реакторы, в которых фермент или клетки иммобилизованы на мембранах, проницаемых для субстрата, продуктов и кислорода

6. Преимущества и недостатки метода иммобилизации

Выводы

Список используемой литературы

ВВЕДЕНИЕ

Применение иммобилизованных культур является в настоящее время одним из приоритетных направлений биотехнологии, с которым связывают благосостояние всего человечества в обозримом будущем.

Применение иммобилизованных культур позволяет существенно интенсифицировать производство, повышать эффективность использования природных ресурсов, решать экологические проблемы, а также восполнять дефицит белка и энергии, предотвращать опасные заболевания.

Использование иммобилизованных культур позволяет: увеличить продолжительность пребывания микроорганизмов в реакторе, уменьшить прирост избыточной биомассы. В связи с этим этот метод является актуальным.

Цель работы: рассмотреть иммобилизованные культуры и возможность их применения в различных отраслях.

В соответствии с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1. Ознакомиться с использованной литературой
 2. Охарактеризовать процесс иммобилизации;
 3. Рассмотреть носители для иммобилизации ферментов и клеток;
 4. Дать характеристику способам иммобилизации клеток и ферментов;
 5. Рассмотреть применение иммобилизованных культур в промышленных процессах и в очистке сточных вод;
 6. Рассмотреть типы реакторов с применением иммобилизованных культур;
 7. Выявить преимущества и недостатки использования иммобилизованных культур.
1. Процесс иммобилизации

Иммобилизация - это прикрепление клеток микроорганизмов или ферментов к нерастворимым носителям.

Иммобилизация клеток может быть естественным процессом или может быть вызвана химическими или физическими способами. Именно развитие методов управления искусственной или индуцированной иммобилизацией привело в настоящее время к осознанию преимуществ применения в биологических реакторах иммобилизованных клеток. Так, при биологической очистке сточных вод долгое время применяли иммобилизованные клетки, распределенные в виде пленки по твердой поверхности капельного биофильтра, и традиционный способ получения уксуса включает применение клеток *Acetobacter*, иммобилизованных на березовых прутьях. Эти процессы, однако, представляют собой примеры иммобилизации, происходящей естественным путем. В настоящее время стала доступной иммобилизация любых микробных или тканевых клеток, что привело к значительному расширению возможностей их применения. Даже в случае очистки сточных вод последние достижения позволили значительно усовершенствовать этот традиционный процесс, основанный на использовании иммобилизованных клеток, за счет увеличения удельной поверхности насадки в системе.

Клеточная иммобилизация как прокариотических, так и эукариотических клеток позволяет создавать биочастицы любого размера, объема и плотности. Одной из

важнейших особенностей процесса клеточной иммобилизации является возможность достижения чрезвычайно высокой концентрации клеток, что, наряду с легкостью отделения иммобилизованных клеток от жидкой фазы, обуславливает ряд преимуществ и способов усовершенствования процесса.

Иммобилизованные клетки остаются в реакторе при непрерывном прохождении жидкой фазы, что позволяет контролировать скорость роста клеток вне зависимости от расхода. Можно легко проводить непрерывный процесс даже с не растущими клетками, что невозможно в случае свободно взвешенных клеток.

Возрастание общей продуктивности. Это является прямым следствием сохраняющейся высокой концентрации клеток в реакторе. Легкое разделение клеток и жидкости. Грубое фильтрование или быстрое осаждение под действием силы тяжести позволяет удалить жидкость из реактора, не удаляя клетки. Повторное культивирование с использованием тех же клеток. Отработанную жидкость можно удалить, а сосуд наполнить свежей средой.

Усиливается массообмен между газовой и жидкой фазами. Иммобилизация разрешает проблему вязкости, часто связанную с высокими концентрациями взвешенных клеток, что позволяет улучшить массообмен.

1.1 Культуры, применяемые для иммобилизации

Методы иммобилизации универсальны для всех видов иммобилизованных биокатализаторов -- индивидуальных ферментов, клеток, субклеточных структур, комбинированных препаратов.

Для иммобилизации используются такие ферменты как: *E. Coli*, *Kluyvermyces fragilis*, *K lactis*, *Aspergillus niger*, *A oryzae*, *B. Subtilis*, *B.licheniformis*, *B. Thermoproteolyticus*, *Mucor pusillus*.

Наряду с иммобилизацией ферментов в последнее время все большее внимание уделяется иммобилизации клеток и субклеточных структур: *Mucobacterium globiformis*, *Arthrobacter*, *Aureobacidium pullulan*, *Bacillus thermoproteoliticus*, *Erwinia herbicola*, *E. Intermedia*, *E. Coli*. Это объясняется тем, что при использовании иммобилизованных клеток отпадает необходимость выделения и очистки ферментных препаратов, применение кофакторов; создается возможность получения полиферментных систем, осуществляющих многостадийные непрерывно действующие процессы.

В промышленных процессах чаще используют покоящиеся клетки. Для подавления роста иммобилизованных клеток растений используют дефицит фитогормонов, а рост клетки бактерий тормозят добавлением антибиотиков.

2. Виды носителей для иммобилизации клеток и ферментов

Идеальные материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими основными свойствами: нерастворимостью; высокой химической и биологической стойкостью; значительной гидрофильностью; достаточной проницаемостью, как для ферментов, так и для коферментов, субстратов и продуктов реакции; способностью носителя легко активироваться (переходить в реакционноспособную форму).

Естественно, ни один из используемых в настоящее время в качестве носителя

материал не отвечает полностью перечисленным требованиям. Тем не менее, существует широкий набор носителей, пригодных для иммобилизации определенных энзимов в конкретных условиях.

В зависимости от природы носители делятся на органические и неорганические материалы.

2.1 Органические полимерные носители

Иммобилизация многих ферментов осуществляется на полимерных носителях органической природы. Существующие органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные и синтетические полимерные носители. В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения. Среди природных полимеров выделяют белковые, полисахаридные и липидные носители, а среди синтетических -- полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные.

