

УДК 579.66, 577.15

П.М. ГОТОВЦЕВ^{1,*}, Е.Ю. ЮЗБАШЕВА², К.В. ГОРИН¹, В.В. БУТЫЛИН¹, Г.У. БАДРАНОВА¹, Н.И. ПЕРКОВСКАЯ²,
Е.Б. МОСТОВА², З.Б. НАМСАРАЕВ¹, Н.И. РУДНЕВА³, А.В. КОМОВА¹, Р.Г. ВАСИЛОВ¹, С.П. СИНЕОКИЙ²

¹НИЦ «Курчатовский институт», Москва, 123182

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИГенетика), Москва, 117545

³ФГБОУ ВПО «Мичуринский государственный аграрный университет», Мичуринск, Тамбовская область, 393760

e-mail: gotovtsevpm@gmail.com

Иммобилизация микробных клеток для биотехнологических производств. Современные решения и перспективные технологии

Представлен обзор современных работ в области создания биотехнологических процессов с использованием иммобилизованных на различных носителях клеток. Приведены общие требования к материалам для иммобилизации, осуществляемой в основном методами абсорбции и механической фиксации. Рассмотрены результаты исследований по иммобилизации клеток, проведен анализ использованных материалов и методов. Описаны некоторые потенциальные и действующие приложения систем с иммобилизованными клетками для биотехнологических производств. Представлен также обзор возможных вариантов технологических решений для биореакторов, загруженных носителями с иммобилизованными клетками. Показано, что использование подобной загрузки позволяет сделать существенно более эффективными конструктивные решения биореакторов.

Ключевые слова: биореактор, биотехнология, иммобилизация клеток, наноцеллюлоза, синтетические пептиды, ферментативный катализ.

В настоящее время промышленная биотехнология продолжает активно развиваться. Создаются новые штаммы микроорганизмов для получения новых продуктов или более эффективные штаммы для уже производящихся биосинтетических продуктов, применяются разнообразные ферменты. Кроме того, начинают использоваться и рекомбинантные штаммы с ферментами, иммобилизованными на клеточной стенке в качестве клеточных катализаторов [1]. Так например, ведутся исследования в области применения таких штаммов для производства биодизеля [2].

На сегодняшний день в промышленных процессах используют ферменты, иммобилизованные на каком-либо носителе. Данное направление широко развито, и целый ряд носителей

(например, альгинат, ионообменные смолы и др.) стали промышленным стандартом [3]. Однако в настоящее время актуально применение аналогичных носителей и для иммобилизации целых клеток, которые осуществляют биосинтез нужных продуктов или участвуют в биосинтезе продуктов в качестве клеточных катализаторов [3, 4]. Данная задача является более комплексной, так как в случае клеток речь идет об иммобилизации сложной физико-химической системы, чье взаимодействие с окружающей средой чрезвычайно многообразно.

В данной работе рассмотрены основные пути иммобилизации клеток, материалы для иммобилизации и подходы к теоретическому анализу процессов иммобилизации.

Готовцев Павел Михайлович, Юзбашева Евгения Юрьевна, Горин Кирилл Викторович, Бутылин Виктор Владимирович, Бадранова Гульфия Ураловна, Перковская Наталья Игоревна, Мостова Елизавета Борисовна, Намсараев Зоригто Баирович, Руднева Нина Ивановна, Комова Анастасия Викторовна, Василев Раиф Гаянович, Синеокий Сергей Павлович.

Список сокращений: КЖ — культуральная жидкость.

* Автор для переписки.

В случае биосинтеза полезных продуктов иммобилизация клеток может дать следующие преимущества:

- возможность создания проточных систем с многократной циркуляцией субстрата;
- возможность постоянного отвода продуктов реакции;
- возможность упростить отделение биомассы после завершения процесса;
- расширенные возможности по использованию газообразных субстратов путем применения половолоконных систем.

Выбор технологии использования иммобилизованных клеток в первую очередь определяется штаммом, его продуктивностью и используемыми субстратами [5].

В случае использования иммобилизованных клеток как катализаторов их иммобилизация может также предоставить следующие преимущества:

- возможность создания более компактных биореакторов, в том числе проточных;
- возможность постоянного подвода вступающих в реакцию веществ и отвода продуктов;
- возможность многократной циркуляции веществ через реактор.

На данный момент иммобилизованные клетки нашли широкое применение при производстве различных спиртов, в том числе и этанола, с использованием рекомбинантных штаммов *Saccharomyces cerevisiae* [6—9]. С помощью иммобилизованных клеток можно также синтезировать различные ферменты, такие как, например, липазы (*Aspergillus niger*, *Rhizopus chinensis*, *Candida rugosa*), пектиназы (*Aspergillus niger*), протеазы (*Bacillus subtilis*), амилазы (*E. coli*) и др. [10—16]. Показана возможность подобного получения ряда антибиотиков: эритромицина (*Saccharopolyspora erythraea*), неомицина (*Streptomyces marinensis*), патулина (*Penicillium urticae*), окситетрациклина (*Streptomyces rimosus*), цефалоспорины (*Streptomyces clavaligerus*); имеются данные о синтезе иммобилизованными клетками бацитрацина, никкомицина, кандицидина [17—21]. Возможно получение с помощью иммобилизованных клеток различных органических кислот, таких как молочная, лимонная, уксусная [22, 23]. Особое внимание уделяется использованию иммобилизованных клеток для очистки сточных вод [24—29].

В случае иммобилизации микроорганизмов для биотехнологических производств к материалам предъявляются следующие требования [5]:

- стабильность в динамических условиях при протоке рабочих сред и повышенном давлении;

- химическая стабильность, обеспечивающая стабильность ферментов и/или выживаемость микроорганизмов;

- возможность создания гранул препарата определенного объема, желательное получение монодисперсных порошков;

- возможность масштабирования процесса иммобилизации и отсутствие факторов, которые могут привести к инаktivации ферментов и/или иммобилизуемых клеток;

- доступность материала в больших количествах и его низкая стоимость;

- возможность безопасной утилизации (принадлежность к категории неопасных отходов).

Первое требование напрямую связано с методом иммобилизации, а точнее, теми физико-химическими взаимодействиями, которые устанавливаются между носителем и клеткой. Сила этих взаимодействий определяет стабильность препарата в условиях потока рабочих сред и культуральной жидкости. Немаловажной является и стабильность самих гранул носителей клеток под действием гидродинамических сил в проточном реакторе.

Химическая стабильность материала должна обеспечивать неизменное закрепление клеток на поверхности на всех стадиях процесса. Также желательно, чтобы материал мог использоваться для максимально возможного количества циклов при иммобилизации различных видов микроорганизмов [5, 30]. При создании проточных реакторов гранулометрический состав загружаемого препарата существенно влияет на гидродинамику всей системы в целом и, соответственно, на энергозатраты, связанные с прокачкой вводимых веществ.

На сегодняшний день иммобилизация клеток широко применяется в медицине [31], однако в данной области ставятся совершенно иные требования к материалам по сравнению с биотехнологическими производствами [5, 31].

Таким образом, характеристики материала для иммобилизации и метода закрепления клеток являются важными параметрами при осуществлении биотехнологических процессов с помощью иммобилизованных клеток в биореакторе.

СУЩЕСТВУЮЩИЕ МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Процессы иммобилизации микроорганизмов на различных носителях на сегодняшний день достаточно сложно описать с учетом влияния всех теоретически возможных факторов. В общем виде основные варианты процесса взаимо-

действия клеток и носителя при иммобилизации можно разделить на три большие группы [4, 5]:

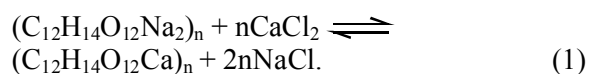
— химическое связывание. В данном случае происходит химическое взаимодействие соединений клеточной стенки с веществом носителя, и образовавшиеся таким образом связи препятствуют отрыву клетки от носителя;

— адсорбция клеток за счет межмолекулярных и/или поверхностных взаимодействий, таких как, например, гидрофобные/гидрофильные взаимодействия;

— механическое закрепление в слое или структуре какого-либо материала. Никаких химических взаимодействий между клеточной стенкой и материалом не происходит, а создаются механические препятствия для диссоциации клеток от носителя.

