

УДК 606:579.6

Дрожжи *Debaryomyces hansenii* в органосиликатной оболочке как основа гетерогенного биокатализатора

© 2017 г. О.Н. ПОНАМОРЕВА^{1,*}, Е. Л. АФОНИНА¹, О.А. КАМАНИНА¹, Д.Г. ЛАВРОВА¹, В.А. АРЛЯПОВ¹, В.А. АЛФЕРОВ¹, А.М. БОРОНИН²

¹ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, 300012

²ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрябина», Российская академия наук, Московская обл., Пушкино, 142290

e-mail: olgaponamoreva@mail.ru*

Поступила 11.11.2016 г.

Принята в печать 26.12.2016 г.

Продемонстрированы возможности мягких методов золь-гель инкапсулирования для формирования вокруг клеток дрожжей *Debaryomyces hansenii* защитных оболочек на основе ормосила (органомодифицированного кремнезема). Процесс инкапсулирования включал самопроизвольное формирование 3D-структуры «клетка в оболочке». Физиологическую активность инкапсулированных дрожжей определяли, измеряя дыхательную активность микроорганизмов в БПК-биосенсоре, содержащем инкапсулированные в ормосил клетки дрожжей. Установлено, что капсулы вокруг микробных клеток не мешают диффузии к клеткам субстратов и демонстрируют отличные защитные функции по отношению к экстремальным факторам окружающей среды (ионам тяжелых металлов, крайним значениям pH, УФ-излучению). Разработанный БПК-биосенсор по ряду основных характеристик (чувствительность, стабильность, воспроизводимость результатов измерения) превосходит описанные в литературе биосенсоры. Полученные результаты важны для разработки инновационных методов инкапсулирования живых клеток и создания стабильных биокатализаторов с целью применения в биотехнологии и экологии.

Ключевые слова: биосенсор, биохимическая потребность в кислороде, гетерогенный биокатализатор, золь-гель, «клетка в оболочке», органомодифицированные силикагели (ормосилы), *Debaryomyces hansenii*.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-44-53

Одним из эффективных подходов к интенсификации и повышению экономической привлекательности современных биотехнологических процессов является применение иммобилизованных микроорганизмов, что позволяет значительно упростить технические решения по сравнению с использованием клеточных суспензий. Иммобилизованные клетки сохраняют жизнеспособность и высокую концентрацию в ограниченном пространстве в течение длительного времени, что

создает им конкурентные преимущества при использовании в промышленной и экологической биотехнологии [1, 2].

Микрокапсуляция является современным методом иммобилизации микроорганизмов и заключается в получении структур, представляющих собой клетки, окруженные полупроницаемой оболочкой. Искусственные оболочки защищают клетки от воздействия физических и химических стрессовых факторов, поэтому микроорганизмы

Список сокращений: БПК – биологическая потребность в кислороде; ГГС – глюкозо-глутаматная смесь; КОЕ – колониеобразующая единица; МТЭС – метилтриэтоксисилан; ПЭГ – полиэтиленгликоль 3000; СЭМ – сканирующая электронная микроскопия; ТЭОС – тетраэтоксисилан; УФ – ультрафиолетовый; BSE (Back Scattered Electrons) – обратно отраженные электроны; SE (Secondary Electrons) – вторичные электроны.

в синтетической капсуле иногда называют «искусственными спорами», подчеркивая их схожесть с природными спорами микроорганизмов в отношении защищенности живых клеток [3]. Такая структура, как «клетка в защитной оболочке», может являться стабильным биокатализатором, обладающим значительным инновационным потенциалом [4].

В природе существуют примеры одноклеточных живых организмов с естественной защитной оболочкой, одним из которых являются диатомовые водоросли. Диатомеи способны формировать силикатные капсулы, образуя экзоскелет для обеспечения механически прочной структуры и защиты от неблагоприятных факторов окружающей среды, включая воздействие других микроорганизмов [5]. Диатомовые водоросли вдохновили исследователей на создание клеток в минеральной оболочке на основе соединений кремния – силикагелей (SiO_2) или органомодифицированных силикагелей (ормосилов). Такие оболочки способны удерживать воду без значительного набухания, химически и биологически инертны, обладают механической прочностью. При этом органомодифицированные силикагели отличаются большей гибкостью по сравнению с гелями на основе SiO_2 и их пористость можно контролировать, что обеспечивает комфортное окружение клеток и высокую скорость диффузионных потоков веществ [6].

Для получения указанных материалов обычно применяют золь-гель методы, которые не требуют энергоемкого, дорогостоящего оборудования, являются экономичными и экологически чистыми. Однако главным преимуществом этих методов является то, что реакции золь-гель синтеза протекают в мягких условиях, что важно при иммобилизации живых клеток [7]. Исходными соединениями для синтеза могут служить кремнийорганические соединения, например алкоксисиланы и алкилалкоксисиланы, которые гидролизуются с последующей конденсацией, формируя частицы золя, а затем гели. Структура образующихся силикагелей зависит от различных факторов: строения силановых предшественников – алкоксисиланов и алкилалкоксисиланов с негидролизруемыми Si-C связями, их концентрации и соотношения, pH среды, типа катализатора, а также присутствия в системе других веществ – органических растворителей, амфифильных соединений, водорастворимых полимеров и даже клеток.