К преимуществам природных носителей следует отнести их доступность, полифункциональность и гидрофильность, а к недостаткам -- биodeградируемость и достаточно высокую стоимость.

Из полисахаридов для иммобилизации наиболее часто используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные. Химической модификацией крахмала сшивающими г-агентами (формальдегид, глиоксаль, глутаровый альдегид) синтезирован новый носитель -- губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью к гликозидазам.

Из природных аминсахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Среди белков практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие, как кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена - желатина. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в значительных количествах, дешевы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Белки способны к биodeградации, что очень важно при конструировании иммобилизованных ферментов для медицинских целей. К недостаткам белков как носителей в этом случае следует отнести их высокую иммуногенность.

2.2 Синтетические полимерные носители

Благодаря разнообразию и доступности материалы этой группы широко используются как носители для иммобилизации. К ним относятся полимеры на основе стирола, акриловой кислоты, поливинилового спирта; полиамидные и полиуретановые полимеры. Большинство синтетических полимерных носителей обладают механической прочностью, а при образовании обеспечивают возможность варьирования в широких пределах величины пор, введения различных функциональных групп. Некоторые синтетические полимеры могут быть произведены в различных физических формах (трубы, волокна, гранулы). Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

2.3 Носители неорганической природы

В качестве носителей наиболее часто применяют материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, а также силохромы, оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего, носители покрывают пленкой оксидов алюминия, титана, гафния, циркония или обрабатывают органическими полимерами. Основное преимущество неорганических носителей -- легкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

К настоящему времени создано огромное число разнообразных носителей для иммобилизации ферментов [3].

3. Способы иммобилизации

В настоящее время разработано большое число методов иммобилизации, многие из которых повторяют приемы иммобилизации ферментов. Методы иммобилизации можно разделить на группы согласно используемому физическому процессу: прикрепление, внедрение, включение и агрегация.

Необходимо различать методы иммобилизации, в результате которых клетки становятся неподвижными при естественном росте на предоставленной подходящей поверхности, и те, при которых выращенная клеточная популяция «активно» обрабатывается для достижения иммобилизации. «Активные» методы более широко распространены и могут быть использованы для клеток в любом физиологическом состоянии. «Естественные» методики, в общем, более доступны и дешевы, так как не требуют никаких дополнительных затрат. Рассмотрим наиболее широко распространенные методы, разделенные на четыре группы.

3.1 Прикрепление

Рис. 3.1. Иммобилизация клеток методом прикрепления

К этой группе принадлежат все формы иммобилизации, при которой клетки каким-либо способом прикрепляются к поверхности или твердому носителю (рис. 3.1). Прикрепление может являться следствием естественной адгезии или индуцироваться химически. Естественная адгезия клеток -- широко распространенное явление, послужившее объектом многих исследований, однако его механизм еще не до конца ясен. Это простейший метод иммобилизации, который используется в двух старейших промышленных процессах, основанных на применении иммобилизованных клеток: производстве уксуса и очистке сточных вод. В системах, разработанных недавно, предпочтение отдается использованию мелкодисперсных твердых носителей, материалов типа песка, который, например, в процессах с псевдооживленным слоем обеспечивает гораздо большую площадь поверхности для прикрепления на единицу объема реактора, чем в традиционных процессах. Частицы носителя, которые обычно имеют диаметр менее 1 мм, просто загружаются в реактор, который затем инокулируется (или засеивается) обычным образом.

Клетки естественным образом прикрепляются к поверхности и по мере роста образуют активную пленку. Толщина пленки может составлять один слой клеток,

как в случае иммобилизации клеток тканей животных, или несколько миллиметров, как в случае микроорганизмов, применяемых для очистки сточных вод. Клетки, которые не способны к естественному прикреплению к поверхности, могут быть прикреплены с помощью химических способов, таких как сшивание с помощью глутарового альдегида, или прикрепление к кремнийсодержащим носителям с помощью силанизации, или хелатообразование с оксидами металлов. В этих случаях прочность прикрепления такая же, как и при естественной адгезии.

Прикрепленные клетки непосредственно контактируют с окружающей средой и потому подвержены действию сил трения, возникающих при движении частиц и жидкости относительно друг друга. Весьма вероятно, что при этом клетки отделяются и переходят в жидкую фазу, поэтому данный способ не применяют, если необходимо оставить жидкость бесклеточной. В такой системе весьма затруднительно управлять толщиной биопленки и даже определять ее, что также является недостатком.

При иммобилизации клеток путем прикрепления особое внимание следует уделять правильному подбору носителя, пригодного для промышленного использования, и заселению его нужным микроорганизмом или популяцией микроорганизмов с возможно большей плотностью.

3.2 Внедрение

Клетки при иммобилизации можно заключать внутрь различных, простых материалов, как приготовленных заранее, так и формирующихся *in situ* вокруг клеток (рис. 3.2).

Внедрение внутрь готовых структур обычно является естественным следствием роста клеток, причем эффективность иммобилизации, как и в случае естественного прикрепления, зависит от типа клеток и носителя.

Рис. 3.2 Иммобилизация клеток методом внедрения

Напротив, пористые структуры, образующиеся *in situ*, можно использовать для иммобилизации практически любого типа клеток, хотя иногда условия образования частиц носителя могут быть губительны для клеток.

Методики внедрения клеток в готовые пористые структуры чрезвычайно похожи на применяемые при естественном прикреплении. Клетки свободно диффундируют в пористые структуры и, увеличиваясь в размере по мере роста, «падают в ловушку». Этот процесс может происходить на микроскопическом уровне на частицах микропористого носителя, например кирпича, кокса, керамики, пористого стекла или кизельгура, в которых поры соизмеримы с размерами клеток, или на макроскопическом уровне, где частицы имеют большие поры (до 0,1 мм).

