

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ, МОЛОДІ ТА СПОРТУ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ**

**Н.М. ГРЕГІРЧАК
М.М. АНТОНЮК**

ІММОБІЛІЗОВАНІ ФЕРМЕНТИ І КЛІТИНИ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

для студентів спеціальності 8.05140101 «Промислова біотехнологія»
денної та заочної форм навчання

Київ НУХТ 2011

Н.М. Грегірчак, М.М. Антонюк Імобілізовані ферменти і клітини в біотехнології: Конспект лекцій для студ. спец. 8.05140101 «Промислова біотехнологія» ден. та заоч. форм навч. – К.: НУХТ, 2011. – 59 с.

Рецензент **Т.П.Пирог**, д-р біол. наук

Н.М. ГРЕГІРЧАК,
М.М. АНТОНЮК, кандидати техн. наук

Видання подається в авторській редакції

© Н.М. Грегірчак,
М.М. Антонюк, 2011
© НУХТ, 2011

ВСТУП

У біологічних об'єктах ферменти перебувають у фіксованому стані на поверхні різних клітинних структур, завдяки чому вони зберігають тривалий час свою активність. У технології довго використовувалися препарати нативних ферментів, що обмежувало термін їх застосування. Досягнення в галузі ензимології сприяло детальному вивченню ферментів, завдяки чому було створено теоретичну базу для виробництва ферментів пролонгованої дії або іммобілізованих ферментних препаратів.

Вже в 1916 р. Нельсон і Гріффін показали, що інвертаза, якщо адсорбувати її на вугіллі або на алюмогелі, зберігає каталітичну активність. Однак, цілеспрямована розробка такого роду гетерогенних каталізаторів на основі ферментів розпочалася лише в 50-х рр. ХХ-го століття. Одним із провідних центрів, де активно проводилися дослідження в галузі іммобілізації ферментів, стала кафедра хімічної ензимології Московського державного університету під керівництвом члена-кореспондента АН СРСР І. В. Березіна.

Термін “іммобілізовані ферменти” був узаконений в 1971 р., однак на сьогодні поняття “іммобілізація” розуміють ширше, ніж просто зв'язування ферменту з водонерозчинним носієм.

Іммобілізованими називаються ферменти, рух яких у просторі повністю або незначно обмежено. Іммобілізація ферменту – це методичний прийом, при якому молекулу біокаталізатора включають у фазу, відокремлену від фази вільного розчину, але здатну обмінюватися з нею молекулами субстрату.

Іммобілізовані ферменти, порівняно з нативними попередниками, мають такі переваги:

- гетерогенний каталізатор легко відокремлюється від реакційного середовища, що дає можливість зупиняти реакцію в будь-який момент та отримувати чистий від ферменту продукт;

- ферментативний процес з використанням іммобілізованих ферментів можна проводити безперервно, регулюючи швидкість реакції та вихід продукту;

- модифікація ферменту дозволяє змінити його властивості (специфічність, залежність каталітичної активності від рН та іонного складу, стабільність);

- використання іммобілізованих ферментів у медицині зумовлене зниженням їх імуногенності, алергенності та токсичності поряд з підвищеною стабільністю та пролонгованістю дії по відношенню до нативних аналогів.

Отже, ідеї іммобілізації біокаталізаторів стимулювали бурхливий розвиток одного з важливих напрямів сучасної біотехнології – інженерної ензимології. Завдання інженерної ензимології полягає у розробленні наукових основ застосування ферментних каталізаторів для створення нових біотехнологічних процесів у промисловості, нових методів у терапії та

медичній діагностиці, аналізі, органічному синтезі й інших галузях практичної діяльності. Наряду з прикладними аспектами іммобілізація ферментів та клітин є новим підходом у вивченні фундаментальних проблем молекулярної ензимології та біохімії.

1. ОСНОВНІ ГАЛУЗІ ЗАСТОСУВАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ

Ферменти як біологічні каталізатори застосовуються в різних галузях промисловості – харчовій, фармацевтичній, текстильній, шкіряній, в медицині, сільському господарстві, в тонкому органічному синтезі, для очищення стічних вод тощо.

Зокрема, широкого використання набули іммобілізовані ферменти та ферментні композиції *в технологічних процесах харчової промисловості*, таких як гідроліз крохмалю, білків, полісахаридів, освітлення вин, соків, покращення їх фільтрації, інтенсифікації процесів дифузії; в консервній промисловості; в масложировій – вдосконалення процесів рафінації і екстракції, гідроліз масел, покращення якості харчових продуктів, удосконалення умов їх зберігання після обробки іммобілізованими ферментами. В харчовій промисловості за участі іммобілізованих ферментів також одержують глюкозо-фруктозні сиропи, глюкозу, яблучну та аспарагінову кислоти, оптично активні L-амінокислоти, дієтичне безлактозне молоко, цукри із молочної сироватки тощо.

Для *синтетичної органічної хімії* важливим є збереження ферментом каталітичної активності у двофазних реакційних середовищах, навіть при досить малому вмісті води. Тому рівновагу реакції, що каталізується, (вихід продукту) експериментатор може регулювати в широких межах, підбираючи необхідний органічний розчинник.

Іммобілізовані ферменти дали поштовх до створення принципово нових методів “безреагентного” неперервного аналізу багатокомпонентних систем органічних та неорганічних сполук. Головною ланкою у цих методах є “ферментні електроди” та “ферментні термістори”. У майбутньому важливу роль у контролі за станом навколишнього середовища та в клінічній діагностиці відіграватимуть такі методи, як біолюмінісцентний та імуноферментний аналіз.

Нині проблеми *біоконверсії енергії та маси* намагаються вирішувати біотехнологічними методами з використанням іммобілізованих ферментів при фотолізі води та біоелектрокаталізі, у створенні паливних елементів. Перспективним є й використання іммобілізованих ферментів у процесах переробки лігніноцелюлозної сировини.

Іммобілізовані ферменти можуть застосовуватися також як *штучні підсилювачі слабких сигналів*. На активний центр іммобілізованого ферменту можна подіяти через носій, піддаючи його ультразвуковому обробленню чи фотохімічним перетворенням. Це дозволяє регулювати каталітичну активність системи фермент-носіїв під дією механічних,

ультразвукових і світлових сигналів. На цій основі були створені механічно- і звукочутливі датчики та відкритий шлях до створення безсрібної фотографії.

На сьогодні найінтенсивніше розвивається **використання іммобілізованих ферментних препаратів у медицині**.

Основними напрямками ензимотерапії є:

- 1) ліквідація дефіциту ферментів з метою компенсації вродженої чи набутої функціональної нестачі;
- 2) видалення нежиттєздатних, денатурованих структур, клітинних і тканинних осколків;
- 3) лізис тромбів;
- 4) комплексна терапія злоякісних новоутворень;
- 5) детоксикація організму.

Однак, повсякденне клінічне використання ферментів обмежено як економічними факторами (високою вартістю і малодоступністю), так і швидкою інактивацією в умовах організму, а також спричиненими ними, як чужорідними білками, різними побічними реакціями (антигенність, алергенність, токсичність тощо). Тому одним із актуальних напрямів інженерної ензимології є розробка та впровадження саме іммобілізованих терапевтичних ферментних препаратів (табл. 1).

Таблиця 1

Асортимент деяких іммобілізованих ферментних препаратів

Назва препарату	Продуцент ферменту	Форма випуску, спосіб використання	Фармакологічна дія
1	2	3	4
Стрептодеказа (streptodecasa)	<i>Streptomyces naemoliticus</i>	Ліофілізований порошок у флаконах, внутрішньовенно	Фібринолітик
Стрептокіназа (streptokinasa)	-//-	-//-	Тромболітик
Целіаза (celiasa)	-//-	-//-	-//-
Рибонуклеаза (ribonucleasum)	-//-	Ліофілізований порошок, внутрішньом'язово, аерозоль - місцево	Антифлогістик при захворюваннях дихальних шляхів
Аспераза (asperasum)	<i>Aspergillus oryzae</i>	2%-ва мазь в тубах, місцево	Протеолітичне, лікуюче при гнійно-некротичних процесах

Продовження табл. 1

1	2	3	4
Террилітин (terrilytinum)	<i>Aspergillus terricola</i>	Ліофілізований порошок у флаконах, місцево, внутрішньопорожнинно	-//-
Терридеказа (terridecasa)	-//-	-//-	Протеолітичне, протизапальне, ранозагоювальне
Профезим (profezimum)	<i>Bacillus subtilis</i>	10%-ва суспензія у флаконах, місцево	Протеолітичне, некролітичне, протиабрякове
Альфа-амілаза (alpha- amylasum)	-//-	Таблетки у флаконах, перорально	Регулює травлення
Ораза (orazum)	<i>Aspergillus oryzae</i>	Гранули у флаконах, перорально	Протеолітичне, протизапальне, регулює травлення
Сомілаза (somylasum)	<i>Penicillium solitum, Bacillus subtilis</i>	Таблетки у флаконах, перорально	Ліполітичне, регулює травлення
Пеніциліназа (penicillinasum)	<i>Bacillus licheniformis</i>	Ліофілізований порошок у флаконах, внутрішньом'язово	Гострі алергічні реакції, анафілактичний шок

Існує два підходи щодо застосування таких препаратів.

