

Содержание

Введение.....	3
1. Имобилизованные ферменты и их преимущества.....	4
2. Основы технологии иммобилизации ферментов.....	8
2.1. Общие принципы иммобилизации.....	8
2.2. Методы физической иммобилизации.....	9
2.3. Микрокапсулирование.....	14
2.4. Иммобилизация металлохелатным способом.....	16
3. Носители для иммобилизованных ферментов.....	20
4. Использование иммобилизованных ферментов.....	31
Заключение.....	35
Список использованных источников.....	36

Введение

Ферменты (энзимы) являются веществами белковой природы, которые используются живыми организмами для катализа многих химических реакций. Все ферменты (в настоящее время их более 3000) разделены на различные классы в соответствии с теми химическими реакциями, которые они катализируют. Каждый класс состоит из подкласса, уточняющего природу субстрата, кофермента или характер превращения.

Источником фермента может служить любой живой объект, поэтому они могут быть как растительного, так и животного происхождения. В настоящее время для получения ферментов и ферментных препаратов используют микроскопические грибы, бактерии и дрожжи [3, с. 4].

Как известно, в клетках ферменты находятся не в растворенной форме, а прикреплены к определенным структурам и локализованы в органеллах. Это связано с тем, что ферменты — нестабильные соединения и при воздействии ряда физических и химических факторов могут инактивироваться.

Иммобилизованными ферментами называют ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства. Иммобилизация — ограничение подвижности молекул ферментов, позволяющие закрепить их активный центр, сохраняя максимальную работоспособность в течение длительного времени, не подвергаясь структурным изменениям.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами: такие ферменты представляют собой гетерогенные катализаторы, легко отделяющиеся от реакционной среды, могут использоваться многократно, обеспечивают непрерывность каталитического процесса.

Цель данной работы — изучение важнейших методов иммобилизации ферментов.

Задачи работы:

- 1) охарактеризовать преимущества иммобилизованных ферментов;
- 2) изучить основы технологии иммобилизации ферментов — общие принципы иммобилизации, методы физической иммобилизации, микрокапсулирование, иммобилизацию металлохелатным способом;
- 3) рассмотреть носители для иммобилизованных ферментов;
- 4) кратко осветить направления использования иммобилизованных ферментов.

Для написания реферата использованы информационные источники, перечень которых приведен в разделе «Список использованных источников».

1. Имобилизованные ферменты и их преимущества

В современной биотехнологии одно из видных мест принадлежит ферментам. Ферменты и ферментные системы широко используются в различных отраслях промышленности, медицине, сельском хозяйстве, химическом анализе и т. д.

Ферменты — вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов. Начало этому методу было положено в 1916 году, когда Дж. Нельсон и Е. Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность. Сам термин «иммобилизованные ферменты» стал применяться с 1971 года, и означает любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве.

Под иммобилизацией фермента понимается его включение в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в последней молекулами субстрата или эффектора. Иными словами, иммобилизация представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема.

Иммобилизация ферментов — это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности. Вообще, в идеальном случае иммобилизация фермента не должна приводить к потере каталитической активности. Адсорбция — мягкий метод иммобилизации, который, как правило, слабо изменяет каталитическую активность фермента. Наоборот, ковалентное связывание приводит часто к снижению ферментативной активности. Однако инактивацию фермента можно предотвратить, если проводить иммобилизацию в присутствии субстрата, который защищает активный центр [4, с. 87].

Примеры типичных водонерастворимых носителей, используемых для адсорбции и ковалентной иммобилизации ферментов, приведены в таблице 1.

Широкое технологическое применение ферментов долгое время сдерживалось рядом причин, из которых важнейшим являются:

- трудоемкость отделения ферментов от исходных реагентов и продуктов реакции после завершения процесса, в результате чего ферменты используются, как правило, однократно;
- неустойчивость (лабильность) ферментов при хранении, а также при различных воздействиях (главным образом тепловых);

- трудоемкость очистки ферментов и получения их в достаточно активном виде и, как следствие, высокая стоимость активных ферментов.

Таблица 1 – Материалы, используемые для иммобилизации

Адсорбционная иммобилизация	Ковалентная иммобилизация
Окись алюминия	Агароза (сефароза)
Бентонит	Целлюлоза
Карбонат кальция	Декстран (сефадекс)
Гель фосфата кальция	Стекло
Уголь	Сополимеры полиакриламида
Целлюлоза	
Глина	Полиаминостирол
Коллаген	
Конковалин А-сефарозы	

В последнее время определились пути преодоления этих трудностей. Они связаны как раз с получением иммобилизованных ферментов, а также иммобилизованных клеток (микроорганизмов). Открылись принципиально новые перспективы перед прикладной наукой в результате создания иммобилизованных ферментов. Дж. Нельсон и Е. Гриффин в 1916 г. показали, что инвертаза, адсорбированная на угле (т. е. иммобилизованная), сохраняет каталитическую активность. В 20–30-х годах прошлого века работы по получению адсорбции белков и ферментов были продолжены главным образом в практических целях.

Каким образом с помощью иммобилизации удастся преодолеть перечисленные выше трудности промышленного использования ферментов?

1. В результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества гетерогенных катализаторов, — их можно удалять из реакционной смеси (и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией. Этим устраняется первый из перечисленных недостатков растворимых ферментов как технологических катализаторов. Более того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим, используя колонны или проточные аппараты с иммобилизованными ферментами.

2. Иммобилизованные ферменты более устойчивы к внешним воздействиям, чем растворимые ферменты. Таким образом, возникли перспективы преодоления и второго недостатка — их лабильности.

3. Наконец, принцип иммобилизации был применен не только к ферментам, но и к их субстратам, ингибиторам и кофакторам, т. е. веществам, имеющим избирательное сродство к ферментам. Это позволило создать метод выделения и очистки ферментов,

основанный на хроматографии по сродству, или аффинной хроматографии. Тем самым существенно облегчается выделение чистых ферментов, и в настоящее время можно рассчитывать на то, что и третья из отмеченных причин, ограничивающих промышленное применение ферментов, успешно преодолевается.

Иммобилизованные ферменты обладают рядом преимуществ при использовании их в прикладных целях:

1. Гетерогенный катализатор легко отделить от реакционной среды, что дает возможность:

- остановить в нужный момент реакцию;
- использовать катализатор повторно;
- получать продукт, не загрязненный ферментом (важное обстоятельство для пищевых и фармацевтических производств).

2. Использование гетерогенных катализаторов позволяет проводить ферментативный процесс непрерывно, например, в проточных колоннах, и регулировать скорость катализируемой реакции, а также выход продукта путем изменения скорости потока.

3. Иммобилизация или модификация фермента способствует целенаправленному изменению свойств катализатора, в том числе специфичности, зависимости каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды и, что важно, его стабильности по отношению к различного рода денатурирующим воздействиям.

4. Иммобилизация ферментов дает возможность регулировать их каталитическую активность путем изменения свойств носителя под действием некоторых физических факторов (свет, звук); создаются механо- и звукочувствительные датчики, усилители слабых сигналов и бессеребряные фотографические процессы.

С практической точки зрения иммобилизация ферментов на водонерастворимых носителях очень выгодна, поскольку после завершения ферментативной реакции иммобилизованный фермент может быть выделен и использован повторно. Однако необходимо знать, остается ли иммобилизованный фермент связанным с носителем при различных условиях (pH, температура, присутствие субстрата и продуктов). Убедившись в прочности связывания фермента с носителем, можно сравнивать свойства свободного и иммобилизованного фермента.

Одним из свойств носителя является максимальная «нагрузка». Под максимальной «нагрузкой» (емкостью) носителя ферментом подразумевается максимальное количество фермента, которое может быть иммобилизовано на определенном количестве носителя.

Это очень важный параметр, так как высокая степень загрузки носителя позволяет уменьшить размеры реактора. Перенасыщение носителя может привести к тесному сближению молекул и к уменьшению активности фермента за счет стерических затруднений при взаимодействии субстрата с активным центром. Однако, ограниченная «нагрузка» носителя может приводить к блокированию свободными молекулами пространства между связанными молекулами фермента.

Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60%-м полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом. Это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

2. Основы технологии иммобилизации ферментов

2.1. Общие принципы иммобилизации

Иммобилизацию можно рассматривать как физическое разделение биокатализатора (клеток, клеточных фракций или ферментов) и растворителя, при котором молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между фазами. Разделение катализатора и растворителя может быть достигнуто либо адсорбционным, либо ковалентным связыванием с нерастворимым органическим или неорганическим носителем, либо связыванием отдельных молекул катализатора друг с другом с образованием агрегатов или сополимеров. Недостатком этих методов иммобилизации является необходимость использования большого количества катализаторов. Кроме того, химическая модификация, которой подвергаются препараты (ферменты, клетки) в процессе иммобилизации, может нежелательным образом изменить их каталитические и другие свойства. По этой причине многие исследователи предпочитают отделение клеток или ферментов от остального объема и включение в носитель или инкапсулирование. Таким образом катализатор можно включить в полимерную сетку, например, полиакриламидного геля или геля альгината кальция, путем проведения полимеризации или реакции полярного сшивания геля в присутствии ферментов или клеток [7, с. 76].

Родственными методами являются либо инкапсулирование в липосомы, нейлоновые или коллодиевые мембраны, либо их физическое отграничение от других компонентов в аппаратах для ультрафильтрации. Для облегчения работы с частицами, содержащими биокатализатор, им придают по возможности сферическую форму.