Преимуществом данного метода иммобилизации является то, что клетки, растущие вне частиц, уничтожаются трением частиц друг о друга или потока жидкости о частицы, и таким способом удобно управлять ростом клеток.

В настоящее время наиболее широко применяемым в лабораторной практике методом иммобилизации является внедрение клеток в пористые структуры, образующиеся *in situ* вокруг них. Клетки в виде густой суспензии или пасты смешивают с компонентом, который затем образует гелеобразный пористый

матрикс Для иммобилизации такого типа применяли и другие синтетические полимеры, но большая часть современных методов иммобилизации *in situ* основана на использовании полисахаридов. Из этих гелей на основе каппакарагената, агара и альгинатов наиболее популярен гель альгината кальция.

Вряд ли можно представить себе более простой и мягкий процесс, чем включение клеток в альгинат кальция. Клетки суспендируют в растворе альгината натрия и смешивают с раствором соли кальция. Гель образуется на поверхности мгновенно, но его необходимо выдержать 20 мин для полной полимеризации альгината. В альгинат и раствор соли кальция можно включать защитные материалы, такие как питательные и поддерживающие осмос вещества.

Метод не требует термообработки, а иммобилизованные клетки сохраняют высокую активность. Недостатком данного метода является то, что гели легко разрушаются при контакте с хелатирующими агентами, связывающими кальций, кроме того, приготовление частиц альгината диаметром менее 5 мм затруднено.

Данный метод позволяет получить результат, который обычен в природе для некоторых организмов, например слизеобразующих бактерий. Физические свойства гелей не отличаются от таковых у слизей, но слизи образуют лишь немногие виды, а иммобилизация в геле может быть осуществлена практически для любых организмов.

3.3 Включение

Рис. 3.3. Иммобилизация клеток методом включения

Сущность методов этой группы состоит в иммобилизации путем включения клеток в заранее подготовленную или образованную оболочку (рис. 3.3). Такой оболочкой может служить просто граница раздела фаз между двумя несмешивающимися жидкостями. В этом случае клеточная суспензия эмульгируется в органическом растворителе и затем ресуспендируется в виде капель в водной фазе. Примером заранее подготовленной оболочки является полупроницаемая мембрана, используемая для микро и ультрафильтрации. При этом питательные вещества легко диффундируют к клеткам, находящимся за мембраной.

Основное применение данной системы определяется возможностью с ее помощью очистить рабочую среду от клеток, что используется главным образом при работе с клеточными культурами тканей млекопитающих.

3.4 Агрегация

Клетки можно иммобилизовать путем флокуляции с образованием больших агрегатов, что позволяет сохранить их в непрерывно работающем реакторе, например, с неподвижным или псевдооживленным слоем. Естественная флокуляция дрожжевых клеток происходит по окончании ферментации, иммобилизованные таким путем клетки, используются в башенных ферментерах при производстве пива. Мицелий грибов также образует агрегаты в виде сферических пеллет. Флокуляция является характернейшим процессом очистки сточных вод активным илом. Для усиления агрегации могут использоваться искусственные флокулянты, хотя механизм флокулообразования еще слабо изучен [7].

реактор иммобилизация клетка фермент

4. Применение иммобилизованных микроорганизмов

4.1 Очистка сточных вод с помощью иммобилизованных культур

Эффективным направлением совершенствования биотехнологии и ускорения процесса очистки сточных вод служит целенаправленная трансформация токсичных органических примесей селекционированными микроорганизмами перед подачей очищаемых вод на окончательную аэробную очистку. Технологически эту задачу можно решить путем фиксации клеток микроорганизмов-деструкторов к нерастворимым в воде и невымываемым из системы носителям.

Технологические возможности повышения эффективности работы биологических очистных сооружений довольно ограничены. В этой связи первостепенное значение приобретает разработка методов интенсификации процессов очистки на основе использования высокоэффективных микроорганизмов-деструкторов. Разработка микробиологических основ очистки промышленных сточных вод подтвердила идею возможности замены активного ила и биопленки очистных сооружений чистыми культурами не только в лабораторных, но и в производственных условиях.

В блок биологической очистки сточных вод включены:

Аэротенк: анаэробная, аноксидная, аэробная зоны;

Вторичный отстойник;

Биореактор доочистки;

Биофильтр;

Аэробный стабилизатор.

Аэротенк является основным сооружением очистки сточных вод. Аэротенк представляет собой резервуар, в котором медленно движется смесь активного ила и очищаемой сточной жидкости. Активный ил представляет собой биоценоз микроорганизмов-минерализаторов, способных сорбировать на своей поверхности, и окислять в присутствии кислорода воздуха органические вещества сточной жидкости. Хороший активный ил имеет компактные хлопья средней крупности. Для обеспечения тщательной и надежной очистки обрабатываемой воды при значительной скорости потока необходимо удерживать в очистном сооружении значительную биомассу микроорганизмов-деструкторов, а это можно достичь иммобилизацией микроорганизмов на носителе (табл.4.1). Прикрепленные организмы более устойчивы к действию токсикантов, размножаются быстрее, чем во взвешенном состоянии, характеризуются повышенной метаболической активностью.

Таблица 4.1 Возможности очистки сточных вод с помощью иммобилизованных микроорганизмов-деструкторов

Загрязняющие вещества

Микроорганизм

Носитель

Гексаметиленамин

Bacillus subtilis

Стекловолокно, глинистые минералы

Красители

Pseudomonas sp.

Древесный уголь, створки мидий, морской песок

Ароматические углеводороды, гетероциклические амины, фенолсодержащие стоки металлургических заводов

Pseudomonas sp., *Trichosporon cutaneum*., активный ил

Ерши из стекловолокна, стеклянные шарики

Поверхностно-активные вещества, красители, морфолинсодержащие стоки

Pseudomonas sp., *Bacillus subtilis*

Ерши из стекловолокна, волокно из природных материалов

Этилкетон, этилацетат, пропионовый альдегид, кротоновый альдегид, ацетальдегид, стирол

Pseudomonas fluorescens, *Bacillus subtilis*

Активированный уголь Поролон, стеклоткань, стеклянные бусы, стеклоерши

Капролактамы

Achromobacter guttatus

Включение в ПААГ, коллаген

Жирные кислоты

Alkaligenes sp.