Наибольшее распространение получили второй и третий подходы в силу их простоты и относительной универсальности. В настоящем обзоре проанализированы данные, касающиеся в основном адсорбционной и механической иммобилизации клеток. Некоторые из использованных носителей успешно применялись для иммобилизации различных микроорганизмов [1, 4, 5].

Одним из наиболее распространенных методов *механического закрепления* как свободных ферментов, так и одноклеточных микроорганизмов является связывание в альгинате кальция [30—32]. Метод основан на образовании хлопьеобразных структур альгината кальция. При наличии в среде клеток хлопья физически захватывают их в процессе образования. Процесс проходит при наличии альгината натрия и хлорида кальция в водной среде при нормальных термодинамических параметрах. В общем виде протекающая реакция выглядит следующим образом:



Преимуществами метода являются простота реализации и использование сравнительно недорогих и безопасных реагентов. Метод применялся для иммобилизации *Saccharomyces cerevisiae* при производстве алкогольных напитков [32] и очистки сточных вод с помощью *Yarrowia lipolytica W29* [30]. Также метод использовался при получении фармацевтических препаратов, в том числе различных антибиотиков, с использованием клеток *Saccharopolyspora erythraea* (эритромицин) и представителей р. *Streptomyces* (актиномицин D, цефалоспорин и никомидин) [1].

В работе [8] авторы проводили сопоставление продуктивности процессов получения этанола

при использовании различных носителей. В данной работе при непрерывном получении этанола с помощью клеток мутантного штамма *Saccharomyces cerevisiae* AS 2.11900, иммобилизованных на поливинилово-спирте, максимальная эффективность ферментации составила 83,26%, максимальный выход этанола — 0,44 г/г биомассы, концентрация этанола — 65,81 г/л, а продуктивность — 2,74 г/л/ч.

К достоинствам данного метода можно отнести простоту реализации, дешевизну используемых реагентов и стабильность прикрепления клеток к носителю в неагрессивных средах. Однако метод не лишен и недостатков, к которым относятся следующие [1, 30]:

— сложность использования живых клеток, которые при делении переходят в среду;

— возможность для некоторой части биомассы при закреплении оказаться в оболочке из альгината кальция и тем самым инактивироваться.

Адсорбция клеток на носителе в водных средах, как правило, происходит за счет действия электростатических сил и гидрофобных взаимодействий [33]. Данный вид закрепления применяется для иммобилизации клеток на пористых материалах, фиброматериалах и гидрогелях. Характеристики материала также играют существенную роль в стабильности препарата [34], в особенности пористость и размер самих пор. Поры обеспечивают высокую удельную поверхность для закрепления микроорганизмов, при этом их размер должен быть достаточным и для размещения микроорганизмов, и для обеспечения необходимого притока сред, чтобы обеспечить выполнение клеткой своих функций. Размер волокон или элементов материала оказывает также влияние на парный потенциал гидрофобного взаимодействия, который в общем виде можно охарактеризовать как [35]:

$$\Delta G \approx -20\sigma, \quad (2)$$

где ΔG — парный потенциал гидрофобного взаимодействия (кДж/моль); σ — размер элементов носителя.

На сегодняшний день исследовано достаточно много различных материалов для иммобилизации клеток за счет указанных взаимодействий [36, 37]. Было показано, что закрепление клеток путем адсорбции достаточно стабильно [36, 38].

Однако в случае использования неводных сред стабильность данного вида иммобилизации резко падает. Во многом это обусловлено изменением характера электростатических и гидрофобных (сольвофобных) межмолекулярных взаимодействий в неводных растворах. Примером может служить процесс перэтерификации при получе-

нии биодизеля [39]. Он представляет собой реакцию между спиртом и триглицеридами с образованием эфиров жирных кислот и глицерина. В качестве спирта чаще всего используется метанол, который подается с избытком по сравнению с маслом [40]. При использовании неводной среды гидрофобные взаимодействия отсутствуют, и это негативно сказывается на стабильности закрепления клеток на носителе.

В случае иммобилизации подобным методом в водных средах и растворах электролитов необходимо кроме того учитывать поляризацию соединений клеточной стенки и самого материала носителя [41], а также изменение характера экранирования электростатических межмолекулярных взаимодействий в зависимости от концентрации и вида ионов в используемом растворе [42—44].

Повышение стабильности адсорбции возможно за счет предварительной обработки материала [36, 45] при использовании в качестве реагентов для обработки полиэтиленimina [36] и глутаральдегида совместно с полиэтиленимином [45].

Кинетика процессов адсорбции и десорбции была в общем виде проанализирована в работе [46]. Авторы суммарно отобразили процессы адсорбции и десорбции с помощью простой реакции:



где N — количество клеток в растворе; E — количество потенциальных сайтов для закрепления клеток; NE — количество сайтов, занятых клетками.

В уравнении (3) прямой процесс характеризует адсорбцию, обратный — десорбцию. Таким образом, скорость процесса адсорбции можно в общем виде записать как

$$-d[N]/dt = k_a[N][E] - k_d[NE], \quad (4)$$

где t — время процесса; k_a — константа скорости процесса адсорбции; k_d — константа скорости процесса десорбции.

Решая с рядом допущений уравнение (4), авторы [46] получили следующую зависимость для изменения количества клеток в растворе в процессе адсорбции:

$$\ln(N/N_o) = -k_a E_o t, \quad (5)$$

где N_o — начальное количество клеток в растворе; E_o — количество потенциальных сайтов на носителе до начала адсорбции клеток.

Данное уравнение с хорошей корреляцией описывает результаты эксперимента [46]; таким образом, оно может использоваться для оценки адсорбции клеток на носителе. Более детальный ана-

лиз должен проводиться с учетом основных свойств клеточной стенки конкретного микроорганизма [47, 48].

Адсорбция как метод иммобилизации находит все больше приложений в различных биотехнологических процессах. В частности, при исследовании ферментативного получения этанола с использованием клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, иммобилизованных на багассе, полученной из плодов *Anacardium occidentale* (cashew apple bagasse (CAB)), было показано, что продуктивность иммобилизованных клеток (около 2,58—2,99 г/л/ч) и концентрация этанола (в среднем около 20,63—23,92 г/л) были несколько выше, чем при использовании свободных клеток [9].

В работе [10] изучалась возможность получения альфа-амилазы с использованием клеток *Bacillus subtilis*. Проводилось сравнение свободных и иммобилизованных в поливиниловом спирте и глицинате натрия клеток. В результате было установлено, что удельная активность КЖ при иммобилизации на поливиниловом спирте была на 11% выше, чем на глицинате натрия и на 28% выше, чем при использовании свободных клеток.

Весьма интересные результаты по продуктивности иммобилизованных клеток показаны в работе [22]. При оптимальных условиях производительность клеткок *Rhizopus oryzae* NRRL 395, иммобилизованных на полиуретане, по молочной кислоте была на 55% выше по сравнению с суспензией клеток (93,2 и 60,0 г/л, соответственно).

В работе [23] авторы рассматривали вопросы иммобилизации сразу на нескольких недорогих носителях. Пористая делигнифицированная целлюлоза (или трубчатая целлюлоза, ТС) древесины индийского манго (*Mangifera indica*) и шореи (*Shorea robusta*), рисовая шелуха, а также композиты ТС/альгинат кальция/полилактид были использованы в качестве носителей для иммобилизации *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSMZ 20081 при ферментации молочной кислоты сывороточного сыра. Использование подобных носителей позволило сократить время ферментации, повысить выход молочной кислоты (г/г) и продуктивность (г/л/ч) по сравнению со свободными клетками на 38—46%.

Фиброматериалы природного происхождения (такие, как шелковая нить) также показывают достаточную стабильность закрепления [49, 50] и в то же время являются нетоксичными, биоразлагаемыми и обладают высокой пористостью [51, 52].

Весьма перспективным материалом для иммобилизации дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* может выступать анионный полиуретан

[53]. Авторы использовали для получения этанола иммобилизованные клетки с активностью, близкой к активности свободных клеток, однако рабочий диапазон рН при этом снизился. В то же время температурный оптимум, равный 40°, остался неизменным. В случае иммобилизованных клеток увеличение концентрации этанола происходило медленнее, чем в случае свободных, однако удавалось достичь больших его концентраций. При использовании свободных клеток концентрация этанола стабилизировалась после 8 ч ферментации на уровне примерно 15 г/л, в то время как в случае иммобилизованных в тот же момент времени она составляла лишь 7 г/л. Спустя 5 ч при использовании иммобилизованных клеток концентрация этанола достигала примерно 30 г/л.