При одностадийной катализируемой реакции иммобилизуют или подходящий фермент, или жизнеспособные клетки, обладающие необходимой активностью. В первом случае, чтобы увеличить степень включения и свести к минимуму утечку фермента, требуется высокая степень сшивки носителя. Однако при высокой степени сшивки может ограничиться диффузия молекул субстрата и продукта внутрь частиц носителя и из них наружу. Эта проблема исчезает в случае иммобилизации клеток. Поскольку размеры клеток относительно велики, то можно использовать носители с низкой степенью сшивки и, следовательно, с хорошими диффузионными свойствами.

Для катализа многостадийных реакций, например превращение глюкозы в этанол, где регенерация и удержание кофакторов является обязательным условием, необходимо особое внимание уделять влиянию сшивающих агентов на жизнеспособность клеток. Нужно также иметь в виду и подачу и отвод необходимого для данных клеток количества газов (кислорода, CO_2). Таким образом, включение живых клеток требует мягких условий

иммобилизации; носитель при этом должен представлять систему открытых пор, обеспечивающих хорошие условия для газообмена. К сожалению, частицы носителя, полученные с учетом этих требований, обладают низкой прочностью. Этот фактор особенно важен при увеличении масштабов процесса.

Методы иммобилизации часто рассматриваются с точки зрения природных сил, удерживающих препарат в зоне носителя. В этом случае методы иммобилизации подразделяют на химические и физические. В первом случае препарат химически «пришивается» к носителю, что, в свою очередь, может осуществляться как на поверхности соответствующего нерастворимого материала, так и в объеме носителя. Во втором случае удержание препарата носителем осуществляется за счет физических факторов: адсорбционно, полупроницаемой мембраной, электрическим полем и т. д., в этом случае имеют ввиду иммобилизацию, при которой препарат не соединяется с носителем ковалентными связями.

Другой принцип классификации методов основывается на следующих положениях: производится ли иммобилизация одновременно с обездвиживанием препарата и образованием матрицы носителя или же процесс иммобилизации происходит на заранее подготовленной нерастворимой основе, на которой тем или иным способом закрепляют биологическое действующее начало.

В ряде случаев конкретный препарат (клетка) прикрепляется в реальных условиях к нерастворимым материалам (например, древесина, почва, минералы и др.). В этом случае жизнедеятельность клетки в иммобилизованном состоянии является для нее естественной, отличающейся от природной только искусственно поддерживаемыми в биотехнологическом процессе внешними параметрами (температура, давление, влажность и др.) и набором подаваемых клетке веществ.

Иммобилизация препаратов (т. е. удерживание на носителе) может быть как необратимой, так и временной. Когда иммобилизуют растущую, интенсивно делящуюся культуру, часто наблюдается постепенный переход из фазы носителя в окружающую среду, даже если исходная биомасса была фиксирована носителем необратимо. Но иногда оказывается удобной обратимая фиксация. В этом случае, возможно, удалить отработавшие свой срок клетки и вновь иммобилизовать свежие. Такой подход к регенерации биокатализаторов удастся применять, например, в случае адсорбционных вариантов иммобилизации.

2.2. Методы физической иммобилизации

Все методы физической иммобилизации (т. е. иммобилизации, при которой фермент не соединен с носителем ковалентными связями) разделяют на четыре группы:

1. Адсорбция на нерастворимых носителях (т. е. на поверхности носителя).
2. Включение в поры геля.
3. Иммобилизация в полимерных пленках (мембранах).
4. Включение в двухфазную реакционную среду, где препарат может находиться только в одной из фаз.

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из всех существующих способов. Еще в 1916 году Нельсон и Гриффин провели успешную иммобилизацию инвертазы путем адсорбции на активированном угле и геле гидроксида алюминия.

Адсорбционная иммобилизация клеток, в частности микроорганизмов основывается часто на способности многих из них прикрепляться к разнообразным твердым или гелеобразным носителям и продолжать жизнедеятельность в таком состоянии (микробные популяции почвы, кишечника, рубца, некоторые азотфиксирующие микроорганизмы растений и т. д.).

Поверхность клеток неоднородна, характеризуется мозаичной структурой — наличием гидрофильных и гидрофобных участков. Разнообразие свойств поверхности клеток и адсорбентов определяют различные механизмы адсорбционного взаимодействия (ион-ионные взаимодействия, ван-дер-ваальсовы силы и т. д.).

Однако указанные подходы к классификации способов иммобилизации оставляют в стороне проблему микроокружение препарата. Поэтому предлагается использовать следующую классификацию [10, с. 26]:

1. Иммобилизация на носителе или на поверхности носителя. В этом случае удерживающая поверхность или часть поверхности носителя «омывается» внешней средой (жидкой или газообразной).

2. Иммобилизация в носителе или в массе (объеме) носителя. Между внешней средой и препаратом в результате иммобилизации появляется слой материала носителя. В данном случае свойства носителя (например, пористость, заряд, гидрофильность) в значительной степени могут сказываться на функционировании иммобилизованного препарата и на уровне реализации потенциальных возможностей.

3. Иммобилизация с использованием мембранной технологии. Препарат и небольшая часть внешней среды помещены в замкнутый объем, отделенный от остальной среды избирательно проницаемой мембраной, размер пор, в которой таковы, что

субстраты и продукты через них проникают, а иммобилизованный препарат удерживается внутри замкнутого объема.

Иммобилизация на поверхности носителя. Для осуществления данного подхода к созданию иммобилизованных систем используются разные носители: непористые, ячеистые и др.

При иммобилизации на носителе препарат может быть связан различными силами:

- адсорбционно неспецифически — взаимодействие базируется на не ковалентных контактах (ионные, гидрофобные, водородные и др.);
- адсорбционно биоспецифически — носитель, содержащий аффинные лиганды, способен образовать достаточно прочные комплексы с поверхностью препарата (в основе также лежат нековалентные взаимодействия);
- химически удерживающая матрица должна иметь особые группировки, способные реагировать с компонентами препарата (этот случай можно рассматривать как хемосорбцию), либо для ковалентного связывания препарата с носителем необходим специальный сшивающий агент.

К достоинствам адсорбционной иммобилизации относятся исключительная простота методов ее проведения. По существу, иммобилизация происходит при контакте водной суспензии биопрепаратов с адсорбентом (исключение составляет иммобилизация с помощью электроадсорбции).

Способы адсорбционной иммобилизации разделяются на статические, с перемешиванием и путем нанесения на колонке (рисунок 1).

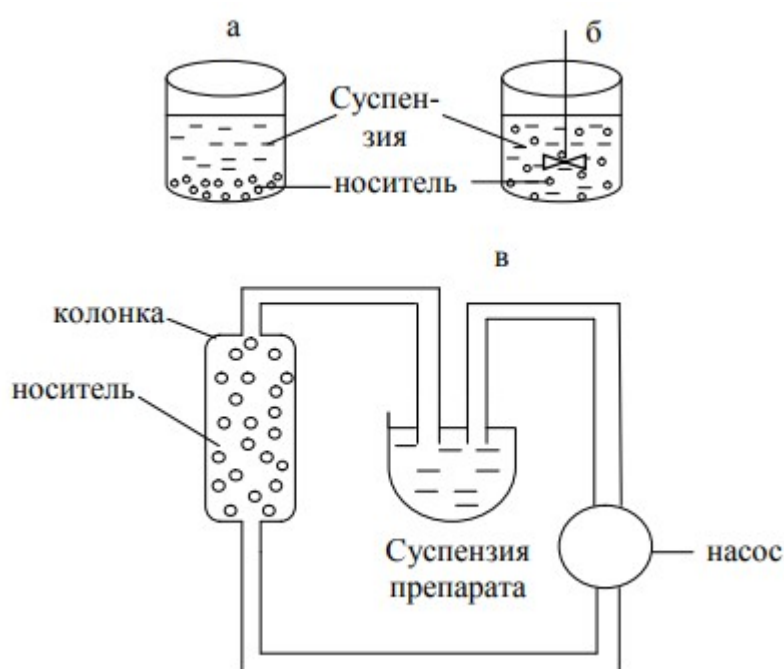


Рисунок 1 – Способы адсорбционной иммобилизации: *а* – статический; *б* – с перемешиванием; *в* – нанесения в колонке

Статический способ наиболее прост и заключается в том, что носитель (адсорбент) вносят в суспензию биопрепарата и смесь некоторое время инкубируют. Иммобилизация достигается за счет осаждения клеток и последующей их адсорбции на частицах носителя. Недостатком способа является необходимость длительного контакта адсорбента с суспензией биопрепарата.

Способ с перемешиванием обеспечивает более быстрое завершение процесса адсорбции и более равномерное заполнение носителя.

Способ нанесения в колонке заключается в прокачивании суспензии с препаратом через колонку, заполненную носителем.

Иногда для проведения адсорбционной иммобилизации применяют метод электроосаждения (электроадсорбция) (рисунок 2). В этом случае в раствор препарата погружают два электрода, на поверхность одного из которых помещают слой носителя. При пропускании электрического тока молекулы фермента или клетки благодаря имеющимся на поверхности заряженным группам начинают перемещаться в растворе в направлении электрода с носителем и осаждаются на поверхности последнего.