Цеолит

Нафталин-2-сульфонат

Pseudomonas sp.

Песок

Фенол

Candida tropicalis

Включение в Са-альгинат, гели на основе полистирола, ПААГ, адсорбция на активированном угле

Бензол

Pseudomonas putida

Включение в ПААГ, Са-альгинат

Б-Метилстирол

P. aeruginosa

Са-альгинат

Кротоновый альдегид, ацетальдегид, этанол, бутанол, этилацетат, винилбутиловый эфир

B. coagulans, *B. alcaligenes*

Флоки клеток (флокулянт - латекс дивинилстирольного типа)

Биомассу микроорганизмов-деструкторов выращивают заранее и высококонцентрированную суспензию вводят в контакт с инертным материалом, чтобы произошла иммобилизация. В качестве органического вещества для питания микроорганизмов можно использовать ксенобиотик, подвергшийся разложению, но чаще рост на таком субстрате бывает замедленным, поэтому для быстрого накопления биомассы используют среды с легкодоступным источником углерода [4]. Использование биореакторов с закрепленными на носителе высокоактивными бактериями-деструкторами позволяет эффективно очищать промышленные сточные воды, характеризующимися различным составом и концентрацией загрязняющих веществ. Здесь наиболее приемлемым является иммобилизация методом адсорбции и агрегации. В качестве адсорбентов могут быть использованы органические и неорганические носители - различные полимеры, керамика, глина и другие, особое внимание в последние годы привлекают крупнопористые носители. Микробиологическая очистка экономична, не требует больших капитальных и эксплуатационных затрат, локальные очистные установки занимают

незначительные площади, просты и надежны в обслуживании.

Ответственным этапом обеспечения работы реактора с закрепленными микроорганизмами является выбор носителя. Носитель для иммобилизации должен быть легко проницаемым и способным защищать микроорганизмы от механических, аэро- и гидродинамических воздействий, резких изменений pH, температуры, концентрации загрязнителей. В практике микробной очистки воды широкое применение в качестве носителей микроорганизмов нашли насадки типа «вия» и стеклоерши. В последнее время были разработаны новые полимерные носители микроорганизмов. Среди них особый интерес вызывают материалы в виде формоустойчивых волокнистых нетканых элементов, которые изготавливают пневмораспылением расплавов термопластинчатых полимеров.

Очистка сточных вод от нефтепродуктов.

Микроорганизмы, способные потреблять дизельное топливо в качестве единственного источника углерода, широко распространены в окружающей среде. Штаммы *Acinetobacter* sp. НВ-1 и *Mycobacterium* sp. ЦКМ В 65-Б окисляют 55% и 4506% дизельного топлива (1%) за 14 сут, соответственно, а *Mycobacterium flavescens* ЕХ-91 - 45% за 7 сут. Максимальная степень окисления дизельного топлива (1%), равная 95%, достигая штаммами *Arthrobacter oxydans* Ас-1838Д и *Pseudomonas* В-2443 на четвертые сутки. Культуры *Arthrobacter globiformis* ВКПМ S-1551 и *Rhodococcus eritropolis* ВКПМ S 1550 утилизируют дизтопливо (0,5%) на 99% при скорости потока 0,29 - 0,33 ч-1. Также изучена способность клеток штамма *Rhodococcus opacus* 31 КР адсорбироваться на капроновом носителе и волокнистом полимерном материале. Родококк хорошо сорбируется на поверхности обоих носителей. Однако волокнистом полимерном материале заселяется микроорганизмами предпочтительнее, чем капроновый носитель «вия». Это существенное преимущество волокнистого полимерного материала перед носителем «вия» заключается в том, что структура волокнистого полимерного материала наряду с присутствующими ей значительной пористостью и удельной поверхностью обеспечивает иммобилизованным клеткам микроорганизмов защищенность от гидро- и аэродинамических нагрузок. Это обусловлено жидкостью волокнистого полимерного материала, состоящего из волокон, когезионно скрепленных между собой в местах касания.

Установлено, что вода, загрязненная дизельным топливом, в условиях интенсивного снабжения воздухом очищается иммобилизованными микроорганизмами-деструкторами при скорости разбавления 0,30 ч-1 с эффективностью очистки по ХПК, равной 76,9% (табл. 4.2). Дизельное топливо при этом окисляется на 98%. При увеличении скорости потока модельной сточной воды до 0,45 и 0,8 л/ч эффективность окисления загрязнителя снижается до 91,4% и 78,1% соответственно [6].

Таблица 4.2 Окисление дизельного топлива в воде микроорганизмами-деструкторами, иммобилизованными на волокнистом полимерном материале

Концентрация дизельного топлива, мг/л

ХПК, мгО₂/л

Скорость потока, л/ч

Скорость разбавления, ч-1

Эффектив-ность окисления дизельного топлива, %

Эффективность очистки по ХПК, %

Исходная вода

Очищен-ная вода

Исход-ная вода

Очищенная вода

32,5
140,0
355,0

511,0

118,0
165,0
212,0

0,28
0,45
0,80

0,30
0,45
0,80

98,0
91,4
78,1

76,9
67,7
58,5

Один из способов удаления углеводов из сточных вод - применение микроорганизмов, способных использовать нефть и нефтепродукты в качестве источника углерода и энергии. Среди методов биологической очистки загрязненных нефтью вод предпочтение отдается микробным ассоциациям (биоценозы) либо специализированным, адаптированным к определенному составу химических

загрязнений, культурам микроорганизмов. Эффективность очистки воды от нефти и нефтепродуктов повышается при иммобилизации микроорганизмов. Накопительные культуры микроорганизмов состоят из 3-4 типов бактерий. Большинство из выделенных монокультур на средах с нефтью, парафинами и гексадеканом менее активно используют эти субстраты по сравнению с ассоциациями, из которых монокультуры были выделены.

