

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-111

**ИНКАПСУЛИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* MG1655 В ГИДРОГЕЛИ
НА ОСНОВЕ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯТОВ КРЕМНИЯ: ЗОЛЬ-ГЕЛЬ СИНТЕЗ,
СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ОЦЕНКА ДЫХАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ***

**ENCAPSULATION OF *ESCHERICHIA COLI* MG1655 BACTERIA IN HYDROGELS
BASED ON SILICON POLYETHYLENE GLYCOLATES: SOL-GEL SYNTHESIS, STRUCTURAL
FEATURES AND RESPIRATORY ACTIVITY ESTIMATION**

Е. С. Филиппова¹, А. Н. Звонарев², Д. Г. Лаврова¹

¹Лаборатория экологической и медицинской биотехнологии, НИЦ «БиоХимТех» ТулГУ

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пушchino

E. S. Filippova¹, A. N. Zvonarev², D. G. Lavrova¹

¹Laboratory of Ecological and Medical Biotechnology, SRC "BioChemTech" Tula State University

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino

✉katya.filippova010197@gmail.com

Аннотация

Исследована возможность применения органо-неорганических гидрогелей на основе полиэтиленгликолятов кремния (Si-ПЭГ) для эффективного инкапсулирования грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* MG1655. Инкапсулирование проводилось в условиях одностадийного золь-гель синтеза. Подтверждено образование оболочки из Si-ПЭГ вокруг клеток. Клетки микроорганизмов сохраняют свою жизнеспособность после инкапсулирования более одной недели.

Abstract

The possibility of using organo-inorganic hydrogels based on silicon polyethylene glycolates (Si-PEG) for effective encapsulation of Gram-negative bacteria *Escherichia coli* MG1655 was investigated. Encapsulation was carried out under the conditions of one-step sol-gel synthesis. The formation of a Si-PEG shell around the cells was confirmed. Microbial cells remain viable after encapsulation for more than 1 week.

В биотехнологических процессах инкапсулированные микроорганизмы используются для обеспечения стабильности и повышения эффективности ферментации и получения ценных вторичных метаболитов. Особенностью использования целых клеток микроорганизмов, по сравнению с отдельными ферментами, является сохранение всех белковых комплексов, транспортных механизмов и коферментов, необходимых для биохимических реакций, которые дорого и трудоемко воспроизводить *in vitro*. Инкапсуляция предотвращает потерю мутантных штаммов, что важно как с биотехнологической, так и с экологической точки зрения. Перспективными матрицами для инкапсуляции живых клеток являются органо-неорганические гидрогели на основе кремнезема [1], которые формируются в мягких условиях золь-гель синтеза, захватывая при этом клетки в сетевую трехмерную структуру. Полиэтиленгликоляты кремния используются в качестве прекурсоров при синтезе кремнийорганических композитов для медицинских и биотехнологических применений [2, 3]. Их преимуществом перед традиционными предшественниками алкоксиланами и алкилалкоксиланами на основе одноатомных спиртов является то, что гидрофильные полимеры не вызывают денатурации и (или) осаждения биологических макромолекул. Впервые полиэтиленгликолят кремния был применен для инкапсуляции метилотрофных дрожжей *Ogataea polymorpha* ВКМ У-2559 [4].

В данной работе в качестве объекта инкапсулирования в условиях одностадийного золь-гель синтеза в гидрогели из полиэтиленгликолята кремния использовали грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* MG1655 (рис. 1), которые являются модельной системой для генетических исследований [5], получения рекомбинантных белковых молекул [6] за счет простоты культивирования, быстрого роста и возможности перенаправления метаболических путей бактерии, что позволяет использовать их в методах очистки окружающей среды, производства биотоплива.

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (№ 24-24-20032) и правительства Тульской области.
© Е. С. Филиппова, А. Н. Звонарев, Д. Г. Лаврова, 2024