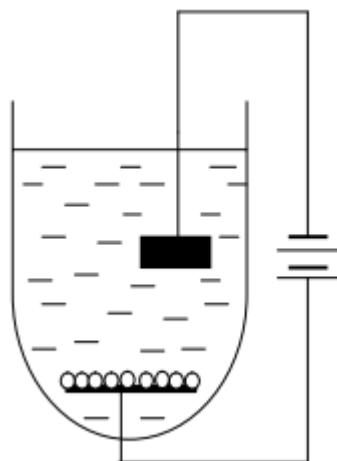


Рисунок 2 – Иммобилизация методом электроосаждения

Иммобилизация в массе носителя. Этот вариант один из самых распространенных, хотя его нельзя отнести к самым простым подходам. В данном варианте иммобилизации в качестве носителей применяются либо полимерный гель, либо полимерное волокно.

Нерастворимые материалы, которые служат основой матриц подобных носителей, могут быть как органическими веществами, так и неорганическими соединениями, как синтетическими производными, так и природными продуктами.

Если говорить о природе сил, удерживающих препарат в объеме носителя, то и здесь может быть как обездвиживание за счет физических факторов (просто массой носителя, т. е. механически), так и фиксация с образованием ковалентных связей между компонентами препарата и веществом матрицы (препарат «вшивается» в носитель) (рисунок 3).

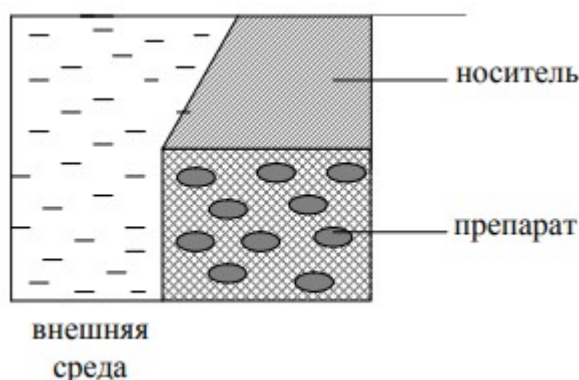


Рисунок 3 – Иммобилизация в массе носителя

Широкое распространение метода обусловлено тем, что в этом варианте достигается более высокая удельная концентрация иммобилизованных препаратов в носителе. Это в свою очередь теоретически дает возможность поднять продуктивность биотехнологического процесса в целом.

Еще одно важное преимущество иммобилизации в носителе по сравнению с иммобилизацией на носителе состоит в хороших эксплуатационных свойствах получаемых препаратов. Препараты также лучше защищены от многих неблагоприятных факторов среды.

Иммобилизация с использованием мембранной технологии. Суть метода — водный раствор препарата отделяется от водного раствора субстрата избирательно проницаемой мембраной. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения избирательно проницаемой мембраны и ее природой. Важным фактором является толщина мембраны, — с ее уменьшением происходит повышение проявляемой иммобилизованными биокатализаторами активности, что определяется возможностью увеличения диффузии субстрата к биокатализатору.

Наиболее широкое распространение мембранные биокатализаторы получили не в системах превращения веществ, а при создании чувствительных элементов биосенсоров.

В мембранной технологии применяются следующие системы: плоские мембраны, пористые волокна и микрокапсулы.

Плоские мембраны легко пропускают молекулы субстрата, но представляют собой непреодолимый барьер для крупных молекул фермента или клеток (рисунок 4).

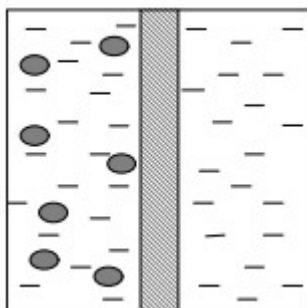


Рисунок 4 – Иммунизация с использованием мембранной технологии

Пористые волокна — аналогично случаю плоских мембранных носителей, только здесь используются мембранные полые волокна. Фактически эти волокна представляют собой длинные тонкие трубки, стенки которых выполнены из полимерной мембраны (рисунок 5).

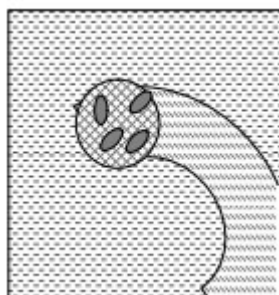


Рисунок 5 – Иммунизация в пористые волокна

По сравнению с плоскими мембранами отношение занимаемого препаратами объема к общему объему системы выше, поэтому и выше получаются удельные продуктивности. Среди волокнообразующих полимеров используются триацетат целлюлозы — дешевый и доступный носитель, а также волокна коагулята целлюлозы. Носитель из коагулята целлюлозы гидрофилен, обладает высокой механической прочностью, его химическая и биологическая устойчивость определяется стабильностью самой целлюлозы.

2.3. Микрокапсулирование

Суть метода микрокапсулирования в том, что водный раствор с биопрепаратом (фермент, клетка) включают внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (мембраной). В зависимости от условий получения размер микрокапсул изменяется от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров.

Для формирования микрокапсул с иммобилизованными препаратами существуют два основных подхода: диспергирование и (микро) гранулирование.

В первом случае водная суспензия фермента диспергируется в несмешивающуюся с ней органическую жидкость, а присутствующие в системе специальные добавки образуют на поверхности капелек водной фазы мембранную пленку. Получаемые микрокапсулы имеют неодинаковые размеры — существует некоторое распределение величин их диаметров, зависящее от гидродинамических свойств применяемых жидкостей, интенсивности перемешивания, соотношения объемов фаз, геометрии рабочего сосуда и конструкции мешалки.

Во втором случае водная суспензия препарата через особое дозирующее устройство (гранулятор) инъецируется порциями строго заданного объема в несмешивающуюся с водой органическую жидкость, где на границе раздела фаз поверхности водной капли происходит формирование оболочки микрокапсулы. В этом случае получают частицы практически одинаковой величины.

В принципе микрокапсулирование отличается от включения в волокна главным образом формой получаемых препаратов: при микрокапсулировании образуются сферические микрокапсулы, а при втором способе — нити.

Технология микрокапсулирования в настоящее время находит очень широкое применение в самых разнообразных отраслях — от производства лекарств и пищевых добавок до изготовления красящего слоя печатающих устройств или специальных антипиреновых присадок к полимерным композициям. Большие надежды связываются с практической реализацией лазерного термоядерного синтеза, где используют шарики дейтериево-тритиевого топлива, включенные как раз в микрокапсулы. Определенное развитие получили методы иммобилизации ферментов в полимерные микрокапсулы, а также довольно популярны эти приемы при иммобилизации животных и растительных клеток; что касается микроорганизмов, то таких работ еще мало.

Наполнение микрокапсул (внутреннее содержимое) может быть газовым, жидким, студнеобразным и твердым.

Весьма интересен прием совместного капсулирования клеток и экзогенных ферментов. Например, бактерии *Gluconobacter oxydans*, способные окислять глюкозу в глюконовую кислоту, требуют для этого хорошего снабжения кислородом. Однако при капсулировании даже при обильной аэрации они проявляли низкую глюкозооксидазную активность. При включении в полимер одновременно с клетками каталазы и добавлении в среду H_2O_2 (донор кислорода) количество образующейся глюконовой кислоты резко увеличилась.

2.4. Иммобилизация металлохелатным способом

Для целей иммобилизации, как оказалось, можно использовать свойства ряда металлов образовывать хелатные комплексы. В этом случае не требуется дополнительной модификации носителя, и иммобилизация протекает быстро и в достаточно обычных условиях. Наиболее подходящими свойствами для иммобилизации обладают из переходных металлов титан и цирконий, оксиды которых не проявляют токсического действия.

Этот метод иммобилизации разработан для ферментов на основе химии гидроксидов переходных металлов. В качестве носителя используют собственно гидроксид металла, который можно получить осаждением при гидролизе соответствующего хлорида. Молекула фермента иммобилизуется при образовании хелатов.

При некоторых приемах используется совместное осаждение гидроксидов металлов с ферментами. Такое осаждение может привести к получению более активного продукта, чем при последующем добавлении фермента, так как поверхность частицы выпадающего в осадок гидроксида очень велика. Однако при этом необходимо учитывать возможную инактивацию фермента в результате инкубации при низких значениях pH.

Чтобы получить более высокую ферментативную активность, нужно оптимизировать процесс иммобилизации относительно некоторых важных условий: продолжительность иммобилизации, pH, соотношение количества фермента и носителя.

Металлохелатный метод иммобилизации ферментов впервые разработал Новеис в университете г. Бирменген (Великобритания) в опытах иммобилизации на целлюлозе с применением диазотирования.

Рассмотрим возможность переходных металлов образовывать хелатные комплексы с биополимерами на примере титана и целлюлозы. В растворе хлорида титана определенная часть ионов титана образует октаэдрические координационные комплексы с

другими молекулами и ионами, которые в данном случае выступают в роли лигандов комплексного иона (пример комплексного иона приведен на рисунке 6).