1. При різних системних ураженнях, коли присутність ферменту необхідна у різних органах та тканинах, доцільним є використання стабілізованих водорозчинних препаратів іммобілізованих ферментів, які володіють підвищеною стабільністю у фізіологічних умовах і уповільненим виведенням із організму.

2. Для терапії локальних уражень, коли присутність ферменту необхідна лише в конкретному місці, доцільним є створення біосумісних ферментвмісних полімерних часток (що біодеградують або тимчасово імплантуються), які можуть бути локалізовані в певному місці і залишатися там заданий час, безперервно виділяючи в оточуюче середовище терапевтичний фермент (бажано додатково стабілізований).

Окремо виділяють напрям використання іммобілізованих ферментів у апаратах екстракорпоральної перфузії типу штучної нирки, в перев'язочних матеріалах для прискорення загоєння ран та опіків і модифікації внутрішньої поверхні протезів кровоносних судин з метою зниження тромбоутворення.

Імобілізовані ферменти відкрили шлях до створення лікарських препаратів пролонгованої дії із зниженою токсичністю та алергенністю.

Ферментвмісні препарати за допомогою катетеризації вводять безпосередньо в м'язову тканину або в капілярну мережу ураженого органу, де імобілізовані ферменти підтримують високу локальну концентрацію. Імобілізовані на водорозчинній полісахаридній матриці тромболітичні ферменти (стрептодеказа, стрептокіназа), переносяться в місце розміщення тромбу та ефективні в меншій дозі.

Перспективним є одержання біологічно активних полімерів медичного призначення спільною імобілізацією протеолітичних ферментів та антимікробних речовин з метою створення лікарських препаратів поліфункціональної дії. Розроблені технології створення інтерактивних ранових медичних пов'язок, отриманих імобілізацією ферментів та ліків на диальдегід целюлозі.

Однією з основних задач при одержанні медичних препаратів на основі імобілізованих ферментів є створення системи лікарських засобів з регульованою фармакокінетикою. З цією метою використовують включення ферментів у мікрокапсули, в тому числі і в ліпосоми.

Залежно від фізичних параметрів фосфоліпідів (заряду, рідини, розміру) ліпосоми проникають у клітину ендоцитозом або за рахунок злиття з природними мембранами. При ендоцитозі фосфоліпідна оболонка ліпосом усередині клітин руйнується фосфоліпазами і ферменти вивільняються в цитоплазму; при злитті з клітинною мембраною фосфоліпідний комплекс ліпосом входить до складу клітинних мембран, активна субстанція поступає в цитоплазму.

Спрямованість дії ліпосом може бути змінена за рахунок складу компонентів, що утворюють мембрану, спорідненість ліпосом до клітин-мішеней посилена специфічними чинниками (антитілами та ін.).

Пігулки і гранули ферментних препаратів (трипсину, лізоциму, лужної фосфатази, каталази та ін.) отримують в суміші з біосумісними полімерами. Імплантований в зону ураження або поблизу від неї фермент, що знаходиться в полімері, практично повністю захищений від дії агресивного фізіологічного середовища. З полімеру фермент виходить у нативному стані, швидкість його подальшої інактивації і виведення аналогічна нативному ферменту, що використовується традиційним способом.

Ліпосомні препарати ефективні при лікуванні інфаркту мозку та ішемічній хворобі серця.

Існують перспективні дослідження мультиферментних мікрокапсул, які імітують клітини живого організму. Створено препарати пролонгованої дії (тромболітичні, фібринолітичні, протеолітичні) для лікування серцево-судинних захворювань, тромбозів, тромбоемболій, інфарктів міокарда. Стерильний апірогенний розчин імобілізованих на поліетиленоксиді протеаз може використовуватися в медицині і ветеринарії при отриманні ін'єкційних препаратів імобілізованих ферментів; ліпази, імобілізовані на

твердих носіях, – при лікуванні різних захворювань шлунково-кишкового тракту та порушенні жирового обміну.

Контрольні запитання

1. Що таке іммобілізовані ферменти?
2. Які переваги використання іммобілізованих ферментів порівняно з нативними?
3. Наведіть приклади використання іммобілізованих ферментів у різних галузях промисловості.
4. Які основні напрямки використання іммобілізованих ферментів у відновлювальній терапії?

2. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ КЛІТИН

Поряд з іммобілізацією ферментів останнім часом все більшу увагу приділяють іммобілізації клітин і субклітинних структур. Це пояснюється тим, що у разі використання іммобілізованих клітин відпадає потреба у виділенні та очищенні продуктів мікробного синтезу; уможливорюється одержання поліферментних систем, що здійснюють багатостадійні безперервні процеси.

Біокатализатори на основі іммобілізованих клітин володіють усіма перевагами гетерогенних катализаторів та практично ідеально підходять для досягнення цілей і задач біотехнології.

Серед основних напрямів використання іммобілізованих клітин виділяють такі:

- трансформація і біосинтез органічних сполук;
- одержання енергії (біоенергії) ;
- одержання кормів, продуктів харчування, виробів побутової хімії;
- медицина, ветеринарія;
- утилізація відходів, контроль за станом навколишнього середовища;
- біоелектроніка;
- гідроліз ряду складних ефірів;
- інверсія сахарози;
- відновлення й гідроксилювання стероїдів;
- заміна традиційної сировини на нетрадиційну;
- видобуток мінеральної сировини;
- очищення і концентрування речовин;
- одержання біологічно активних сполук;
- використання іммобілізованих клітин і органел для процесів фотосинтезу, біокаталізу, очищення стічних вод від природних і чужорідних забруднень, зберігання культур в іммобілізованому стані;
- в медицині і біології для аналітичних цілей тощо.

Зокрема, іммобілізовані хроматофори використовують у лабораторних установках для синтезу АТФ, а пурпурові мембрани – для створення штучних фотоелектричних перетворювачів – аналогів сонячних батарей. Також створено реактори з іммобілізованими клітинами для виробництва етанолу тощо.

Використання іммобілізованих клітин виключає стадію очищення необхідних ферментів, підвищується стабільність ферментів у нативному оточенні всередині клітини, здійснюється тривала безперервна регенерація кофакторів.

Таблиця 2

Процеси із застосуванням іммобілізованих біокаталізаторів

Процес	Іммобілізований біокаталізатор
Одержання глюкозо-фруктозних сиропів	Глюкозоізомераза або мертві клітини, що містять глюकोзоізомеразу
Розділення рацемічних сумішей амінокислот	Аміноацилаза
Одержання похідних L-амінокислот	Гідантоїназа
Одержання 6-амінопеніцилінової кислоти	Пеніцилінамідаза або мертві клітини, що містять пеніцилінамідазу
Одержання безлактозного молока	Лактаза (β -галактозидаза)
Одержання інвертного цукру	Інвертаза
Одержання глюкози з гідролізатів крохмалю	Глюкоамілаза
Синтез L-аспарагінової кислоти	Мертві клітини, що містять аспартазу
Синтез L-яблучної кислоти	Живі клітини, що містять фумаразу
Трансформація гідрокортизону в преднізолон	Живі клітини, що містять 3-кетостероїд-Д-дегідрогеназу

Можливості клітинного метаболізму з погляду перетворення одних речовин в інші набагато ширші, ніж при використанні окремого ферменту або навіть мультиферментної системи, це дозволяє здійснювати більш складні синтези, трансформації, деструкції, багатостадійні сполучені процеси. Однак, клітини - більш "тонкий" в експлуатації об'єкт, ніж індивідуальні ферменти: у більшості випадків необхідно підтримувати

цілісність і життєздатність клітин, а також зберігати їх у тій фазі розвитку, в якій синтезуються необхідні клітинні ферменти, та враховувати можливість протікання небажаних (побічних) процесів.

У промислових процесах все частіше використовують клітини у стані спокою. Так, багато високовартісних продуктів синтезуються, зазвичай, у стаціонарній фазі росту продуцентів. Клітини, що ростуть і розмножуються, порушують структуру носія, вивільняються з нього і забруднюють цільовий продукт. Для пригнічення росту іммобілізованих клітин рослин використовують дефіцит фітогормонів, а на ріст клітин бактерій впливають додаванням антибіотиків.

Іммобілізовані клітини мікроорганізмів здатні відносно довго здійснювати характерні для них біохімічні процеси. Головним при іммобілізації клітин мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків — підбір методу іммобілізації клітин, що дозволяє зберегти їх здатність синтезувати велику кількість того чи іншого антибіотика тривалий час.

Рослинні клітини дуже чутливі до змін навколишнього середовища, і для їх іммобілізації можуть бути використані тільки найбільш м'які методи, наприклад, включення в гель кальцію альгінату. За допомогою іммобілізації рослинних клітин частково або повністю вдається вирішити проблеми, пов'язані з використанням культур рослинних тканин для отримання складних органічних сполук. Наприклад, іммобілізовані клітини *Digitales lanata* здатні здійснювати 1-2-β-гідроксилювання похідного дигоксину з утворенням дигітоксину – єдиного препарату наперстянки, який використовується у всьому світі.

На сьогодні розроблено технологію одержання біологічно активних речовин з біомаси рослинних клітин, які культивують у ферментерах суспензійним способом. Створені комерційні препарати (женьшень, шипшина та ін.).

Іммобілізовані клітини використовують при трансформації стероїдних сполук, оскільки деякі ферменти, особливо гідроксилази і дегідрогенази, — дуже лабільні білки. Як носії використовують поліакриламід (ПАА), каррагеніни, агар, кальцію альгінат.

