

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по микробиология "Стефан Ангелов"
Секция "Екстремофилни бактерии"



Людмила Владимирова Кабаиванова

РАЗГРАЖДАНЕ НА НИТРИЛНИ СЪЕДИНЕНИЯ С
ИМОБИЛИЗИРАНИ В РАЗЛИЧНИ НОСИТЕЛИ КЛЕТКИ ОТ *Bacillus*
sp. UG – 5B, ПРОДУЦЕНТ НА ТЕРМОСТАБИЛНА НИТРИЛАЗА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен
за присъждане на образователна и научна степен "Доктор"

Научна специалност:
01.06.12. Микробиология

Научен ръководител: ст.н.с.Ист. д-р Елена Добрева

София, 2006

Дисертационният труд е написан на 120 страници, включва 39 фигури, 8 схеми и 10 таблици.

Библиографията съдържа 203 източника.

Защитата на дисертационният труд ще се състои на 15.07. 2006 година от 14. часа в аулата на Националния център по заразни и паразитни болести.

СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ,
ВИРУСОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ ПРИ ВИСШАТА
АТЕСТАЦИОННА КОМИСИЯ

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
Институт по микробиология "Стефан Ангелов"
Секция "Екстремофилни бактерии"



Людмила Владимирова Кабаиванова

РАЗГРАЖДАНЕ НА НИТРИЛНИ СЪЕДИНЕНИЯ С
ИМОБИЛИЗИРАНИ В РАЗЛИЧНИ НОСИТЕЛИ
КЛЕТКИ ОТ *Bacillus sp.* UG – 5B, ПРОДУЦЕНТ НА
ТЕРМОСТАБИЛНА НИТРИЛАЗА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд, представен
за присъждане на образователна и научна степен
"Доктор"

Научна специалност:
01.06.12. Микробиология

Научен ръководител: ст.н.с.Ист. д-р Елена Добрева

Рецензенти: 1. ст.н.с.И ст. д-р Мария Ангелова дбн
2. ст.н.с.И ст. д-р Игнат Абрашев

София, 2006

1. Въведение

Използването на имобилизирани биокатализатори е едно от важните направления на съвременната биотехнология. Като правило те са с по-висока стабилност спрямо токсичните субстанции и по-добра операционна стабилност в сравнение със свободните клетки.

Разработването на технологични процеси за микробно пречистване на замърсени почви и води на основата на имобилизирани клетки е сред задачите, които не губят актуалността и значимостта си.

Огромният естествен капацитет на микроорганизмите да разграждат органични съединения лежи в основата на биоремедиацията.

Много от ароматните съединения се причисляват към най-опасните замърсители на околната среда, които се натрупват като отпадни продукти от различни индустриални производства.

Нитрилите са органоцианиди, силно токсични, канцерогенни и мутагенни фактори поради наличието на циано група в състава им ($R-C\equiv N$).

Нитрилните съединения могат да бъдат разградени до съответната киселина и амоняк чрез една единствена реакция с участието на микробния ензим-нитрилаза, която принадлежи към ензимите от трети клас-хидролази (EC 3.5.5.1), без образуване на стабилен амиден междинен продукт.

Приложението на биологични системи за превръщане на токсични нитрил-съдържащи субстрати до съответни карбоксилни киселини е атрактивна алтернатива спрямо химичните методи поради добрия добив, меките реакционни условия, и специфичните активности, които притежават ензимните им системи.

Използването на имобилизирани клетки в биоремедиацията се изучава задълбочено и се прилага все-повече при отстраняване на много токсични химикали. Биологичната деградация на нитрилните съединения е едно от тези направления, което продължава да бъде с важно значение за почистване на отпадни води и почви в следствие на индустриалните производства.

Поради тази причина с разработката на настоящата дисертационна работа се цели да се решат част от проблемите чрез изследване възможностите за имобилизация от термофилен шам *Bacillus sp. UG-5B*, продуцент на термостабилна нитрилаза и получаване на биокатализатори, способни да разграждат нитрилни съединения.

2. Литературни данни за имобилизацията на клетки от продуценти на нитрилаза

Оскъдни са данните относно имобилизацията на продуценти на нитрил-метаболизиращи ензими. Иmobилизация е осъществена на някои мезофилни продуценти на нитрил-хидратаза и амидаза или нитрилаза. Единствено е описана имобилизация в Са-алгинат на клетки от умерения термофил *Bacillus pallidus* Dac 521, който продуцира термостабилна нитрилаза. Очертават се перспективите за използване на имобилизирани микробни клетки за биодеградация на токсични органоцианидни съединения и в частност нитрили. Възможно е прилагането им в периодични и непрекъснати процеси чрез включване на живите микробни продуценти в различни носители за деградация

на токсични вещества, намиращи се в природата в резултат на различни индустриални дейности.

Това даде основание за разработване на настоящата дисертация.

3. Цел и задачи

Изследване възможностите за имобилизация на клетки от термофилен шам *Bacillus sp. UG-5B*, продуцент на термостабилна нитрилаза и получаване на биокатализатори, разграждащи нитрилни съединения

Във връзка с тази цел бяха формулирани следните задачи:

1. Подбор на подходящи носители и методи за имобилизация на клетки от шам *Bacillus sp. UG-5B*, продуцент на термостабилна нитрилаза.
2. Определяне на оптималните условия за имобилизация на клетките в оказалите се перспективни носители.
3. Установяване на способността на свободни и имобилизирани клетки от изпитвания шам за деградация на различни нитрилни съединения във връзка с определяне на субстратната им специфичност.
4. Сравнителен анализ на свободни и имобилизирани клетки във връзка с определяне на ензимната термостабилност.
5. Определяне на деградационната ефективност и операционната стабилност на имобилизираните системи при многократно използване за ензимно разграждане на нитрили.
6. Приложение на имобилизираните клетки от изследвания шам за осъществяване на непрекъснат процес на разграждане на нитрилни съединения чрез използване на колонен тип реактор.

4. Материали и методи

Характеристика на шамата

За осъществяване на поставените задачи беше използван умерен термофилен шам *Bacillus sp. UG-5B*, изолиран от замърсени промишлени води (Емануилова *et al.*, 2002). Той се характеризира с пръчковидна форма с размери 0.5-0.8 μm за напречната и 1.5-4 μm за надлъжната ос. Оптималната температура за растеж е 50°C и граници на растеж от 40 до 65°C. pH оптимумът за растеж е между 6 и 8.5. Този шам е способен да се развива в минимална хранителна среда, съдържаща бензонитрил като единствен въглероден и азотен източник.

Среда и условия за култивиране

Използвана е следната течна хранителна среда със следния състав (g/l):

- Peptone (Oxoid) – 5.0;
- Yeast extract (Difco) – 5.0;

NaCl – 1.0;
KH₂PO₄·3H₂O – 6.6;
MgSO₄ – 0.1; Fe SO₄·7 H₂O – 0.03;
Benzonitrile – 20 mM,
pH – 7.5

Култивирането се извършва във ферментор Bioflo, New Brunswick Sci, с работен обем 350 ml, с комплексна среда при температура 50°C и аерация 1.0 v/v/m; pH–7.5 за 7-9 h. Клетките се отделят от културалната среда в края на експоненциалната и началото на стационарната фаза, когато бензонитрилатната активност е най-висока в границите от 0.12 U.mg белтък⁻¹ до 0.5 U.mg белтък⁻¹.

Имобилизация на бактериалните клетки

Културалната течност се центрофугира при 6000 rpm в продължение на 15 минути и получената биомаса се ресуспендира във фосфатен буфер (0.66 M, pH–7.2) и отново се центрофугира при същите условия до получаването на клетъчна суспензия с определена концентрация в границите 13.6-30 mg/ml клетки и активност 0.7-2.25 U.ml⁻¹, която се използва в имобилизационните процедури.