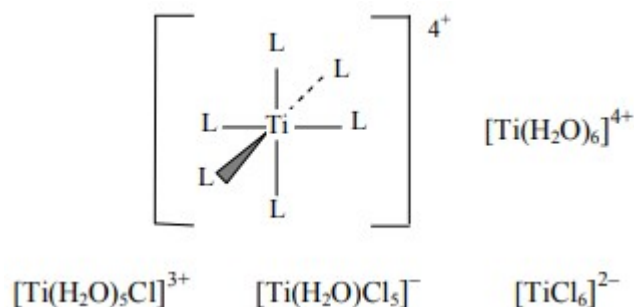


Рисунок 6 – Пример комплексного иона

Гидроксильные группы являются эффективными лигандами для ионов переходных металлов, и, следовательно, можно ожидать, что ионы переходных металлов будут образовывать комплексы с полисахаридами, гидроксильные группы которых будут замещать другие лиганды. Более того, хорошо известно, что гликоли — очень эффективные лиганды ионов переходных металлов. Некоторые полисахариды, такие как целлюлоза, содержат гидроксильные группы, не участвующие в образовании гликозидных связей между углеводными остатками, и, следовательно, способные образовывать хелаты с ионами переходных металлов, замещая своими гидроксильными группами два лиганда иона титана. Таким образом, поскольку целлюлоза представляет собой полимер молекул D-глюкопиранозы, связанных β -1,4-связью, в образовании хелатов могут участвовать гидроксильные группы в положении 2 и 3.

О возможности участия во взаимодействии целлюлозной цепи с титаном гидроксильной группы в положении 6 D-глюкопиранозного остатка можно лишь строить предположения. Стерически этой группе трудно приблизиться к другим гидроксильным группам целлюлозы и участвовать в образовании хелата. Таким образом, обработанную хлоридом титана целлюлозу можно рассматривать как полимерный хелат с аква-, хлораква- и хлор-комплексами титана, преобладающими в водном растворе хлорида титана (рисунок 7).

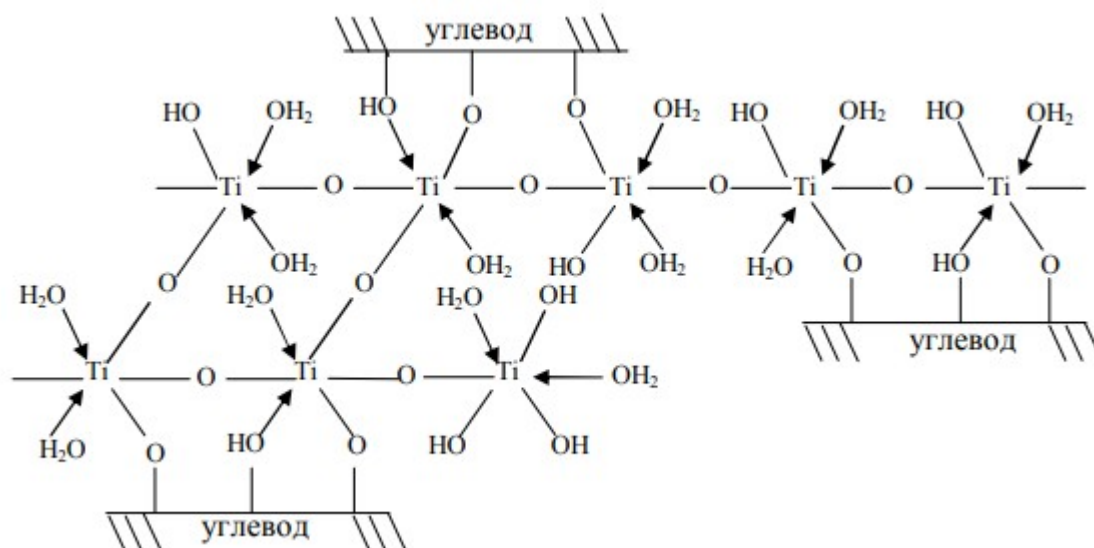


Рисунок 7 – Обработанная титаном целлюлоза, координационно связавшая вдоль своих цепей различные аква-, хлораква- и хлор-комплексы ионов титана, преобладающие в растворе

Следует отметить, что по стерическим соображениям все лиганды иона титана заместить гидроксильными группами полисахаридной цепи невозможно. Более того, оставшиеся лиганды не будут замещаться гидроксильными группами соседней целлюлозной цепи из-за нерастворимости и недостаточной подвижности макромолекулы целлюлозы. Любая же другая молекула, содержащая группы, способные замещать лиганды, может образовать хелат с титаном, связанным с целлюлозой. Такая молекула должна находиться в водном растворе и pH раствора может быть близок к нейтральному.

Образование связи между полимером (целлюлоза), обработанным металлом, и ферментом (с появлением ферментативно активного производного) будет успешным лишь при выполнении следующих условий:

- в молекуле фермента должны присутствовать группы, способные выступать в роли лигандов;
- контакт этих групп с атомами металла стерически возможен;
- эти группы не должны находиться в области активного центра фермента;
- молекулы фермента, уже связанные с носителем, не должны располагаться слишком близко друг к другу.

Удельная активность получаемых препаратов на основе различных ферментов (глюкоамилаза, инвертаза, нуклеаза и др.) обычно довольно высокая (50–80 %). В результате иммобилизации металлохелатным методом константа Михаэлиса фермента, как правило не меняется.

Использование хлорида титана приводило к получению препарата иммобилизованного фермента с большей активностью, чем в его отсутствии. Метод весьма прост и состоит из следующих стадий:

1. Взвесить в чашке 10 г микрокристаллической целлюлозы.
2. Добавить 50 мл 15 %-го (вес/объем) хлорида титана (IV) к 15 %-ной (вес/объем) HCl и хорошо перемешать.
3. Поместить смесь в вакуумный эксикатор с гидроксидом натрия и откачать воздух.
4. Выдержать смесь в сушильном шкафу при 45 °С до полного высыхания (примерно 24 ч).
5. Промыть сухой остаток три раза буферным раствором (рН буфера обычно выбирают соответствующим оптимальной активности фермента), пока носитель не станет практически белым.
6. К промытому носителю добавить раствор фермента, содержащий 1 г белка, и перемешивать при 4 °С в течение 18 ч.
7. Отцентрифугировать суспензию и промыть иммобилизованный фермент буфером, затем буфером, содержащим 1 М NaCl, еще раз этими же растворами, затем еще два раза буфером.
8. Ресуспендировать иммобилизованный фермент в буфере и хранить при 4 °С.

Потенциальная возможность использования ферментного препарата в промышленных целях связана с его стабильностью в процессе функционирования (операционная стабильность). В этом плане металлохелатная иммобилизация дает неоднозначные результаты, которые зависят от вида фермента, материала носителя, условий окружающей среды и т. д. Особенно низкая операционная стабильность наблюдается при использовании высокополимерных субстратов.

Логическим развитием рассматриваемого метода явилось его использование для иммобилизации целых клеток, в частности микроорганизмов.

Процесс иммобилизации на гидроксидах металлов представляет собой замещение гидроксильных групп на поверхности гидроксида подходящими лигандами, входящими в состав фермента или клетки. В результате образуются связи, аналогичные ковалентным. Структурная сложность клеточных оболочек обеспечивает достаточное разнообразие подходящих лигандов, входящих в состав белковых и углеводных компонентов клеточной стенки. В качестве примера применение иммобилизованных металлохелатным методом живых клеток, может служить сообщение об использовании таких клеток для производства уксуса.

Следует отметить, что рассмотренные методы иммобилизации для разных вариантов разработаны с различной степенью детализации. Выбор средств и путей реализации зависит от конкретных биотехнологических задач.

3. Носители для иммобилизованных ферментов

Для получения иммобилизованных ферментов и клеток используется огромное число носителей. Основные требования, предъявляемые к материалам, которые могут быть применены в качестве носителя для иммобилизации:

- высокая механическая, химическая и биологическая устойчивость (стойкость), обеспечивающая стабильность получаемых иммобилизованных препаратов;
- возможность получения технологически удобных форм (гранул, мембран, листов и т. д.);
- носитель не должен затрагивать активность фермента или ферментативные системы клетки при реализации конкретной технологии, необходимо исключить нежелательные воздействия носителя (токсичность, температура, стресс и т. д.);
- надежное удержание фермента и клетки носителем;
- материал носителя не должен препятствовать обеспечению иммобилизованного препарата субстратами, газообмену и отводу продуктов жизнедеятельности;
- высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность реакций в водной среде;
- дешевизна носителя и простота иммобилизации, т. е. экономическая оправданность.

Выполнить все требования крайне сложно, поэтому необходимо находить компромисс между «идеальным» и «реально возможным». Для приближения к оптимальному варианту необходима разработка научно-обоснованных подходов для выбора путей иммобилизации. Выбор путей иммобилизации и материала носителя на эмпирической основе — это надежда на случайную удачу, требующую больших затрат труда, времени и веществ. Поэтому необходимо в этом направлении проведение фундаментальных исследований.

Отсутствие носителей, удовлетворяющих одновременно всем требованиям, и разнообразие задач, стоящих перед экспериментаторами, обуславливают широкий набор применяемых для иммобилизации материалов. Для иммобилизации используются как органические, так и неорганические материалы.

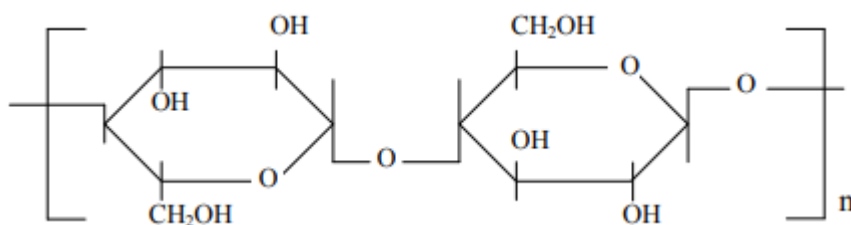
Существующие в настоящее время органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные полимеры и синтетические полимерные носители. В свою очередь класс природных полимеров можно подразделить на группы в соответствии с их биохимической классификацией: полисахаридные, белковые и липидные. Синтетические полимеры также могут быть подразделены на группы, например, в

соответствии с химическим строением основной цепи макромолекул: полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные носители.