При гелеобразовании в присутствии клеток силановые предшественники, как правило, формируют монолитные гели, в которых иммобилизованы клетки микроорганизмов [8–10]. Для по-

лучения оболочек вокруг клеток необходимо применение специальных технологий (например, обеспечивающих определенные газо-фазные условия золь-гель синтеза) или формирование на клеточной поверхности каталитической матрицы в виде полиэлектролита или липидного слоя для направленного образования наноструктурированного оксида кремния у поверхности клеток [3].

Ранее нами были предложены простые и мягкие условия золь-гель синтеза, при которых происходит самопроизвольное образование органосиликатной капсулы вокруг клеток дрожжей [11]. Тогда нам впервые удалось проследить динамику формирования частиц золя и фрактальной структуры геля на поверхности дрожжевых клеток и выявить непосредственное участие дрожжей в самопроизвольном образовании 3D-структуры типа «клетка в оболочке» [12]. Следует отметить, что в процессе золь-гель синтеза при гидролизе и поликонденсации алкоксисиланов выделяется спирт, который может быть токсичен для живых клеток. В отличие от маслянистых дрожжей *Cryptococcus curvatus* ВКМ Y-3288, метилотрофные дрожжи *Pichia angusta* ВКМ Y-2559, для которых спирты являются субстратами, сохраняли свою активность после инкапсулирования в предложенных нами условиях золь-гель синтеза. Это позволило использовать их инкапсулированную форму при разработке биочувствительной системы для определения метанола [12] и биофильтра для утилизации метанолсодержащих стоков [13]. В то же время, известно [13], что уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans* в таких же условиях не капсулируются, а значит нельзя утверждать, что другие микроорганизмы также могут участвовать в формировании защитной оболочки на своей поверхности и тем более сохранять при этом свою активность.

Дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 (*D. hansenii*) благодаря своей гало-, осмо- криотолерантности и способности окислять широкий спектр различных субстратов, в том числе некоторые ксенобиотики, обладают значительным потенциалом в экобиотехнологии [14]. *D. hansenii* в защитной оболочке из ормосила должны иметь значительные преимущества как биокатализаторы. Кроме того, расширение круга микроорганизмов для изучения золь-гель процессов формирования органосиликатных оболочек вокруг живых клеток вносит вклад в развитие данного метода, позволяющего получать эффективные и стабильные гетерогенные биокатализаторы с 3D-структурой типа «клетки в оболочке».

Целью данной работы было выявление защитной функции образовавшейся капсулы из ормосила для живых клеток дрожжей *Debaryomyces hansenii*, а также других важных характеристик полученных клеток в оболочке, как биокатализаторов в составе БПК-биосенсора на основе кислородного электрода.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Культивирование микроорганизмов

Клетки штамма *Debaryomyces hansenii* ВКМ У-2482 выращивали на богатой минеральной среде (жидкая глюкозо-пептонная питательная среда) следующего состава, г/л: глюкоза (Sigma, США) – 10; пептон (Sigma) – 5; дрожжевой экстракт (Sigma) – 0,5. Клетки культивировали аэробно в течение 18–20 ч в колбах объемом 750 мл при температуре 29°C. Затем полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре и 4000 г 10 мин. Далее осадок биомассы трижды промывали 20 мМ фосфатным буфером (Sigma), pH 6,8, каждый раз осаждая его центрифугированием в течение 5 мин. Биомассу взвешивали и хранили в микропробирках при температуре 4°C.

Оценка физиологической активности клеток

Физиологическую активность выращенных клеток оценивали по изменению дыхательной активности микроорганизмов в разработанном БПК-сенсоре при добавлении субстрата. Для этого $7 \cdot 10^{-4}$ мл суспензии клеток наносили на пористый стекловолоконный фильтр Whatman GF/A (Sigma) и подсушивали в течение 15 мин. Полученный гетерогенный биокатализатор наносили на поверхность кислородного электрода термооксиметра «ЭКСПЕРТ-001-4.0.1» («Эконикс-Эксперт», Россия) и перед использованием промывали в течение 5 мин, погружая в фосфатный буферный раствор.

Иммобилизация биоматериала и формирование биораспознающего элемента (микробного электрода)

К 20%-ному раствору ПЭГ (Ferak Berlin, Германия) в фосфатном буферном растворе (0,022 мл) добавляли 0,005 мл суспензии клеток ($(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^9$ КОЕ/мл) в фосфатном буфере (33 мМ, pH 6,8) и перемешивали в течение 5 мин. После этого вносили 0,015 мл ТЭОС (Sigma, США) и 0,085 мл МТЭС (Sigma, США) и вновь перемешивали в течение 5 мин. Затем добавляли 0,005 мл 0,2 М раствора катализатора фторида на-

трия и перемешивали в течение 15 мин. Из смеси отбирали аликвоту объемом 0,007 мл, наносили на пористый стекловолоконный фильтр Whatman GF/A (Sigma) и подсушивали 15 мин. Полученный гетерогенный биокатализатор помещали на поверхность кислородного электрода. Модифицированный микробный электрод перед использованием промывали фосфатным буферным раствором в течение 5 мин.

Биосенсорные измерения

Для проведения исследования использовали модифицированный микробный электрод (см. выше) и pH-метр-иономер-БПК-термооксиметр ЭКСПЕРТ-001-4.0.1 («Эконикс-эксперт», Россия), который позволяет регистрировать содержание растворенного кислорода.