Цікаві можливості відкриваються й при іммобілізації клітинних органел як активних поліферментних систем.

Отже, іммобілізація ферментів і клітин, як засіб збільшення їх активності та підвищення продуктивності синтезу запасних і фізіологічно активних речовин займає важливе місце в біотехнології. Нині ефективність процесів, які використовуються в найрізноманітніших галузях (медицина, енергетика, харчова промисловість, мікроелектроніка), вдалося підвищити за допомогою іммобілізованих препаратів.

Контрольні запитання

1. Які існують підходи щодо використання іммобілізованих клітин?

2. В яких промислових процесах використовуються іммобілізовані біокаталізатори?

3. Які переваги біокаталізаторів на основі іммобілізованих клітин?

3. МЕТОДИ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ

Суть іммобілізації ферментів полягає в прикріпленні їх в активній формі до нерозчинної основи або включенні в напівпроникну мембранну систему. Існує два методи іммобілізації ферментів: фізичний та хімічний.

3.1 Фізичні методи іммобілізації

Фізичні методи полягають у зв'язуванні ферменту без участі ковалентних зв'язків. Вони поділяються на два типи: адсорбційні та механічні.

При *адсорбційній іммобілізації* фермент утримується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних та водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій. При *механічному способі іммобілізації* відбувається включення ферменту в гелі, які зшиті поперечними зв'язками, включення ферменту в мікрокапсули, волокна, мембрани тощо. Фізичні методи іммобілізації прості, швидкі й ефективні. Вони широко застосовуються в інженерній ензимології.

Виділяють чотири таких типи зв'язування ферментів:

- адсорбція на нерозчинних носіях;
- включення в пори гелю;
- просторове відділення ферменту від об'єму реакційної системи за допомогою напівпроникної мембрани;
- включення в двофазне середовище, де фермент розчиняється і перебуває тільки в одній із фаз.

Найпростіший метод іммобілізації ферменту – це ***адсорбція на нерозчинному носії*** (рис. 1, а). Процедура іммобілізації полягає в змішуванні за придатних умов ферменту й носія, інкубації і відділенні нерозчинного компонента суміші від розчинного компонента центрифугуванням або фільтруванням.

Адсорбція ферментів на носіях здійснюється переважно за рахунок сольових та водневих зв'язків, а також Ван-дер-ваальсових сил. В ідеальному випадку іммобілізація ферменту не повинна призводити до втрати каталітичної активності.

Недолік цього методу полягає в тому, що фермент може зв'язуватися з носієм недостатньо міцно, тобто отримані похідні не володіють стабільністю: вплив незначних умов (рН, іонної сили, температури і природи розчинника) може призвести до десорбції ферменту з носія. Десорбцію ферменту може викликати також і субстрат. Вказані недоліки зменшують широке використання методу адсорбції для іммобілізації ферментів.

Переваги методу – простий, легкий у використанні, дешевий, забезпечує високий вихід і рівномірне розподілення зв'язаного ферменту в носії.

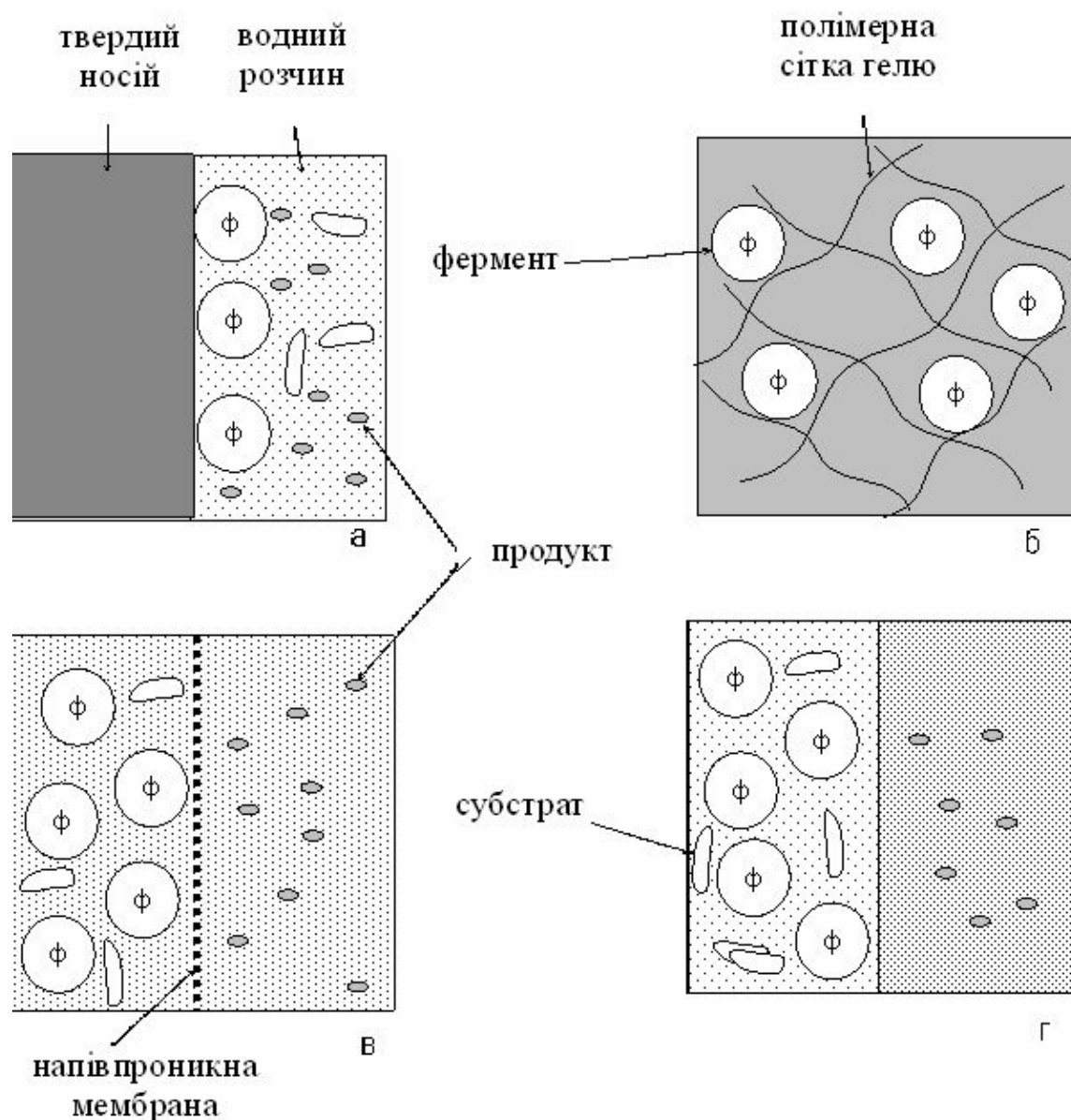


Рис. 1. Фізичні методи іммобілізації ферментів:

а – адсорбція на нерозчинному носії; б – включення в пори гелю; в – відокремлення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани; г – використання системи двофазного типу.

Ферменти можна адсорбувати (внаслідок фізичних або іонних взаємодій) на кераміці, склі, силікагелі, оксидах і гідроксидах металів, полісахаридах, органічних смолах та інших носіях. Для посилення адсорбції ферменти іноді хімічно модифікують, вводячи в поверхневий шар білкової глобули додаткові іонні або гідрофобні групи.

Включення ферменту в гель (рис. 1, б). Суть цього методу полягає в тому, що молекули ферменту включаються у трьохмірну сітку із тісно переплетьених полімерних ланцюгів, що утворюють гель. Іммобілізацію ферментів у гелі проводять двома способами (рис. 2).

1. Фермент поміщають у водний розчин мономеру, а потім проводять полімеризацію, в результаті чого утворюється полімерний гель із включеними в нього молекулами ферменту. В реакційну суміш часто додають також біфункціональні зшиваючі агенти, які надають полімеру, що утворюється, структуру трьохмірної сітки.

2. Альтернативний спосіб – фермент вносять у розчин уже готового полімеру, який потім якимось чином переводять у гелеподібний стан.