Природные носители. Большое значение природных полимеров в качестве носителей для иммобилизации объясняется их доступностью и наличием реакционноспособных функциональных групп (в исходном или модифицированном препарате), легко вступающих в различные химические реакции, а также высокой гидрофильностью. К недостаткам можно отнести неустойчивость к воздействию микроорганизмов, относительно высокую стоимость многих из них.

Полисахариды. Наиболее часто для иммобилизации используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные [4, с. 87].

Целлюлоза представляет собой поли-1,4-β-D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозу:

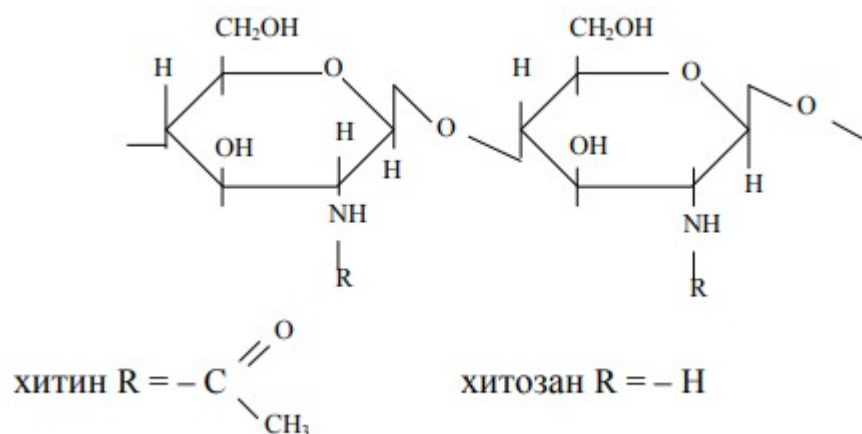


Целлюлоза отличается высокой степенью гидрофильности, а наличие большого количества гидроксильных групп дает возможность ее легко модифицировать путем введения различных заместителей.

Препараты целлюлозы для придания им химической устойчивости «сшивают» эпихлоргидрином. Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются ее аморфные участки. На их место для сохранения прочности между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированная целлюлоза благодаря простоте получения, сравнительно низкой стоимости относится к удобным носителям для иммобилизации ферментов. К недостаткам целлюлозы как носителя можно отнести ее неустойчивость к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей.

Гранулированную целлюлозу довольно легко превращают в различные ионообменные производные, которые имеют промышленное значение.

К природным аминополисахаридам относится *хитин*. Его можно рассматривать как целлюлозу, в которой CH₂OH-группа заменена ацетамидным остатком:



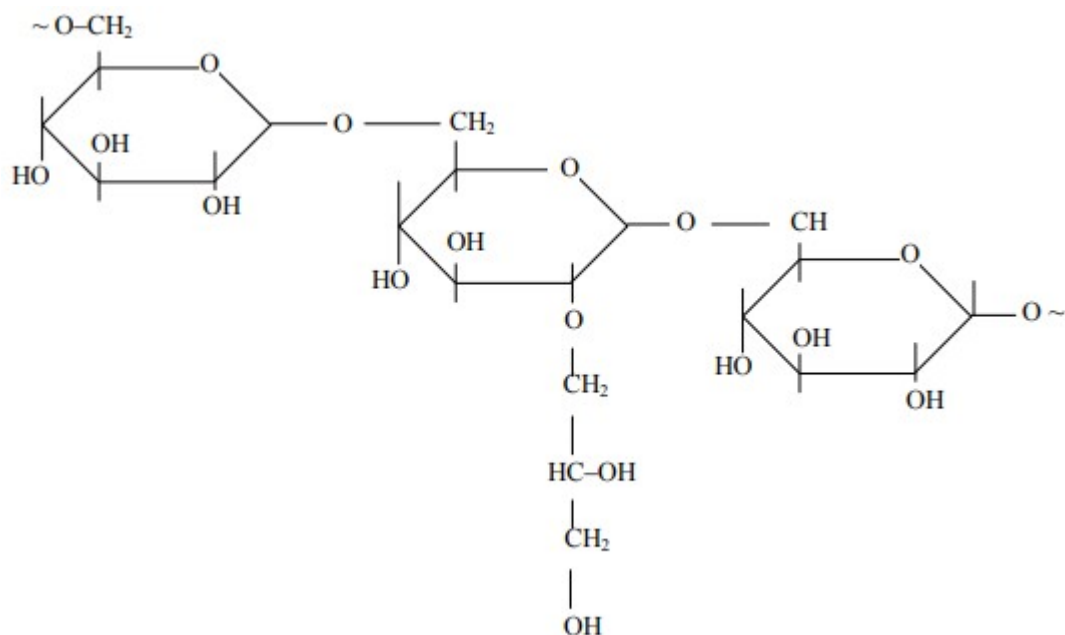
Хитин — основной компонент наружного скелета ракообразных, насекомых, а также клеточных оболочек некоторых грибов. Это соединение является отходом промышленной переработки креветок и крабов, поэтому доступно в больших количествах при относительно низкой стоимости.

Хитин обладает пористой структурой, не растворяется в воде, разбавленных кислотах и щелочах, а также в органических растворителях. Для перевода в реакционноспособную форму он может быть модифицирован глутаровым альдегидом, а также солями тяжелых металлов.

Обработка хитина концентрированными растворами щелочей (деацелирование) приводит к образованию хитозана. Хитозан имеет свободные аминогруппы, поэтому может использоваться для ковалентной иммобилизации с помощью бифункциональных реагентов: диальдегиды, диизоцианаты. В отличие от хитина хитозан растворяется в минеральных и органических кислотах, поэтому для иммобилизации он часто применяется в виде растворов (pH 3–7).

Полученные препараты иммобилизованных ферментов и других биобъектов на основе хитозана обладают высокой каталитической активностью и устойчивостью к микробному воздействию; наблюдается и повышение термостабильности белков, иммобилизованных на хитозане.

Декстран — поли-1,6- α -D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза — разветвленный полисахарид из бактериальных источников, содержащий остатки глюкозы, связанные, в основном, 1,6-глюкозидными связями (а также 1,2-, 1,3- и 1,4- связями):



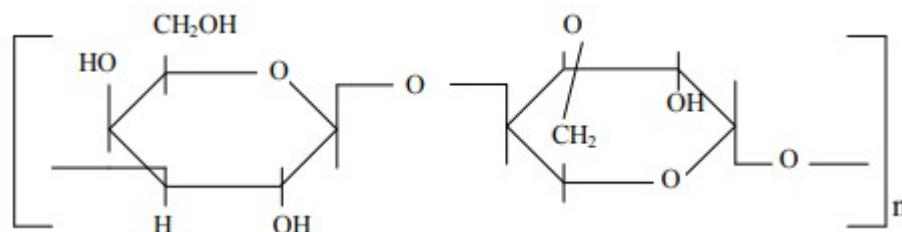
Фирмы «Pharmacia» и «Renal» выпускают ряд производных декстрана, содержащих различные функциональные группы (карбоксиметилсефадекс, сульфопропилсефадекс, диэтиламиноэтилсефадекс, диэтил-(2-оксипропил)-аминоэтилсефадекс, молселект).

Гели на основе декстрана обладают высокой стойкостью и гидрофильностью (из-за наличия большого количества гидроксильных групп).

К группе декстранов можно отнести и *крахмал*, представляющий смесь полисахаридов, основными компонентами которой являются амилоза — поли-1,4- α -D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза и амилопектин — разветвленный полисахарид, состоящий из остатков D-глюкозы, связанной 1,4- α -глюкозидными связями, а в местах разветвлений — 1,6- α - глюкозидными связями.

При химической модификации крахмала сшивающими агентами (формальдегид, глиоксаль, глутаровый альдегид) получен новый носитель — *губчатый крахмал*. Этот носитель обладает повышенной устойчивостью по отношению к ферментам, гидролизующим полисахариды. Введение диэтанол- и триэтаноламинных групп дает возможность применять губчатый крахмал для иммобилизации.

Агароза — поли- β -галактопиранозил-3,6-ангидро- α -L-галактопираноза:



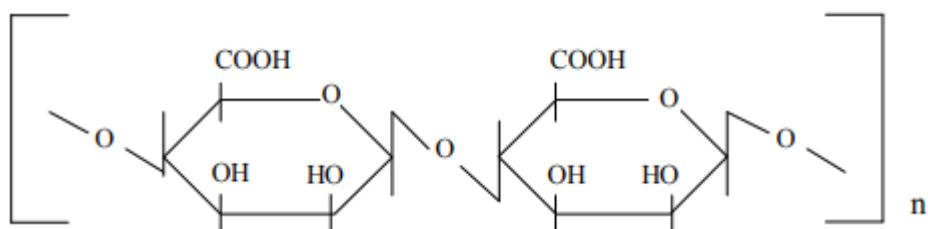
Агароза широко используется как носитель для иммобилизации. Однако стоимость ее очень высока, поэтому разрабатываются различные методы ее модификации с целью получения легко регенерируемых форм. При охлаждении горячего 2–6 % водного

раствора агарозы до температуры ниже 45 °С образуются прочные крупнопористые гели, представляющие собой сложную смесь из заряженных и нейтральных полисахаридов. Гели на основе агарозы выпускаются под названиями «сефароза» и «биогель А».