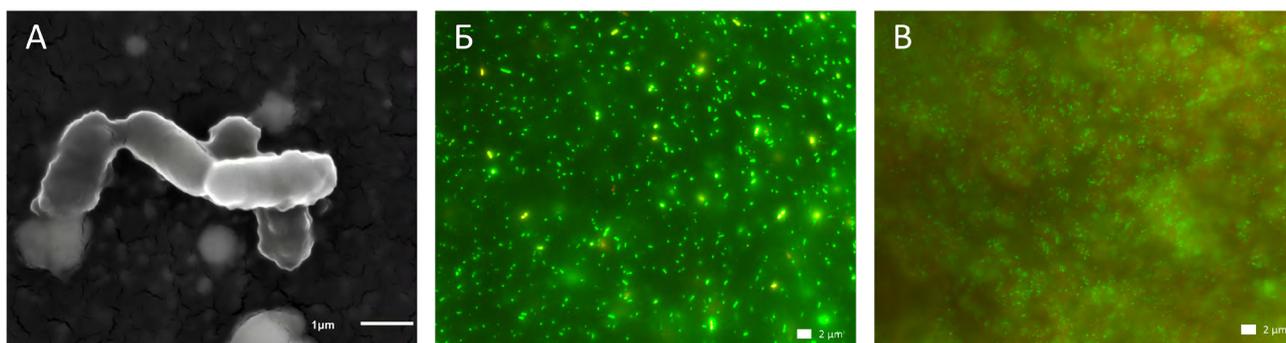


Рис. 1. Оценка структурных особенностей и жизнеспособности инкапсулированных в гидрогели из Si-ПЭГ бактерий *Escherichia coli* MG1655. А — СЭМ-фотография инкапсулированных в гидрогели из Si-ПЭГ бактерий *Escherichia coli* MG1655. Флуоресцентная микроскопия: Б — суспензия свободных бактерий *Escherichia coli* MG1655, цитохимическая окраска с помощью флуоресцентного красителя LIVE/DEAD™ BacLight™; В — инкапсулированные в гидрогели из Si-ПЭГ бактерии *Escherichia coli* MG1655, цитохимическая окраска с помощью флуоресцентного красителя LIVE/DEAD™ BacLight™

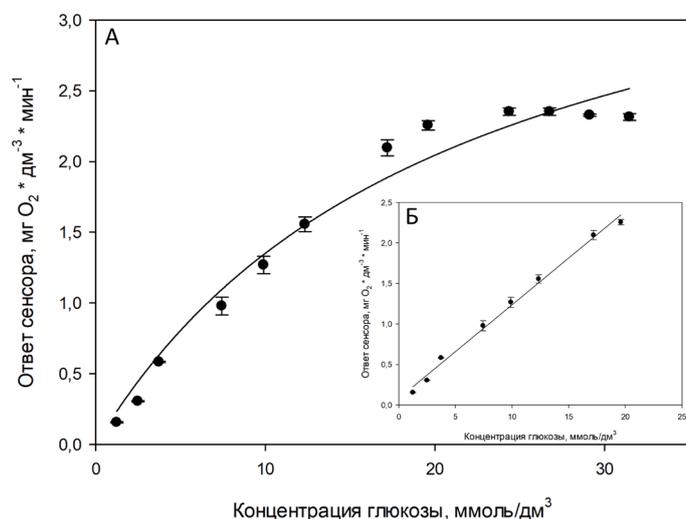


Рис. 2. Градуировочная зависимость (А) и линейная область зависимости (Б) ответа сенсора от концентрации субстрата для бактерий *Escherichia coli* MG1655

На СЭМ-фотографии наблюдаются бактерии, покрытые оболочкой из гидрогеля. При изучении жизнеспособности бактериальной культуры установлена высокая выживаемость клеток после иммобилизации в гидрогель из Si-ПЭГ.

Дыхательную активность инкапсулированных в гидрогель из Si-ПЭГ бактерий определяли с использованием биосенсорного подхода. Такой подход широко используется при разработке целоклеточных биосенсоров и обеспечивает оперативность и надежность в получении количественных характеристик биокатализаторов — иммобилизованных микроорганизмов. Гидрогель с клетками наносили на поверхность кислородного электрода типа Кларка и измеряли скорость изменения кислорода в предэлектродном пространстве при введении субстрата (1М глюкоза) (рис. 2).

Для биосенсора на основе инкапсулированных бактерий определены характеристики чувствительности и стабильности: коэффициент чувствительности составил $0,116 \pm 0,002$ мг

$\text{O}_2 \times \text{ммоль}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$, диапазон определяемых концентраций 1–21 ммоль/дм³, операционная стабильность — 13 %, долговременная стабильность — 9 суток. Полученный биогибридный материал уступает по чувствительности ($0,85 \pm 0,08$ мг $\text{O}_2 \times \text{ммоль}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$) дрожжевым клеткам *Ogataea polymorpha* ВКМ Y-2559, инкапсулированным в ту же матрицу [4], однако по стабильности превышают показатели с дрожжевыми клетками, что важно при разработке стабильных биокатализаторов в области биотехнологии, экологии и медицины.

Литература

1. Shchipunov Y. Biomimetic Sol-Gel Chemistry to Tailor Structure, Properties, and Functionality of Bionanocomposites by Biopolymers and Cells // Mater. 2023. Vol. 17, No. 1. P. 224.
2. Khonina T. G. et al. Mechanism of structural networking in hydrogels based on silicon and titanium glycerolates // J. Colloid Interface Sci. 2012. Vol. 365, No. 1. P. 81–89.
3. Shkryl Y. N. et al. Biomimetic Synthesis of Nanosized Silica Structures on a Substrate with Silicatein // Russ. J. Bioorg Chem. 2018. Vol. 44, No. 4. P. 469–471.
4. Lavrova D. G. et al. Biocompatible Silica-Polyethylene Glycol-Based Composites for Immobilization of Microbial Cells by Sol-Gel Synthesis // Polymers. 2023. Vol. 15, No. 2. P. 458.
5. Croxen M. A., Finlay B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // Nat. Rev. Microbiol. 2010. Vol. 8, No. 1. P. 26–38.
6. Blount Z. D. The unexhausted potential of *E. coli* // eLife. 2015. Vol. 4. P. e05826.