В кювету объемом 5 мл помещали буферный раствор (20 мМ фосфатный буфер, pH 6,8) и анализируемую пробу. Раствор перемешивали магнитной мешалкой (200 об/мин). Пробы вводили автоматическими микропипетками (Biotech, США) переменного объема, мкл: 200–1000, 20–200, 0,5–10. В качестве модельной использовали смесь глюкозы и глютаминовой кислоты (ГТС) в массовом соотношении 1:1, которая применяется в качестве стандарта в определении БПК₅ (т.е. анализе БПК в течение 5 дней) в Российской Федерации и за рубежом. Согласно нормативной документации [15], БПК₅, равная 205 мг/л, соответствует раствору, содержащему 150 мг/л глюкозы и 150 мг/л глютаминовой кислоты (БПК₅ = $0,68 \cdot (\text{концентрация ГТС})$).

Сканирующая электронная микроскопия

Для приготовления образцов клеток *D. hansenii* каплю клеточной суспензии ($(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл) наносили на поверхность токопроводящего скотча (JEOL, Япония) и инкубировали в течение 5 мин; после этого каплю промокали фильтровальной бумагой и поверхность промывали несколько раз водой для удаления несвязавшихся клеток. Затем скотч с образцом монтировали на поверхности объектодержателя и проводили напыление платиново-углеродной смесью с помощью вакуумно-напылительной установки JEE-4X (JEOL, Япония). СЭМ-анализ проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-6510 LV (JEOL) в режиме низкого вакуума (30 Па) для регистрации обратно отраженных электронов (BSE), а также в режиме высокого вакуума для регистрации вторичных электронов (SE).

Влияние ионов тяжелых металлов на дыхательную активность иммобилизованных микроорганизмов

Перед внесением в измерительную кювету определяемого образца к буферному раствору добавляли соли различных тяжелых металлов (см. ниже) до концентрации, равной ПДК для водных источников или превышающей ее в 10, 25, 50 и 100 раз.

Влияние pH на дыхательную активность иммобилизованных микроорганизмов

В измерительную кювету помещали буферный раствор Мак-Ильвена (Sigma) с различными значениями pH в интервале от 2 до 12 и затем вносили анализируемую пробу.

Определение БПК₅

В качестве референсного метода для определения БПК₅ использовали стандартный метод разбавления. Анализ проводили в соответствии с методикой [15]. Определение содержания растворенного кислорода проводили с использованием БПК-термооксиметра ЭКСПЕРТ-001-4.0.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3D-структура инкапсулированных дрожжей

В качестве силановых предшественников для синтеза органомодифицированных силикагелей использовали ТЭОС (15% об.), который гидро-

лизует полностью, и МТЭС (85% об.), который содержит негидролизующуюся связь Si-C. В условиях основного катализа (реакция, катализируемая NaF) при нейтральных значениях pH скорость гидролиза лимитирует скорость всего процесса, что приводит к образованию микрочастиц золя и формированию пористой структуры геля.

На микрофотографиях исследуемого образца наблюдаются преимущественно сферы с шероховатой поверхностью, которые представляют собой отдельные дрожжевые клетки, покрытые органосиликатной оболочкой, при этом клетки и золь-гель образуют единую структуру материала (рис. 1, а).

Ранее самопроизвольное формирование похожих структур наблюдали с участием метилотрофных дрожжей *Pichia angusta* ВКМ Y-2559 и маслянистых дрожжей *Cryptococcus curvatus* ВКМ Y-3288 [12].

Таким образом, независимо от типа дрожжей в предложенных нами условиях золь-гель синтеза формируются одинаковые структуры гибридных материалов: клетки дрожжей служат центрами формирования органосиликатной матрицы и образование капсулы происходит вокруг каждой клетки. Иными словами, разные виды дрожжей участвуют в формировании сходных структур типа «клетка в органосиликатной оболочке», т.е. функциональная характеристика поверхности дрожжевых клеток, по-видимому, играет определяющую роль в самоорганизации 3D-архитектур гибридного биоматериала.