В работе [54] багасса использовалась как основа для иммобилизации дрожжей *Candida tropicalis* РНВ5 с целью биодеградации фенола. Эффективность адсорбции дрожжей на багассе составляла 87,74%. Максимальный уровень деструкции фенола достигал 9,599, 1,665 и 2,248 г/г/ч для свободных клеток, иммобилизованных на альгинате кальция и багассе сахарного тростника, соответственно. Следует отметить, что багасса является весьма недорогим и доступным материалом в странах, где активно развито выращивание сахарного тростника.

Активированный уголь, цеолит, диатомит, агаровые шарики использовались в качестве подложки для иммобилизации клеток *Actinobacillus succinogenes* с целью получения янтарной кислоты [55]. Клетки, иммобилизованные на диатомитовой подложке, синтезировали 6,7 г/л продукта; при этом наблюдалось неполное потребление глюкозы. Это явление могло возникнуть за счет низкой удерживающей способности диатомовой подложки. Выход янтарной кислоты при культивировании иммобилизованных клеток *A. succinogenes* на активированном угле и свободных клетках был одинаковым и составлял 10,4 г/л. Наибольший выход янтарной кислоты наблюдался при культивировании бактерий *Actinobacillus succinogenes*, заключенных в агаровые шарики, и составлял 12,4 г/л.

В работе [56] глицерин, отход получения биодизеля, использовался для биоконверсии в 1,3-пропандиол с помощью иммобилизованных на альгинате кальция клеток *Klebsiella pneumoniae* ВLh-1. Наибольшая возможная продуктивность иммобилизованных клеток наблюдалась при размере шариков альгината кальция 3,4 мм и составляла 1,85 г/л/ч при 12-часовом культивировании по сравнению с 1,22 г/л/ч при 16-часовом культивировании суспензии свободных клеток.

Интересным направлением применения иммобилизованных микроорганизмов является биоремедиация. В работе [57] для разрушения сырой нефти использовали морские бактерии *Acinetobacter* sp. НС8-3S, иммобилизованные на хлопковых волокнах. Авторами отмечается рост степени разрушения углеводов примерно на 30% в случае использования иммобилизованных бактерий. Фиксированные микроорганизмы также используются для удаления тяжелых металлов. Так, на сегодняшний день уже показана возможность применения *S. cerevisiae* для этих целей [32, 58—60]. В работе [61] в качестве носителя для данных клеток был выбран гидроксипатит. Сам метод иммобилизации заключался в культивировании дрожжевых клеток в среде, в которую были изначально добавлены таблетки гидроксипатита; система показала свою эффективность при удалении тяжелых металлов.

БИОРЕАКТОРЫ ДЛЯ РАБОТЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ

Как уже упоминалось выше, появление носителей для иммобилизации клеток обеспечивает основу для создания специальных биореакторов, которые могут быть более компактными по сравнению с традиционными [3, 5]. Иммобилизация клеток методом адсорбции на фиброматериалах открывает новые возможности в области культивирования с использованием газообразных сред [62, 63]. В частности, разрабатываются технологии, основанные на подаче газов в среду культивирования через полые волокна, на поверхности которых клетки растут в виде пленок (рис. 1).

В основном биореакторы на основе полых волокон используются для культивирования клеточных линий, таких, как гибридомы, клетки яичников китайского хомячка, эмбриональные клетки почек человека. В качестве материала использовали полисульфон и производные целлюлозы [64]. Однако на сегодняшний день подобные биореакторы находят применение и в случае использования микроорганизмов. Так, в работе [65] асимметрические полволоконные мембраны были использованы для иммобилизации активно растущей культуры *Escherichia coli* С600(pBR322) — продуцента бета-лактамазы, концентрация которой при культивировании в макропористом матриксе обычно достигала более 10^{12} кл/мл и которая формировала в доступном свободном объеме тканеподобную массу.

В настоящее время уже разработана конструкция биореактора, включающая иммобилиза-

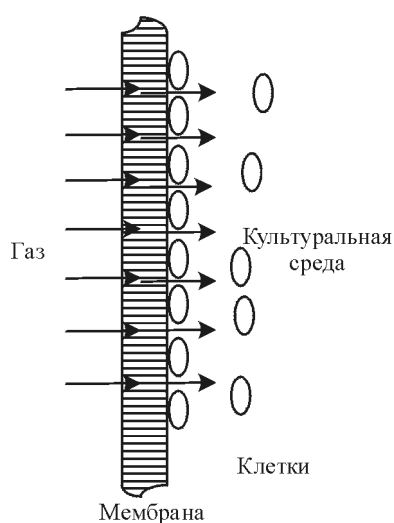


Рис. 1. Схема работы биореактора с полволоконной мембраной

цию мембран из полых волокон [66—69]. В одном из вариантов исполнения микропористый слой содержал биопленку культивируемого организма, и внешний непроницаемый для жидкости слой позволял газу проходить через жидкую фазу. Это решение дает возможность газу контактировать напрямую с культивируемым организмом, предотвращая необходимость первичной подачи газа в жидкую среду [68].

Использование полволоконных мембран в биореакторах также позволило реализовать решения по получению биотехнологическим методом таких продуктов, как этанол из синтез-газа [70]. Помимо этанола в качестве перспективных веществ для биосинтеза с использованием синтез-газа рассматриваются изопропанол, бутанол и уксусная кислота [71]. Потенциальными микроорганизмами для осуществления данных процессов являются *Clostridium ljungdahlii*, *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans*, *C. ragsdalei* и *Alkalibaculum bacchi* [71—73].

В настоящее время сразу несколько компаний специализируются на биотехнологическом производстве различных продуктов на основе синтез-газа. Пионерами в этой области являются INEOS Bio, Coskata и LanzaTech. INEOS Bio была создана в 2008 г. как филиал компании INEOS. Сообщается, что пилотный завод производит 100 галлонов этанола из каждой тонны сухого сырья при использовании выделенного и запатентованного микроорганизма *Clostridium ljungdahlii* в качестве биокатализатора. В 2011 г. INEOS Bio начала строительство первого промышленного завода во Флориде. Планируемый завод мощностью 300 т в день сможет производить 8 млн. галлонов этанола в год.

Второй завод построен в 2013 г. в Великобритании [74]. Компания Coskata, основанная в 2006 г. в США, использует для производства этанола запатентованную бактерию *Clostridium coskatii* [75]. Демонстрационный завод находится в Мэдисоне и работает с октября 2009 г.; там синтез-газ получают из древесной биомассы и твердых муниципальных отходов, используя процесс плазменной газификации, разработанный компанией Westinghouse Plasma Corporation [74]. Компания LanzaTech была основана в Новой Зеландии в 2005 г.; путь коммерциализации компании основан на использовании синтез-газа и отработанных газов промышленных предприятий, богатых CO, для производства этанола и 2,3-бутандиола с помощью запатентованного штамма *C. autoethanogenum* [76].

Биореактор на основе микропористых полипропиленовых полых волокон использовали для накопления биомассы *Streptomyces aureofaciens* (ATCC 12416с) и получения тетрациклина. Концентрация клеток в свободном межтрубном пространстве составляла 10^{11} /мл, при этом продуктивность по тетрациклину была равна 5,5 мг/мл/ч [77].

Биореактор с полипропиленовыми полыми мембранами применяли также и для культивирования *S. cerevisiae* ATCC 4126 с целью получения спирта. Общий объем реактора составлял 3,5 мл, концентрация клеток — $3,5 \cdot 10^9$ /мл, а продуктивность по спирту — 17 г/л/ч на второй день культивирования [78].

Интересным вариантом использования иммобилизованных клеток является биореактор с плотноупакованным слоем загрузки [4] (рис. 2). В качестве такой загрузки выступают гранулы с иммобилизованными клетками. Однако в зависимости от технологического процесса в биореактор в качестве подпитки могут подаваться различные сложные среды, содержащие органические соединения [79]. Так например, при производстве биодизеля подаются спирт и масло, которые достаточно сложно идеально перемешать, и в связи с этим крайне затруднительно обеспечить равномерное движение фронта реакции по высоте загрузки и полное протекание всех необходимых процессов по мере прохождения субстратов через реактор. Еще одной проблемой для таких реакторов является образование газов, характерное для некоторых биотехнологических процессов [80]. Диффузия газов и образование пузырьков приводят к перемешиванию слоя загрузки и нарушают равномерность распределения субстратов по фронту фильтрования. Это ведет к тому, что подаваемый субстрат может использоваться неполностью за один проход через реактор и может возникнуть необхо-

димось в рециркуляции раствора. Также следует отметить, что данный биореактор — это система, работающая под давлением, создаваемым в потоке вводимых сред для преодоления гидравлического сопротивления слоя загрузки. Таким образом, в данном случае необходимо обратить внимание на устойчивость выбранного биокатализатора в таких сложных динамических условиях. Однако при эффективном гидравлическом режиме работы биореакторы с плотноупакованным слоем носителя клеток в силу высокой поверхности контакта клеток со средой могут оказаться гораздо более компактными по сравнению с другими конструкциями одинаковой производительности [63].