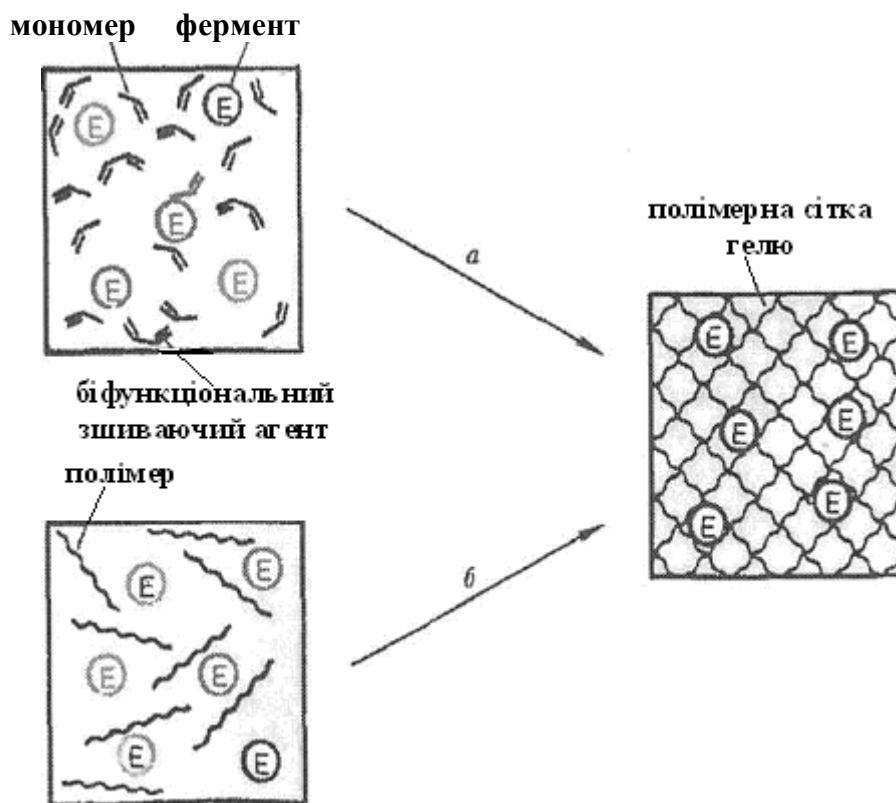


Рис. 2. Імобілізація ферментів включенням в гель, одержаний шляхом полімеризації низькомолекулярного мономеру (а) і готового полімеру (б)

До переваг методу відносять простоту реалізації, можливість створювати іммобілізовані препарати будь-якої геометричної конфігурації, забезпечуючи при цьому рівномірний розподіл біокаталізатора в об'ємі носія. Багато полімерних гелів володіють високою механічною, хімічною і тепловою стійкістю, що дає змогу багаторазово використовувати іммобілізовані препарати на їх основі. Імобілізація в гелі призводить до значної стабілізації ферментів (вихід активності до 90 %). Фермент, включений у гель, також надійно захищений від інактивації внаслідок бактеріальної контамінації.

Основним недоліком цього методу є те, що полімерна матриця створює значні перешкоди для дифузії субстрату до ферменту, знижуючи цим каталітичну ефективність іммобілізованого препарату.

Таким методом можна іммобілізувати α -амілазу, глюकोамілазу, глюкооксидазу та ін. Попередньо фермент адсорбується на порошкоподібних каоліні, желатині, крохмалі, целюлозі.

Для іммобілізації ферментів використовують також гелі полікремнієвої кислоти (силікагель), поліакриламідний гель, гель кальцію альгінату, каррагінану, агару тощо.

Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних мембран (рис. 1, в). Цей метод іммобілізації здійснюється за таким принципом: водний розчин ферменту відділяється від водного розчину субстрату напівпроникною мембраною, яка легко пропускає невеликі молекули субстрату, але представляє собою непроникний бар'єр для крупних молекул ферменту.

Перевагами цього методу є збереження каталітичної активності ферменту, підвищення його стабільності, а також можливість одержувати іммобілізовані препарати з високим вмістом включеного ферменту.

Основним недоліком мембранних систем є неможливість ферментативного перетворення високомолекулярних субстратів, для яких мембрана створює дифузійний бар'єр.

Існують модифікації цього методу, які відрізняються лише за способами одержання напівпроникної мембрани та її природою.

Мікрокапсулювання ферментів у напівпроникні мембрани. Суть методу: водний розчин ферменту включають всередину мікрокапсул, які представляють собою замкнуті сферичні кульки з тонкою полімерною стінкою (мембраною). Існує три принципи включення в капсулу: міжфазна поліконденсація, міжфазна коацервація і метод подвійного емульгування.

Метод мікрокапсулювання ферментів дозволяє отримати капсули з тонкою та ультратонкою мембраною (0,1 – 2,0 мкм), що позитивно впливає на характеристики іммобілізованого препарату (збільшення активності поверхні та зменшення дифузійних ускладнень).

Перевага мікрокапсулювання — велика площа поверхні, що припадає на одиницю активності іммобілізованого ферменту. Це дає змогу використовувати високі концентрації ферменту в початковому розчині та досягати більшої ефективності дії іммобілізованого препарату.

Недоліком методу є дифузійні ускладнення, що виникають при проходженні субстрату та продуктів реакції через полімерну напівпроникну оболонку.

Для запобігання інактивації ферментів органічними розчинниками та мономерами перед мікрокапсулюванням ферменти змішують з полімерами (бичачою сироваткою альбуміну, гемоглобіном, полівінілпропілідом (ПВП), полівініловим спиртом (ПВС), поліетиленгліколем (ПЕГ) у концентрації 1%), що сприяє збереженню активності біокатализатора. Гідрофобні ділянки полімерів екранують молекулу ферменту, захищаючи її у процесі мікрокапсулювання.

Для утворення мікросфер в органічному розчиннику використовують емульгатор (span - 85 в концентрації 0,1%) для покриття поверхні краплин водної фази, що оберігає фермент від безпосереднього контакту з органічним розчинником.

Фізичні і хімічні властивості мікрокапсульованих ферментів залежать від природи полімеру, з якого формується мікрокапсула. Полімер повинен володіти когезійними властивостями, що забезпечують утворення безперервної плівки, бути проникним для субстрату, інертним по відношенню до реакційної суміші. Для отримання мікрокапсул використовують природні й синтетичні полімери – карбоксиметилцелюлозу, ацетатфталат целюлозу, нітрат целюлози, желатин, епоксидні смоли, поліуретани, стирол, поліаміди.

Для мікрокапсулювання ферментних систем найчастіше застосовують коацервацію. Полімерами для коацервації є ацетат і нітрат целюлози, бутандієновий каучук (рис. 3).

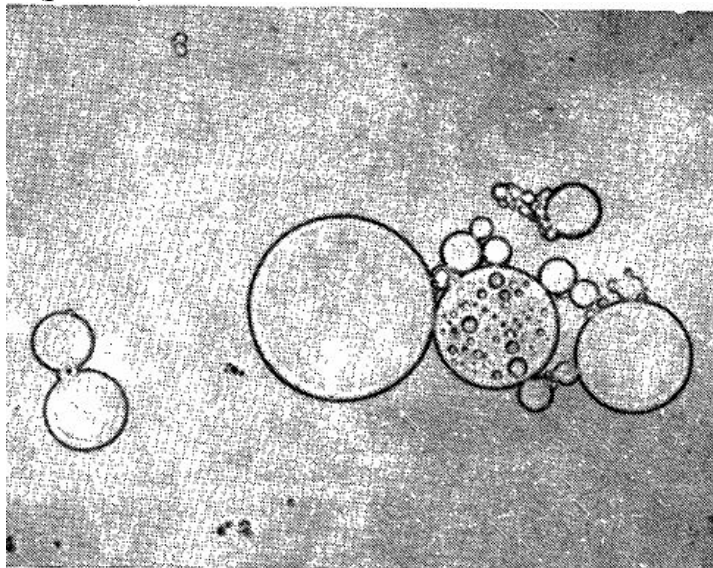


Рис. 3. Каталаза, мікрокапсульована в мембрану бутандієнового каучука (всередині великої капсули знаходяться маленькі)

Мікрокапсулювання ферментів включає наступні стадії:

- 1) Розчинення ферменту в буферному розчині, що містить для захисту від денатурації інші білки, наприклад альбумін;
- 2) Приготування органічної фази, що містить емульгований агент, (наприклад, span – 85). Органічна фаза (ефір, циклогексан, толуол) не повинна змішуватися з водою;
- 3) Внесення водного розчину ферменту в органічну фазу, перемішування впродовж заданого часу з певною швидкістю (розмір мікрокапсул залежить від швидкості перемішування);
- 4) Додавання до двофазної суміші наступного органічного розчину, що містить полімер і органічний розчинник. При додаванні другого органічного розчину відбувається утворення дрібного колоїду, обумовлене розбавленням органічного розчинника;

5) Відгонка органічного розчинника з постійним перемішування в умовах вакууму. При цьому відбувається подальше осадження водних мікросфер з щільною мембраною, товщина якої залежить від кількості полімеру, доданого до органічної фази, та від тривалості преципітації;

6) Виділення мікрокапсул з органічної фази центрифугуванням і промиванням буферним розчином, що містить твін-20.

Метод включення ферментів у волокна полягає у розчиненні волокна полімеру в органічному розчиннику, емульгуванні отриманого розчину з розчином чи суспензією ферменту і продавлюванні емульсії через тонкі отвори прядильного пристрою в рідину, що коагулює (наприклад, у толуол).

Одержані волокна представляють собою пористі полімерні гелі, що містять гомогенну дисперсію невеликих крапель водного розчину ферменту розміром близько 1 мкм. Ферментвмісні волокна володіють високою механічною міцністю.

Від мікрокапсулювання цей спосіб іммобілізації відрізняється, головним чином, формою одержуваних препаратів.

До іммобілізації з використанням напівпроникних мембран належить метод *включення в ліпосоми*, які застосовують, головним чином, з медичною метою, а також при проведенні фундаментальних досліджень (такі системи подібні до природних мембран, тому їх вивчення може дати корисну інформацію про ферментативні процеси в клітині).

Ліпосоми – біповерхневі сферичні утворення з водною фазою усередині або поліповерхневі утворення, що складаються з декількох концентричних біповерхонь з внутрішньою порожниною і розміром до 10 нм (рис. 4).