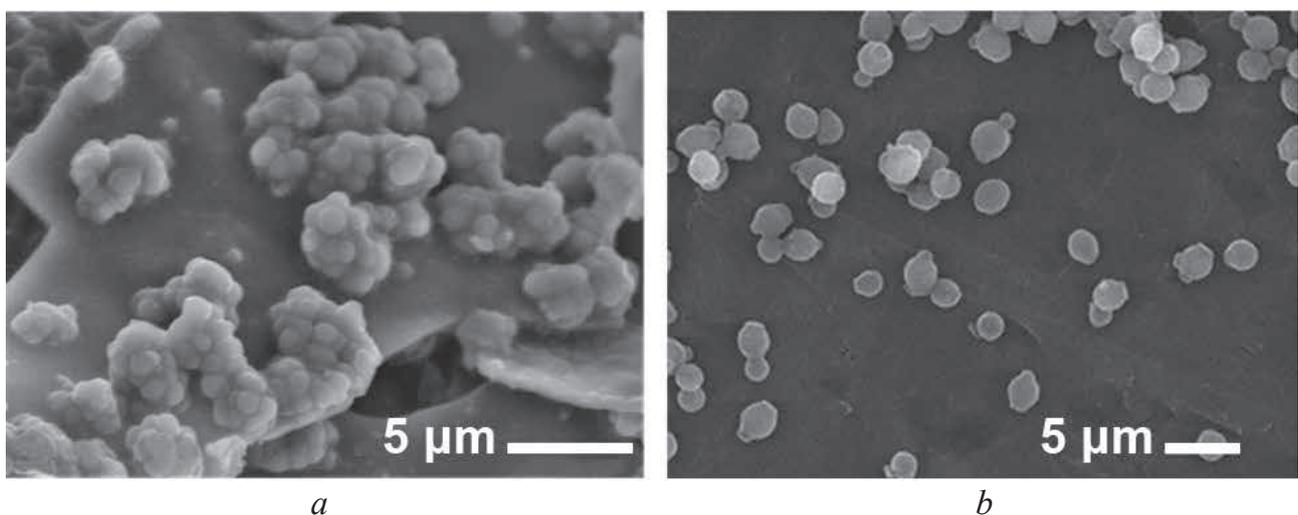


Рис. 1. Результаты СЭМ инкапсулированных в золь-гель матрицу (а) и неинкапсулированных (б) клеток дрожжей *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482

Fig. 1. SEM of sol-gel matrix-encapsulated (a) and non-encapsulated (b) *Debaryomyces hansenii* VKM Y-2482 yeast cells

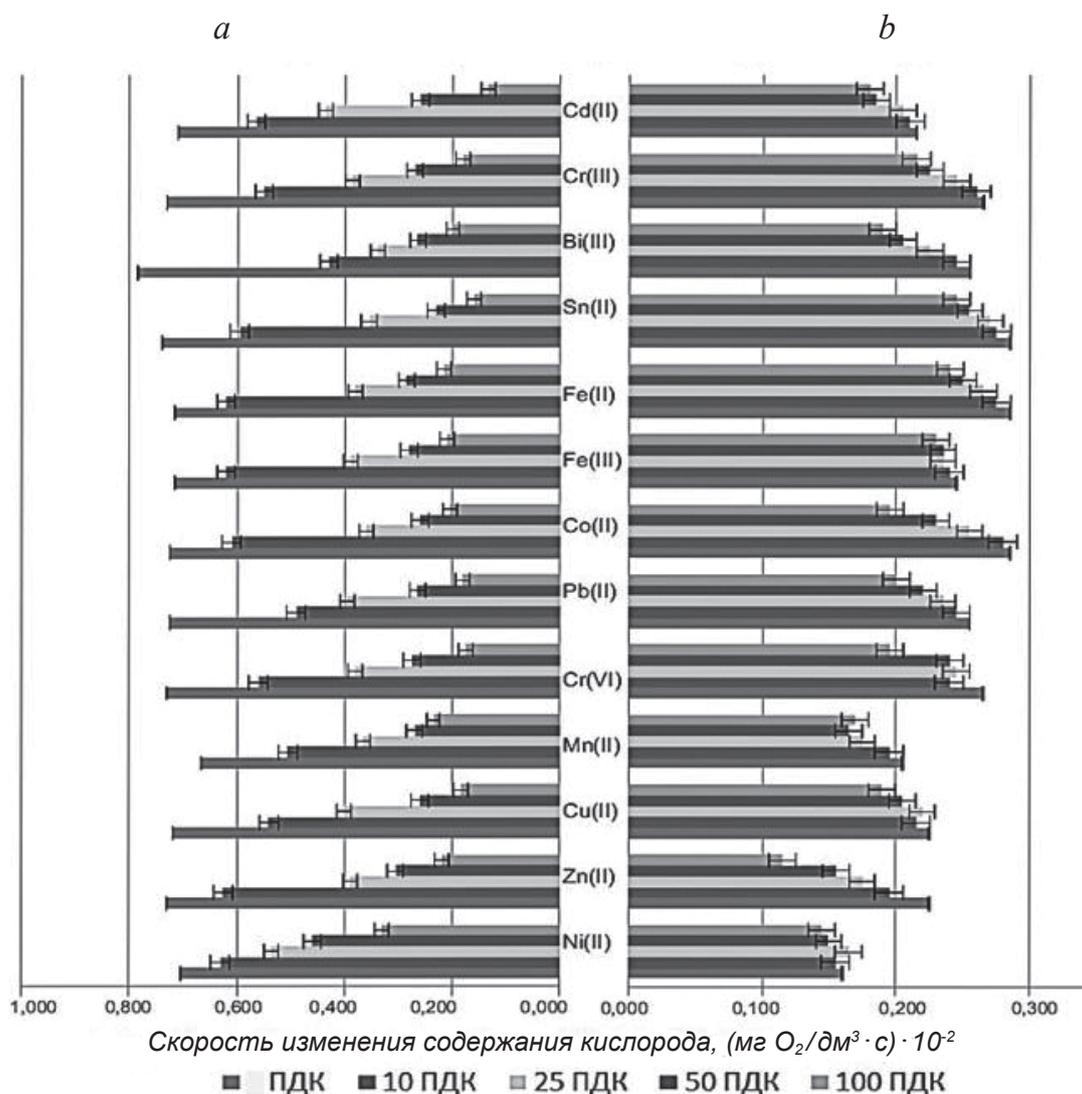


Рис. 2. Влияние ионов тяжелых металлов на дыхательную активность неинкапсулированных (*a*) и инкапсулированных (*b*) клеток дрожжей *D. hansenii* VKM Y-2482. Используются значения ПДК из нормативно закрепленного документа ГН 2.1.5.1315-03, Россия

Fig. 2. Effect of heavy metal ions on respiratory activity of suspension (*a*) and encapsulated (*b*) cells of *D. hansenii* VKM Y-2482 yeast. BOD values from Russian normative documents were used

Одним из показателей физиологической активности инкапсулированных микроорганизмов является их дыхательная активность, которую можно определить с помощью термооксиметра. Если клетки микроорганизмов поместить на поверхность кислородного электрода, то можно оперативно регистрировать изменение содержания кислорода в приэлектродном пространстве. Такой подход используется при разработке БПК-биосенсоров, при этом в качестве субстрата применяют ГГС.