Агар выделяют из некоторых красных водорослей. Установлено, что он содержит, по крайней мере, два полисахарида: агарозу и агаропектин. Гели агара образуются аналогично агарозным при охлаждении до температуры ниже 38 °С. После высушивания гель агара превращается в прозрачную пленку, что позволяет использовать для изучения иммобилизованных в геле препаратов оптические методы. К преимуществам агара следует отнести его низкую стоимость, нетоксичность и способность формировать механически прочные гели даже при малых концентрациях в растворе.

Улучшить свойства агара можно сшиванием эпихлоргидрином, диэпоксидными агентами и т. д. Сшитый агар с регулируемой проницаемостью устойчив к нагреванию даже в щелочной среде, обладает высокой механической прочностью, а наличие большого количества оксигрупп позволяет легко модифицировать носитель. Это дало основание отдельным исследователям считать агар почти идеальным носителем.

Альгиновые кислоты и их соли — это полисахариды бурых морских водорослей, состоящие из связанных β-1,4-связями остатков D-маннуроновой кислоты.

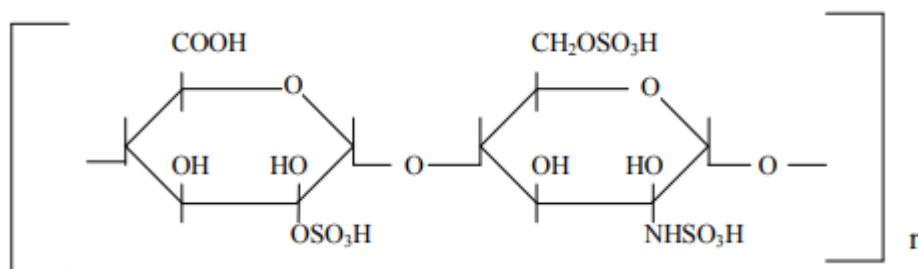


Они служат основой при получении альгинатных гелей. В присутствии моновалентных катионов эти полисахариды даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор, а в присутствии двухвалентных катионов, особенно Ca^{2+} , наблюдается образование геля. В зависимости от присутствующего катиона эти гели и носят различные названия: натрий альгинатный гель, кальций альгинатный гель и т. д.

Характерной особенностью этих носителей является зависимость их растворимости от температуры и pH-раствора. Для иммобилизации биопрепаратов широкое распространение получила система с альгинатом кальция. Выбор этого геля для иммобилизации произошел не случайно: условия включения в гель альгината кальция очень мягкие, полимер можно стерилизовать автоклавированием, и кроме того, процесс иммобилизации обратим, что достигается добавлением агента, связывающего Ca^{2+} (например, ЭДТА или лимонной кислоты). Последнее особенно важно было на начальных этапах исследования, поскольку необходимо было изучать свойства клеток по мере их нахождения в иммобилизованном состоянии.

От соотношения концентрации альгината и Ca^{2+} зависит плотность сшивки геля. Стабильность геля возрастает с увеличением концентрации полимера, но при высоких концентрациях альгината масса становится вязкой, что может затруднять процесс образования гранул. Поэтому необходимо подобрать такие условия, которые бы позволили получать стабильный гель.

Гепарин представляет собой кислый полисахарид, содержащий чередующие звенья сульфатированной D-глюкуроновой кислоты (или L-идуроновой) и сульфатированного глюкозамина (или N-ацетилглюкозамина):



Гепарин успешно применяется для получения водорастворимых препаратов иммобилизованных ферментов, используемых в медицине для введения *in vivo*.

κ-Каррагинан. Каррагинаны представляют собой гетерогенные полисахариды, содержащие главным образом эфиры α-D-галактопиранозилсерной кислоты. κ-Каррагинан — это нерастворимая фракция, которую получают при добавлении ионов Ca^{2+} к водному экстракту каррагинана. При нагревании он растворяется, а при последующем охлаждении образует гель. Температура образования и качество геля зависят как от концентрации полимера, так и от количества присутствующих в растворе катионов (например, K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} или Ba^{2+}).

Белки используют в качестве носителей для иммобилизации ферментов. Известно, что многие ферменты в клетке функционируют в тесном контакте с липидами и белками. Поэтому полагают, что изучение поведения ферментов, иммобилизованных на белковых матрицах, позволит также лучше понять закономерности функционирования ферментов *in vivo*. С точки зрения практической значимости важными свойствами этих носителей являются высокая вместимость по отношению к ферментам и способность к биодegradации, а также возможность применения большинства из них (благодаря фибриллярной природе) в виде тонкой пленки (толщина 80 мкм).

Иммобилизацию на белковых носителях можно проводить как в присутствии, так и отсутствии сшивающих агентов. К недостаткам белков как носителей, в частности для медицинских препаратов, используемых *in vivo*, следует отнести высокую иммуногенность (исключение составляют коллаген и фибрин).

Наиболее часто в качестве носителей применяют структурные белки, такие как кератин, фиброин, коллаген; двигательные белки, в частности миозин, а также транспортные белки, например сывороточный альбумин.

Коллаген — фибриллярный белок группы склеропротеидов, основной компонент хрящей и сухожилий, обладает высокой прочностью на разрыв. Особенностью этого белка является высокая гидрофильность. Легкость выделения коллагена и наличие большого числа групп для связывания ферментов делают возможным его использование в качестве носителя. Коллаген используют и в виде модифицированных производных. Например, блокированием amino- или карбоксильных групп изменяют поверхностный заряд носителя и, соответственно, гидрофильность, с помощью сшивающих аминов получают сжатую микроструктуру. Наиболее часто коллаген употребляется в азидной форме. В результате длительной обработки коллагена кипящей водой, в ходе чего гидролизуются некоторые его ковалентные связи, получают желатин. Ценностью этого носителя, обладающего гелевой структурой, является нетоксичность, легкость биodeградации, что позволяет применять его в фармацевтической и пищевой промышленности.

Другим представителем фибриллярных белков группы склеропротеидов является *кератин*. Из кератина почти полностью состоят шерсть, волосы, роговые покровы, шелк и т. д. Чаще всего кератин получают при переработке перьев. Таким образом, кератин дешев и доступен в больших количествах.

Существуют две формы кератина — α и β . α -Кератин характеризуется высоким содержанием цистеина, что способствует иммобилизации препаратов, содержащих SH-группы. β -Кератины характеризуются высоким содержанием глицина и аланина, что способствует образованию вытянутой зигзагообразной полипептидной цепи. Нити β -кератина обладают мягкостью, гибкостью и нерастворимостью, однако по прочности уступают α -кератину.

При иммобилизации препаратов на носителях белковой природы необходимо учитывать диффузионные ограничения, определяемые гелевой структурой матрицы.

Липиды. Иммобилизация ферментов на природных липидных носителях (конструирование ансамблей белок—липид) может рассматриваться как приближение к живой клетке. Для такой иммобилизации, как правило, используются природные липиды — компоненты биомембран. Обычно липидные носители применяются в виде монослоев на различных поверхностях или бислоев (как правило, сферической формы). Липиды, имеющие хотя бы небольшую полярную «головку», способны образовывать мономолекулярную пленку на границе раздела фаз (вода—воздух, вода—неполярный растворитель). Липидные молекулы в монослое расположены таким образом, что

полярные «головки» погружены в водную среду, а углеводные группы направлены в воздух или неполярную среду. Такая пленка способна сорбировать белковые молекулы.

Изучение монослоев липидов, содержащих белок, помогает также установить природу взаимодействия липидов и белков в биологической мембране.

Липидный монослой можно нанести на твердую подложку (силикагель, сажа и т. д.). В качестве липидной матрицы используют обычно лецитин, фосфатидилэтаноламин и холестерин. Возможность варьировать структуру и ориентацию молекул в липидных слоях достигается подбором полярности носителя и природы используемого растворителя липида. Если липид с молекулами бифильной природы, растворенный в неполярном органическом растворителе (бензол, гептан), адсорбировать на полярном силикагеле, то в монослое липида углеводородные цепи будут ориентированы наружу. При адсорбции липида из полярного растворителя на неполярной графитовой саже можно получить гидрофильный монослой, в котором полярные головки ориентированы в сторону растворителя.

В качестве природных носителей используются *липосомы*. Для приготовления липосом наиболее часто используются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и др. Размер и форма липосом зависит от способа их приготовления, а также от таких факторов, как кислотность среды, присутствие неорганических солей и природы используемого липида.

Существует три различных типа липосом: мультиламеллярные, моноламеллярные и макровезикулярные. Мультиламеллярные липосомы представляют собой замкнутые упорядоченные структуры, состоящие из нескольких концентрических липидных бислоев, отделенных один от другого водной средой. Расстояние между соседними бислоями составляет 7,5 нм, диаметр центрального водного ядра равен ~0,15 мкм, а общий диаметр мультиламеллярных липосом колеблется от 1–2 до 50 мкм.

Ультразвуковая обработка мультиламеллярных липосом приводит к трансформации их в моноламеллярные. Диаметр таких липосом составляет 20–50 нм.

Макровезикулярные липосомы образуются, например, путем слияния малых липосом, индуцируемого ионами Ca^{2+} , а также присутствием фосфолипидов с отрицательно заряженными головными группами. Такие липосомы состоят из одного бислоя и имеют диаметр от 60 нм до 100 мкм.

Широкое применение липосом как носителей для ферментов и лекарственных препаратов обусловлено простотой получения, легкостью регенерации иммобилизованного материала, а также возможностью использования *in vivo* благодаря близости свойств этих липидов — носителей и природных биомембран.