Носители

- чисти силициеви носители
- хибридни носители, получени по зол-гелен метод
- полисулфонов мембрани с дебелина 260 – 290 µm и диаметър на порите 0.2 µm и 0.45 µm
- йонотропен гел–Са-алгинат
- термообратим гел–агар

Методи за имобилизация

- Адсорбция на повърхността на носителя (зол-гел)
- Включване в различни носители (зол-гел, алгинат, агар)
- Химично свързване между повърхността на клетките и носителя, след предварителна активация (зол-гел, хибридни матрици и полисулфонов мембрани).

Промяна в параметрите на носителите

Количество използвана клетъчна суспензия

Количество на клетъчната суспензия с концентрация 30 mg/ml, използвана за имобилизация е варирано в експерименталната работа. Изпитвани са различни концентрации: 2.5 ml (75 mg клетки); 5 ml (150 mg клетки) и 10 ml (300 mg клетки) за определяне на оптималното количество.

Зол-гелни матрици

Варирано е и съдържанието и вида на съставките в хибридните зол-гелни носители, като различен процент - 5, 10, 15 и 20 от неорганичната част се замества с органична част в матрицата.

С цел да се запази жизнеността на клетките, химичните условия на зол-гелната синтеза леко се изменят.

Полимерни мембрани

Използвани са мембрани с различна големина на порите, и различна площ, която се използва за имобилизацията. В експериментите се използват 4, 8, 12, или 16 броя мембрани, всяка с площ 1 cm².

Агар и алгинат: различен процент от техните разтвори се използва за формиране на еднакви сфери с постоянна форма.

Методи за определяне на различни параметри в хода на експериментите

Определяне на ензимна активност

Нитрилатната активност се определя чрез измерване на отделения амоняк, вследствие действието на ензима по фенол/хипохлоридния метод на Fawcett and Scott, 1960.

Определяне на белтък

Количеството белтък се определя по метода на Bradford, 1976.

Сканираща електронна микроскопия (SEM)

За доказване целостта на клетките и липсата на увреждане в следствие имобилизацията, както и разположението им върху матриците, част от препаратите са наблюдавани със сканиращ електронен микроскоп.

Клетъчна концентрация

Концентрацията на бактериалните клетки се определя чрез измерване на оптическата плътност при дължина на вълната 660 nm и представена като mg сухо тегло според стандартна крива.

Температурна стабилност на имобилизационната система, получена при използване на PS мембрани и хибридна матрица с PAAG

За определяне на температурната стабилност на свободните и имобилизираните клетки, пробите за третиране се инкубират в буфер (pH–7.2) при температури от 50, 60 и 70°C във водна баня. През определени интервали от време (от 5 до 90 min) се прекратява температурното въздействие.

Субстратна специфичност на нитрилатата от изследвания шам

Субстратната специфичност се определя при използване на 20 mM концентрация на субстратите. Реакцията протича 15 min при 45°C. Изразява се в процент спрямо ензимната активност при хидролизата на бензонитрил, приета за 100%.

Операционна стабилност на получените биокатализатори

Проследена е способността на имобилизираните клетки за многократно използване.

Описание на биореактора, използван за провеждане на непрекъснати процеси с имобилизирани клетки

Колонният тип биореактор, използван при експериментите представлява цилиндричен стъклен съд с работен обем 100 ml ($\varnothing=5$ cm, дължина=18 cm). Общият обем на перлите е 45 ml. Разтворът на субстрата (20 mM) се подава към реактора с помощта на перисталтична помпа. Реакторът притежава двойни стени, където преминава вода, подавана от термостата и поддържаща определена постоянна температура (45°C или 55°C).

3. Резултати и обсъждане

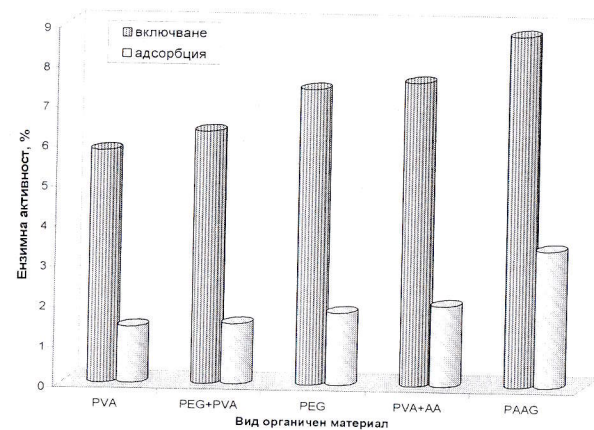
Подбор на подходящ носител и метод за имобилизация създаване на имобилизационна система от клетки на шам *Bacillus sp.*UG-5B и различни носители.

Изпитване на зол-гелни носители

От резултатите се вижда зависимостта на имобилизационната ефективност от количеството клетки, имобилизирани във и върху матриците спрямо общото количество клетъчна суспензия, използвана за имобилизация. Другият изследван показател е нитрилазната активност, отнесена за грам биокатализатор или за милиграм клетки, участващи в имобилизационния процес.

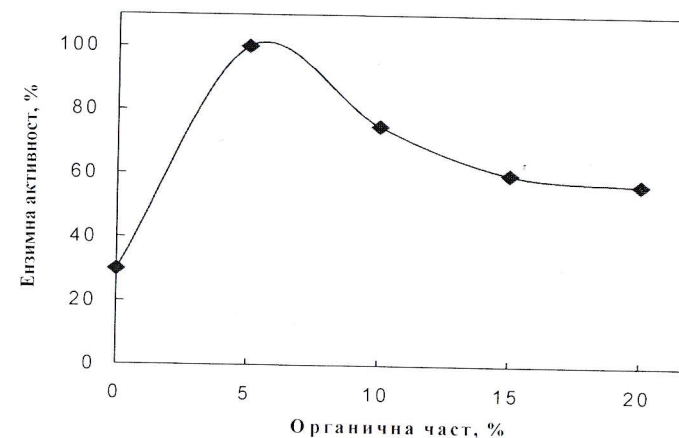
Методът на имобилизация, както и съставът на използвания носител (неорганична и органична част) оказват своето влияние върху ефективността на процеса.

В експериментите за синтеза на хибридни носители бяха включени различни неорганични прекурсори-TEOS или TMOS, MTES или ETMS. Както се вижда от Фигура 1, типа на органичния материал се явява от значение за получаване на добра имобилизационна ефективност. Тя намалява в реда: PAAG>PVA+AA>PEG>PEG+PVA>PVA. Най-подходяща органична част се оказва PAAG като при адсорбцията активността е 0.067 U/g биокатализатор, а при включване е 0.20 U/g биокатализатор. Подобни резултати докладват Owen *et al.*, 1998 и Hemachander *et al.*, 2001 като установяват, че за синтез на матрици, които да се използват за имобилизация на ензими и клетки, най-подходящи са синтетични полимери като PAAG, PEG и AA, а ефектът от добавянето на различни видове водоразтворими полимери при зол-гелната реакция довежда до промяна в структурата на порите, фазовия характер и времето за образуване на гела (Agren *et al.*, 1998; Agren *et al.*, 1999; Gerritsen *et al.*, 2000).



Фигура 1. Сравнение на имобилизационната ефективност при включване и адсорбция на зол-гелни хибридни матрици според ензимната активност (% от общата активност – 2.25 U/ml и 30 mg/ml клетки, приета за 100 %).

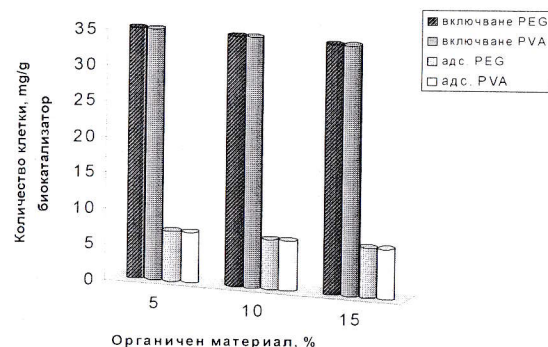
Добавянето на органика към неорганичната част оказва положителен ефект в сравнение с чистия неорганичен носител (Фигура 2). Вероятно, увеличаването на концентрацията на органичната част в матрицата довежда до неблагоприятен ефект върху клетките и инхибиране на ензимната активност, в резултат на токсично действие.