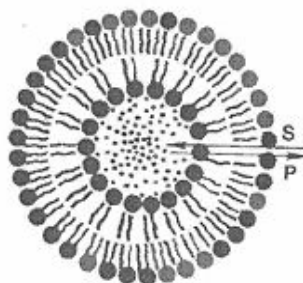


Рис. 4. Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок (мембран) – включення в ліпосому

Для отримання ліпосом ферментів (або інших біологічно активних речовин) їх водні розчини піддають УЗ-обробці в присутності позитивно або негативно заряджених фосфоліпідів.

Залежно від фізичних параметрів фосфоліпідів (заряду, рідини, розміру) ліпосоми проникають в клітину ендоцитозом або за рахунок злиття з природними мембранами. При ендоцитозі фосфоліпідна оболонка ліпосом усередині клітин руйнується фосфоліпазами і фермент вивільняється в цитоплазму; при злитті з клітинною мембраною фосфоліпідний комплекс

ліпосом входить до складу клітинних мембран, активна субстанція поступає в цитоплазму.

Спрямованість дії ліпосом може бути змінена за рахунок складу компонентів, що утворюють мембрану, спорідненість ліпосом до клітин-мішеней посилена специфічними чинниками (антитілами та ін.).

На даний час описано включення в ліпосоми різного складу таких ферментів, як глюкозооксидаза, глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа, галактозидаза і гексокіназа, β -глюкуронидаза, глюкоцереб्रोзидаза, декстраназа, α -манозидаза, амілоглюкозидаза, гексоамінідаза А, лізоцим, пероксидаза, р-D-фруктофуранозидаза, нейрамінідаза, цитохромоксидаза, Na^+ , K^+ -АТФаза та ін.

При **імобілізації ферментів з використанням системи двофазного типу** (рис. 1, г) обмеження руху ферменту досягається завдяки його здатності розчинятися тільки в одній із фаз. Субстрат і продукт ферментативного перетворення розподіляється між двома фазами відповідно до їх розчинності в них. Природа фаз підбирається таким чином, щоб продукт накопичувався у фазі, в якій відсутній фермент. Після завершення реакції ця фаза відокремлюється, а продукт вилучається.

Існує модифікація цього способу імобілізації: в якості матеріалу для утворення мембрани замість водонерозчинного полімеру використовують рідкі вуглеводні з великою молекулярною масою. Цей метод названо імобілізацією шляхом включення в "рідкі" мембрани.

Перевагою системи двофазного типу є можливість здійснення ферментативних перетворень високомолекулярних субстратів, які неможливі при застосуванні жорстких носіїв з обмеженим розміром пор. Метод доступний та простий у використанні.

До основних недоліків можна віднести недовготривалу роботу ферменту внаслідок можливого інфікування розчину білку.

3.2 Хімічні методи імобілізації

До хімічних методів імобілізації належать імобілізація за допомогою ковалентного зшивання з полімерним носієм та поперечного зшивання ковалентними зв'язками молекул білка без носія.

Переваги таких препаратів:

1. Висока міцність утвореного кон'югату, що забезпечується ковалентним зв'язком ферменту з носієм. При варіюванні умов таких як рН, температура фермент не десорбується з носія і не забруднює цільових продуктів каталізуємої ним реакції.

2. При хімічній модифікації ферментів можливі зміни їх властивостей (субстратної специфічності, каталітичної активності, стабільності). Саме завдяки цьому методу вдається досягти найбільших ефектів стабілізації ферментів.

Суттєвим недоліком хімічної іммобілізації є інактивація ферменту. Однак, цього можна запобігти, якщо проводити іммобілізацію при наявності субстрату, який захищає активний центр.

Метод ковалентного зв'язування ферментів має два різновиди.

1. *Ковалентні зв'язки утворюються між реактивними групами носія та ферменту* (безпосередньо або через проміжну ланку). В утворенні цих зв'язків з боку ферменту беруть участь функціональні групи амінокислотних залишків, з яких найбільшу перевагу мають аміногрупи L-лізину та карбоксильні групи глутамінової і аспаргінової кислот. У той же час функціональні групи, необхідні для каталітичної активності ферменту, повинні залишатися вільними і реакційно спроможними, тому їх часто в різний спосіб “захищають” (наприклад, діючи на тіольні групи відповідними зворотними інгібіторами).

Хімічні підходи дозволяють ковалентно приєднувати ферменти через їх функціональні групи, несуттєві для каталізу (в тому числі $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$, $-\text{OH}$ та ін.) як до неорганічних носіїв (наприклад, до пористого скла, кераміки, заліза), так і до природних матеріалів (наприклад, до целюлози, хітину, декстранів, агарози) або до синтетичних полімерів (наприклад, до нейлону, полістиролу, поліакриламід, іонообмінних смол).

Вважається доцільним з'єднувати ферменти та матрицю не прямо, а через посередника (місток). Молекули таких посередників повинні бути невеликого розміру і містити більш ніж одну реакційноздатну групу. Такі властивості мають поліфункціональні реагенти, як хлористий ціанур та глутаровий альдегід (рис. 5).

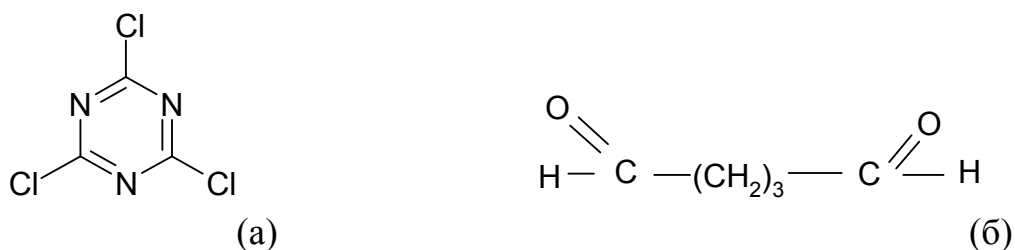


Рис. 5. Хімічна структура поліфункціональних реагентів:

а - хлористий ціанур, б - глутаровий альдегід

Для надання носію достатньо високої зв'язуючої здатності його поверхню іноді доводиться “активувати”.

Іммобілізацію білка на полісахаридній матриці, за класичним методом, здійснюють наступним чином: на першій стадії носій окислюють перйодатом калію до появи альдегідних груп; потім фермент з'єднують з активованим носієм через азометинові зв'язки; для надання більшої стійкості зв'язок між білком і носієм відновлюють боргідридом натрію.

2. *Сополімеризаційний метод* – молекули ферменту зв'язуються одна з одною за допомогою біфункціонального реагенту з утворенням нерозчинного „суперполімеру”, який може розглядатися як носій.

Даний метод є більш гнучким, порівняно з попереднім, завдяки можливості широкого вибору зшиваючого реагенту для іммобілізації.

Суть методу полягає в утворенні різного типу тривимірних сіток, вузлами яких є молекули ферменту, ковалентно пов'язані між собою через зшиваючий реагент. Розмір молекули реагенту визначає дифузійні характеристики усієї системи. На першій стадії у молекулу ферменту вводять подвійні зв'язки, що забезпечують здатність до сополімеризації. Наприклад, фермент ацилюють акрилоїлхлоридом, потім акрилоїлірований фермент вносять у розчин мономеру і проводять сополімеризацію. У результаті фермент виявляється хімічно "вшитим" у полімерну сітку гелю.

Іноді фермент іммобілізують методом ковалентного зв'язування з бичачим сироватковим альбуміном за допомогою глутаральдегіду, як зшиваючого реагенту. Дві альдегідні групи глутаральдегіду реагують з аміногрупами ферменту та білку носія, зшиваючи їх між собою і утворюючи, таким чином, мембрану. Ці зв'язки стійкі до різких змін рН, температури. Завдяки обробці фермент стає стабільнішим, однак недоліком даного процесу є зниження активності ферменту. Від надлишку вільних груп глутаральдегіду звільняються, обробляючи мембрану розчином гліцину. Ковалентна зшивка ферменту забезпечує високу міцність зв'язків, що утворюються. Це особливо важливо для забезпечення стійких і відтворюваних результатів у аналітичних системах.

Недоліком методів ковалентних зв'язків є необхідність у попередній активації носія, тривалої інкубації для завершення реакції приєднання та створення спеціальних умов.

Іммобілізація ферментів металохелатним методом. Для уникнення недоліків при іммобілізації ферментів методами ковалентних зв'язків можна використовувати властивості перехідних металів утворювати хелатні комплекси. В якості перехідних металів використовують титану хлорид чистий або у кислому розчині, гідроксиди титану, цирконію, хрому (їх оксиди нетоксичні), заліза, ванадію, олова. Як носії – похідні целюлози і силікагелі, глутаровий альдегід. Желеподібні гідратовані оксиди металів утворюють з ферментом нерозчинні комплекси, що володіють доброю ферментативною активністю. На целюлозі одержують препарати іммобілізованих ферментів з найбільшою активністю.

Як приклад можна навести утворення хелатних комплексів хлориду титану та целюлози. У розчині хлориду титану певна кількість іонів титану утворює октаедричні координаційні комплекси з іншими молекулами та іонами, які в даному випадку виступають як ліганди комплексного іону. Гідроксильні групи є ефективними лігандами для іонів перехідних металів і, відповідно, іони перехідних металів будуть утворювати комплекси з полісахаридами, гідроксильні групи яких будуть заміщати інші ліганди. Деякі полісахариди, такі, як целюлоза, містять дві віцинальні гідроксильні групи, які не приймають участь в утворенні глікозидних зв'язків між вуглеводними залишками. Тому, відповідно, вони здатні утворювати хелати з

іонами перехідних металів, заміщуючи своїми гідроксильними групами два ліганди іону титану.

