

Mikroorganizmy immobilizowane

Unieruchamianie komórek, czyli immobilizacja, to proces, który występuje w środowisku naturalnym lub wywołany jest działalnością człowieka. Polega on na wiązaniu drobno-ustrojów z nośnikiem, tak aby ograniczyć ich swobodny ruch, a jednocześnie zapewnić dostęp do składników odżywczych i odpływ produktów przemiany. Jedną ze stosowanych obecnie definicji unieruchamiania pojęciem tym określa ograniczenie katalitycznej aktywności enzymów lub komórek do wnętrza systemu bioreaktora i zapobieganie ich przechodzeniu do ruchomej fazy unoszącej substrat i produkt.

Pierwsze procesy przemysłowe z użyciem unieruchomionych enzymów wprowadzono w latach 60. XX wieku. W latach 70. i 80. nastąpił dynamiczny rozwój metod unieruchamiania oraz pojawiło się wiele nowych propozycji technologii z użyciem biokatalizatorów unieruchomionych, jednak wiele z nich jedynie w skali laboratoryjnej. Należy przy tym zaznaczyć, że pierwsze przemysłowe zastosowanie komórek unieruchomionych miało miejsce już w 1820 roku i była to mikrobiologiczna produkcja octu metodą Schützenbacha. W procesie tym roztwór etanolu przepływał przez złożę wiórków bukowych, na którym zaadsorbowane były komórki bakterii kwasu octowego.

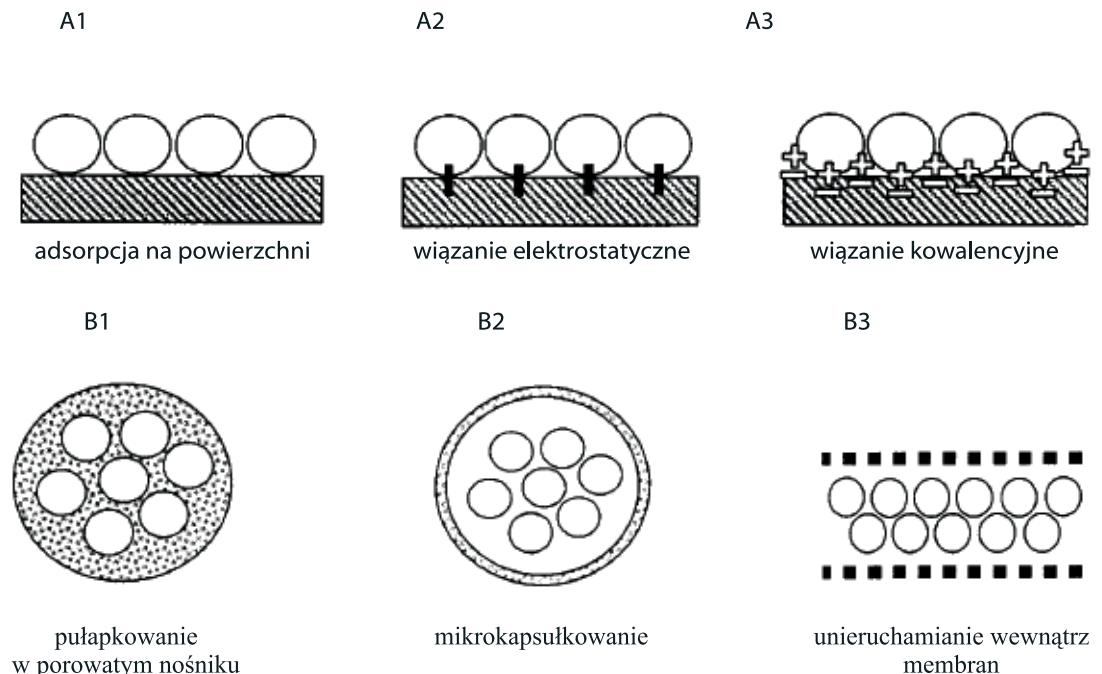
Obecnie jest kilka klasyfikacji metod unieruchamiania. Najpopularniejsza z nich wyróżnia:

- unieruchamianie na powierzchni nośnika,
- unieruchamianie wewnątrz nośnika,
- unieruchamianie bez nośnika.