Фигура 2. Влияние на различната концентрация на органичен материал-PEG, включен в матриците върху ензимната активност на имобилизираните клетки

На фигура 2 е представен резултатът при изпитване на хибридна зол-гелна матрица, съставена от неорганичен прекурсор TEOS (0 % органичен материал) и последващото заместване с 5, 10, 15, и 20 % PEG като органичен компонент. За 100 % ензимна активност (0.065 U/g биокатализатор) е приета тази, получена при използване на носител, съдържащ 5 % PEG.

При включване в зол-гелната матрица цялото количество използвани клетки (140 mg-100 %) се включват в гелната мрежа и при този случай получените биокатализатори са натоварени с 35 mg клетки/g носител (фигура 4), независимо от вида и количеството органичен материал в съответната хибридна матрица. При прилагане на метода адсорбция клетъчното натоварване на повърхността на биокатализаторите е от 10 до 12 % или от 7 до 8.5 mg клетки/g носител. Останалото количество незакачени клетки се отмиват преди провеждане на анализи.



Фигура 3. Клетъчна концентрация като функция на метода за имобилизация и концентрация на органичен материал в матриците

При осъществяване на химическо свързване между активираната с формалдехид повърхност на матрицата и клетъчната повърхност се установи, че от 10 до 17 % от общото количество клетки се оказват свързани. Останалото количество остава в промивните води.

По отношение на общата ензимната активност на получените биокатализатори се определи, че активността за включените клетки в сравнение с адсорбираните е от 7 до 9 пъти по-висока (Таблица 1). След активиране на повърхността на носителите, вече химично свързаните клетки върху зол-гелните хибриди показват стойности за ензимната активност от 3 до 4 пъти по-високи в сравнение с адсорбираните клетки. Клетъчното натоварване на получените по различните методи биокатализатори е 18.75 mg/g при включване, 3.75 mg/g при адсорбция и 5 mg/g при осъществяване на химично свързване с активираната повърхност. Това е причината голямата разлика в ензимната активност при адсорбция и включване да се премахне, когато бъде представена като единици на милиграм имобилизирани клетки при съответните процеси на имобилизация. Нитрилазната активност по този начин за адсорбираните клетки достига и надвишава тази за включените.

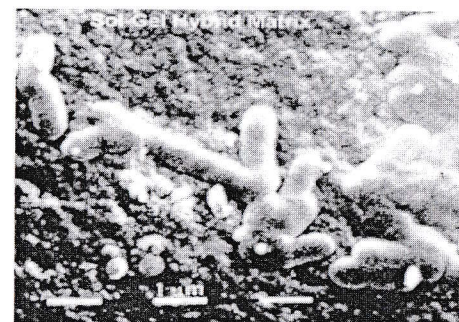
Таблица 1 Имобилизационна ефективност според нитрилазната активност на всички биокатализатори

Зол-гелни хибридни носители в система с:	Нитрилазна активност на имобилизираните биокатализатори								
	При включване			При адсорбция			При химично свързване след активация		
	Обща (U)	(%)*	U/mg клетки	Обща (U)	(%)*	U/mg клетки	Обща (U)	(%)*	U/mg клетки
MMA	0.81	7	0.010	0.07	0.63	0.009	0.50	4.3	0.047
PEG	0.83	7.4	0.011	0.10	0.9	0.013	0.33	2.9	0.036
PVA	0.24	2.1	0.003	0.033	0.3	0.004	0.14	1.2	0.015
PEG+PVA	0.61	5.4	0.008	0.08	0.7	0.011	0.25	2.2	0.028
PVA+AA	0.80	7	0.010	0.09	0.8	0.010	0.39	3.4	0.042
PAAG	0.88	9	0.014	0.12	3.0	0.048	0.59	5.1	0.056
Agar	-	-	-	-	-	-	0.57	4.9	0.054
Алгинат	-	-	-	-	-	-	0.51	4.4	0.049

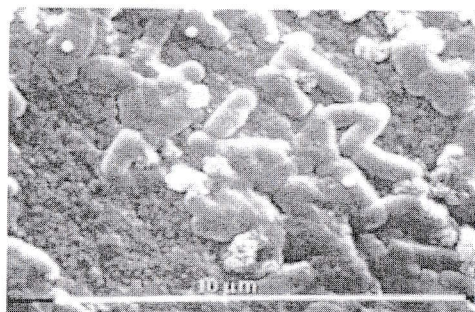
* Процентът е изчислен спрямо общата ензимна активност на 5 ml клетъчна суспензия (2.25 U/ml, приета за 100 %) и клетъчна концентрация 75 mg клетки, използвана при имобилизацията

Синтезирането на матриците по зол-гелния метод при стайна температура позволява множество комбинации и получаване на различни видове носители, а също така леко модифициране на метода, за да бъде съвместим с живите клетки са предпоставки за осъществяване на сполучлива имобилизация.

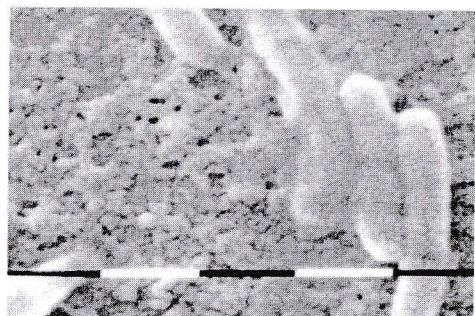
В потвърждение на това са и направените снимки на имобилизираните в изпитваните матрици клетки от шам *Bacillus sp.* UG-5B със сканиращ електронен микроскоп (Фигури 4, 5, 6).



a



b

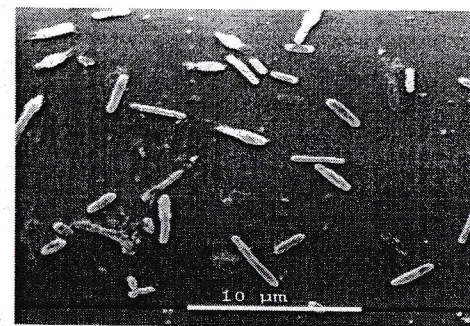


c

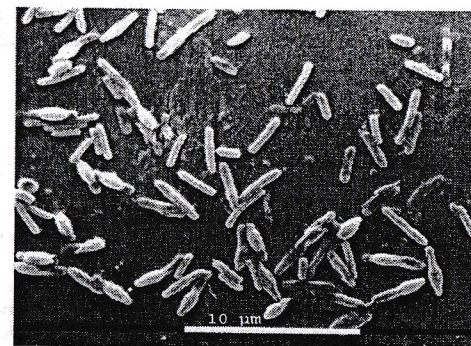


d

Фигура 4. Електронно микроскопска снимка на клетки от изследвания шам при включване на клетките в хибридна зол-гелна матрица a-Bar =1 μm; b-Bar =10 μm; c- Bar=0.2 μm, d-Bar=1 μm.



Фигура 5. Клетки на шама при процеса адсорбция върху хибридна матрица, съдържаща PAAG Bar=10 μm



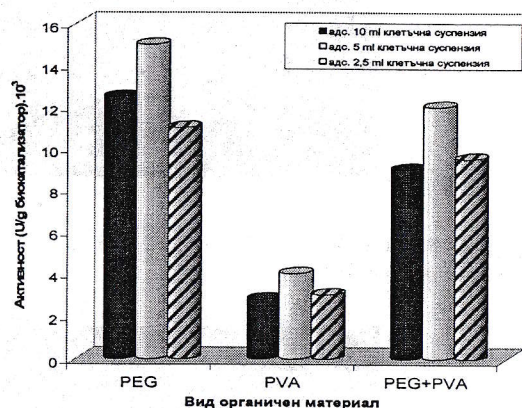
Фигура 6. Клетки при осъществяване на химично свързване с хибридна матрица, съдържаща PAAG, Bar=10 μm

Фактори, влияещи върху ефективността на имобилизацията

Количество клетъчна суспензия

За определяне на оптималното количество е варирано количеството на клетъчната суспензия с концентрация 30 mg/ml, използвана за имобилизация като в експериментите бяха използвани 2.5 ml от нея или (75 mg клетки), 5 ml (150 mg клетки) и 10 ml (300 mg клетки).