Синтетические полимерные носители. Огромное разнообразие доступных синтетических полимеров обеспечило их широкое использование в качестве носителей для иммобилизации. Вводя в полимерные молекулы различные функциональные группы, можно в широких пределах варьировать физические свойства носителей и создаваемое ими микроокружение для иммобилизованных препаратов.

Синтетические полимеры применяются как для ковалентной иммобилизации, так и сорбционной, а также для получения гелей и микрокапсул.

Полимеры на основе *стирола* являются основой многих промышленных марок ионообменных материалов. Для сорбционной иммобилизации применяются как микропористые, так и макропористые (размер пор 10–1000 нм) материалы. Сополимеры стирола в виде сферических частиц с различными сшивающими агентами можно получить гранульной полимеризацией. Геометрическая структура таких макропористых носителей (размер пор, удельная поверхность) варьирует в широких пределах при изменении количества агента и концентрации растворителя мономеров в реакционной среде. Наиболее часто в качестве сшивающего агента используется дивинилбензол. Пористость сополимеров стирола регулируют полимеризацией в присутствии порообразователей, например добавок, разлагающихся при нагревании с выделением газообразных веществ (NH_4Cl).

В последние годы стали применяться носители, имеющие макросетчатую, изопористую и гетеропористую структуры. Макросетчатые полистиролы подобны стеклам. Они имеют стабильную структуру пор, не набухают в воде, отличаются повышенной механической прочностью. Получают их эмульсионной сополимеризацией стирола с дивинилбензолом в присутствии осаждающего вещества. Изопористый полистирол образуется при сшивании стирола в дихлорэтане, содержащем *n*-ксилилендихлорид. Под действием монохлордиметилового эфира и парообразователя получают гетеропористый полистирол с диаметром пор ~ 1 мкм. Применение гетеропористых носителей обеспечивает высокую остаточную активность биопрепаратов.

Немодифицированные полистирольные носители гидрофобны. Присоединением ионогенных групп в пароположении бензольных радикалов можно придать некоторую гидрофильность, хотя в целом, сохраняется склонность полимера к гидрофобным взаимодействиям.

Широкие возможности для разработки новых видов носителей открывает введение реакционноспособных ангидридных групп в состав синтетических полимеров. В этом случае получают носитель при сополимеризации эквимольных количеств стирола и малеинового ангидрида. В присутствии избыточного количества диметилендиамина

получают носитель, содержащий аминогруппы. Последние обладают высокой вместимостью по отношению к белкам, могут применяться как для ковалентной, так и нековалентной иммобилизации.

Полиакриламидный гель получается при сополимеризации производных акриловой кислоты со сшивающими агентами.

Полиакриламид — носитель, часто используемый для включения ферментов и клеток, не обладает ионообменными свойствами, поэтому при иммобилизации рН-профиль активности препаратов практически не меняется. По этой же причине не происходит ни обогащения, ни обеднения носителя заряженными субстратами и продуктами. Однако отсутствие взаимодействия включенных белков с носителем не способствует их удержанию. Для устранения утечки требуется высокая степень сшивки носителя, т. е. желательна как можно более полная полимеризация.

К сожалению, при высокой степени сшивки возникает проблема диффузионных ограничений. Таким образом, хотя включение препаратов в полиакриламидный гель используется довольно широко, методы иммобилизации, также как ковалентное сшивание с инертным носителем, имеют в этом случае определенные преимущества. Кроме того, полиакриламидный гель вследствие токсичности используемых для его получения мономеров (акриламида, бисакриламида) и выделения тепла при полимеризации снижает жизнеспособность клеток и ферментов. Но поскольку клетки значительно больше ферментов, то высокая степень сшивки необязательна. По этой причине для иммобилизации клеток в последнее время используют поперечносшитый и предварительно полимеризованный линейный полиакриламид.

Полиамидные носители — это группа различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой $-C(O)-NH-$. Один из способов получения основан на гомополиконденсации аминокислот, например ϵ -аминокапроновой кислоты.

Носители на основе *поливинилового спирта* обладают высокой реакционной способностью. Соответствующая обработка позволяет вводить в них различные функциональные группы: альдегидные, хлортриазинные, дисульфидные и др. Для получения гидрофильных гелей носители могут быть сшиты глутаровым альдегидом в кислой среде, а в щелочной — эпихлоргидрином. К достоинствам этих носителей следует отнести, помимо высокого содержания реакционноспособных групп, большую вместимость по отношению к белкам.

Гидрофильные *полиуретановые полимеры*, содержащие группировку $-NH-C-O-$, являются достаточно удобными материалами для включения препаратов в гель; процедура иммобилизации в этом случае состоит в простом смешивании компонентов.

Полиуретанты обладают стойкостью по отношению к воде и окислителем по сравнению с полиамидами.

Неорганические материалы. Для иммобилизации используются различные типы неорганических носителей. Основными качествами, обуславливающими широкое внедрение неорганических материалов в промышленные процессы, являются легкость их регенерации и возможность придания им любой конфигурации. Носители применяются как в виде порошков, шариков, так и монолита.

Неорганические носители могут быть как пористыми, так и непористыми. К *макропористым кремнеземам* относятся силикагели, силохромы и макропористые стекла. Достоинства: механическая прочность, химическая инертность ко многим растворителям, наличие жесткого скелета с заданным размером пор, устойчивость к воздействию микроорганизмов. Поверхность частиц кремнеземов покрыта гидрофильными и гидроксильными группами, обладающими слабовыраженными кислотными свойствами. К недостаткам этих носителей следует отнести использование их в ограниченном диапазоне pH и некоторую неспецифическую сорбцию на их поверхности. Можно химически модифицировать кремнеземы путем введения различных реакционноспособных групп ($-CN$, $-NO_2$, $-NH_2$ и др.) или гидрофобизировать поверхность соответствующими реагентами.

Применение различных модифицирующих агентов дает возможность целенаправленного изменения свойства поверхности кремнеземных носителей. Однако стоимость кремнеземных носителей относительно высока, а модификация еще более повышает их стоимость, что является существенным ограничением во внедрении их в промышленности. Природные алюмосиликаты (глины, цеолиты), а также пористая керамика. Поверхность также может быть модифицирована различными органическими веществами. Они характеризуются высокой плотностью поверхностных групп, связыванием белковых групп, что имеет немаловажное значение для эффективной иммобилизации.

Уголь и графитированная сажа. Уголь может быть использован в качестве носителя как для адсорбционной, так и для ковалентной иммобилизации. Достоинства графитированной сажи: однородность и электрическая проводимость ее поверхности. Последнее свойство важно при создании биоэлектрокаталитических систем на основе иммобилизованных препаратов. К недостаткам можно отнести низкую механическую прочность.

Весьма перспективны носители на основе *металлов* и их *оксидов*. Эти носители характеризуются высокой механической прочностью, относительной дешевизной,

стабильностью, хорошими гидродинамическими свойствами. Металлические поверхности, используемые в качестве носителей, как правило модифицируют, либо создавая оксидную пленку на поверхности матрицы, либо покрывая их слоем полимера (производные полистирола, целлюлозы и т. д.). Это позволяет повысить сорбционную емкость носителя.

4. Использование иммобилизованных ферментов

Синтез и модификация органических соединений. Ферменты в своем естественном окружении катализируют сотни и тысячи процессов, приводящих к образованию и распаду химических связей. В принципе любой из них может быть реализован в качестве процесса «тонкого органического синтеза». Однако на практике дело обстоит не так просто, поскольку «естественное окружение» фермента невозможно создать в технологическом реакторе. Решение соответствующей задачи инженерной энзимологии зависит от того, каким образом исследователю (или технологу) удалось реализовать каталитический потенциал фермента или ферментной системы и насколько остроумные подходы, зачастую весьма далекие от тех, которые предлагает природа, были при этом использованы.

Был предложен и реализован подход к проведению ферментативных реакций в водно-органических системах с крайне высоким содержанием неводного компонента. Основная идея решения состоит в использовании органического растворителя, практически несмешиваемого с водой (хлороформ, эфир, жирные алифатические спирты, углеводороды и т. д.), в то время как сам иммобилизованный фермент находится в водной фазе системы. Субстраты, будучи растворенными в органической фазе, свободно диффундируют из нее в воду и там под действием фермента претерпевают химическое превращение; образовавшиеся продукты могут диффундировать из воды обратно в органическую фазу. Поскольку относительное содержание органической фазы может быть в принципе сколь угодно близко к единице, то условия термодинамического равновесия реакции в такой двухфазной системе могут быть сколь угодно близки к равновесию в чистой органической среде. Эта идея была апробирована на примере синтеза этилового эфира N-ацетил-L-триптофана из этанола и других реакциях.

Перспективный метод ферментативного получения незаменимой аминокислоты L-лизина из DL- α -аминокапролактама разработан в Японии и СССР. В данном случае используются два фермента — L- α -аминокапролактамамидаза и α -аминокапролактамацеаза. Они имеют бактериальное происхождение, стабильность их после иммобилизации достаточно высока.

Иммобилизованная пенициллинамидаза нашла промышленное применение для получения 6-аминопенициллановой кислоты из пенициллина G. Было показано, что субстратная специфичность этого фермента достаточно широка и позволяет осуществлять гидролиз не только пенициллина, но и цефалоспорины, причем в последнем случае образуется 7-аминодезацетокси-цефалоспориновая кислота (7-АДЦК) — важное исходное соединение для синтеза антибиотиков цефалоспоринового ряда. Успешно был проведен

синтез ряда антибиотиков пенициллинового и цефалоспоринового ряда — ампициллина, цефалексина, цефалотина и цефалоридина — с помощью пенициллинамидазы, иммобилизованной путем связывания с нерастворимыми носителями, а также в составе клеток микроорганизмов.