Важным и существенным фактором для иммобилизации клеток при выращивании штаммов является образование гомогенной клеточной суспензии. Но часто могут образовываться конгломераты клеток, может наблюдаться частичная или полная флоатация.

Штаммы *A.calcoeticus* K-4, *N.vaceinii* K-8, *R.erythropolis* ЭК-1 способны расти и размножаться в присутствии керамзита. При этом наблюдается как увеличение максимальной удельной скорости роста бактерий, так и повышение уровня биомассы. После выращивания бактерий в присутствии керамзита количество остаточной нефти в сточной воде составляет 20-35 %, а без керамзита - 40-55%. При этом уровень биомассы почти не изменяется. Снижение содержания нефти в вариантах с керамзитом обусловлено адсорбцией на нем нефти.

Применение бактериальных культур для очистки от нефтяных загрязнений часто оказывается эффективным лишь при добавлении минеральных источников питания. Так, при внесении в места загрязнения нефтью азота, фосфора и калия, происходит ускорение процесса биodeградации нефти. Дополнительное внесение фосфатов сопровождается значительным увеличением потребления нефти. Добавление в загрязненную нефтью воду 0,1% диаммонийфосфата приводит к снижению содержания нефти после очистки. При этом эффективность очистки составляет 99,5%.

При увеличении начального содержания нефти в воде со 100 до 250 мг/л эффективность очистки иммобилизованными на керамзите клетками штамма *N.vaceinii* K-8 снижается и составляет не более 90 %, в то время как для штамма *R.erythropolis* ЭК-1 практически не изменяется и остается на уровне 99,5% (при высокой скорости подачи воды-0,68 л/мин. и в условиях низкой аэрации-до 0,1 л воздуха на 1 л воды в мин.) [5].

Очистка металлсодержащих сточных вод

Все больше заводов горно-рудной промышленности приходят к выводу, что для извлечения ценных металлов и очистки промышленных сточных вод можно использовать биологические процессы, причем эти процессы могут быть более экономичными и эффективными, чем обычно применяемые методы. Применяемые процессы осуществляют в аэротенках, больших отстойниках или проточных прудах с медленным течением, в которых растут водоросли и микроорганизмы. Эти организмы накапливают растворенные металлы и их частицы или образуют продукты, переводящие примеси в нерастворимую форму. Многие микроорганизмы способны накапливать металлы в больших концентрациях и содержат структурные компоненты, которые могут избирательно связывать специфические ионы. Селекция микроорганизмов, способных накапливать металлы, и создание технически более

совершенных систем в целях использования этих организмов для удаления всех или отдельных загрязняющих ионов, присутствующих в малых количествах в больших объемах сточных вод, получили широкое применение в горнодобывающей промышленности и в других отраслях индустрии.

Извлекать металлы способны все микроорганизмы, поскольку такие металлы, как железо, магний, цинк, медь, молибден и многие другие входят в состав ферментов или пигментов, подобных цитохромам или хлорофиллам. В ряде случаев металлы накапливаются микроорганизмами в значительных количествах; в бактериальной клетке могут содержаться ионы калия в концентрации 0,2М, даже если в среде калий присутствует в концентрациях 0,0001М и ниже. Микроорганизмы обладают системами поглощения, специфичными к определенным металлам и способными к значительному их концентрированию. В результате метаболических реакций, протекающих у микроорганизмов, могут происходить различные превращения металлов: выделяемые в окружающую среду продукты метаболизма способны образовывать комплексы с металлами или осаждать их из растворов; некоторые металлы могут переводиться с их помощью в летучие формы и удаляться из раствора; металлы могут окисляться или восстанавливаться.

Основными механизмами иммобилизации металлов из сточных вод микроорганизмами являются следующие:

Перевод в летучую форму;

Внеклеточное осаждение;

Внеклеточное комплексообразование и последующее накопление;

Связывание клеточной поверхностью;

Внутриклеточное накопление.

У различных штаммов родственных бактерий уровень поверхностного связывания существенно различается. Например, *Bacillus megaterium* КМ (при концентрации 1 г сухой массы на 1 л) при 20 °С связывает 43 мг кадмия на 1 г сухой массы из раствора, содержащего кадмия в концентрации 112 мг/л (в то время, как *B. polymyxa* - всего 10 мг кадмия на 1 г сухой массы).

Могут иммобилизовываться также радиоактивные металлы, например, такие, как уран, что очень важно для окружающей среды [2].

4.2 Промышленные процессы с использованием иммобилизованных клеток и ферментов

Сочетание уникальных каталитических свойств энзимов с преимуществами иммобилизованных ферментов как гетерогенных катализаторов позволило создать новые промышленные технологические процессы. Следует отметить, что все они относятся к производству пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

В настоящее время в мире разработаны следующие крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов и клеток:

Получение глюкозофруктозных сиропов.

Получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей.

Синтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония.

Синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты.

Синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты.

Получение безлактозного молока.

Получение Сахаров из молочной сыворотки.

Получение б-аминопенициллановой кислоты.

В качестве примера рассмотрим некоторые из них.

Получение глюкозофруктозных сиропов.

Фруктоза (фруктовый, плодовый или медовый сахар) -- важнейший в физиологическом и технологическом отношении природный моносахарид.

Превращаясь в печени и кишечнике млекопитающих в глюкозу, фруктоза включается в пластический и энергетический обмен клетки. Она в 2,5 раза слаще глюкозы и в 1,7 раза слаще тростникового сахара (сахароза), благодаря чему фруктоза -- менее калорийный пищевой продукт по сравнению с последними. В отличие от глюкозы обмен фруктозы не контролируется инсулином, поэтому фруктовый сахар может потребляться больными диабетом. Фруктоза практически не вызывает кариеса зубов. В смеси с глюкозой фруктоза не кристаллизуется, поэтому широко используется для производства кондитерских изделий.