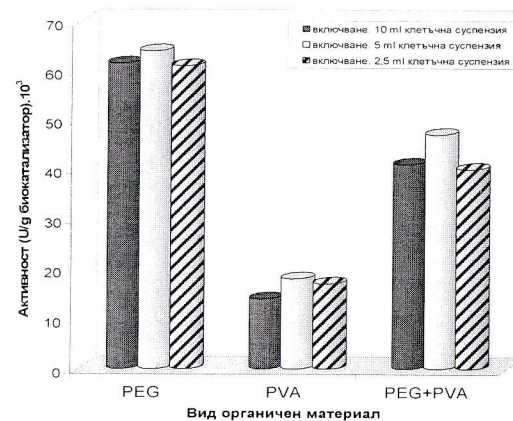
За определяне на оптималното количество е варирано количеството на клетъчната суспензия с концентрация 30 mg/ml, използвана за имобилизация като в експериментите бяха използвани 2.5 ml от нея или (75 mg клетки), 5 ml (150 mg клетки) и 10 ml (300 mg клетки).



Фигура 7. Ензимна активност като функция на количеството клетки, използвани за адсорбция на повърхността на хибридни зол-гелни матрици с TEOS и PEG, PVA както и PEG+PVA, изразена за грам биокатализатор

Както се вижда от фигура 7, използването на 5 ml клетъчна суспензия със 150 mg клетки при клетъчна концентрация 30 mg/ml се оказва най-удачно за осъществяване на сполучлива имобилизация и висока имобилизационна ефективност при адсорбция и дава най-добър резултат по отношение на нитрилазната активност-0.015 U/g биокатализатор.

Резултатите, получени при използване на метода включване с 5ml клетъчна суспензия в хибридна матрица с PEG са най-добри (Фигура 8). Вижда се ясно, че при метода включване в обема на различно количество от клетъчната биомаса не влияе съществено върху активността : 0.065 U/g биокатализатор при 5 ml суспензия и 0.062 U/g биокатализатор при 10 ml. За хибридите, съдържащи PEG+PVA нитрилазната активност е съответно: 0.048 U/g биокатализатор за 5 ml и 0.040 U/g биокатализатор за 10 ml.

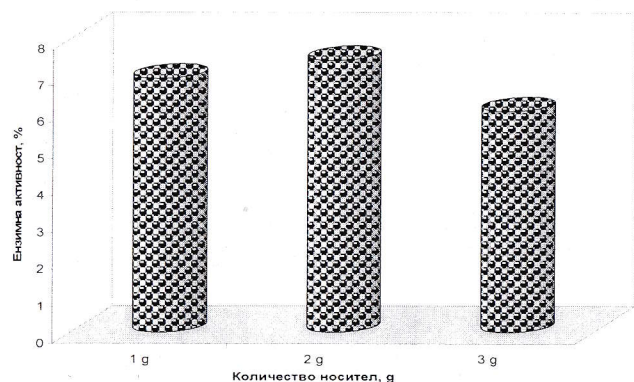


Фигура 8. Ензимна активност като функция на количеството клетки, използвани за включване в хибридни зол – гелни матрици, изразена за грам биокатализатор

Количеството клетки, използвани за имобилизация оказват влияние на имобилизационната ефективност. Използването на най-голямо количество клетъчна суспензия 10 ml (300 mg клетки) не довежда до най-висока ензимна активност за всички видове органичен материал, включен в хибридни носители и за двата имобилизационни метода. В някои случаи при натрупването на по-голямо количество клетки става агрегация на клетките, която довежда до пространствено пречене и намаляване на дифузията на субстрата до активните центрове на ензимите в клетките, отговарящи за биодegradацията на дадено съединение.

Количество носител

Друг фактор при оптимизацията на условията за имобилизация е количеството на използвания носител. За определяне на оптималното количество в експеримента беше използвана зол-гелна хибридна матрица със съдържание-5 % PEG и 5 ml клетъчна суспензия с обща ензимна активност 3.5 U (Фигура 9). Различното количество оказва влияние при осъществяване на имобилизацията и това се установява по разликата в нитрилазната активност.

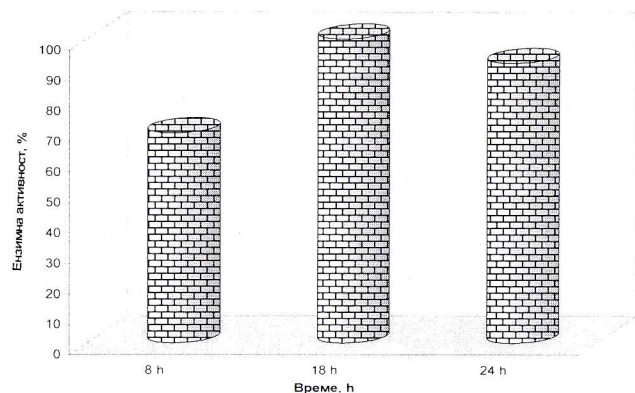


Фигура 9. Влияние на количеството носител върху ензимната активност на биокатализаторите

Най-висок процент на ензимна активност спрямо общата активност на клетъчната суспензия, използвана за имобилизация (0.75 U/ml) се постига с 2 g носител - 0.023 U/mg клетки или 8 % от общата нитрилазна активност. По-голямо количество носител се оказва неудачно, защото вероятно става сцепване на люспите от носител и контактът със субстрата се затруднява.

7.3.1. Време за контакт на носителите с клетъчната суспензия

Друг важен фактор за оптимизиране на имобилизационния процес е времето за контакт на клетъчната суспензия с носител.



Фигура 10. Влияние на времето за имобилизация върху ензимната активност

За 18 h се осъществява най-добър контакт на клетките с носител за постигане на най-добро свързване при метода адсорбция. За същия интервал от време се осъществява и успешно химично свързване на активираните матрици с клетките. Експериментът е проведен със зол-гелен композит, съставен от TMOS и 5 % PEG. Получената най-висока активност, приета за 100 % е 0.0026 U/mg клетки.

Изпитване на полисулфонови мембрани

Оптимизация на условията за имобилизация при изпитване на полисулфонови мембрани

Големината на порите

Резултатите от тези изследвания са представени в Таблица 2. Използваната клетъчна суспензия в експериментите е с концентрация 13.6 mg/ml клетки и ензимна активност 1.5 U/ml

Таблица 2. Влияние на големината на порите върху имобилизационната ефективност

PS-мембрани размер на порите	Количество имобилизирани клетки			Ензимна активност на имобилизираните клетки			
	Общо (mg)	%*	mg/cm ²	Обща (U)	%	U/cm ²	U/mg
0.20 μm	6.3	9.5	0.79	0.19	2.6	0.02	0.03
0.45 μm	9	13.6	1.2	0.63	8.4	0.08	0.06

*-процентът е изчислен спрямо общата активност 7.5U

От получените резултати, отнасящи се за имобилизационната ефективност, се установи, че по-подходящи за имобилизация както по отношение на количеството клетки, така и по отношение на ензимната активност (0.08 U/cm²), са мембраните с големина на порите 0.45 μ.

Брой мембрани и използвана площ от матрицата, участваща в имобилизацията.