Загрязненные стоки могут содержать токсичные для микроорганизмов соединения. Для выяснения защитных функций органосиликатной оболочки регистрировали клеточное дыхание в присутствии стрессовых факторов.

Роль органосиликатной оболочки в защите клеток дрожжей от токсического действия ионов тяжелых металлов

Защитное действие органосиликатной капсулы по отношению к ионам тяжелых металлов определяли на основе сравнительного анализа дыхательной активности инкапсулированных и неинкапсулированных микроорганизмов в ходе окисления ГГС в присутствии данных ионов (рис. 2).

Как показано на рис. 2, *b*, значения ответа биосенсора на основе инкапсулированных дрожжей практически не меняются в зависимости от наличия или отсутствия ионов металлов. При

превышении ПДК в 100 раз снижение ответа у биосенсора на основе покрытых оболочкой клеток составляет не более 20%, в то время как дыхательная активность дрожжей, не покрытых силикатной капсулой, снижается в несколько раз (см. рис. 2, а). Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что органосиликатное покрытие, которое образуется вокруг клеток дрожжей, выполняет защитную функцию.

Роль органосиликатной оболочки в защите клеток дрожжей от экстремальных значений рН среды

Инкапсулированные дрожжи *D. hansenii* – перспективные биокатализаторы для использования в экобиотехнологии. Сточные воды промышленных производств могут иметь сильно кислую или сильно щелочную реакцию, поэтому важно выяснить, насколько органосиликатная капсула способна защищать клетки при экстремальных значениях рН (рис. 3).

Наибольшая дыхательная активность клеток наблюдается в диапазоне рН от 5 до 9, что согласуется с оптимальным рН-диапазоном функционирования этих дрожжей [16]. При низких значениях рН дыхательная активность незащищенных капсулой клеток ингибируется полностью, тогда как инкапсулированные клетки сохраняют 50% активности, характерной для рН 8,0, даже при рН 2. Похожий результат наблюдается в щелоч-

ной среде. Важно отметить, что при возвращении оптимального значения рН буферного раствора к средним значениям происходит полное восстановление активности инкапсулированных клеток, в то время как активность клеток, не имеющих защитной капсулы, ингибируется необратимо. Подобный эффект можно объяснить тем, что вокруг клеток формируется стабильная гидратная оболочка и даже при рН 2 степень протонирования молекул воды в ней недостаточна для того, чтобы привести к ингибированию физиологической активности клеток.

Роль органосиликатной оболочки в защите клеток дрожжей от УФ-облучения

Известно, что материалы на основе SiO_2 непроницаемы для коротковолнового и средневолнового диапазона ультрафиолетового излучения. УФ-излучение часто используют в микробиологии, биотехнологии и медицине для обеззараживания оборудования, поэтому важно понимать, насколько эффективно в этих условиях органосиликатные капсулы защищают живые клетки. Характеристики БПК-биосенсора с биочувствительными элементами на основе инкапсулированных и неинкапсулированных клеток изучали после воздействия УФ-излучения в течение 5 ч при $\lambda=254$ нм. Дыхательная активность дрожжей в органосиликатной оболочке в результате воздействия практически не изменилась, в то время как незащищенные капсулой клетки погибли.

Полученные результаты указывают, что капсулы из ормосила осуществляют универсальную защиту клеток *D. hansenii* от различных негативных факторов среды. Эти данные свидетельствуют, в частности и о том, что УФ-облучение можно использовать для периодической очистки используемого биокатализатора от посторонней микрофлоры.

Способность инкапсулированных клеток *D. hansenii* к окислению различных субстратов

Одним из важнейших требований к биокатализаторам в экобиотехнологии является способность утилизировать широкий спектр органических соединений. Важно было выяснить, будет ли органосиликатная оболочка служить для клеток барьером к различным субстратам и препятствовать их окислению (рис. 4).

Из рис. 4 видно, что инкапсулированные дрожжи *D. hansenii* окисляют спирты, сахара, аминокислоты и органические кислоты, а также способны метаболизировать ароматические и

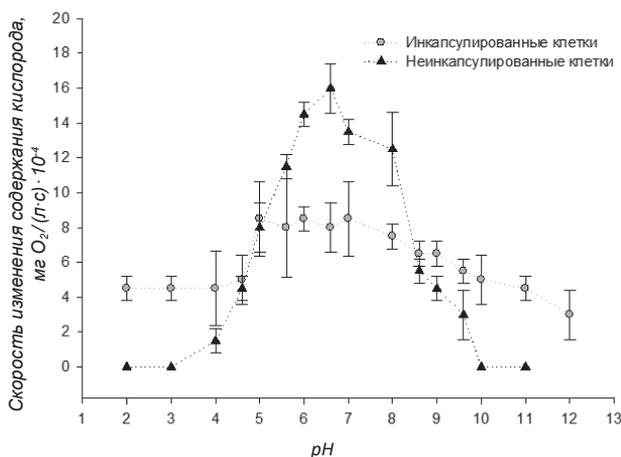


Рис. 3. Зависимость дыхательной активности инкапсулированных и неинкапсулированных клеток дрожжей *D. hansenii* ВКМ Y-2482, измеренной с помощью БПК-биосенсора, от рН среды