Еще одним вариантом обеспечения максимального контакта загрузки с субстратом является поддержание ее гранул в так называемом «кипящем слое» [4] (рис. 3). При данном режиме работы в нижнюю часть биореактора в зависимости от биотехнологического процесса под давлением подается либо газ (см. рис. 3, А), либо субстрат (см. рис. 3, Б). Соответственно в первом случае гранулы загрузки находятся во взвешенном состоянии за счет интенсивной диффузии пузырьков газа и гидравлического потока рабочей среды снизу вверх, во втором — исключительно за счет тока жидкости. Теоретически использование тока жидкости и газа для создания «кипящего слоя» более эффективно [81], однако существует целый ряд факторов, которые необходимо учитывать при выборе метода создания «кипящего слоя»:

- масса, размер и форма частиц загрузки;
- гидрофобность частиц загрузки в случае использования водных сред, так как данный параметр определяет степень контакта частицы с пузырьками газа и, следовательно, скорость их всплытия;
- гидравлические характеристики рабочей среды (динамическая вязкость, плотность и т.д.);
- химический состав среды, в частности, наличие органических соединений, проявляющих гидрофобные свойства, так как такие соединения могут сцепляться с пузырьками воздуха и интенсивно флотировать к поверхности.

Анализ указанных факторов должен помочь подобрать такой технологический режим, при котором загрузка находилась бы во взвешенном состоянии и в то же время не наблюдался бы эффект флотации. При флотации частицы загрузки могут всплывать на поверхность вместе с пузырьками, тем самым существенно уменьшая контакт клеток с субстратом. На сегодняшний день данное явление достаточно хорошо изучено [82], поэтому определение параметров флотации можно проводить, опираясь на установленные закономерности [82, 83].

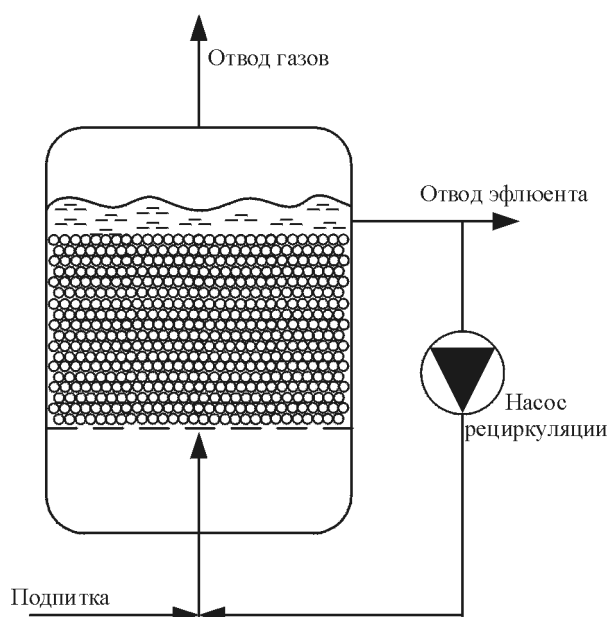


Рис. 2. Схема биореактора с плотноупакованным слоем носителя клеток

Хотя по отношению объема загрузки к объему реактора биореакторы с «кипящим слоем» уступают биореакторам с плотной упаковкой загрузки, они позволяют обеспечивать эффективный контакт клеток со средой и, что немаловажно, эффективное перемешивание среды. Однако требуется обратить серьезное внимание на указанные выше ограничения, существующие для данного вида реакторов, и учитывать тот факт, что использование газов приводит к большим энергозатратам.

Заслуживает внимания и применение более традиционных биореакторов с механическим перемешиванием, например, с помощью верхнеприводной мешалки (рис. 4).

Биореакторы с механическим перемешиванием отличаются наибольшим объемом на единицу загруженного материала, однако их преимущество заключается в простоте эксплуатации. Возможная проблема с вымыванием загрузки с эфлюентом решается либо организацией отстаивания эфлюента, либо установкой мембранного фильтра [4] (см. рис. 4, Б).

Как видно из представленных в обзоре данных, в настоящее время рассматриваются различные материалы и методы иммобилизации микроорганизмов. При этом иммобилизованные микроорганизмы используются как для биосинтеза различных продуктов, так и в качестве клеточных катализаторов. При этом критериями выбора способа иммобилизации являются не только увеличение продуктивности (как, например, в работах

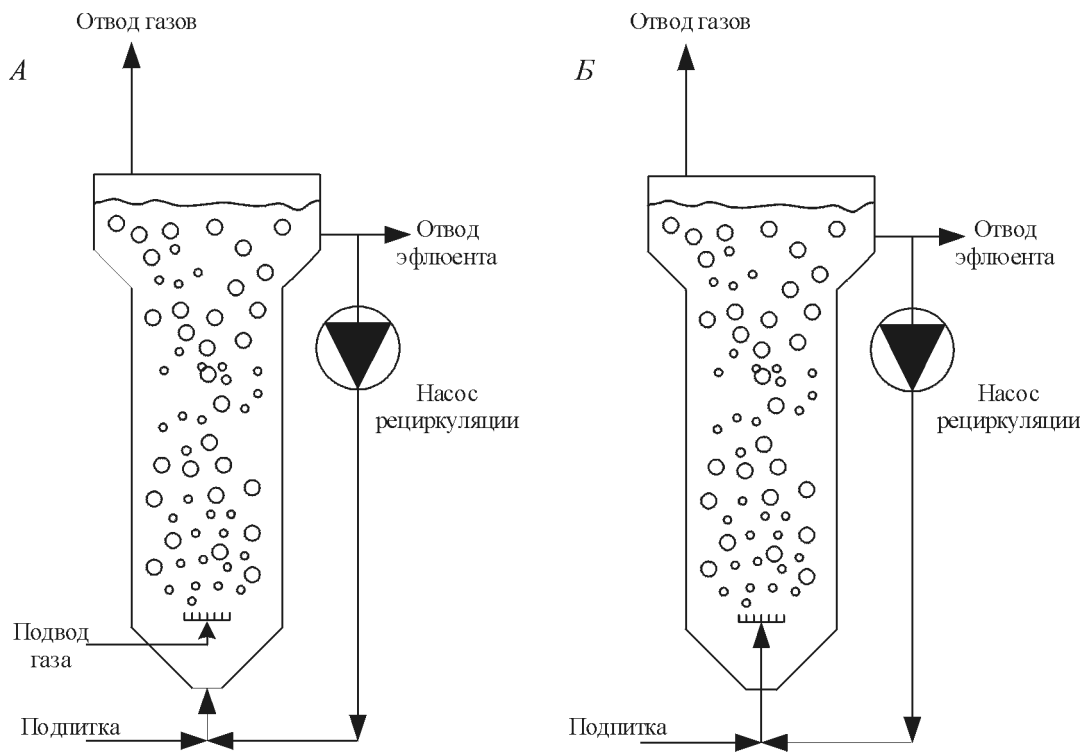


Рис. 3. Схема биореактора «кипящего слоя»: А — с использованием газа под давлением; Б — с использованием рабочей среды