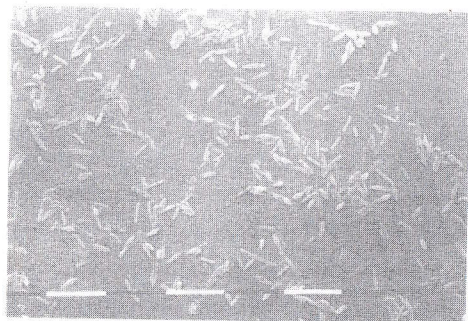
Изследвано е влиянието на използваната мембранна площ върху имобилизационната ефективност като различен брой мембрани с площ 1 cm² се включват в активацията и последващото химично свързване между клетките и модифицираната мембранна повърхност (Таблица 3)

Таблица 3. Влияние на количеството мембрани (използвана повърхност) върху имобилизационната ефективност

Мембрани	Количество имобилизирани клетки			Нитрилазна активност на имобилизираните клетки			
	Общо (mg)	%	mg/cm ²	Общо (U)	%	U/cm ²	U/mg
Брой, площ (cm ²)							
4	7.8	11.8	1.95	0.15	2	0.04	0.02
8	10.5	14	1.12	0.63	8.4	0.08	0.06
12	8.7	13.1	0.75	0.35	4.6	0.03	0.04
16	8.38	12.7	0.53	0.32	4.2	0.02	0.04

Установено е, че използването на осем мембрани, всяка с площ 1 cm^2 води до най-висока ефективност. Най-висока ензимна активност беше достигната с 8 cm^2 площ, а стабилността на тези биоклатализатори беше изпитана в последвалите експерименти.

На Фигура 11 е представена повърхността на активираната мембрана със свързаните клетки.

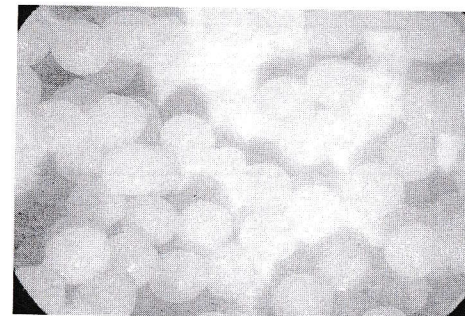


Фигура 11. Сканираща електронно микроскопска снимка на повърхността на активираната мембрана със свързаните към нея клетки

От фигурата се вижда, че, клетките са разпределени равномерно по повърхността на мембраната, а от получените резултати относно нитрилазната активност, става ясно, че е запазена активността на имобилизираните клетки.

Имобилизация в агар и алгинат

При използването на 2 % агар се отчита най-висока ензимна активност (0.022 U/mg клетки при обща активност 1.63 U). Освен по отношение на ензимната активност, при 2 % агар се получава най-добрата форма—правилни сферични перли (Фигура 12), които са с най-подходящ вискозитет, не се разпичат, не променят формата си, а и както се вижда от ензимната активност се осъществява дифузия, без да има изтичане на клетки. Увеличаване на концентрацията на агара води до намаляване на ензимната активност, вероятно поради наличие на дифузионно пречене и формата се изменя към капковидна и нееднакво разпределена сред получените перли. Това е в резултат на намаляване на пропускливостта на носителя по отношение на субстрата.



Фигура 12. Снимка на перли, получени с 2 % агар под бинокюлар (Zeiss), увеличение 5x. Перлите са с диаметър 2 mm.

При използването на 3 % алгинат бяха получени най-добри резултати за ензимната активност (0.013 U/mg клетки при обща активност 0.74 U).

От получените резултати става ясно, че всички, изпитани носители са подходящи в различна степен за имобилизация на клетки от шам *Bacillus sp.* UG-5B, проявяват нитрилазната си активност и могат да се приложат за деградация на нитрили.

Характеристика на свойствата на различните биокатализатори

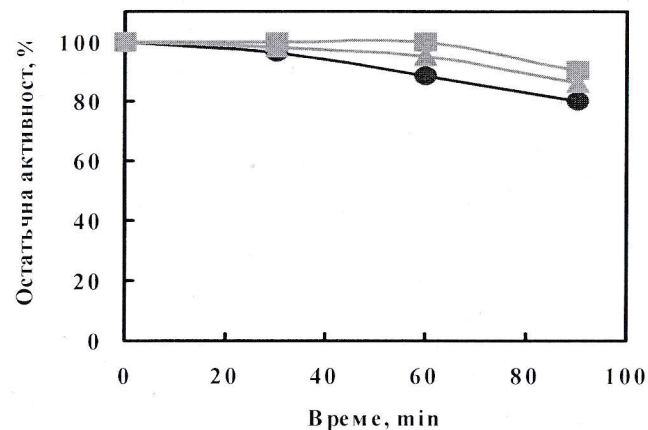
Термостабилност на нитрилазата от *Bacillus sp.* UG-5B

Ефектът на температурното въздействие върху ензимната активност на свободните и имобилизирани клетки показва, че термостабилността е по-добра от тази на свободните клетки и при двата случая на имобилизация.

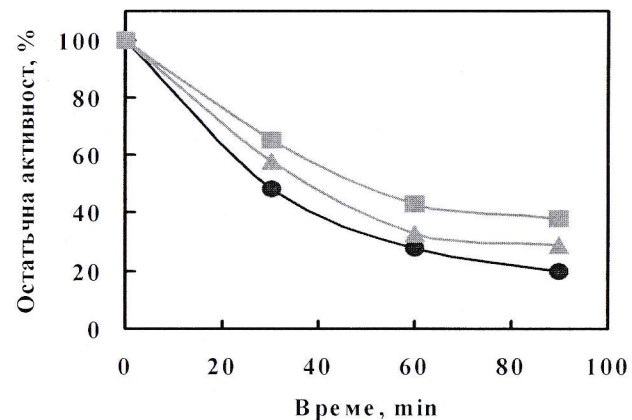
При третиране на пробите при 50°C , и свободните и имобилизираните клетки запазват над 80 % от ензимна активност след 90 min и 90 % е остатъчната ензимна активност за биокатализаторите, имобилизирани върху мембрани (Фигура 13).

Разликата между свободни и имобилизирани клетки в ензимната термоустойчивост на нитрилазата от шам *Bacillus sp.* UG-5B се изразява още по-ясно при инкубиране на пробите при 60°C (Фигура 14). При тази температура полуживотът на активността е 27 min за свободните клетки, 38 min за имобилизираните върху зол-гелни матрици и 50 min за имобилизираните върху полисулфоновите мембрани.

Температурната стабилност при имобилизация може да се повиши като резултат от молекулярни промени или създаването на защитно микрообкръжение. Многоточковото ковалентно свързване (чрез шифови бази) е най-ефективно по отношение на термостабилността, но повишена термостабилност се постига и при включване в гел (Illanes A., 1999)



Фигура 13. Остатъчна ензимна активност при третиране на пробите при 50°C
Свободни клетки (●); имобилизирани клетки при зол-гелни носители (▲); имобилизирани клетки при полисулфонови мембрани (■)

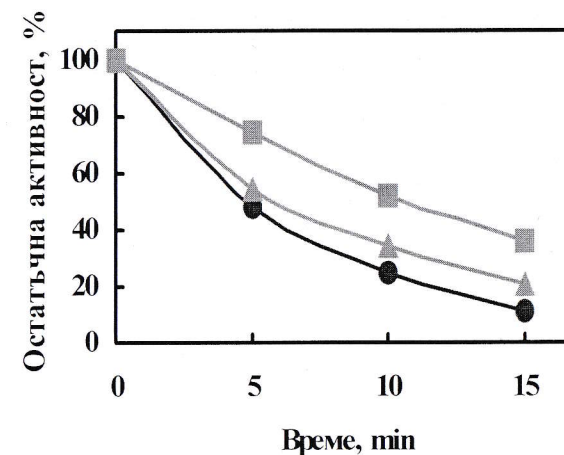


Фигура 14. Остатъчна ензимна активност при третиране на пробите при 60°C
Свободни клетки (●); имобилизирани клетки при зол-гелни носители (▲); имобилизирани клетки при полисулфонови мембрани (■)

Изследването при 70°C отново потвърди по-добрата термостабилност на имобилизираните биокатализатори. Полуживотът на активност на свободните

клетки е 4.5 min, 6 min при зол – гелните матрици и 11 min при мембраните (Фигура 15)

От фигурите се вижда, че термостабилността на нитрилизата при имобилизираните клетки от *Bacillus sp.* UG-5B е по-висока от тази за свободните.