Fig. 3. Dependency of respiratory activity of encapsulated and suspension cells of *D. hansenii* VKM Y-2482 measured by BOD-biosensor depending on medium pH

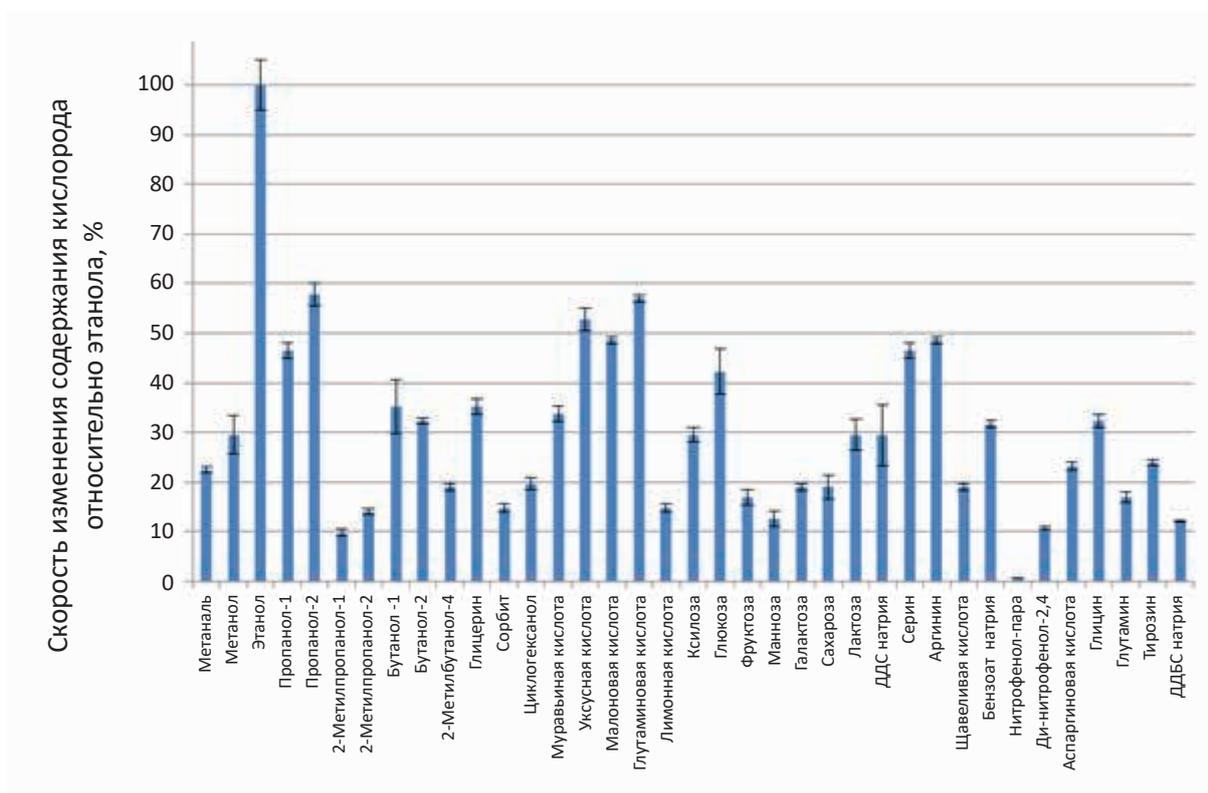


Рис. 4. Субстраты, окисляемые дрожжами *D. hansenii* ВКМ Y-2482, инкапсулированными в ормосил (ответы сенсора приведены в % от ответа на добавление этанола)

Fig. 4. Substrates that are oxidized by ORMOSIL-encapsulated *D. hansenii* ВКМ Y-2482 yeast (bisensor signals are given in % of the response to the ethanol addition)

поверхностно-активные соединения. Указанные компоненты содержатся как в промышленных, так и в хозяйственных стоках, что обуславливает интерес к использованию данного биокатализатора в экобиотехнологии.

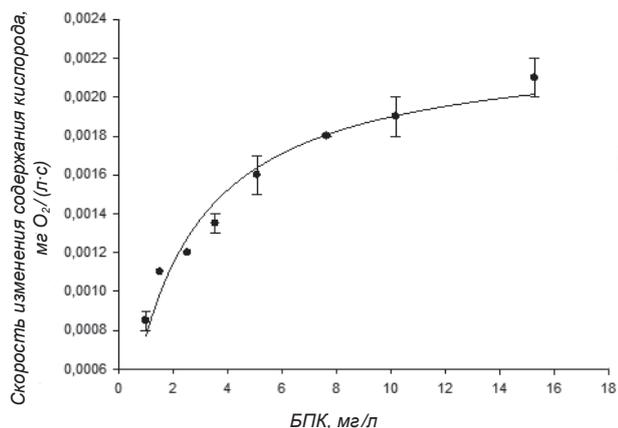


Рис. 5. Калибровочная кривая активности разработанного БПК-биосенсора в зависимости от концентрации субстрата

Fig. 5. Calibration dependency of designed BOD-biosensor on substrate concentration

Важно отметить, что, согласно полученным данным, органосиликатная оболочка не препятствует диффузии окисляемых субстратов к клеткам.