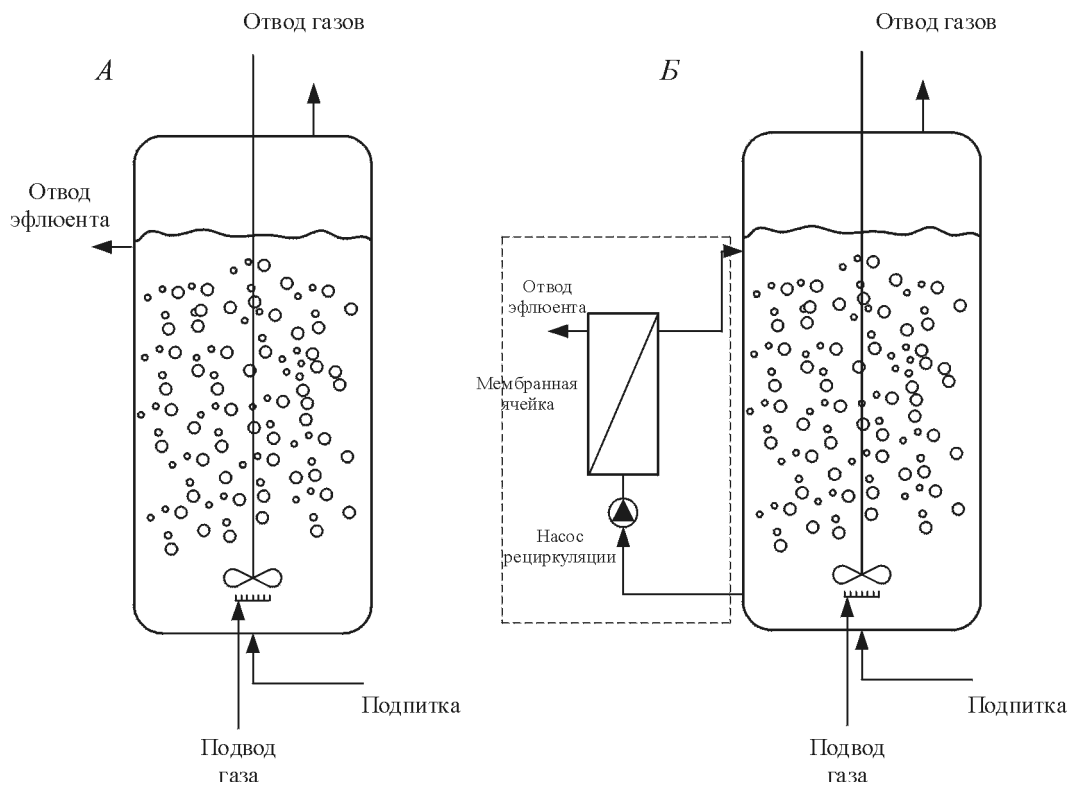


Рис. 4. Схема биореактора с механическим перемешиванием: А — без мембранной фильтрации эфлюента; Б — с мембранной фильтрацией

[22] и [23]), но и повышение технологичности самого процесса. Последнее понимается как обеспечение микроорганизмов питательными веществами, так и, например, упрощение процедуры очистки продуктов от биомассы. Так, при производстве биодизеля с использованием клеточного катализатора затруднительно отделить клеточную массу от глицерина без использования таких энергозатратных методов, как центрифугирование. В подобных случаях иммобилизация клеток позволит сократить потери биомассы и соответственно снизить затраты на выращивание новой и разделение осадка. С учетом вышесказанного возникает вопрос, в каких случаях стоит применять иммобилизованные клетки в биотехнологическом производстве. Очевидно, что в первую очередь возможность иммобилизации определяется используемым штаммом микроорганизма, его свойствами и особенностями процесса, для которого он разработан.

На основании приведенной в обзоре информации, можно указать на ряд общих критериев, которые могут помочь определить, стоит ли начинать исследования в области иммобилизации новых штаммов:

1. Вид процесса. Иммобилизация более перспективна в случае, если используется клеточный катализатор, т. е. в биореактор поступают вещества, реакция между которыми катализируется адсорбированными на клетках ферментами. Сами клетки в этом случае не продуцируют требуемые вещества. В данном случае иммобилизация позволяет применить один из представленных в обзоре видов реактора или при достаточных скоростях реакции сделать систему проточной (см. рис. 2). Кроме того, применение данных реакторов может позволить сократить геометрические размеры всей технологической линии и соответственно размеры цехов [63]. В случае биосинтеза требуемых веществ клетками подобные преимущества неочевидны и требуются исследования, которые вполне могут показать, что иммобилизация не дает серьезного прироста продуктивности. Например, если разработан высокоэффективный штамм, который обеспечивает хорошую продуктивность в традиционных биореакторах, то возможно не стоит концентрироваться на проведении серьезных исследований по его иммобилизации.

2. Вид продукта. В случае, если речь идет о крупнотоннажном производстве недорогого продукта, сокращение размеров биореакторов за счет успешной иммобилизации микроорганизмов может привести к уменьшению материалоемкости всей технологической линии и в идеале к снижению капитальных затрат [3, 4].

3. Материалы и методы иммобилизации. Они не могут быть полностью универсальными для всех процессов. Какие-то подходы и носители могут найти достаточно широкое применение в различных процессах (например, альгинат). В то же время, как упоминалось выше, методы иммобилизации за счет гидрофобных взаимодействий неэффективны для неводных сред.

4. Сложность разделения КЖ. Возможность иммобилизации целесообразно рассматривать, если после классического культивирования сложно отделить биомассу от продукта.

5. Субстраты. При использовании газообразных субстратов крайне важно обеспечить эффективное снабжение ими клеток. Для этих целей использование половолоконных систем представляется весьма эффективным решением [66—69, 74—76].

Следует обратить внимание, что в настоящее время появляются новые материалы, которые могут найти применение при решении рассматриваемых задач. Так например, наноцеллюлоза уже обсуждается в качестве потенциального носителя клеток для биотехнологии [84—86]. В зависимости от метода получения этот материал может проявлять гидрофобные свойства, вплоть до сильногидрофобных [87, 88]. Также из наноцеллюлозы можно получать гидрогели с различными свойствами [89, 90]. Кроме того, данный материал является биосовместимым [91, 92] и прекрасно взаимодействует с различными полисахаридами [93].

Интересными свойствами в качестве носителей обладают синтетические пептиды [94—97]. Эти материалы обладают широким спектром физико-химических свойств, которые можно варьировать в зависимости от их первичной аминокислотной последовательности [95, 96]. Однако пока что их стоимость слишком высока для применения в качестве материала при иммобилизации промышленно-ценных микроорганизмов [94]. Снижение их стоимости за счет роста производства для нужд других отраслей может в перспективе сделать возможным их использование в рассматриваемых в данной статье приложениях.

Как можно видеть из представленного обзора, задача иммобилизации клеток в целом является актуальной для многих биотехнологических процессов. Наиболее интересны такие подходы в случае создания систем с биокатализаторами, когда клетки с иммобилизованными на клеточной стенке ферментами в свою очередь фиксируются на носителе. Однако, как показано в обзоре, в некоторых случаях иммобилизация позволила повысить эффективность и биосинтетических процессов.

Немаловажным фактором при этом является возможность создания компактных биореакторов с низкой материалоемкостью, что при прочих равных условиях позволяет снизить капитальные затраты на организацию производства.

Следует также отметить, что появление новых относительно недорогих материалов может существенно расширить возможности применения систем с иммобилизованными клетками в биотехнологических процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках соглашения о предоставлении субсидии №14.607.21.0034. Уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) — RFMEFI60714X0034.