Объем производства сахарозы за последние 100 лет возрос в 15 раз и составляет, по разным оценкам, 30 -- 40 кг в год на человека. Однако, несмотря на явные преимущества использования фруктозы, первая промышленная установка для превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы была запущена лишь в 1973 г. (компания «Клинтон Корн», США). Исходным сырьем для этого процесса служит глюкоза, которую получают при гидролизе кукурузного или картофельного крахмала в присутствии минеральных кислот. Для конструирования промышленного биокатализатора глюкоизомеразу сорбируют на пористых неорганических носителях или ионообменных смолах. Во многих случаях используют иммобилизованные клетки разного происхождения (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *S. olivaceus*, *S. venezuelae*).

Коммерческие препараты иммобилизованной глюкоизомеразы имеют вид гранул, шариков, волокон или аморфной массы. Наиболее эффективными биореакторами для получения фруктозы признаны аппараты колонного типа высотой около 5 м, в которых по сравнению с реакторами перемешивания расход фермента минимален.

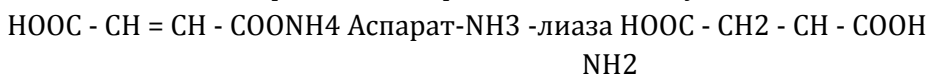
Производительность такого реактора варьирует от 600 до 9000 кг глюкозофруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента в зависимости от чистоты исходного сырья, а время полуинактивации катализатора -- 20-50 суток.

Возникающий в результате, каталитического процесса глюкозофруктозный сироп содержит 42--45% фруктозы, около 51 % глюкозы, небольшое количество олигосахаридов и по сладости соответствует инвертному сахару, получаемому при гидролизе сахарозы. Эти смеси постепенно вытесняют инвертированный сахар в промышленности и медицине. Глюкозофруктозную смесь широко применяют для производства тонизирующих напитков, консервированных фруктов, кондитерских изделий, хлеба, мороженого и пр. Экономические расчеты показали, что производство глюкозофруктозных сиропов с использованием иммобилизованной глюкоизомеразы в 1,5 раза выгоднее получения сахарозы из сахарной свеклы по

традиционной технологии. Благодаря этому обстоятельству производство глюкозофруктозных сиропов в мире постоянно растет. Так, в 1980 г. 10 % потребляемого населением Японии сахара заменено на глюкозофруктозную смесь. В США эта доля к началу нового столетия достигла 40 %.

Получение L-аспарагиновой кислоты.

Аспарагиновая кислота широко употребляется в качестве пищевой добавки (подсластитель и подкислитель). Первая в мире промышленная установка для синтеза L-аспарагиновой кислоты из получаемого химическим путем fumarата аммония была запущена в 1973 г. в Японии (фирма «Танабе Сейяку»); в ней использованы иммобилизованные в полиакриламидном геле клетки кишечной палочки *E. coli*, содержащие аспартат-аммиак-лиазу:

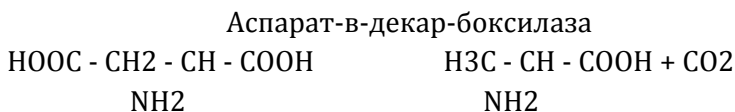


Полиакриламидный гель с иммобилизованными микробными клетками формируют в виде кубиков размером 2 -- 3 мм, которыми заполняют колонку объемом 1 м³. Через колонку пропускают раствор fumarата аммония.

При подкислении выходящего из колонки элюата до pH 2,8 и охлаждении до 15 °C из него выкристаллизовывается аспарагиновая кислота в виде препарата 100%-й чистоты. Процесс получения аспартата полностью автоматизирован и осуществляется в непрерывном режиме. Производительность процесса -- 1700 кг чистой аспарагиновой кислоты в сутки на реактор. Иммобилизованные клетки кишечной палочки сохраняют активность фермента на 80 % в течение 120 дней и на 50 % в течение 600 дней работы реактора, в то время как свободные клетки -- всего на протяжении 10 дней с уровнем активности 25 % от исходной.

Получение L-аланина.

В настоящее время основной промышленный способ получения L-аланина -- ферментативное декарбоксилирование L-аспарагиновой кислоты:



Процесс превращения L-аспартата в L-аланин катализируется аспартат-р-декарбоксилазой ряда микроорганизмов (*Pseudomonas dacunhae*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter pestifier*), иммобилизованных в полиакриламидном геле, каррагинане или полиуретане. Разработанная установка производит этим способом 10 т аланина в месяц. Усовершенствование процесса связано с использованием в качестве сырья fumarата аммония. В данном случае процесс получения L-аланина становится двустадийным и реализуется в двух последовательно расположенных реакционных колонках. На первом этапе fumarатаммония превращается в L-аспарагиновую кислоту, которая без выделения из реакционной среды на втором этапе претерпевает в-декарбоксилирование с образованием аланина.

С помощью иммобилизованных клеток *Serratia marcescens* из треонина и глюкозы синтезируют L-изолейцин, а с помощью иммобилизованных клеток *Corynebacterium*

glutamicum -- L-глутаминовую кислоту из L-глюкозы; L-триптофан -- из индола; L-орнитин -- из L-аргинина. Таким образом, расширение производства аминокислот стало возможным благодаря изменению технологии получения промышленных биокатализаторов и снижению затрат при их производстве.

Получение L-яблочной кислоты.

Яблочная кислота -- заменитель лимонной в продуктах питания и лекарственных препаратах.