Интенсивно разрабатывается производство ряда физиологически активных веществ (преднизолон и других кортикостероидов, оптически активных эстрогенов, простагландина E₂ и т. д.) с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Биоконверсия растительного сырья. К важнейшим направлениям инженерной энзимологии как в фундаментальном, так и прикладном отношении следует отнести биоконверсию возобновляемого растительного сырья для целей пищевой, микробиологической, нефтехимической, энергетической, медицинской промышленности и сельского хозяйства. В зависимости от вида исходного сырья, желаемого продукта и технологического решения процесса в целом биоконверсия может включать в себя предварительную обработку сырья, ферментативную деструкцию его вплоть до мономера, ферментацию мономеров с получением желаемого продукта или прямую микробиологическую конверсию сырья в продукты (промежуточные или конечные). Конкретными процессами, для которых, как ожидается, будет найдено достаточно эффективное технологическое решение, являются следующие:

1. Ферментативное получение глюкозы из целлюлозосодержащего сырья (отходов промышленности и сельского хозяйства).

2. Биоконверсия целлюлозных и лигноцеллюлозных материалов в этанол.

3. Гидролитическая (возможно, окислительно-гидролитическая) деструкция растительной биомассы для повышения ее питательной ценности для сельскохозяйственных животных (в первую очередь — крупного рогатого скота).

4. Ферментативная и (или) микробиологическая деструкция лигнина для получения алкилфенольных, оксифенольных и других фенольных производных в качестве возможных исходных соединений для последующего получения продуктов полимерной химии.

Применение иммобилизованных ферментов для химического анализа. Благодаря своей высокой специфичности ферменты давно применяются в области аналитической химии. Применение иммобилизованных ферментов способствует созданию методов «безреагентного» анализа, позволяющих проводить практически непрерывный анализ водных растворов органических (а в ряде случаев и неорганических) соединений. В свою очередь достижения в этой области стимулируют развитие эффективных методов контроля окружающей среды, клинической диагностики и т. д. [1,

с. 16] Созданные в недавнее время так называемые ферментные электроды применяются в быстром автоматическом анализе многокомпонентных систем. Наконец, разработаны чувствительные ферментативные методы с использованием термисторов, в том числе и с «ферментными термисторами».

Применение иммобилизованных ферментов, позволяющих проводить массовые химические анализы в отдельных пробах или в потоке (с многократным использованием одного и того же препарата фермента), в значительной степени снимает проблему высокой стоимости ферментных методов анализа и зачастую повышает точность аналитического метода. Существуют два общих подхода к аналитическому определению концентрации реагентов (субстратов) в исследуемой системе. В одном из них ферментативную реакцию доводят до полного израсходования определяемого вещества (или до установления в системе равновесия между исходными реагентами и продуктами реакции), регистрируя при этом изменение какого-либо подходящего физического или химического свойства системы, и по количеству образовавшегося продукта рассчитывают количество субстрата в исходном образце. Во втором подходе используют кинетические методы анализа для определения скорости появления продукта или исчезновения субстрата в ферментативной реакции и вычисление исходной концентрации субстрата по соответствующей калибровочной кривой. Этот метод применим также для определения концентрации эффекторов (ингибиторов или активаторов), присутствующих в реакционной системе. Оба данных подхода были реализованы на практике с применением иммобилизованных ферментов. Следует, однако, отметить, что ферментативные методы пока еще недостаточно используются для контроля окружающей среды. Разработано сравнительно мало ферментативных методов определения остаточных количеств пестицидов, токсичных органических и неорганических соединений, ионов физиологически активных металлов.

Новые возможности создания безреагентных методов анализа открывает впервые обнаруженное в нашей стране явление биоэлектродкатализа — ускорения электродных процессов под действием ферментов. Приложения биоэлектродкатализа не ограничиваются аналитической химией. Высокие скорости ферментативных реакций способны обеспечить весьма высокие удельные мощности электрохимических преобразователей энергии и увеличить число используемых топлив. Это в свою очередь может создать основу для внедрения окислительно-восстановительных ферментов в системы преобразования энергии химических реакций в электричество. Наконец, подобные же системы могут найти применение при решении проблемы фотолиза воды видимым светом с образованием водорода и кислорода.

Применение иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывает новые перспективы создания эффективных лекарственных средств. Ферменты, закрепленные на носителях или модифицированные полимерами, зачастую снижают свою антигенность из-за уменьшения доступности их для рецепторов иммунной системы. На принципах иммобилизации физиологически активных соединений базируется приготовление ферментных препаратов типа «контейнер» и других, обладающих повышенным терапевтическим эффектом.

Интересные возможности были обнаружены при использовании ферментов для повышения чувствительности иммунохимических методов анализа. Сущность любого иммунохимического анализа сводится к тому, чтобы после завершения реакции антиген-антитело определить концентрацию избыточного компонента (антигена или антитела), не вступившего в реакцию. Поскольку эти концентрации очень невысоки (10^{-12} — 10^{-8} моль/л), для их обнаружения обычно применяют легко детектируемую метку радиоактивным атомом, вводимым в один из компонентов (радиоактивный йод, тритий). Оказалось, что без потери чувствительности метода радиоактивная метка может быть заменена присоединением фермента, который после реакции обнаруживается по его каталитической активности. Накоплен достаточный материал по применению этого нового метода, получившего название иммуноферментный анализ (ИФА). С помощью ИФА могут быть детектированы любые вещества, обладающие свойствами антигенов и, естественно, многочисленные возбудители заболеваний человека, животных, растений. Многие из этих методов могут быть приспособлены к автоматическому режиму слежения, что важно для решения задач экологии, контроля технологических производств и т. д.

Заключение

Химическая модификация ферментов, их перенос в неводную среду, обработка с целью стабилизации, белковая инженерия — все эти методы относятся к компетенции инженерной энзимологии. Центральный метод инженерной энзимологии — иммобилизация ферментов.

Под иммобилизацией клеток и ферментов понимают любое ограничение свободы их физического движения в пространстве. Материальный посредник, ограничивающий подвижность, считается носителем, а полученная система клетка-носитель называется иммобилизованным биокатализатором.

Иммобилизация клеток и ферментов обеспечивает возможность создания биотехнологических процессов длительного пользования с высоким выходом целевых продуктов, при этом техническое решение таких процессов существенно упрощено по сравнению с процессами на основе свободных (суспензионных) клеток и ферментов.

Принцип иммобилизации заключается в стабилизации ферментативной активности ферментов, принципиальном увеличении объемной продуктивности, расширении значений рН- и температурных оптимумов, удлинении срока действия ферментов внутри и вне клетки, сокращении времени процесса и достижении более эффективного превращения субстрата в продукт вместо биомассы. Использование нерастворимых носителей для иммобилизации клеток и ферментов позволяет получать незагрязненный продукт при возможности многократного применения и технически несложного отделения системы от реагентов.

Иммобилизованные ферменты по своей сути представляют собой препараты ферментов, подвижность которых ограничена благодаря связыванию с носителем, включению в гель или микрокапсулы. Связывание с носителем происходит за счет ковалентного взаимодействия, путём адсорбции и др. Иммобилизация ферментов создает ряд преимуществ при использовании: их легко можно отделить от инкубационной среды и применять многократно; часто происходит стабилизация ферментов — повышается их термостабильность, устойчивость к агрессивным средам и протеолитическим ферментам. На основе иммобилизованных ферментов создаются непрерывные биотехнологические процессы (производство аминокислот, антибиотиков, гормонов и др.). Они применяются для решения фундаментальных задач в биохимии, а также для создания т. н. ферментных электродов, используемых для определения содержания глюкозы, мочевины и других соединений, в иммуноферментном анализе и медицине (для заживления ран, лечения онкологических и кардиологических заболеваний).

Список использованных источников

1. Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 8: Инженерная энзимология / И. В. Березин, А. А. Клёсов, В. К. Швядас и др. – М.: Высшая школа, 1987. – 143 с.
2. Гамаюрова В. С., Зиновьева М. Е. Ферменты. Лабораторный практикум: учеб. пособие. – СПб.: Проспект Науки, 2011. – 256 с.
3. Демьянцева Е. Ю., Парфенова А. В. Способы инкапсулирования ферментов: учебно-метод. пособие. – СПб.: ВШТЭ СПбГУПТД, 2018. – 20 с.
4. Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А. Основы биотехнологии. – М.: Академия, 2003. – 208 с.
5. Коницев А. С., Севастьянова Г. А. Молекулярная биология: учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Академия, 2012. – 400 с.
6. Ксенофонтов Б. С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии: учеб. пособие. – М.: ИД «ФОРУМ», ИНФРА-М, 2017. – 224 с.
7. Ленивко С. М., Кирисюк Ю. В. Основы биотехнологии. – Брест: БрГУ, 2018. – 92 с.
8. Рыбчин В. Н. Основы генетической инженерии: учеб. пособие для вузов. – СПб.: СПбГТУ, 2002. – 522 с.
9. Шмид Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2016. – 325 с.
10. Юрин В. М. Имобилизованные клетки и ферменты: курс лекций. – Минск: БГУ, 2006. – 133 с.