Получено 20.03.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Ramakrishna, S.V. Microbial fermentation with immobilized cells / S.V. Ramakrishna, R.S. Prakasham // *Current Sci.* — 1999. — V. 77. — P. 87—100.
2. Ranganathan, S.V. An overview of enzymatic production of biodiesel / S.V. Ranganathan S.L. Narasimhan, K. Muthukumar // *Biores. Technol.* — 1999. — V. 99. — P. 3975—3981.
3. Hollaender, A. Laskin, A. Rogers, P. Basic biology of new developments in biotechnology. — New York: Plenum Press, 1983. — P. 465—496.
4. Verbelen, P.J. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications / P.J. Verbelen, D.P. De Schutter, F. Delvaux, K.J. Verstrepen, F.R. Delvaux // *Biotechnol. Lett.* — 2006. — V. 28. — P. 1515—1525.
5. Guisan, J. M. (ed.) Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology. — New-York: Humana Press, 2006. — 437p.
6. Najafpour, G. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae* / G. Najafpour, H. Younesi, K. Syahidah, K. Ismail // *Biores. Technol.* — 2004. — V. 92. — P. 251—260.
7. Lin, Y. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects / Y. Lin, S. Tanaka // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2006. — V. 69(6). — P. 627—642.
8. Xu, W. Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a newly designed combined bioreactor system by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* / W. Xu, L. Liang, Z. Song, M. Zhu // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2014. — V. 61(3). — P. 289—296.
9. Gondim, D.R. Use of cashew apple bagasse as support for *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization for ethanol production / D.R. Gondim, A.M. Pacheco, T.H.S Rodrigues, M.V.P. Rocha, L.R.B Gonçalves // *J. Biob. Mater. Bioen.* — 2014. — V. 8(1). — P. 108—114.
10. Liu Z. Study on immobilized cells for producing alpha-amylase by using polyvinyl alcohol as the carrier / Z. Liu, J. Wang, Z. Li // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* (Chinese J. Biomed. Eng.). — 1997. — V. 14(4). — P. 359—362.
11. Darah, I. Potential use of nylon scouring pad cubes attachment method for pectinase production by *Aspergillus niger* HFD5A-1D / I. Darah, H. Weloosamy, L. Sheh-Hong // *Proc. Biochem.* — 2014. — V. 49. — P. 660—667.
12. Esawy, M.A. Evaluation of free and immobilized *Aspergillus niger* NRC1 amipectinase applicable in industrial processes // M.A. Esawy, A.A. Gamal, Z. Kamel, A.-M. S. Ismail, A.F. Abdel-Fattah // *Carbohydrate Polym.* — 2013. — V. 92(2). — P. 1463—1469.
13. Ellaiah, P. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger* // P. Ellaiah, T. Prabhakar, B. Ramakrishna, A. Thaer Taleb, K. Adinarayana // *Proc. Biochem.* — 2004. — V. 39(5). — P. 525—528.
14. Zajkoska, P. Biocatalysis with immobilized *Escherichia coli* / P. Zajkoska, M. Rebros, M. Rosenberg // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2013. — V. 97. — P. 1441—1455.
15. Kunamneni, A. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* — 2005. — V. 6(3). — P. E391—E397.
16. Chang, Y.-C. Growth and production of cholesterol oxidase by alginate-immobilized cells of *Rhodococcus equi* No. 23 / Y.-C. Chang, C.-C. Chou // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 2002. — V. 35. — P. 69—74.
17. Bandi, S. Studies on neomycin production using immobilized cells of *S. marinensis* NUV-5 in various reactor configurations: a technical note / S. Bandi, E. Poluri, A. Kunamneni // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* — 2003. — V. 4(3). — P. 369—374.
18. Hamed, J. Increased erythromycin production by alginate as a medium ingredient or immobilization support in cultures of *Saccharopolyspora erythraea* / J. Hamed, F. Khodagholi, A. Hassani-Nasab // *Biotechnol. Lett.* — 2005. — V. 27. — P. 661—664.
19. Srinivasulu, B. Neomycin production with free and immobilized cells of *Streptomyces marinensis* in an airlift reactor / B. Srinivasulu, R.S Prakasham, A. Jetty, S. Srinivas, P. Ellaiah, S.V. Ramakrishna // *Proc. Biochem.* — 2002. — V. 38(4). — P. 593—598.
20. Adinarayana, K. Continuous neomycin production by immobilized cells of *Streptomyces marinensis* NUV-5 in an airlift bioreactor // K. Adinarayana, B. Srinivasulu, K.V.V.S.N. Bapi Raju, P. Ellaiah // *Proc. Biochem.* — 2004. — V. 39. — P. 1407—1414.
21. Subbarao, Y.M. Production of neomycin using immobilized cells of *Streptomyces marinensis* and its antimicrobial activity / Y.M. Subbarao, V. Madhukar, S. Dupaguntla, K. Senthil, S. Pratheep // *Res. J. Pharmacog. Phytochem.* — 2010. — V.2(1). — P. 12—14.
22. Tanyildizi, M.S. Optimization of lactic acid production with immobilized *Rhizopus oryzae* / M.S. Tanyildizi, S. Bulut, V. Selen, D. Özer // *African J. Biotechnol.* — 2012. — V. 11(34). — P. 8546—8552.
23. Kumar, M.N. Lactic acid fermentation by cells immobilised on various porous cellulosic materials and their alginate/poly-lactic acid composites / M.N. Kumar, A.-I. Gialleli, J.B. Masson, P. Kandylis, A. Bekatorou, A.A. Koutinas, M. Kanellaki // *Biores. Technol.* — 2014. — V.165. — P. 332—335.

24. *Covarrubias, S.A.* Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae / S.A. Covarrubias, L.E. de-Bashan, M. Moreno, Y. Bashan // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* — 2012. — V. 93(6). — P. 2669—2680.
25. *Taicheng, A.* Recent patents on immobilized microorganism technology and its engineering application in wastewater treatment / A. Taicheng, Z. Lincheng, L. Guiying, F. Jiamo, S. Guoying // *Rec. Pat. Eng.* — 2008. — V. 2(1). — P. 28—35.
26. *Martins, S.C.S.* Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater / S.C.S. Martins, C. M. Martins, L. M. C.G. Fiu'za, S. T. Santaella // *Afr. J. Biotechnol.* — 2013. — V. 12(28). — P. 4412—4418.
27. *de-Bashan, L.E.* Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects / L.E. de-Bashan, Y. Bashan // *Biores. Technol.* — 2010. — V. 101(6). — P. 1611—1627.
28. *Nguyen, T.A.* Treatment of waters and wastewaters containing sulfur dyes: A review / T.A. Nguyen, Ruy-Shin Juang // *Chem. Eng. J.* — 2013. — V. 219. — P. 109—117.
29. *Liu, K.* Immobilization of *Chlorella sorokiniana* GXNN 01 in alginate for removal of N and P from synthetic wastewater / K. Liu, J. Li, H. Qiao, A. Lin, G. Wang // *Biores. Technol.* — 2012. — V. 114. — P. 26—32.
30. *Wu, L.* Biodegradation of oil wastewater by free and immobilized *Yarrowia lipolytica* W29 / L. Wu, G. Ge, J. Wan // *J. Environ. Sci. (China)*. — 2009. — V. 21(2). — P. 237—242.
31. *Langer, R.* Biomaterials and biomedical engineering // *Chem. Eng. Sci.* — 1995. — V. 50. — P. 4109—4121.
32. *Pereira, A.P.* Effect of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilisation on mead production / A.P. Pereira, A. Mendes-Ferreira, J.M. Oliveira, L.M. Estevinho, A. Mendes-Faia // *LWT - Food Sci. Technol.* — 2014. — V. 56. — P. 21—30.
33. *Braschler, T.* Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by in situ alginate hydrogel formation / T. Braschler, R. Johnn, M. Heul, L. Metref, P. Renaud // *Lab. Chip.* — 2005. — V. 5. — P. 553—559.
34. *Hsu, C.H.* Effect of surface characteristics and xanthan polymers on the immobilization of *Xanthomonas campestris* to fibrous matrices / C.H. Hsu, Y.F. Chu, S. Argin-Soysal, T.S. Hahm, Y.M. Lo // *J. Food Sci.* — 2004. — V. 69. — P. E441—E448.
35. *Israelachvili, J.N.* The hydrophobic interaction is long range, decaying exponentially with distance / J.N. Israelachvili, R.M. Pashley // *Nature*. — 1982. — V. 300. — P. 341—342.
36. *Chu, Y.-F.* Immobilization of bioluminescent *Escherichia coli* cells using natural and artificial fibers treated with polyethylenimine / Y.-F. Chu, C.-H. Hsu, Y.M. Lo // *Biores. Technol.* — 2009. — V. 100. — P. 3167—3174.
37. *Kilonzo, P.* Airlift-driven fibrous bed bioreactor for continuous production of glucoamylase using immobilized recombinant yeast cells / P. Kilonzo, A. Margaritis, M.A. Bergougnou // *J. Biotechnol.* — 2009. — V. 143(1). — P. 60—68.
38. *Talabardon, M.* Acetic acid production from lactose by anaerobic thermophilic coculture immobilized in a fibrous-bed bioreactor / M. Talabardon, J.P. Schwitzguelbel, P. Peringer, S.T. Yang // *Biotechnol. Prog.* — 2000. — V. 16. — P. 1008—1017.
39. *Василов П.Г.* Перспективы развития производства биотоплива в России. Биодизель // *Вестник биотехнол. физ.-хим. биол. им. Ю.А. Овчинникова.* — 2007. — Т.3 — № 1. — С. 47—54.
40. *Atadashi, I.M.* High quality biodiesel and its diesel engine application: A review / I.M. Atadashi, M.K. Aroua, A. Abdul Aziz // *Renew. Sustain. Energ. Rev.* — 2010. — V. 14. — P. 1999—2008.
41. *Ratkova, E.L.* On a relationship between molecular polarizability and partial molar volume in water / E.L. Ratkova, M.V. Fedorov // *J. Chem. Phys.* — 2011. — V. 135. — P. 244109.
42. *Terekhova, I.V.* Selective Na⁺/K⁺ Effects on the Formation of α -Cyclodextrin Complexes with Aromatic Carboxylic Acids: Competition for the Guest / I.V. Terekhova, A.O. Romanova, R.S. Kumeev, M.V. Fedorov // *J. Phys. Chem.* — 2010. — V. 114. — P. 12607—12613.
43. *Romanova, A.* α -Cyclodextrin/aminobenzoic acid binding in salt solutions at different pH: Dependence on guest structure / A. Romanova, E. Chibunova, R. Kumeev, M. Fedorov, I. Terekhova // *Int. J. Biolog. Macromolec.* — 2013. — V. 57. — P. 255—258.
44. *Fedorov, M.V.* Unravelling the solvent response to neutral and charged solutes / M.V. Fedorov, A.A. Kornyshev // *Mol. Phys.* — 2007. — V. 105. — P. 1—16.
45. *Kawaguti, H.Y.* Effect of the additive polyethylenimine and glutaraldehyde on the immobilization of *Erwinia* sp. D12 cells in calcium alginate for isomaltulose production / H.Y. Kawaguti, M.F. Buzzano, D.C. Orsi, G.T. Suzuki, H.H. Sato // *Proc. Biochem.* — 2006. — V. 41. — P. 2035—2040.
46. *Kilonzo, P.* Effects of surface treatment and process parameters on immobilization of recombinant yeast cells by adsorption to fibrous matrices / P. Kilonzo, A. Margaritis, M. Bergougnou // *Biores. Technol.* — 2011. — V. 102. — P. 3662—3672.
47. *Vadillo-Rodriguez, V.* Nanoscale cell wall deformation impacts long-range bacterial adhesion forces on surfaces / V. Vadillo-Rodriguez, H.J. Busscher, W. Norde, J. de Vries, R.J.B. Dijkstra, I. Stokroos, H.C. van der Mei // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2004. — V. 70. (9). — P. 5441—5446.
48. *Mortensen, N.P.* Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* cells / N.P. Mortensen, J.D. Fowlkes, C.J. Sullivan, D.P. Allison, N.B. Larsen, S. Molin, M.J. Doktycz // *Langmuir*. — 2009. — V. 25. — P. 3728—3733.
49. *Huang, Y.* Acetate production from whey lactose using coimmobilized cells of homo-lactic and homo-acetic bacteria in a fibrous-bed bioreactor / Y. Huang, S.T. Yang // *Biotechnol. Bioeng.* — 1998. — V. 60. — P. 498—507.
50. *Melo, J.S.* Simultaneous filtration and immobilization of cells from a flowing suspension using a bioreactor containing polyethylenimine coated cotton threads: application in the continuous inversion of concentrated sucrose syrups / J.S. Melo, S.F. D'Souza // *World J. Microbiol. Biotechnol.* — 1999. — V. 15. — P. 23—27.
51. *Dicosmo, F.* Does the spontaneous adhesion of cultured plant cells to polymer surfaces have potential as an immobilization technique / F. Dicosmo, P.J. Facchini, A.W. Neuman // *Trends Biotechnol.* — 1998. — V. 6. — P. 137—140.
52. *Yang, S.-T.* Kinetics and stability of GM-CSF production by recombinant yeast cells immobilized in a fibrous-bed biore-