Яблочную кислоту получают, используя иммобилизованные в полиакриламидном геле клетки, содержащие фумаратгидратазу. В присутствии этого фермента происходит присоединение воды по двойной связи в молекуле фумаровой кислоты:

Фумарат-гидратаза



В интактных клетках время полуинактивации фумаратгидратазы составляет 6 суток, в иммобилизованных в полиакриламидном геле -- 55 суток, а в иммобилизованных в геле на основе каррагинана -- 160 суток.

Таблица 4.3 Применение иммобилизованных ферментов

Название и шифр фермента

Источник фермента, способ иммобилизации

Биотехнологический процесс

Ацилнейтраминат-9-фосфатсинтаза

Фермент E. Coli. Включение в полиакриламидный гель

Синтез сиаловых кислот

В Галактозидаза (КФ 3.2.1.23)

Фермент *Kluyveromyces fragilis*, *K. lactis*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*. Включение в нити ацетата целлюлозы, полиакриламидный гель; адсорбция на фенолформальдегидной смоле, модифицированных керамике и кремнеземе

Гидролиз лактозы; получение безлактозного молока, глюкозы и галактозы

Глюкоамилаза (КФ 3.2.1.33)

Фермент *Aspergillus niger*. Хелатирование целлюлозой, стеклом, нейлоном; ковалентное связывание с клетками

Превращение олигосахаридов в глюкозу

3-Кетостероид-Дегидрогеназа

Клетки *Mycobacterium globiformis*. Включение в полиакриламидный гель

Трансформация гидрокортизона в преднизолон

Пероксидаза (КФ 1.11.1.7)

Фермент из хрена, сополимеризованный с тирозином и включенный в гель альгината

Окисление фенола в сточных водах

Протеазы (КФ 3.4)

Ферменты *B. Subtilis*, *B.licheniformis*, *B. Thermoproteolyticus*, *Mucor pusillus*. Включение в полиакриламидный гель, силикагель; хелатирование на поверхности стекла, микроорганизмов

Получение белковых гидролизаторов

Пуллуназа (КФ 3.2.1.9)

Клетки *Aureobacidium pullulan*, *Arthrobacter*. Ковалентное связывание с биогелем

Расщепление б-1,6-гликозидных связей в амилопектине. Получение декстринов

Название ишифр фермента

Источник фермента, способ иммобилизации

Биотехнологический процесс

Термолизин (КФ 3.4.24.4)

Клетки *Bacillus thermoproteoliticus*, включенные в полиуретан

Реакция конденсации L-аспарагиновой кислоты и метилового эфира L-фенилаланина с образованием пептидного заменителя сахарозы аспартама (в 100 раз слаще сахарозы)

Тирозинфноллиаза (КФ 4.1.99.2)

Клетки *Erwinia herbicola*, *E. Intermedia*. Включение в полиакриламидный гель

Синтез тирозина из ПВК, NH₃ и фенола; Синтез ДОФА из ПВК, NH₃ и пирокатехина

Триптофаназа (КФ 4.1.99.1)

Клетки *E. Coli*. Включение в нити триацетата целлюлозы и гель каррагинана

Получение триптофана из l-серина и индола

4.3 Биосенсоры на основе иммобилизованных культур

Высокая эффективность биологических катализаторов и специфичность их действия делают ферменты идеальными реагентами для аналитической химии. Благодаря этим особенностям с помощью ферментов обнаруживаются вещества при предельно низкой концентрации в присутствии множества других соединений.

К настоящему времени созданы искусственные аналитические системы различных конструкций (биосенсоры, датчики, ферментные электроды, проточные анализаторы), содержащие иммобилизованные ферменты и клетки и предназначенные для автоматического детектирования продуктов энзиматического превращения. Например, если использовать иммобилизованную глюкозооксидазу, то концентрацию окисляемой кислородом глюкозы определяют, регистрируя количество выделившегося в ходе реакции пероксида водорода

В зависимости от концентрации анализируемых веществ выбирают тот или иной способ их детекции.

Технологические варианты реакторов с иммобилизованными ферментами весьма разнообразны -- колонки, трубки, полые волокна и пр. С их помощью на практике определяют концентрацию широкого спектра соединений -- глюкозы, аминокислот, мочевины, пенициллина, АТФ, НАДН, ФМН, стероидов, триглицеридов, желчных кислот и многих других. Так, американскими исследователями сконструирован микродатчик на основе глюкозооксидазы и рутениевого красителя, иммобилизованных в полиакриламидной матрице с использованием субмикронных оптических волокон. Микробиосенсор, не вызывая повреждений, может быть введен в клетку и даже в отдельные ее компартменты для измерения содержания в них глюкозы и кислорода. Предложены датчики на базе иммунодетекции для проведения экспресс-анализов на присутствие производных диоксина и оценки содержания биогенных аминов (с помощью моноаминооксидазы) в пищевых продуктах в связи с процессами их старения. Для определения мочевины ферментным электродом требуется всего 30 с.

Биосенсоры на основе иммобилизованных ферментов помогают выполнять десятки быстрых и точных анализов при диагностике заболеваний, контролировать содержание вредных веществ (инсектицидов, пестицидов, удобрений) в пищевых продуктах и в воздухе. Биосенсоры нашли применение в решении аналитических задач в химической и микробиологической промышленности, а также в научных исследованиях. Иммобилизация металлов из сточных вод микроорганизмами

4.4 Иммобилизованные ферменты в медицине

Иммобилизованные ферменты имеют огромное значение для медицины. В частности, большой рынок сбыта занимают тромболитические ферменты, предназначенные для борьбы с сердечнососудистыми заболеваниями. Так, в отечественную клиническую практику внедрен препарат «стрептодеказа», содержащий стрептокиназу -- активатор предшественника протеиназы плазмينا, предотвращающий образование тромба в кровеносной системе. Ферменты,

разрушающие некоторые незаменимые аминокислоты (например, аспарагиназа), используют для борьбы со злокачественным ростом опухолей. Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, субтилизин, коллагеназа), иммобилизованные на волокнистых материалах (целлюлоза, полиамидные волокна, декстран и др.), применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, абсцессов, а их белковые ингибиторы -- в заместительной терапии для лечения эмфиземы и панкреатитов. Исключительно важны с практической точки зрения работы, посвященные направленному транспорту лекарственных веществ. В этом отношении особенно выгодны инкапсулированные ферменты типа искусственной клетки.