Unieruchamianie na powierzchni nośnika

Unieruchamianie na powierzchni nośnika występuje, gdy komórki wykazują naturalną skłonność przylegania do pewnych powierzchni lub innych organizmów, ewentualnie czynią to po zastosowaniu odpowiedniego chemicznego czynnika wiążącego.

Rys. 1.
Metody unieruchamiania komórek:
A. Unieruchamianie na powierzchni nośnika,
B. Unieruchamianie wewnątrz nośnika
Źródło: Kourkoutas i wsp., 2004



Jest to relatywnie prosta i tania metoda, która możliwa jest do zastosowania jeśli biokatalizator posiada powinowactwo do nośnika. Podstawą jest elektrostatyczne oddziaływanie między nośnikiem a komórką. Unieruchamianie zachodzi na zasadzie adsorpcji lub adhezji na wewnętrznej lub zewnętrznej powierzchni nośnika, dzięki tworzeniu wiązań van der Waalsa, jonowych, kowalencyjnych, hydrofobowych lub też dzięki kombinacji tych wiązań (rys. 1.A).

Nośnikami stosowanymi w tej metodzie są m.in.: szkło porowate, pochodne celulozy, żywice jonowymienne, ziemia okrzemkowa, wióry bukowe, skały wulkaniczne (pumeks), DEAE-celuloza, bawełna, owoce, a komórki tworzą (błonkę) biofilm na powierzchni nośnika. Obserwowana jest dynamiczna równowaga pomiędzy komórkami zaadsorbowanymi a wolnymi, wywołana przez pH i siły jonowe podłoża.

W przypadku unieruchamiania organizmów, takich jak drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, kluczową rolę w wiązaniu odgrywają oddziaływania jonowe między nośnikiem o dużej gęstości ładunków dodatnich, a licznymi ujemnymi ładunkami na ścianie komórkowej drożdży. Aby zwiększyć zdolność unieruchamiania, sugeruje się zredukowanie siły elektrostatycznego odpychania komórka-nośnik. Ewentualnie dąży się do nadania powierzchni komórki lub nośnika ładunku dodatniego, przez zastosowanie np. polietylenoiminy (PEI) lub aldehydu glutarowego. Modyfikacja nośnika musi być jednak indywidualnie dobierana do unieruchamianych organizmów, ponieważ dodatek czynników aktywnych może powodować redukcję żywotności komórek lub na przykład obniżenie ilości otrzymywanego etanolu. Wiązanie drożdży można zwiększyć także w wyniku dehydratacji powierzchni komórkowej. Dehydratacja może być wynikiem suszenia konwekcyjnego lub liofilizacji, co jest związane z niszczeniem fragmentów struktury komórkowej. Następuje zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych i 10-30% składników wewnątrzkomórkowych przedostaje się do otaczającego podłoża, wchodząc i interakcje z powierzchnią nośnika.

W zależności od rodzaju użytego nośnika ilość unieruchomionych komórek jest różna, co wskazuje że immobilizacja zależy od struktury chemicznej nośnika. Natomiast wydajność adsorpcji drobnoustrojów zależy od ich rodzaju, metabolizmu i wieku oraz cech środowiska.

Sposób unieruchamiania jest bardzo prosty i polega na tym, że do roztworu z namnożonym materiałem biologicznym wprowadza się nośnik i pozostawia na pewien czas, bez mieszania lub z mieszaniem, w celu osadzenia się komórek. W drugim sposobie bioreaktor wypełnia się nośnikiem i wtłacza od góry lub od dołu, namnożone na podłożu płynnym komórki.

Unieruchamianie wewnątrz nośnika

Drugi rodzaj immobilizacji polega na „zamykaniu” komórek w materiałach włóknistych lub porowatych. W metodzie tej wyróżnia się pułapkowanie oraz zamykanie wewnątrz membran półprzepuszczalnych (rys. 1.B).

Pułapkowanie (inkluzja) to unieruchamianie w matrycy żelu, która najczęściej jest w kształcie kuleczki o średnicy 0,3-3 mm, ale może być w formie sferycznej czy dysków. Najpowszechniej stosowany nośnik to: alginian, poza tym stosuje się kappa-karagenian, chitozan, agar, pektynę, żywice epoksydowe, poliakryloamid.