- actor / S.-T. Yang, C.-H. Shu // *Biotechnol. Prog.* — 1996. — V. 12. — P. 449—456.
53. Lin, Y.-H. Development of a novel microorganism immobilization method using anionic polyurethane / Y.-H. Lin, S.-C. J. Hwang, W.-C. Shih, K.-C. Chen // *J. Appl. Polymer Sci.* — 2006. — V. 99. — P. 738—743.
54. Basak, B. Studies on the potential use of sugarcane bagasse as carrier matrix for immobilization of *Candida tropicalis* PHB5 for phenol biodegradation / B. Basak, B. Bhunia, A. Dey // *Int. Biodeterior. Biodegrad.* — 2014. — V. 93. — P. 107—117.
55. Corona-Gonzalez, R.I. Immobilization of *Actinobacillus succinogenes* by adhesion or entrapment for the production of succinic acid / R.I. Corona-Gonzalez, R. Miramontes-Murillo, E. Arriola-Guevara, G. Guatemala-Morales, G. Toriz, C. Pelayo-Ortiz // *Biores. Technol.* — 2014. — V. 164. — P. 113—118.
56. de Souza, E.A. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol using immobilized cells of *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 / E.A. de Souza, D.M. Rossi, M.O. Zachia Ayub // *Renew. Energy.* — 2014. — V. 72. — P. 253—257.
57. Lin, M. Use of bacteria-immobilized cotton fibers to absorb and degrade crude oil / M. Lin, Y. Liu, W. Chen, H. Wang, X. Hu // *Int. Biodeter. Biodegrad.* — 2014. — V. 88. — P. 8—12.
58. Teunissen, A.W. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family / A.W. Teunissen, H.Y. Steensma // *Yeast.* — 1995. — V. 11(11). — P. 1001—1013.
59. Machado, M.D. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass / M.D. Machado, S. Janssens, H.M. V. M. Soares, E.V. Soares // *J. Appl. Microbiol.* — 2009. — V. 106(6). — P. 1792—1804.
60. Machado, M.D. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process / M.D. Machado, M.S. Santos, C. Gouveia, H.M. Soares, E.V. Soares // *Biores. Technol.* — 2008. — V. 99(7). — P. 2107—2115.
61. Rapoport, A. Immobilisation of yeast cells on the surface of hydroxyapatite ceramics / A. Rapoport, D. Borovikova, A. Kokina, A. Patmalnieks, N. Polyak, I. Pavlovska, G. Mezinskis, Y. Dekhtyar // *Proc. Biochem.* — 2011. — V. 46. — P. 665—670.
62. Michaels Alan, S., Robertson Channing, R., Cohen Stanley, N. Microbiological methods using hollow fiber membrane reactor // US Patent 4440853, A/435/71/1. 1984.
63. Mulder, M. Basic principles of membrane technology. — 2nd ed. — Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996. — 464 p.
64. Whitford, W.G. Interest in Hollow-Fiber Perfusion Bioreactors Is Growing / W.G. Whitford, J.J.S. Cadwell // *BioProc. Int.* — 2009. — V. 7. — P. 54—63.
65. Ingles, D.S. Hollow-fiber membrane bioreactors using immobilized *E. coli* for protein synthesis / D.S. Ingles, W.J. Smith, D.P. Taylor, S.N. Cohen, A.S. Michaels, C.R. Robertson // *Biotechnol. Bioeng.* — 1983. — V. 25(11). — P. 2653—2681.
66. Tsai, S.P., Datta, R., Basu, R., Yoon, S.H. Syngas conversion system using asymmetric membrane and anaerobic microorganism // U.S. Patent № 0215163, A1. 2009.
67. Tsai, S.P., Datta, R., Basu, R., Yoon, S.H., Robey, R. Modular membrane supported bioreactor for conversion of syngas components to liquid products // U.S. Patent № 0029434, A1. 2009.
68. Hickey, R., Datta, R., Tsai, S.P., Basu, R. Membrane supported bioreactor for conversion of syngas components to liquid products // U.S. Patent № 0256597, A1. 2011.
69. Hickey, R., Basu, R., Datta, R., Tsai, S. Method of Conversion of Syngas Using Microorganism on Hydrophilic Membrane // U.S. Patent 7923227, 435/140. 2011.
70. Griffin, D.W. Fuel and chemical products from biomass syngas: A comparison of gas fermentation to thermochemical conversion routes / D.W. Griffin, M.A. Schultz // *Environ. Prog. Sustain. Energy.* — 2012. — V. 31. — P. 219—224.
71. Kundiyana, D.K. Effect of temperature, pH and buffer on syngas fermentation using *Clostridium* strain P11 / D.K. Kundiyana, M.R. Wilkins, P.B. Maddipati, R.L. Huhnke // *Biores. Technol.* — 2011. — V. 102. — P. 5794—5799.
72. Maddipati, P. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract / P. Maddipati, H.K. Atiyeh, D.D. Belmer, R.L. Huhnke // *Biores. Technol.* — 2011. — V. 102(11). — P. 6494—6501.
73. Liu, K. Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi* / K. Liu, H.K. Atiyeh, R.S. Tanner, M.R. Wilkins, R.L. Huhnke // *Biores. Technol.* — 2012. — V. 104. — P. 336—341.
74. Daniell, J. Commercial biomass syngas fermentation / J. Daniell, M. Köpke, D. J. Simpson // *Energies.* — 2012. — V. 5. — P. 5372—5417.
75. Zahn, J.A., Saxena, J. Novel ethanologenic species *Clostridium coskatii* // U.S. Patent № 0229947, A1. 2011.
76. Heijstra, B., Kern, E., Koepke, M., Segovia, S., Liew, F. Novel bacteria and methods of use thereof // Patent WO 015317, C12R1/145. 2012.
77. Robertson, C.R. Dual aerobic hollow-fiber bioreactor for cultivation of *Streptomyces aureofaciens* / C.R. Robertson, I.H. Kim // *Biotechnol. Bioeng.* — 1985. — V. 27. — P. 1012—1020.
78. Inloes, D.S. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors / D.S. Inloes, D.P. Taylor, S.N. Cohen, A.S. Michaels, C.R. Robertson // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1983. — V. 46(1). — P. 264—278.
79. Baron, G.V. Willaert, R.G., De Backer, L. Immobilised cell reactors: Immobilised living cell systems: modelling and experimental methods. — Chichester, England: John Wiley & Sons, 1996. — P. 67—95.
80. Obradovic, B., Nedovic, V.A., Bugarski, B., Willaert, R.G., Vunjak-Novakovic, G. Immobilised cell bioreactors: Fundamentals of cell immobilisation biotechnology. [Eds. V. Nedovic, R. Willaert]. — Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004. — P. 411—436.