Оскільки целюлоза являє собою полімер D-глюкопіранози, зв'язаної β-1,4- зв'язком, в утворенні хелатів можуть приймати участь групи в положенні 2 та 3. Оброблену хлоридом титану целюлозу можна розглядати як полімерний хелат з аква-, хлораква-, та хлор-комплексами титану, які переважають у водному розчині хлориду титану.

Будь-які інші молекули, які містять групи, що здатні до заміщення лігандів, можуть утворювати хелат з титаном, зв'язаним з целюлозою. Такі молекули повинні знаходитись в одному розчині з рН, близьким до нейтрального. У випадку ферментів, що являють собою білкові молекули, в якості груп лігандів можуть виступати вільні карбоксильні групи кислих амінокислот, фенольні гідроксили залишків тирозину, спиртові та гідроксильні групи залишків серину та треоніну, вільні сульфгідрильні групи залишків цистеїну та ε-аміногрупи залишків лізіну.

Умови для утворення зв'язків полімер, оброблений Ti – фермент:

- присутність груп, які здатні виступати в ролі лігандів;
- контакт груп з атомами Ti є можливим;
- групи не повинні знаходитись в активному центрі ферменту;
- молекули ферменту, вже зв'язані з носієм, не повинні знаходитись дуже близько один до одного.

Контрольні запитання

1. Наведіть характеристику різновидів фізичних методів іммобілізації.
2. Які основні підходи щодо хімічної іммобілізації ферментів?
3. Які переваги та недоліки методів хімічної іммобілізації ферментів?
4. Які реагенти використовують для з'єднання ферменту з носієм?
5. У чому відмінність методу сополімеризації порівняно з іншими методами ковалентного зв'язування ферментів?
6. Які є модифікації методу іммобілізації ферментів з використанням напівпроникних мембран?
7. У чому суть методу іммобілізації ферментів за рахунок утворення хелатних комплексів?

4. НОСІЇ ДЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ. ВИМОГИ ДО НОСІЇВ

Для іммобілізації ферментів використовують широкий спектр носіїв. Загалом їх можна поділити на дві великі групи – *органічні полімерні носії* та *неорганічні* (рис. 6). Носій має дуже велике значення для успішної іммобілізації ферментів.

До носіїв висувають наступні вимоги:

- вони повинні бути нерозчинними у реакційному середовищі;
- мати різний заряд з ферментом;

- мати високу гідрофільність, хімічну та біологічну стійкість;
- механічну міцність;
- не викликати неспецифічної адсорбції і сильних конформаційних змін молекули білка;
- легко гранулюватися та активуватися.

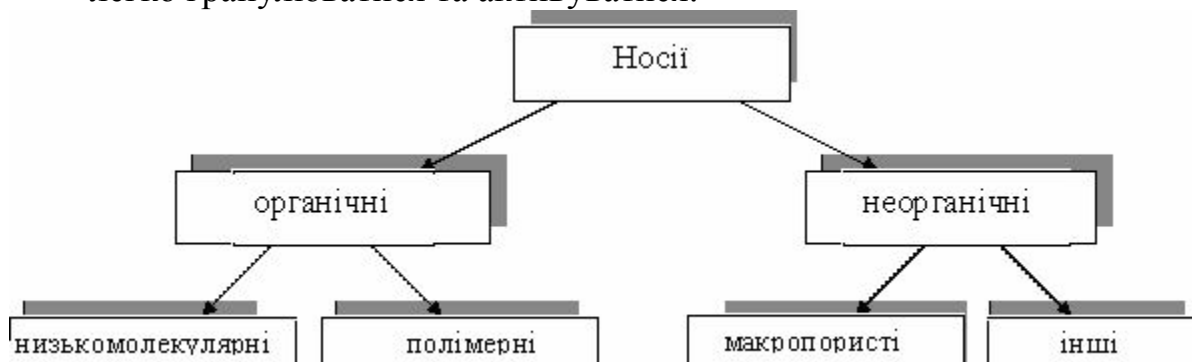


Рис. 6. Класифікація носіїв для іммобілізації

Носії для іммобілізації можуть мати зернисту структуру, бути виконані у вигляді волокон, плівок, пустотілих трубок, мембран тощо. Зазвичай, носії використовують у вигляді порошків, дрібних кульок і гранул. Інколи, для зниження гідродинамічного опору – у формі монолітів, пронизаних великою кількістю вузьких паралельних каналів, розділених тонкими стінками. Важливими характеристиками носіїв є питома поверхня, розмір пор, механічна і хімічна стійкість.

Органічні полімерні носії (як низько-, так і високомолекулярні) можуть бути природного або синтетичного походження. *Природні* полімерні органічні носії поділяють відповідно з їх біохімічною класифікацією на 3 групи: полісахаридні, білкові та ліпідні. До *синтетичних* полімерних носіїв можна віднести поліметиленові, поліамідні та поліефірні.

Основою **природних** полісахаридних носіїв можуть бути целюлоза (рис. 7), декстран, агароза, губчастий крохмаль, хітин та інші полісахариди.

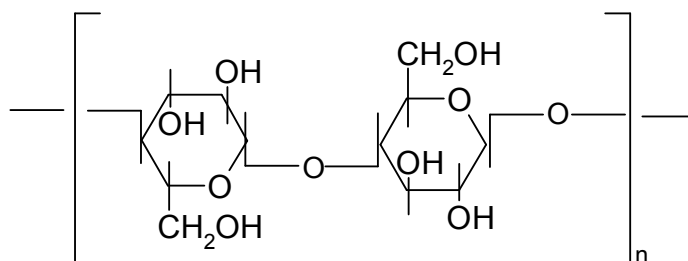


Рис. 7. Хімічна структурна формула целюлози (полі-1,4-β-D-глюкопіранозил -D-глюкопіраноза)

Целюлоза використовується у вигляді пористих сферичних гранул, що володіють добрими механічними та технологічними властивостями. При цьому целюлозу застосовують у вигляді модифікацій, які отримують за

допомогою різних методів обробки. Похідні целюлози широко випускають у вигляді порошків та паперів, що містять різні функціональні групи.

На модифікованих гранулах целюлози іммобілізують багато ферментів (глюкозоамілаза, β -амілаза, протеїнази та інші).

Декстран. Носії з похідних декстрану використовують у вигляді зшитих за допомогою епіхлоргідрину або дієпоксидів макропористих полімерів – “сефадексів”.

Декстран (полі-1,6- α -D-глюкопіраноза) – розгалужений полісахарид, який містить залишки глюкози, зв’язані головним чином 1,6-глюкозидними зв’язками (а також 1,2-, 1,3- та 1,4-зв’язками).

Агароза (полі- β -галактопіранозил-3,6-ангідро- α -L-галактопіраноза). Зшиті молекули агарози випускають під назвою “сефароза”. При використанні цих полісахаридів, як носіїв для іммобілізації, їх активують шляхом введення у них функціональних груп ($-\text{CH}_3$; ізо $-\text{C}_5\text{H}_{11}$; $-\text{C}_6\text{H}_{13}$ та ін.), що необхідні для пришивання ферментів.

Губчастий крохмаль – крохмаль, модифікований зшиваючими агентами (формальдегідом, гліоксалем, глутаровим альдегідом). Сполука є стійкою до дії ферментів, що гідролізують звичайний крохмаль. При введенні до такого крохмалю діетанол- або триетаноламінних груп, його використовують як носій при іммобілізації ферментів. На таких носіях іммобілізують трипсин, уреазу, ліпази, глюкозоізомерази та інші. Глікоген після активації бромціаном також може використовуватися в якості носія при іммобілізації ферментів.

Хітин – головний компонент зовнішнього скелету ракоподібних комах, а також клітинних оболонок деяких грибів. Хітин – це природний амінополісахарид, його можна розглядати, як целюлозу, у якої $\text{C}_2\text{-OH-}$ група заміщена на ацетамідний залишок. Хітин є відходом при переробці крабів та креветок. Нерозчинний, має пористу структуру, активується солями титану. Після обробки хітину міцним лугом одержують хітозан, який використовують як носій для ковалентної іммобілізації ферментів. На хітозані іммобілізують ферменти різного ступеню очищення, клітини, і навіть цілі фрагменти тваринних та рослинних тканин.

В якості носіїв ферментів іноді використовують деякі *білки* (колаген та його модифіковані форми, желатин, керратин, нерозчинні глобуліни бавовнику та ін.), які не піддаються мікробній деградації та не викликають імунну реакцію.

Синтетичні полімерні носії можна поділити на групи залежно від хімічної будови основного ланцюга макромолекул. Синтетичні полімерні носії дуже часто використовують у вигляді макро- та мікропористих матеріалів. Широкого застосування набули іонообмінники типу дауекса та амберліта, що являють собою сополімери стиролу та дивінілбензолу у вигляді гранул, а також носії на основі поліакриламідну.

Існує безліч синтетичних полімерних носіїв. Полімери отримують шляхом різних модифікацій поліакриламідних гелів (ПАГ), що синтезуються

на основі акрилової кислоти: аміноалкіл-ПАГ (інша назва – аміноетилбіогель Р-150), діоксипропіл-похідні ПАГ (отримані приєднанням до ПАГ нітростиролу), іміноєфірні похідні (сополімеризацією N,N'-метилбісакриламиду з мономером) та ін.