Свойства разработанного БПК-биосенсора на основе инкапсулированных дрожжей

Кривая зависимости ответа БПК-биосенсора от содержания ГГС имеет вид гиперболы, что определяется кинетикой ферментативного окисления субстратов микроорганизмами (рис. 5).

Характеристики разработанного БПК-биосенсора на основе дрожжей *Debaryomyces hansenii* сравнивали со свойствами других биосенсоров (таблица). Биосенсор на основе *D. hansenii* в ормосиле характеризуется в 10 раз более высокой чувствительностью (большим коэффициентом чувствительности) по сравнению с биосенсором на основе этих дрожжей, иммобилизованных в гидрогеле поливинилового спирта [17]. Стабильность медиаторного биосенсора почти втрое ниже, чем у разработанного устройства [18]. Таким образом, клетки дрожжей *D. hansenii*, покрытые органосиликатной оболочкой, могут стать основой БПК-биосенсора, характеризующегося повышенной чувствительностью и стабильностью.

Сравнение свойств разработанного БПК-биосенсора на основе дрожжей *D. hansenii* ВКМ Y-2482 и других известных биосенсоров

Comparison of characteristics of designed BOD-biosensor based on *D. hansenii* ВКМ Y-2482 yeast and other known biosensors

Характеристика	Биосенсор на основе дрожжей, иммобилизованных		
	в кремнийорганической золь-гель матрице	в пленке поливинилового спирта [4]	на графито-пастовом электроде [2]
Тип преобразователя	Кислородный электрод	Кислородный электрод	Медиаторный биосенсор
Коэффициент чувствительности	0,0480±0,0001 мин ⁻¹	0,0045±0,0003 мин ⁻¹	0,40±0,01 (нА·л)/мгО ₂
Диапазон определяемого содержания, мг/л	0,5–5	0,7–206,7	375–1400
Стабильность, сут	40	30	15
Относительное стандартное отклонение измерения, %	6,7	4,2	4

Для апробации и коррелятивной оценки БПК-биосенсора были взяты восемь образцов речной и колодезной воды, а также сточные и талые воды в Тульской области. Статистический анализ результатов определения БПК показал, что выборки, полученные двумя методами, однородны по воспроизводимости (рис. 6).

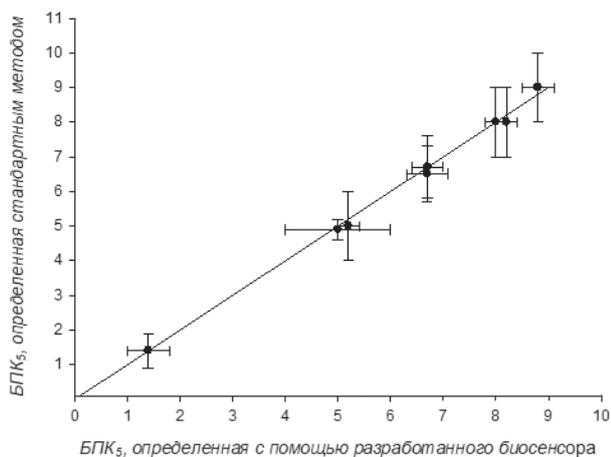


Рис 6. Корреляция результатов определения БПК с помощью разработанного биосенсора и стандартным методом (см. «Условия эксперимента»)

Fig. 6. Correlation of BOD determination results by designed biosensor and by standard method (see EXPERIMENTAL section)

Как видно из полученных данных, значения БПК, измеренные с помощью биосенсора на основе инкапсулированных дрожжей и стандартным методом, одинаковы в пределах ошибки определения. Таким образом, биосенсор на основе инкапсулированных в ормосил дрожжей *D. hansenii* является перспективным инструментом для мониторинга загрязнений сточных вод.

В ходе настоящего исследования инкапсулированные в ормосил микроорганизмы были получены в мягких условиях золь-гель синтеза из силиановых предшественников (тетраэтоксисилана и метилтриэтоксисилана в присутствии полиэтиленгликоля) при значениях pH, близких к нейтральному. При этом происходит направленное образование органосиликатных капсул вокруг дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 и жизнеспособность дрожжей сохраняется, несмотря на выделяющийся в процессе синтеза спирт. Оболочка вокруг живых клеток проявляет универсальные защитные функции, что представляет интерес при разработке стабильных гетерогенных биокатализаторов на основе дрожжей. Инкапсулированные дрожжи *Debaryomyces hansenii* ВКМ Y-2482 демонстрировали высокую окислительную активность в отношении большого числа субстратов даже в экстремальных условиях, что свидетельствует об их значительном потенциале для применения в экобиотехнологии и биотехнологической промышленности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ и правительства Тульской области № 16-43-710183, а также гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук, договор № 14.Z56.16.5425-МК.