81. *Dalmau, M.* Towards integrated operation of membrane bioreactors: Effects of aeration on biological and filtration performance / M. Dalmau, H. Monclús, S. Gabarro'n, I. Rodriguez-Roda, J. Comas // *Biorec. Technol.* — 2014. — V. 171. — P. 103—112.
82. *Lotter, N.O.* Modern practice of laboratory flotation testing for flow sheet development: A review / N.O. Lotter, E. Whiteman, D.J. Bradshaw // *Minerals Eng.* — 2014. — V. 66—68. — P. 2—12.
83. *dos Santos, N.A.* Modelling flotation with a flexible approach — integrating different models to the compartment model / N.A. dos Santos, O. Savassi, A.E. Clark Peres, A.H. Martins // *Minerals Eng.* — 2014. — V. 66—68. — P. 68—76.
84. *Li, Q.* Nanocellulose life cycle assessment / Q. Li, S. McGinnis, C. Sydnor, A. Wong, S. Rennecker // *ACS Sustain. Chem. Eng.* — 2013. — V. 1(8). — P. 919—928.
85. *Guo, B.* Preparation of flexible, highly transparent, cross-linked cellulose thin film with high mechanical strength and low coefficient of thermal expansion / B. Guo, W. Chen, L. Yan // *ACS Sustain. Chem. Eng.* — 2013. — V. 1(11). — P. 1474—1479.
86. *Kose, R.* “Nanocellulose” as a single nanofiber prepared from pellicle secreted by *Gluconacetobacter xylinus* using aqueous counter collision / R. Kose, I. Mitani, W. Kasai, T. Kondo // *Biomacromol.* — 2011. — V. 12(3). — P. 716—720.
87. *Jin, H.* Superhydrophobic and superoleophobic nanocellulose aerogel membranes as bioinspired cargo carriers on water and oil / H. Jin, M. Kettunen, A. Laiho, H. Pynnönen, J. Paltakari, A. Marmur, O. Ikkala, R.H.A. Ras // *Langmuir.* — 2011. — V. 27(5). — P. 1930—1934.
88. *Habibi, Y.* Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications / Y. Habibi, L.A. Lucia, O.J. Rojas // *Chem. Rev.* — 2010. — V. 110(6). — P. 3479—3500.
89. *Nair, S.S.* Hydrogels Prepared from Cross-Linked Nanofibrillated Cellulose / S.S. Nair, J.Y. Zhu, Y. Deng, A.J. Ragauskas // *ACS Sust. Chem. Eng.* — 2014. — V. 2(4). — P. 772—780.
90. *McKee, J.R.* Thermoresponsive nanocellulose hydrogels with tunable mechanical properties / J.R. McKee, S. Hietala, J. Seitonen, J. Laine, E. Kontturi, O. Ikkala // *ACS Macro Lett.* — 2014. — V. 3(3). — P. 266—270.
91. *Bodin, A.* Modification of nanocellulose with a xyloglucan—RGD conjugate enhances adhesion and proliferation of endothelial cells: implications for tissue engineering / A. Bodin, L. Ahrenstedt, H. Fink, H. Brumer, B. Risberg, P. Gatenholm // *Biomacromol.* — 2007. — V. 8(12). — P. 3697—3704.
92. *Anirudhan, T.S.* Investigation of the extraction of hemoglobin by adsorption onto nanocellulose-based superabsorbent composite having carboxylate functional groups from aqueous solutions: kinetic, equilibrium, and thermodynamic profiles / T.S. Anirudhan, S.R. Rejeena, A.R. Tharun // *Ind. Eng. Chem. Res.* — 2013. — V. 52(32). — P. 11016—11028.
93. *Parikka, K.* Functional and anionic cellulose-interacting polymers by selective chemo-enzymatic carboxylation of galactose-containing polysaccharides / K. Parikka, A-S. Leppänen, C. Xu, L. Pitkänen, P. Eronen, M. Österberg, H. Brumer, S. Willför, M. Tenkanen // *Biomacromol.* — 2012. — V. 13(8). — P. 2418—2428.
94. *Boyle, A.L.* De novo designed peptides for biological applications / A.L. Boyle, D.N. Woolfson // *Chem. Soc. Rev.* — 2011. — V. 40. — P. 4295—4306.
95. *Bellesia, G.* Structure and stability of chiral beta-tapes: A computational coarse-grained approach / G. Bellesia, M.V. Fedorov, Y.A. Kuznetsov, E.G. Timoshenko // *J. Chem. Phys.* — 2005. — V. 122. — P. 134901.
96. *Sarikaya, M.* Molecular biomimetics: nanotechnology through biology / M. Sarikaya, C. Tamerler, A.K.Y. Jen, K. Schulten, F. Baneyx // *Nat. Mat.* — 2003. — V. 2. — P. 577—585.
97. *Fedorov, M.V.* Solvent effects and hydration of a tripeptide in sodium halide aqueous solutions: an *in silico* study / M.V. Fedorov, J.M. Goodman, S. Schumm // *Phys. Chem.* — 2007. — V. 9. — P. 5423—5435.

P.M. GOTOVTSEV^{1,*}, E.Yu. YUZBASHEVA²,
K.V. GORIN¹, V.V. BUTYLIN¹, G.U. BADRANOVA¹,
N.I. PERKOVSKAYA², E.B. MOSTOVA²,
Z.B. NAMSARAIEV¹, N.I. RUDNEVA³, A.V. KOMOVA¹,
R.G. VASILOV¹, and S.P. SINEOKII²

¹The Research Center *Kurchatovskii Institute*, 123182, Moscow Russia

²The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, 117545, Moscow Russia

³The Michurinskii State Agrarian University, 393760, Michurinsk, Tambovskaya oblast Russia

e-mail: gotovtsevpm@gmail.com

Immobilization of Microbial Cells for Biotechnological Processes. Current Solutions and Promising Technologies

A review of up-to-date investigations in the field of the development of biotechnological processes based on cells immobilized on various carriers is represented. The results of the study on cell immobilization are discussed, the analysis of the used materials and methods is performed. Some potential and acting applications of systems with immobilized cells for biotechnological processes are described. Possible technological solutions for bioreactors loaded by carriers with immobilized cells were reviewed. This load was shown to make bioreactor construction significantly more efficient.

Key words: cell immobilization, biotechnology, bioreactor, enzymatic catalysis, nanocellulose, synthetic peptides.

* Author for correspondence.