Фигура 15. Остатъчна ензимна активност при третиране на пробите при 70°C
Свободни клетки (●); имобилизирани клетки при зол-гелни носители (▲); имобилизирани клетки при полисулфонови мембрани (■)

Субстратна специфичност на нитрилаза от *Bacillus sp.* UG-5B

Нитрилизата е ензим, който проявява по-голяма субстратна специфичност към субстрати с ароматен характер (Harper *et al.*, 1977). Редица експериментални данни от литературата доказват, че нитрилизната активност се проявява към широк спектър от субстрати (Yamaki *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 1998; Cramp *et al.*, 1998; Almatawah *et al.*, 1999). Хидролизиращата активност на нитрилизата от изследвания шам се проявява към алифатни, карбоксилни и хетероциклически нитрили и субстратната специфичност е широка.

Най-високата ензимна активност е регистрирана за 4-цианопиридина, както за свободните, така и за имобилизираните в агар клетки. Наблюдават се някои различия в активността на свободните и имобилизираните клетки спрямо различните субстрати. При 7 от 22 изпитани субстрати беше получена по-висока активност от 10 % до 70 % (при използване на валеронитрил, акрилонитрил, циклохексилцианид, m-толуенитрил) за имобилизираните биокатализатори в сравнение със свободните, а за 5 от тях, ензимната активност е по-ниска от 27 % до 80 %.

За всички останали субстрати нитрилазната активност е еднаква. Различията вероятно се дължат на формирането на преграда около включените клетки, която в някои случаи може да представлява препятствие за навлизане на субстрата до клетките, но при други случаи тази преграда оказва защитно действие спрямо токсичното влияние на субстратите.

Същият факт е установен и от Graham *et al.* (2000), които констатира, че имобилизацията в алгинатен гел води до допълнителна стабилизация на клетките към висока концентрация на органоцианидни съединения, а според Diefenbach *et al.* (1992), чрез имобилизацията се постига увеличаване на клетъчната толерантност към субстратно и продуктно инхибиране.

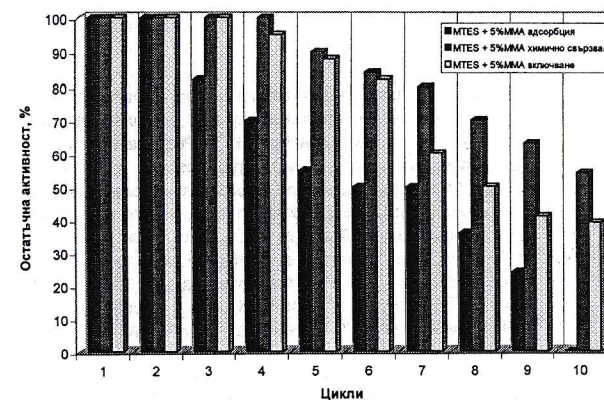
Операционна стабилност при използване на различните видове биокатализатори

Основното предимство на имобилизираните клетки е възможността за многократно им използване. Поради тази причина беше проследена операционната стабилност на биокатализаторите.

Зол-гелни хибридни матрици

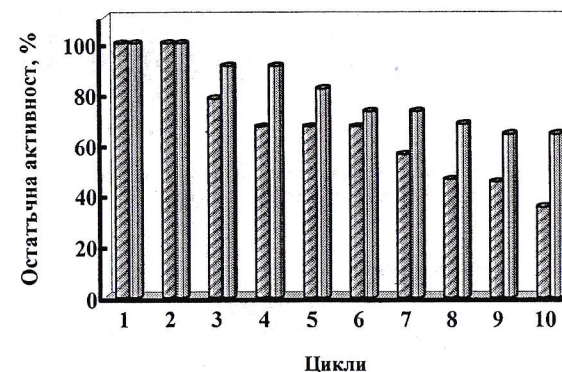
Операционната стабилност е по-добра при включените клетки в сравнение с адсорбираните. Това се обяснява с по-лесното отмиване на адсорбираните клетки след многократно приложение. Операционната стабилност, обаче, се повишава след провеждане на химична активация на повърхността на матриците и след третия цикъл на експлоатация е по-висока от тази за включените клетки и се запазват 51 % от началната нитрилазна активност след десет цикъла на ензим-субстратната реакция с участие на даления биокатализатор.

При многократно прилагане (10 цикъла) на биокатализаторите, получени с включване на MMA като органичен компонент (Фигура 16) в случая с химична активация се постигат по-добри резултати. В експериментите се използват неактивирани и активирани носители и съответно включени в гел. Установихме, че при изпитване на хибридна матрица, която съдържа метилметакрилат (MMA) операционната стабилност, както и имобилизационната ефективност са по-добри. Това вероятно се дължи на свойствата на матрицата, която в този случай влияе отрицателно, токсично върху клетките, а при включване в обема на контакта на MMA с клетките е най-голям.



Фигура 16. Операционна стабилност при адсорбция, химично свързване и включване в зол-гелна хибридна матрица с MMA

Проведено е и включване на клетките в зол-гела отново с PAAG (Фигура 17).



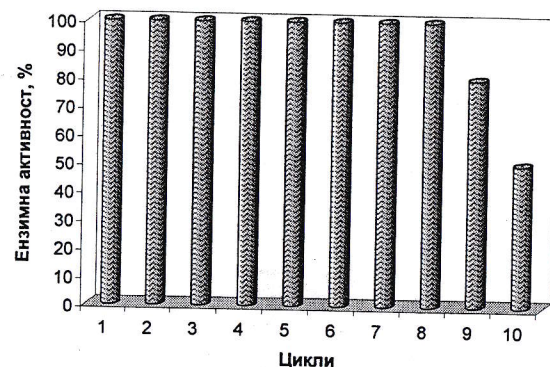
Фигура 17 Операционна стабилност при включване в зол – гелна хибридна матрица с PAAG и TEOS и PAAG и TMOS

От фигурата се вижда, че тези биокатализатори показват при използване на метода включване най-добра операционна стабилност от всички изпитани зол-гелни носители (с TMOS). При приложението им за ензимна деградация на

нитрили те запазват 64 % от активността си след 10 реакционни цикъла (0.027 U/mg клетки).

Полисулфоновите мембрани

Операционната стабилност на полисулфоновите мембрани беше проследена при 10 цикъла на приложение при използване на клетъчна суспензия с активност 1.5 U/ml (Фигура 18). Резултатите показваха, че те са много подходящи за многократно приложение, тъй като с модификацията на мембранната повърхност се образуват здрави химични връзки с клетъчната повърхност, които не позволяват отмиването на клетките. Това са матриците, които показват най-добри резултати по отношение на операционната стабилност при прилагане на метода химично свързване след десет цикъла на провеждане на ензим-субстратната реакция. Остатъчната активност се запазва 100 % (0.06 U/mg клетки или 0.08 U/cm²) след 8 реакционни цикъла и на деветия е намалела само с 20 % спрямо първия реакционен цикъл.



Фигура 18. Операционна стабилност на биокатализаторите при използване на активирани полисулфоновите мембрани

Агар и алгинат

Операционната стабилност е изпитана и на биокатализатори, получени след включване на бактериалните клетки в гел от 2 % агар и 3 % алгинат. При тези носители е установена добра операционна стабилност.

При използването на алгинат, остатъчната ензимна активност е 85 % след 4 реакционни цикъла и 38 % след 10 (0.013 U/mg клетки). Включените в 2 % агар клетки показват по-добра операционна стабилност от тези, включени в алгинат и запазват 100 % от активността си след 4 реакционни цикъла и 52% остатъчна ензимна активност след 10 (0.022 U/mg клетки).