Alginian jest kopolimerem kwasu β -D-mannurowego i α -L-guluronowego, uzyskanym metodą ekstrakcji z brązowych alg *Phaeophyceae*. W obecności kationów dwuwartościowych

(jak Ca^{2+}) kwas alginianowy tworzy porowaty żel, idealny do kolonizacji i uzyskania dużego stężenia biomasy w nośniku. Matrycę polimeru uzyskuje się przez żelowanie w łagodnych warunkach, co umożliwia zamknięcie komórek z minimalną utratą ich aktywności. Najpowszechniej stosowana technika to zawieszanie komórek w alginianie sodu i wkraplanie tej mieszaniny do roztworu chlorku wapnia, w ten sposób otrzymuje się porowate kulki z uwięzionym biokatalizatorem, biomasą mikroorganizmów lub białkiem enzymatycznym (rys. 2).

Zamykanie komórek w żelach nie eliminuje ich ucieczki do fermentowanego podłoża, ponadto, w przypadku drożdży, zachodzi pęknięcie kuleczek pod wpływem powstającego podczas fermentacji CO_2 . W celu ograniczenia tego zjawiska prowadzono m.in. badania nad utwardzaniem kuleczek alginianu wapnia polietylenoiminą i aldehydem glutarowym, karagenianu chlorkiem potasu, a kuleczek żelatyny utlenioną skrobią. Innym rozwiązaniem jest tworzenie płaszczu z alginianu wapnia, który ochrania kuleczki alginianowe z zamkniętymi w środku komórkami drożdży. Dzięki temu komórki, które wydostają się z żelu zatrzymują się w wolnej warstwie między kuleczką a płaszczem.

W immobilizacji wewnątrz nośnika wykorzystuje się również półprzepuszczalne membrany, przez które dyfundują małocząsteczkowe produkty i substraty, natomiast niemożliwa jest migracja cząsteczek biokatalizatora. Biokatalizatory albo zamyka się we wnętrzu kapsułki, która imituje naturalne błony biologiczne, wówczas mówimy o mikrokapsułkowaniu, albo biokatalizator jest oddzielony od środowiska przegrodą membranową w postaci płaskiej „folii” lub w postaci kapilary. W przypadku mikrokapsułkowania stosuje się membrany nylonowe, silikonowe, liposomowe, a także wytwarzane z pochodnych celulozy, a przegrody membranowe otrzymuje się na bazie polimerów, takich jak polichlorek winylu czy polipropylen. Ten sposób unieruchamiania jest jednak rzadko stosowany w przypadku żywych komórek, częściej zamykane są enzymy.

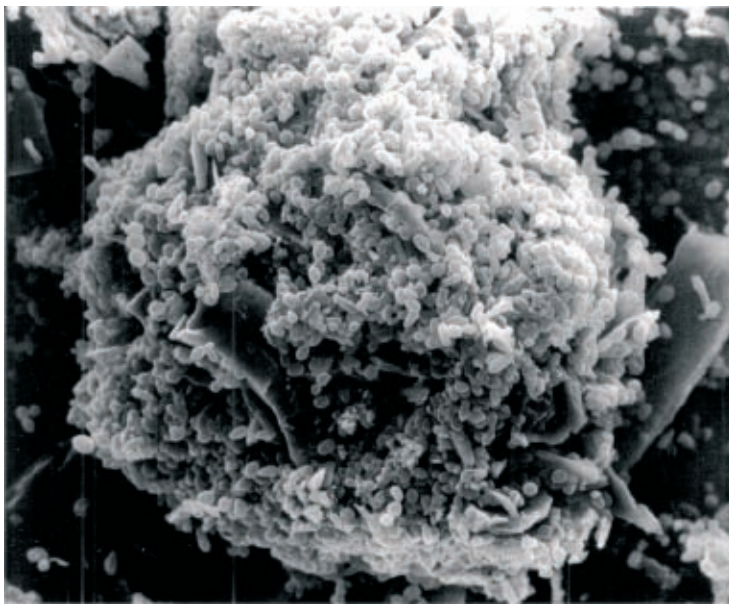
Unieruchamianie bez pomocy nośnika

Ten rodzaj unieruchamiania, określane jako flokulacja, przez niektórych autorów nie jest zaliczany do immobilizacji. Wykorzystuje on zdolność drobnoustrojów, głównie drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i bakterii *Zymomonas mobilis*, do tworzenia skupisk, aglomeratów lub kłaczek, zwłaszcza wówczas, gdy występuje duża koncentracja biomasy. Takie połączenie cząstek biomasy jest stabilne i umożliwia bardzo duże obciążenie biomasy substratem, a więc dużą aktywność mikroorganizmów. W przypadku komórek drożdży flokulacja zachodzi dzięki obecności na powierzchni ściany komórkowej białek lektynowych, określane jako „białkowe wypustki”, które wiążą reszty mannozowe na ścianach sąsiadujących komórek drożdży.