Так, микрокапсулы, стенки которых представлены оболочкой эритроцита («тень эритроцита»), а их содержимое заполнено ферментом аспарагиназой, переносятся кровотоком к зонам скопления аспарагина и поэтому при меняются для лечения аспарагинзависимых опухолей, в частности саркомы. Колонки, заполненные микрокапсулами с ферментом, используют для диализа в аппарате «искусственная почка», которая работает в 100 раз эффективнее обычного аппарата. Таким образом, использование иммобилизованных ферментов во многих жизненно важных отраслях народного хозяйства становится все более массовым. Выгодное сочетание избирательности и эффективности с долговечностью и стабильностью иммобилизованных ферментов в корне меняет химическое производство, способы добывания сырья, способствует созданию новых биотехнологических процессов и методов терапии, совершенствует медицинскую диагностику, анализ, органический синтез и оказывает огромное влияние на образ жизни человека [3].

5. Типы реакторов с использованием иммобилизованных культур

Первым целенаправленным применением иммобилизованных клеток, возможно, было создание Пастером агрегата для получения уксуса, в котором клетки *Acetobacter* прикреплялись к поверхности деревянной стружки. Этот тип биореактора, капельный фильтр, до сих пор применяется при производстве винного уксуса и для очистки сточных вод.

Большинство современных биореакторов представляют собой ферментеры для периодического культивирования с перемешиванием. Однако проблема иммобилизации клеток тесно связана с непрерывным культивированием. Кроме того, в ферментерах с перемешиванием частицы с иммобилизованными клетками часто разрушаются. Поэтому необходимо создавать другие типы реакторов для использования иммобилизованных клеток. Несмотря на большое число статей, посвященных методам иммобилизации клеток, практически отсутствует подробное рассмотрение реакторов с иммобилизованными клетками.

Выбор реактора для каждого конкретного процесса определяется множеством факторов. Сюда входят метод иммобилизации, характеристики частиц (форма, размер, плотность, прочность), природа субстрата, влияние ингибиторов, кроме того, гидродинамические и экономические соображения. Реакторы с иммобилизованными клетками могут работать в периодическом или непрерывном режиме, хотя, в общем, несколько больше преимуществ у первых. Системы, работающие в непрерывном режиме, могут эксплуатироваться как реактор идеального вытеснения или как

реактор полного смешения. Реакторы полного смешения часто более предпочтительны в тех случаях, когда в ферментере нежелательны высокие концентрации субстрата из-за его ингибирующего действия, но они не очень пригодны в случае ингибирования процесса конечным продуктом, так как все клетки оказываются подвержены действию ингибирующих концентраций продукта. Существуют трудности в снабжении кислородом и управлении реакторами идеального вытеснения.

Обычно в процессах биотрансформации, даже если они осуществляются живыми клетками микроорганизмов, целевым продуктом является не биомасса, а продукт биотрансформации.

Наилучшим способом при этом является непрерывный процесс, в котором через аппарат протекает жидкость, а пространство аппарата заполнено иммобилизованным биокатализатором, который остается в аппарате в течение довольно продолжительного времени.

Рассмотрим технологические схемы реализации процесса биотрансформации.

5.1 Проточный аппарат с мешалкой, заполненный гранулами биокатализатора

На выходе потока из биореактора нужны сетчатые или пористые фильтры, задерживающие гранулы биокатализатора (рис. 5.1). При этом в аппарат можно «вогнать» достаточно много биокатализатора. Но для аэробных процессов биотрансформации возникают проблемы со снабжением гранул кислородом.

Рис. 5.1 Схема биореактора с механическим перемешиванием:

1 - биореактор; 2 - фильтр; I - субстрат; II - продукт

Для обеспечения высоких значений KLa требуется интенсивное перемешивание, а для гранул биокатализатора еще возрастает кажущееся значение Scr , так что массопередача нужна больше, чем для свободных клеток. Мешалка при этом может разрушать и истирать гранулы.

5.2 Аппарат с упакованной насадкой биокатализатора

Концентрация биомассы или фермента в рабочем объеме аппарата возрастает, что, конечно, хорошо, но одновременно возникают проблемы с аэрацией для аэробных процессов. (рис. 5.2) В анаэробных процессах (например, получение спирта) такое оформление процесса вполне приемлемо и даже оптимально. При наличии потребности в кислороде можно использовать модификацию аппарата -- секционирование его на невысокие секции, для которых хватает запаса растворенного в жидкости кислорода, с промежуточной аэрацией жидкостного потока.

Рис. 5.2. Схема биореактора с неподвижной насадкой гранул биокатализатора: 1 - корпус; 2 - фильтрующие сетки; 3 - насадка биокатализатора; I - субстрат; II - продукт

5.3 Аппарат с псевдооживленной насадкой

В этом случае гранулы биокатализатора под воздействием протекающего раствора и подаваемого в аппарат для аэрации воздуха постоянно движутся в растворе, что обеспечивает хороший коэффициент массопередачи между жидкостью и биокатализатором (рис. 5.3). Более интенсивный гидродинамический режим обеспечивает более высокое значение коэффициента массопередачи кислорода от

воздушных пузырьков к жидкости, чем в аппарате с насадкой.

Недостаток -- меньшее количество работающего биокатализатора и механическое воздействие на гранулы вследствие их соударений, вызывающее разрушение и истирание гранул.

Рис. 5.3 Схема биореактора с псевдооживленным слоем биокатализатора: 1 - корпус; 2 - фильтрующие сетки; 3 - псевдооживленный слой биокатализатора; I - субстрат; II, IV - воздух; III - продукт