ЛИТЕРАТУРА

- Verica, M., Coradin, T. Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Immobilized cells, John Wiley & Sons, Inc. 2009 p. 965–976
- Michelini, E. Roda A. Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402(5), 1785–1797. doi: 10.1007/s00216-011-5364-x
- Yang, S. H., Yang, S., Hong, D. et al. Artificial spores: cytocompatible encapsulation of individual living cells within thin, tough artificial shells. *Small*, 2013, 9(2), 178–186. doi: 10.1002/asia.201601237
- Wang, S. and Z. Guo. Bio-inspired encapsulation and functionalization of living cells with artificial shells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014, 113(1), 483–500. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.09.024
- Hamm, C. E., Merkel, R., Springer, O., et al. Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature*, 2003, 421(6925), 841–843. doi: 10.1038/nature01416
- Dickson D. J., Ely R. L. Silica sol-gel encapsulation of cyanobacteria: lessons for academic and applied research. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2013, 97(5), 1809–1819. doi: 10.1007/s00253-012-4686-8
- Blondeau, M. and T. Coradin. Living materials from sol-gel chemistry: current challenges and perspectives. *J. Materials Chemistry*, 2012, 22(42), 22335–22343. doi: 10.1039/C2JM33647B
- Depagne, C., Depagne, C., Roux, C., Coradin, T. How to design cell-based biosensors using the sol-gel process. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400(4), 965–976. doi: 10.1007/s00216-010-4351-y
- Ciriminna, R., Ciriminna, R., Fidalgo, A., et al. The sol-gel route to advanced silica-based materials and recent applications. *Chem. Rev.*, 2013, 113(8), 6592–6620. doi: 10.1021/cr300399c
- Kuncová, G. and J. Trögl. Physiology of microorganisms immobilized into inorganic polymers. Handbook of Inorganic Chemistry Research. [Ed. D. A. Morrison], Nova Science Publishers, Inc. 2010, 53–101. doi: 10.1007/s10971-017-4333-z
- Kamanina O.A., Fedoseeva, D G, Rogova, T V, et al. Synthesis of organosilicon sol-gel matrices and preparation of heterogeneous biocatalysts based on them. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2014. 87(6), 761–766.
- Ponamoreva O.N., Kamanina, O A, Alferov, V A., et al. Yeast-based self-organized hybrid bio-silica sol-gels for the design of biosensors. *Biosens. Bioelectron*, 2015, 67(0), 321–326. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.045
- Kamanina O.A. Lavrova, D G, Arlyapov, V A, et al. Silica sol-gel encapsulated methylotrophic yeast as filling of biofilters for the removal of methanol from industrial wastewater: article. *Enzyme Microb. Technol.*, 2016, 92, 94–98. doi: 10.1016/j.enzmictec.2016.06.014
- Arlyapov V. Kamanin S, Ponamoreva O, and Reshetilov A. Biosensor analyzer for {BOD} index express control on the basis of the yeast microorganisms *Candida maltosa*, *C. blankii*, and *Debaryomyces hansenii*: article. *Enzyme Microb. Technol.*, 2012, 50(4–5), 215–220. doi: 10.1016/j.enzmictec.2012.01.002
- Lin L., Xiao L.L., Huang S., et al. Novel BOD optical fiber biosensor based on co-immobilized microorganisms in ormosils matrix, *Biosens Bioelectron*, 2006, (21), 1703–1709. doi: 10.1016/j.bios.2005.08.007.
- Ratledge C T.K.-H. In Yeast Biotechnology and Biocatalysis. N. Y.: Marcel Dek, 1990. 253 p.
- Arlyapov V.A., Yudina N.Y., Asulyan L.D., et al. BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* immobilized in poly(vinyl alcohol) modified by N-vinylpyrrolidone, *Enzyme Microb. Technol.* 53 (2013) 257–262. doi: 10.1016/j.enzmictec.2013.05.004
- Бабкина Е.Е., Арляпов В.А., Беленьких А.В. Алферов В.А. Медиаторный биосенсор на основе дрожжевых клеток *Debaryomyces hansenii* для определения БПК. *Известия Тульского государственного университета Естественные науки*, 2011, 3, 199–209

Yeast *Debaryomyces hansenii* in ORMOSIL Shells as a Heterogeneous Biocatalyst

O.N. PONAMOREVA^{1,*}, E.L. AFONINA¹, O.A. KAMANINA¹, D.G. LAVROVA¹, V.A. ARLIAPOV¹, V.A. ALFEROV¹, and A.M. BORONIN²

¹Tula State University, Tula, 300012, Russia

²Skryabin Institute for Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy Sciences, Pushchino, Moskovskaya Oblast, 142290, Russia

e-mail: olgaPONAMOREVA@mail.ru*

Received November 11, 2016

Accepted December 26, 2016

Abstract—The possibilities of the acceptable sol-gel encapsulation methods to design ORMOSIL (organically modified silica) protective shells around *Debaryomyces hansenii* yeast cells have been investigated. The encapsulation included a spontaneous “cell in shell” 3D structure formation. The physiological activity of the sol-gel encapsulated yeast was determined by measuring the oxidative activity of the BOD biosensor containing the ORMOSIL-encapsulated cells. It was shown that the shells around the microbial cells did not prevent the diffusion of substrates to the cells and showed excellent protective functions with respect to extreme environmental factors (heavy metal ions, pH ultimate values, UV radiation). In addition, it was established that the designed device surpasses in the main characteristics (sensitivity, stability and result reproducibility) some reported biosensors. These results are important to the development of innovative methods of cell encapsulation and design of biocatalysts for biotechnology and ecology.

Key words: biosensor, biochemical oxygen demand, heterogeneous biocatalyst, yeast, sol-gel, encapsulated cells, artificial spore, cell in shell, organically modified silica (ORMOSIL), *Debaryomyces hansenii*.

Acknowledgements—The study was supported by the Russian Fund for Basic Research and Tula Region Government according to the Research Project 16-43-710183 and by a Grant of the President of the Russian Federation for the state support of young Russian PhD scientists (14.Z56.16.5425-MK).

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-4-44-53