Rys. 2. Kuleczki żelu z unieruchomionymi komórkami [źródło: www.aveka.com]

W przypadku komórek unieruchomionych na powierzchni nośnika, tworzą one często kilka warstw (rys. 3). Powoduje to, że dostęp substratów do warstw położonych najbliżej powierzchni nośnika jest ograniczony, a komórki jednocześnie kontaktują się między sobą i nośnikiem. Upodabnia to warunki bytowania tych komórek do warunków panujących wewnątrz żelu. Zmiany składu i pH pożywki w czasie procesu drastycznie obniżają stopień adsorpcji komórek. Zachodzić może częściowe uwalnianie komórek, które zależy od szybkości przepływu fazy płynnej, turbulencji nad powierzchnią nośnika oraz od autolizy komórek niższych warstw.



Rys. 3.
Komórki drożdży
Saccharomyces bayanus
na kawałku szkła pian-
kowego, powiększenie
x 600
Źródło: materiał własny
autora

Cechy nośników stosowanych do immobilizacji

W metodach immobilizacji ważny jest właściwy dobór nośnika i techniki immobilizacji, ponieważ decydują one o aktywności unieruchomionego biokatalizatora oraz wydajności procesu technologicznego. Uważa się, że dobry nośnik powinien wykazywać następujące cechy:

- obojętność w stosunku do zatrzymywanych mikroorganizmów,
- prostota i łagodność unieruchamiania,
- duża zdolność zatrzymywania komórek,
- wysoka mechaniczna stabilność,
- obojętność chemiczna,
- duża zdolność dyfuzyjna w stosunku do substratu i produktu,
- możliwość regeneracji i kilkakrotnego użycia,
- łatwa dostępność, niski koszt,
- możliwość zastosowania w skali przemysłowej.

Do unieruchamiania drożdży na powierzchni nośnika, powinno się używać materiał makroporowaty, o średnicy porów co najmniej czterokrotnie większej niż średnica komórek. Taka porowatość zapewnia normalny cykl życiowy drożdży (pączkowanie).

W przypadku komórek unieruchomionych na powierzchni nośnika, tworzą one często kilka warstw (rys. 3). Powoduje to, że dostęp substratów do warstw położonych najbliższej powierzchni nośnika jest ograniczony, a komórki jednocześnie kontaktują się między sobą i nośnikiem. Upodabnia to warunki bytowania tych komórek do warunków panujących wewnątrz żelu. Zmiany składu i pH pożywki w czasie procesu drastycznie obniżają stopień adsorpcji komórek. Zachodzić może częściowe uwalnianie komórek, które zależy od szybkości przepływu fazy płynnej, turbulencji nad powierzchnią nośnika oraz od autolizy komórek niższych warstw.

W procesie unieruchamiania metodą pułapkowania ważną jest początkowa koncentracja komórek. Wysoka zawartość komórek w nośniku powoduje zwiększone pękanie kuleczek. W przypadku kuleczek żelu mogą występować problemy z dyfuzją. Dla optymalnego transportu przez warstwę ważną jest zatem wielkość, tekstura i porowatość kuleczek. Zmniejszenie wymiarów kuleczek powoduje zwiększenie dyfuzji. Innym krytycznym punktem jest transport tlenu, ponieważ

jest on rozpuszczalny w małym stężeniu. Optymalna średnica dla organizmów tlenowych jest mniejsza niż dla beztlenowych. Zależy ona od porowatości, koncentracji komórek i tempa zużycia tlenu. Tworzenie koloni przez organizmy wewnątrz żelu ogranicza dyfuzję, stąd w warunkach przemysłowych korzystne są kuleczki z niewielką ilością komórek.