Серед синтетичних носіїв виділяють так звані жорсткі носії – *сферони*, що являють собою етиленгліколь-метакрилатні гелі з різними розмірами пор. Сферони містять на поверхні гідроксильні групи, близькі за властивостями до аналогічних груп сефарози. Зміна співвідношення концентрацій вихідних мономерів дає змогу в широких межах змінювати пористість, питому поверхню та число активних гідроксильних груп сферонів.

Для іммобілізації використовують також гелі, що утворюються шляхом радіаційної полімеризації різних мономерів, таких як N-вінілпірролідон, акриламід, солі акрилової кислоти. Перевагою їх є стійкість до мікробної деградації. Також застосовують і гідрофільні поліуретанові полімери, що утворюються при взаємодії поліізоціанату з поліоксисполуками.

До групи **неорганічних носіїв** входять: синтетичні кремнеземні сорбенти, метали і їх оксиди, нержавіюча сталь, різні види глини, кераміки та природні мінерали.

Неорганічні носії мають ряд переваг: легко регенеруються, їм можна надати будь-якого вигляду (порошок, кульки, частки неправильної форми, пористий матеріал або моноліт, що утворює багатоканальну систему).

Найчастіше у якості носіїв використовують макропористі кремнеземи (силікагелі, сілохроми та макропористе скло).

Силікагель – це аморфна речовина (загальна хімічна формула $x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$). Отримують силікагель у процесі “старіння” (поліконденсації) ортокремнієвої кислоти ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (рис. 8)



Кремнеземні носії зручні у роботі, однак мають суттєві недоліки: підвищену розчинність у лужному середовищі та неспецифічну адсорбцію ферментів. З метою зниження розчинності цих носіїв використовують різні модифікуючі агенти, що дає змогу цілеспрямовано змінювати властивості поверхні кремнеземних носіїв. Однак, такі носії дорогі, а їх модифікація сприяє ще більшому подорожчанням.

До **природних носіїв** відносяться пісок, глини, цеоліти, рогова оманка та активоване вугілля. Носії з пористої кераміки дуже різноманітні за складом. До них можуть входити кремнезем, оксиди титану та цирконію, глинозем. Можна отримати носії і без вмісту кремнію.

Перевагою цієї групи носіїв є їх достатньо висока міцність, можливість варіювати складом компонентів, низька вартість.

Найбільш перспективними неорганічними носіями є метали та їх оксиди (алюміній, марганець, нікель, титан, цирконій, магнезит, олово, нержавіюча сталь). Ці носії характеризуються високою механічною міцністю, відносною дешевизною, стабільністю, відмінними гідродинамічними та механічними властивостями, їх легко стандартизувати у заводських умовах.

Регенерація компонентів систем з іммобілізованими ферментами. Системи з іммобілізованими ферментами є відносно дороговартісними, тому важливим є їх багаторазове використання, тобто регенерація. До основних компонентів таких систем належать носії, ферменти і кофактори. Як правило, необхідність в регенерації носіїв не виникає, так як вони, переважно дешеві та стабільні. Однак, важливим є питання регенерації ферментів та кофакторів, що на сьогодні активно досліджується.

Контрольні запитання

1. Які вимоги до носіїв для іммобілізації ферментів?
2. На які групи можна поділити носії, що використовують для іммобілізації?
3. Які властивості органічних полімерних носіїв?
4. Наведіть приклади неорганічних носіїв? Які їх переваги?
5. Охарактеризуйте природні полімерні носії.
6. Які переваги та недоліки кремнеземних носіїв?

5. АКТИВНІСТЬ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ. ВПЛИВ ІММОБІЛІЗАЦІЇ НА СТАБІЛІЗАЦІЮ ФЕРМЕНТІВ

5.1 Визначення активності іммобілізованого ферменту

Активність ферменту визначають направляючи його дію на субстрат. На основі аналізу зменшення кількості субстрату, або за кількістю утворених продуктів реакцій роблять висновок про активність ферменту.

Наприклад, величину активності протеолітичних ферментів визначають за кількістю залишку білку або – кількістю утворених продуктів гідролізу (пептидів, амінокислот). Властивості іммобілізованих ферментів аналізують, вимірюючи вплив рН, температури, іонної сили, концентрації ферменту і субстрату на активність ферменту, і порівнюють з показниками вільного ферменту. Вимірювання повинні проходити за однакових умов як для вільного, так і для іммобілізованого ферментів.

Зміни окремих властивостей ферменту при іммобілізації в ряді випадків можна передбачити. Наприклад, при адсорбції ферменту на зарядженому носії (негативно або позитивно) рН-залежності активності й стабільності адсорбованого ферменту можуть зміщуватися в більш лужну чи кислу сторону відповідно. Це зміщення пояснюється зміною властивостей мікрооточення ферменту в безпосередній близькості від зарядженого носія.

Такий ефект спостерігається, наприклад, при іммобілізації дріжджової інвертази на ДЕАЕ-(діетиламіноетил) і КМ(карбоксиметил)-сефадексах.

Однією з основних кінетичних характеристик ферментативної реакції є її швидкість. Вимірювання швидкості реакції проводять лише при варіюванні концентрацією субстрату, в той час, як інші параметри залишаються незмінними. Перевага такого підходу полягає в тому, що при цьому не виникає ускладнень через пригнічення активності ферменту продуктами реакції, зміною конформації ферменту внаслідок зміни рН та температури, а також можливою зворотністю процесу.

Величиною, що характеризує швидкість ферментативної реакції є константа Міхаеліса – така концентрація субстрату, при якій швидкість ферментативної реакції збільшується вдвічі. Іммобілізація ферменту може призводити до збільшення або зменшення константи Міхаеліса (K_m). Тому, зменшення K_m ферменту при іммобілізації може давати додаткові практичні переваги, оскільки за низьких концентрацій субстрату швидкість реакції буде вища, ніж у випадку вільного ферменту. Збільшення K_m , навпаки, означає, що для досягнення даної швидкості реакції потрібна більша концентрація субстрату, ніж для вільного ферменту. Зміни K_m можуть пояснюватись також зміною властивостей мікрооточення частинок іммобілізованого ферменту. Так, наприклад, ці частинки оточує шар розчинника, що не перемішується (шар Ернста), в якому концентрація субстрату нижча, ніж в основній масі розчину. Відповідно, для насичення іммобілізованого ферменту необхідна більш висока концентрація субстрату. Цей ефект виявляється в зменшенні кінцевого значення K_m при зменшенні розмірів частинок, на яких іммобілізовано фермент, або при збільшенні швидкості перемішування. Іонна природа носія також може впливати на показник K_m , наприклад, коли субстрат також заряджений. Якщо заряди носія та субстрату протилежні, то кінцева K_m буде зменшуватись, а якщо вони однойменні – збільшуватиметься.

Кінцеві значення K_m для інвертази та целобіази, іммобілізованих на різних носіях, наведено в таблиці 3.

Таблиця 3

Кінцеві значення K_m препаратів іммобілізованої інвертази та целобіази

Тип носія	K_m , ммоль/л	
	Інвертаза	Целобіаза
Вільний фермент без носія	28,0	2,7
Кон А-сефароза	28,5	1,7
Мікрокристалічна целюлоза	28,5	1,1
CNBr-сефароза	-	1,2
КМ-сефадекс	100,0	-

Вважають, що після іммобілізації ферменту на носії його термостабільність збільшиться, і, відповідно, його дія буде пролонгована. Однак, наперед важко передбачити чи дасть такий ефект даний метод іммобілізації.

Вплив температури на активність ферменту вивчають, вимірюючи початкову швидкість ферментативної реакції за різних температур. Збільшення температурного оптимуму іммобілізованого ферменту не завжди означає збільшення термостабільності, хоча після іммобілізації температурний оптимум ферменту може підвищитися на 10-20°C. За високої температури фермент може бути дуже лабільним та швидко втрачати свою активність, хоча початкова швидкість реакції при цьому зростатиме.

Термостабільність ферменту вимірюють двома методами:

1) попередньою інкубацією ферменту за підвищеної температури протягом різних проміжків часу з наступним охолодженням і вимірюванням активності;

2) інкубацією ферменту з субстратом за визначеної температури та реєструванням перетворення субстрату в продукт.

Наприклад, інвертаза адсорбована на КАС (конкавалін А-сефарозі) або ковалентно зв'язана з мікрокристалічною целюлозою, має підвищену стабільність порівняно з нативним ферментом. У режимі функціонування іммобілізований фермент ще більш стабільний, чим нативний.

5.2 Вплив різних факторів на ефективність адсорбційної іммобілізації ферментів

Значення рН. Реакція середовища виявляє значний вплив на ефективність сорбції ферменту на поверхні носія, особливо, якщо процес здійснюється за рахунок електростатичних взаємодій. Причина цього впливу полягає в тому, що при зміні рН змінюється стан іонізації іоногенних груп носія і білку, відповідальних за зв'язування. При використанні носіїв, які не є іонообмінниками, максимальна адсорбція досягається в ізоелектричній точці білку.

Іонна сила. Значення цієї величини виявляє вплив на міцність зв'язування ферменту з носієм. При високій концентрації солей іони, що наявні в розчині, витісняють з поверхні носія зв'язані за рахунок електростатичних взаємодій білкові молекули. Тобто, збільшення іонної сили викликає десорбцію ферменту. Однак, інколи ця закономірність не діє, і збільшення концентрації солі, навпаки, сприяє адсорбції ферменту на носії. У такому випадку говорять про ефект "висолювання" білка з розчину.