Включените в агар клетки, освен добрата операционна стабилност при разграждане на нитрили са и подходящи за приложение при използване на

колонен тип реактор за осъществяване на непрекъснат процес на деградация на различни токсични съединения, което беше направено в последвалите експерименти.

Най-добрата операционна стабилност показват биокатализаторите, получени при включване в хибридна зол-гелна матрица, съдържаща РААГ-64 % остатъчна активност спрямо първия цикъл. Много по-слаба е операционната стабилност при включени в РААГ клетки от *Acidovorax facilis*, приложени в последователни цикли за превръщане на 2-метилглутаронитрил до 1,5-диметил-2-пиперидон, при което само след 4 реакционни цикъла остатъчната ензимна активност е 35 % от началната (Cooling *et al.*, 2001).

Осъществяване на биодеградиационен процес чрез използване на колонен тип биореактор

Разграждане на бензонитрил и 4-цианопиридин с имобилизирани в агар клетки

Използваният при експериментите колонен тип биореактор е показан на схема 8. Той се напълва с перли от 2 % агар. Именно те се оказаха с най-подходяща форма и здравина за приложението им в биореактора. В обема на гела се включва цялото количество клетки (140 mg). Необходимо е да се намери правилното съотношение между количеството носител с клетките, обема на реактора и скоростта на подаване на субстрата, за да се постигне необходимото време на престой на субстрата в реактора и доброто му разграждане. Започва подаването на субстрата и проследяване на разграждането на бензонитрил (Фиг. 22) при различна скорост на потока—0.5 ml.min⁻¹, 0.75 ml.min⁻¹ и 1.0 ml.min⁻¹.

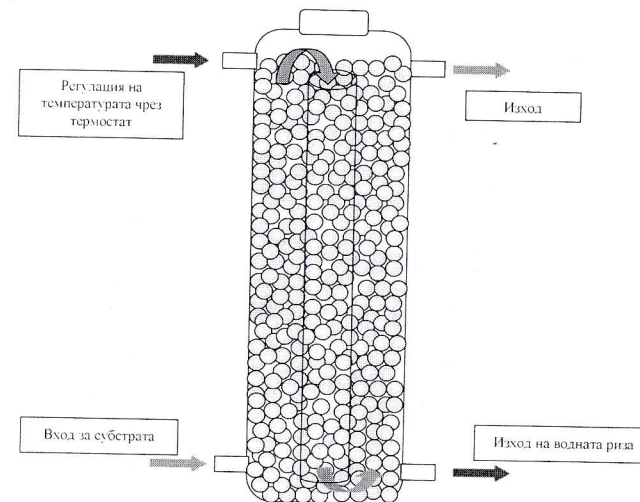


Схема 1. Лабораторен колонен тип биореактор

Като субстрат за разграждане се включва освен бензонитрила и 4-цианопиридин в колонния тип биореактор (Фиг. 19), защото ензимната активност при разграждането му надвишава тази при използване на бензонитрил както за свободните, така и за имобилизираните в агар клетки, приети за 100 %.

Ензимната активност при оптимална скорост на потока $0.75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, която се явява междинната, се увеличава 4.5 пъти в сравнение с тази при провеждането на реакциите в колби. Както се вижда от фигурата при намаляване на скоростта на потока под оптималната, ензимната активност намалява. При по-високата скорост на потока не се увеличава ензимната активност.



Фигура 19. Количество разграден бензонитрил при 45°C в зависимост от скоростта на потока.

Влиянието на скоростта на потока се оказва специфично за различните изследвани шамове, което важи както за използването на свободни клетки, така и за имобилизираните (Cheng *et al.*, 1989).



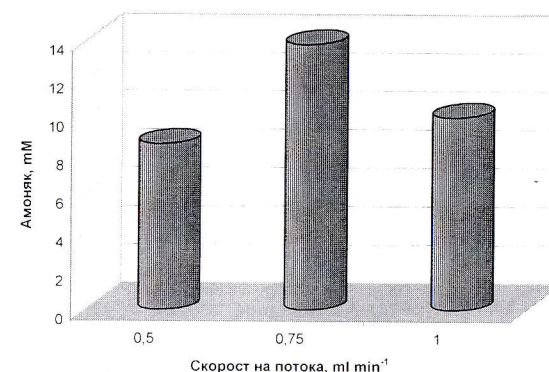
Фигура 20. Количество разграден 4-цианопиридин в зависимост от скоростта на потока 3 h след започване на процеса

На Фигура 20 е представено разграждането на 4-цианопиридин като субстрат, количеството разграден субстрат при 45°C и същите скорости на подаване, което достига 35.1 mM , докато за бензонитрила това количество е 12.2 mM . Този резултат е в съответствие с получените резултати при изпитване на субстратната специфичност, при които за 4-цианопиридин-разграждащата активност е 4 пъти по-висока спрямо тази за бензонитрила. При разграждане на 4-цианопиридин ензимната активност при оптималната скорост на потока ($0.75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) се увеличава 9 пъти в сравнение с тази при провеждане на експериментите в колби.

Разграждане на бензонитрил и 4-цианопиридин с имобилизирани в хибридна матрица с PAAG клетки

Изследванията с използване на биореактора бяха продължени и с другия тип носител, показал най-добрата операционна стабилност при метода включване, а именно зол-гелна хибридна матрица с 5 % PAAG като органична съставка и TMOS като неорганичен компонент. Същото количество перли (40 g) се включват в разградния процес при 45°C .

Субстратът (20 mM) се подава към реактора като ключов параметър отново се оказва скоростта на подаването му. Отново се потвърждава, че хибридните матрици, синтезирани на основата на силициеви алкоксиди и добавянето на органичен компонент са много подходящи при формирането на биокатализатори и използването им за деградация на бензонитрил и 4-цианопиридин, което достига 13.8 mM и 36.9 mM съответно при провеждане на непрекъснат процес за 6 h при температура 45°C .



Фигура 21. Количество разграден бензонитрил при 45°C от биокатализатори получени по зол-гелен метод с 5 % PAAG.



Фигура 22. Количество разграден 4-цианопиридин при 45°C от биокатализатори получени по зол-гелен метод с 5 % PAAG.

Системата в биореактора функционира при 45°C за период от 6 h. Непрекъснато се подава субстрат с концентрация 20 mM.

Проблемът за биологичното третиране на горещи отпадни води, преди тяхното охлаждане е бил винаги актуален от гледна точка на редица физикохимични и хигиенни показатели. Известно е, че с повишаване на температурата се понижава активиращата енергия на химичните взаимодействия, увеличава се скоростта на биохимичните трансформации, способства за биологическата усвояемост на субстратите, увеличава се разтворимостта и скоростта на масообмена в системата. Заедно с това повишаване на температурата води до намаляване на жизнестта на патогенни микроорганизми.

По този начин термофилните технологии с използване на термостабилни ензими от термофилни продуценти стават особено предпочитани при пречистването на отпадни води. Именно по тази причина, показаните най-добър резултат биокатализатори се включват в биодеградиационния процес при 55°C. При провеждането на процеса при 55°C не се използват агаровите перли, защото при тази температура и продължително използване повърхността им се разめква и променят формата си. При тези условия се постига увеличение в количеството разграден субстрат и в двата случая (фиг.23 и 24). При използване на бензонитрил при оптималната скорост на потока се достига количество разграден субстрат 16 mM, а за 4-цианопиридина-38.5 mM.



Фигура 23. Количество разграден бензонитрил при 55°C от биокатализатори получени по зол-гелен метод с 5 % PAAG.

Както се вижда от резултатите процесът е по-ефективен при по-високата температура, което е следствие от използването на термофилен шам, продуцент на термостабилна нитрилаза и обуславя реализирането на ензимно разграждане на нитрили като компоненти на горещи отпадни води.

От графиките се вижда, че 0.75 ml.min⁻¹ е оптимална и при тази скорост биокатализаторът действа като не променя първоначалната си форма и показва добра операционна стабилност.



Фигура 24. Количество разграден 4-цианопиридин при 55°C от биокатализатори получени по зол-гелен метод с 5 % PAAG.