Ponieważ pułapkowanie ogranicza dostęp substratów i tlenu, rozmieszczenie komórek w kuleczkach żelu nie jest jednorodne. W warstwach peryferycznych są korzystniejsze warunki ze względu na większy dostęp substancji odżywczych. Jednocześnie w części centralnej kuleczek jest wyższe, inhibujące stężenie etanolu, powodujące że komórki tworzą warstwę w części zewnętrznej kuleczki, a w części centralnej komórek praktycznie nie obserwuje się.

Ponadto żele alginianowe w kwaśnym środowisku, np. w winie, tracą swe właściwości mechaniczne, a przy dłuższym użyciu mogą ulegać destrukcji, co uniemożliwia ich powtórne wykorzystanie i jest nieekonomiczne.

W przypadku zastosowania mikroorganizmów unieruchomionych w kuleczkach żeli konieczne jest, w warunkach przemysłowych, zastosowanie fermentorów z mieszaniem, ponieważ następuje zginięcie kuleczek pod wpływem sił grawitacji i ciśnienia. W procesach fermentacji alkoholowej zachodzi także inne niekorzystne zjawisko, tj. tworzenie się martwych stref, w których zatrzymywane są produkty niekorzystnie wpływające na przebieg reakcji, np. CO_2 . Kuleczki żeli są natomiast chętnie stosowane w badaniach laboratoryjnych ze względu na łatwość rozdrabniania związaną z liczeniem komórek.

Zalety i wady immobilizacji

Zastosowanie komórek immobilizowanych stwarza korzyści technologiczne oraz ekonomiczne w porównaniu z tradycyjnymi procesami wykorzystującymi komórki wolne. Do korzyści tych można zaliczyć:

- wydłużenie aktywności i stabilności biokatalizatora, ponieważ nośnik może działać ochronnie w przypadku zmian pH, temperatury i składu podłoża,
- zwiększenie gęstości komórek w przeliczeniu na jednostkę objętości fermentora, co prowadzi do wyższej produktywności, skrócenia czasu fermentacji oraz eliminacji fazy namnażania się komórek,
- lepsze wykorzystanie substratu, w związku z czym proces przebiega z wyższą wydajnością,
- możliwość prowadzenia procesów ciągłych,
- ograniczenie występowania zakażeń mikrobiologicznych,
- obniżenie pracochłonności i kosztów procesu, ponieważ biokatalizator wykorzystywany jest przez długi okres czasu.

Jednak w przypadku stosowania komórek immobilizowanych, obok zalet pojawiają się pewne problemy, które nie występują w układach z komórkami wolnymi. Do wad zaliczyć można:

- zmiany metaboliczne wywołane unieruchomieniem i długotrwałym wykorzystaniem tych samych komórek,
- problemy ze skuteczną dyfuzją substratów i produktów,
- problemy z długotrwałą stabilnością nośnika,
- wymywanie komórek z nośnika.
- Stąd cały czas prowadzone są badania nad doбором do różnych procesów technologicznych zarówno metod immobilizacji, jak i nośników.

Literatura

1. Alteriis E.,-de, Porro D., Romano V., Parascandola P., 2001: Relation between growth dynamics and diffusional limitations in *Saccharomyces cerevisiae* cells growing as entrapped in an insolubilised gelatin gel. *FEMS Microbiol. Lett.*, 195, 245-251.
2. Bednarski W., Reps A., 2001, *Biotechnologia żywności*, praca zbiorowa, Wyd. Nauk.-Tech., Warszawa
3. Bekatorou A., Koutinas A.A., Kaliafas A., Kanellaki M., 2001: Freeze-dried *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on gluten pellets for glucose fermentation. *Process Biochem.*, 36, 549-557
4. Bonin S., 2006: Zastosowanie mikroorganizmów immobilizowanych w winiarstwie. *Żywność-Nauka-Technologia-Jakość*, 3, 48, 5-15
5. Divies Ch., Cachon R., Cavin J.F. Prevost H., 1994: Immobilized cell technology in wine production. *Critical Rev. Biotech.*, 14 (2), 135-153.
6. Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R., Koutinas A.A., 2004: Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.*, 21, 377-397.
7. Norton S., D'Amore T., 1994: Physiological effects of yeast cell immobilization: application for brewing. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 16, 365-375
8. Núñez M.I., Lema I.M., 1987: Cell immobilization: application to alcohol production. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 9, 642-650
9. Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Verachtert H., Delvaux F.R., 2003: Yeast flocculation: what brewers should know. *J. Appl. Microbiol.*, 61, 197-205