В заключение можем да кажем, че:Посредством имобилизирани клетки от шам *Bacillus sp.* UG-5B, продуцент на термостабилна нитрилаза, е постигнат непрекъснат биодеградиационен процес за токсичните нитрилни съединения бензонитрил и 4-цианопиридин със сравнително голямо количество разграден субстрат при висока температура и със стабилни във времето биокатализатори.

В този смисъл получените от нас резултати разкриват определени перспективи за осъществяване на биодеградиационни процеси на нитрилни и

други токсични замърсители и възможност за следващи изследвания в тази насока.

4. ИЗВОДИ И ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Доказана е възможността да се реализира биодеградационен процес на редица токсични вещества, съдържащи циано групи с помощта на биокатализатори, получени на основата на клетки от термофилния шам *Bacillus sp.* UG-5B, продуцент на нитрилаза.
2. Всички изпитани носители: нов тип хибридни зол-гелни материали, полисулфонови мембрани, агар и алгинат са подходящи за създаване на имобилизационни системи за разграждане на нитрилни съединения с изключение на чисти SiO_2 матрици.
3. Определени са оптималните условия за имобилизация на клетки от шам *Bacillus sp.* UG-5B, с нитрилазна активност чрез адсорбция, включване и химично свързване при използване на нов тип зол-гелни неорганично-органични хибридни матрици, както и полисулфонови активирани мембрани, агар и алгинат.
4. Най-добра ефективност на имобилизация, отнасяща се до количеството свързани клетки и ензимната активност при метода включване е постигната при използване на агар, следвана от хибридни зол-гелни матрица в системата $\text{SiO}_2 + \text{PAAG}$. При осъществяване на химично свързване най-висока ефективност се наблюдава при имобилизираните клетки върху полисулфонови мембрани.
5. Имобилизираните биокатализатори показват по-добра устойчивост към високите температури, като при 70°C полуживотът на ензимна активност на свободните клетки е 4.5 min в сравнение с 6 min за свързаните със зол-гелните хибридни носители и 11 min за свързаните с активирани полисулфонови мембрани клетки, което обуславя реализирането на ензимно разграждане на токсични замърсители при висока температура.
6. Най-висока операционна стабилност показват имобилизираните биокатализатори, създадени на база полисулфонови мембрани и хибридни матрици с PAAG, следвани от тези в агар. За осем реакционни цикъла остатъчната ензимна активност се запазва над 50 %, а при някои биокатализатори до 100 %.
7. Имобилизираните клетки от изследвания шам са способни да разграждат структурно разнообразни токсични нитрилни съединения-алифатни наситени и ненаситени мононитрили и динитрили, както и карбоксилни алициклени и ароматни нитрили, като се наблюдават определени различия в активностите спрямо различните субстрати в сравнение със свободните клетки.
8. При осъществяване на непрекъснат процес при 45°C с използване на колонен тип биореактор е доказано, че включените в агар клетки успешно разграждат бензонитрил (12.2 mM) и 4-цианопиридин (35.1 mM) при оптималната скорост на потока $0.75 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, а включените в зол-гелна

хибридна матрица с TMOS и PAAG-13.8 mM бензонитрил и 36.9 mM 4-цианопиридин.

9. Провеждането на непрекъснат процес при 55°C доказва възможността за използване на колонния тип биореактор с имобилизирани клетки от изследвания шам за биодеградация на токсични вещества, възможни компоненти на отпадни води при високи температури като се достига разграждане на бензонитрил 16.07 mM и 38.5 mM 4-цианопиридин при оптималната скорост на потока с биокатализатори, получени чрез включване в хибридна зол-гелна матрица. Това показва екологичната значимост на получените резултати.

10. За първи път е осъществена имобилизация на клетки от термофилния шам *Bacillus sp.* UG-5B, продуцент на термостабилна нитрилаза в нови хибридни материали, синтезирани по зол-гелен метод. Получените термостабилни биокатализатори са подходящи за биологично третиране на отпадни води от различни производства.

Библиографска справка

Публикации във връзка с представения дисертационен труд

Публикации в списания и сборници

1. Synthesis, structure and application of new hybrid nanomaterials for cell immobilization
L. Kabaivanova, E. Dobрева, E. Emanuilova, G. Чернев, B. Samuneva
Minerva Biotech 2006:18 (in press) IF=0.4
2. Immobilization of cells with nitrilase activity from a thermophilic bacterial strain
L. Kabaivanova, E. Dobрева, P. Dimitrov, E. Emanuilova
J Ind Microbiol Biotechnol 2005 32:7-11 IF=1.267
3. Continuous process for degradation of toxic compounds using a column bioreactor with immobilized cells
L. Kabaivanova, E. Dobрева, E. Emanuilova, B. Samuneva, G. Чернев
Proceedings book of the XIIIth International Workshop on Bioencapsulation Kingston Ontario, Canada, 2005: 53-56
4. Synthesis and application of hybrid nanomaterials for cell immobilization
L. Kabaivanova, E. Dobрева, P. Dimitrov, S. Engibarov, E. Emanuilova
Proceedings book of the XIIth International Workshop on Bioencapsulation Vitoria-Gasteiz, Spain, 2004:175-179
5. Membrane immobilized bacterial cells for nitrile degradation
L. Kabaivanova, E. Dobрева, P. Dimitrov, E. Emanuilova
Proceedings book of the XIth International Workshop on Bioencapsulation Strasbourg, France 2003:165-168
6. Sol-gel synthesis of glassy hybrid matrices for cell immobilization

B.Samuneva, E. Kadiyska, P. Djambaski, E. Dobрева, I. Bojadjieva, L. Kabaivanova
Glass Science and Technology 2002:434-437 IF=0.170

7. Influence of the quantity of organics in SiO₂-gel matrices on the nitrilase activity of the immobilized bacterial cells

E. Kadiyska, L. Kabaivanova, E. Dobрева, B.Samuneva

Proceedings on CD ROM №18: 1-7 of the EURO-Techmat Bucharest, Romania, 2002

8. Inorganic-organic matrices for bacterial cell immobilization

E. Kadiyska, L. Kabaivanova, E. Dobрева, B.Samuneva

Proceedings on CD ROM №8: 1-7 of the EURO-Techmat Bucharest, Romania, 2002

Участия в на научни форуми

1. Second Balkan Conference on Glass Science and Technology, 24-28 September 2002, Varna, Bulgaria

Influence of the Inorganic Precursors in Sol-gel Silica and Hybrid Matrices on the Efficiency of Cell Adsorption

E.Kadiyska, B.Samuneva, P.Djambaski, S.Vasilev, G.Chernev, L.Kabaivanova,
E.Dobрева

2. Workshop Nanoscience and Nanotechnology 17-19 October 2002, National Center of Nanotechnology, Sofia, Bulgaria

Structure of Nanocomposite Hybrid Materials for Cell Immobilization

E.Kadiyska, B.Samuneva, P.Djambaski, S. Vasilev, G. Chernev, L.Kabaivanova,
E.Dobрева, I.M.Miranda Salvado

3. Workshop on Sol-gel Science and Technology, Sydney-Australia, 25-29 September 2003

Sol-gel synthesis of Nanocomposite Hybrid Biomaterials

Samuneva B., Kadiyska E., Djambaski P., Kashchieva E., Chernev G., Miranda Salvado I.M., Fernandes M.H.V., Kabaivanova L., Dobрева E.

4. 7th ESG Conference on Glass Science and Technology, April 25-28 2004 Athens, Greece

Silica Nanocomposites Containing Polyacrylamide Gel

G.Chernev, B.Samuneva, P.Djambaski, Miranda Salvado, M. Fernandes, L.Kabaivanova

5. 6th Conference Nanoscience and Nanotechnology 24-26 November, 2004 Sofia, Bulgaria

Silica hybrid nanomaterials containing alginate

G.Chernev, B.Samuneva, P.Djambaski, L. Kabaivanova, E Dobрева., E.Emanuilova