Концентрація ферменту. При збільшенні концентрації ферменту в розчині, із якого відбувається адсорбція, кількість сорбованого на носії ферменту збільшується, відповідно зростає питома каталітична активність іммобілізованого препарату. Залежність питомої каталітичної активності від вихідної концентрації ферменту, як правило, має вигляд кривої з насиченням, що свідчить про існування обмеженої кількості центрів зв'язування ферменту на поверхні носія. При подальшому підвищенні концентрації ферменту в розчині може відбуватися утворення на поверхні першого шару адсорбованого ферменту другого та наступних шарів. Найбільшою каталітичною активністю володіють верхні шари адсорбованого ферменту, де

обмеження, що накладаються на швидкість реакції дифузії субстрату, мінімальні. Тому перевантаження носія ферментом призводить до того, що більш глибоко розміщені шари адсорбованого біокатализатора виключаються із сфери реакції, і, в результаті, загальна ефективність використання ферменту знижується.

Температура. Підвищення температури виявляє подвійний вплив на процес адсорбційної іммобілізації. Сильне нагрівання призводить до втрати ферментативної активності внаслідок теплової денатурації білкової глобули, з іншого боку, – забезпечує прискорення процесу завдяки підвищенню швидкості дифузії молекул ферменту в порах носія. Точне значення оптимальної температури залежить від природи адсорбованого ферменту і поверхні носія.

Таким чином, ефективність адсорбційної іммобілізації ферментів визначається балансом цілого ряду факторів. Порушення внаслідок зміни будь-яких із зовнішніх умов може призвести до різкого послаблення взаємодії ферменту з носієм і, відповідно, до його десорбції.

5.3. Способи підвищення стабільності іммобілізованих ферментів

Всі впливи, які призводять до інактивації ферментів умовно поділяють на фізичні та хімічні. До фізичних належать нагрівання, чи переохолодження, опромінення, ультразвук, сорбцію на межі розподілу фаз (типу вода-повітря, рідина-рідина). Хімічна інактивація може бути спричинена, наприклад, кислотами, лугами, поверхнево-активними речовинами, органічними розчинниками, сечовиною, гуанідинхлоридом, деякими окисниками (киснем, перекисом водню) і відновниками (наприклад, тиолами, іонами металів), а також деякими ферментами (наприклад, протеазами, протеїназами). Однак, під дією фізичного фактора часто відбуваються хімічні зміни: окиснення функціональних груп, гідроліз пептидних зв'язків тощо. З іншого боку, дія хімічних денатурантів призводить до змін фізичного стану та структури білка.

В основі інактивації ферментів лежать такі молекулярні механізми:

- агрегація (тривала інкубація в розчині за підвищеної температури, при екстремальних значеннях рН, в присутності хімічних денатурантів);
- зміна первинної структури (реакція розриву поліпептидного ланцюга, хімічна модифікація окремих функціональних груп білку);
- десорбція кофактора із активного центру ферменту;
- дисоціація олігомерних білків на субодиниці;
- сорбція білка на стінках реакційної ємкості;
- інактивація в потоці (при проведенні ферментативних процесів у проточних реакторах);
- незворотні конформаційні зміни (незворотня денатурація).

Кількість можливих інактиваційних механізмів для іммобілізованих ферментів є значно меншою, ніж для нативних. Іммобілізація пригнічує такі полімолекулярні інактиваційні процеси як агрегація та автоліз. Іммобілізовані

білки стабільніші, так як носій механічно захищає молекулу ферменту від деформації в потоці. Розроблено методи іммобілізації, які дозволяють ковалентно пришивати молекулу кофактора в районі активного центру ферменту чи спільно іммобілізувати молекули кофактора і ферменту на одному носії безпосередньо один від одного. Цей методичний прийом дає можливість уникнути десорбції кофактора із активного центру фермента.

З метою уникнення окиснення киснем повітря високореакційноздатних функціональних груп активного центру ферменту застосовують іммобілізацію ферменту в поліелектролітній матриці, що має здатність до екранування від контакту з киснем.

За допомогою іммобілізації можливо підвищити стабільність препаратів шляхом пригнічення первинних зворотних стадій денатурації і дисоціації нативних білків, а також закріпленням нативної конформації ферменту.

Денатураційному розгортуванню ферментної молекули можливо перешкодити, якщо каталітично активну конформацію штучно закріпити. Просторова будова білкової молекули стає більш стійкою при накладанні на неї дужок (проводячи внутрішньомолекулярне «зшивання» білка біфункціональними реагентами), в результаті багатоточкового ковалентного або нековалентного приєднання ферменту до носія або при механічному включенні його до «тісних» пор носія. Таким шляхом денатурацію (інактивацію) білка вдалось сповільнити в сотні, тисячі і мільйони разів (залежно від методу стабілізації і природи ферменту). Це означає, що фермент, який, наприклад, за температури 50 °С інактивується практично миттєво, будучи стабілізований, може «працювати» за температури 80 °С годинами або цілодобово, а при нижчій температурі – місяцями.

Розроблено спосіб, що дає змогу функціонувати ферментам у органічних розчинниках з малим вмістом води. З цією метою застосовують двохфазні системи вода – органічний розчинник, що не змішується з водою. Гетерогенне реакційне середовище створюють, зазвичай, як мікроемульсію водного розчину ферменту в органічному середовищі або, як суспензію в органічному розчиннику пористих частинок (скло, кераміка тощо), просочених водним розчином ферменту. Різновидом таких реакційних середовищ є колоїдний розчин води в органічному розчиннику, де фермент, будучи включеним у згорнену міцелу поверхнево-активної речовини (детергента, ліпиду), функціонує у своєрідному мікрореакторі, що містить лише кілька сотень або тисяч молекул води.

Поряд зі створенням наукових основ стабілізації ферментів зараз успішно вирішуються також й інші проблеми, пов'язані з продовженням тривалості їх експлуатації, такі, як реактивація денатурованих ферментів і регенерація кофакторів.

Контрольні запитання

1. Як визначають активність ферменту?

2. Які фактори впливають на властивості іммобілізованих ферментів?
3. Як змінюється температурний оптимум іммобілізованого ферменту?
4. Якими методами вимірюють термостабільність ферменту?
5. Від чого залежить ефективність адсорбційної іммобілізації ферментів?
6. Назвіть фактори, що впливають на інактивацію ферментів.
7. Якими способами можна підвищити стабільність ферментів?

6. КІНЕТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ІММОБІЛІЗОВАНИХ ФЕРМЕНТІВ ПОРІВНЯНО З РОЗЧИННИМИ ФЕРМЕНТАМИ

6.1 Кінетичні параметри ферментативних реакцій

Властивості іммобілізованих ферментів вивчають, вимірюючи вплив рН, температури, іонної сили, концентрацій субстрату й продукту на кінетичні параметри ферментативної реакції й порівнюють їх з аналогічними результатами, отриманими для нативного ферменту. Виміри повинні проводитися однаковою способом для вільного й іммобілізованого ферментів. Якщо експеримент проводять в «об'ємі» (тобто, фермент просто інкубують у пробірці із субстратом), то швидкості реакції з вільним і іммобілізованим ферментом будуть визначені фактично за різних умов.

У загальному випадку швидкість (V) реакції, що каталізує фермент, аналізується в межах рівняння Міхаеліса-Ментен:

$$V = \frac{k_{кат} * [E]_0 * [S]}{K_{м.уяв.} + [S]_0} \quad (1)$$

де $[E]_0$ й $[S]_0$ – концентрація ферменту й субстрату в системі відповідно; $k_{кат}$ – каталітична константа ферментативної реакції; $K_{м.уяв.}$ – ефективне (уявне) значення константи Міхаеліса, яке потрібно встановити.

Параметр $K_{м.уяв.}$ служить характеристикою спорідненості ферменту до субстрату й, отже, є мірою тієї концентрації субстрату, що необхідна для насичення ферменту. При каталізі іммобілізованими ферментами концентрація субстрату поблизу самого ферменту (локальна концентрація) може відрізнятися від концентрації субстрату в повному об'ємі системи. У цьому випадку дослідний показник $K_{м.уяв.}$ повинен залежати від розподілу субстрату між вільним розчином і носієм, де зосереджений фермент.

Каталітична константа ферментативної реакції $k_{кат}$ характеризує реакційну здатність фермент-субстратного комплексу, що утворився, тому не залежить від розподілу субстрату в системі, а визначається станом, зокрема, конформацією самого ферменту.

Каталітичні параметри ферментативної реакції ($k_{кат}$ і $K_{м.уяв.}$) можуть залежати від наявності в реакційній системі різних ефекторів (інгібітори, активатори, іони водню, температура тощо). У таких випадках необхідно

враховувати розподіл цих ефекторів між розчином і фермент-утримуючою матрицею.

Таким чином, всі кінетичні ефекти, що спостерігаються при каталізі іммобілізованими ферментами, можна розділити на дві групи. До першої з них належать ефекти, пов'язані із впливом іммобілізації на стан (конформацію) ферменту, а до другої – ефекти, обумовлені розподілом реагентів у системі.

6.2 Вплив іммобілізації на стан ферменту

При іммобілізації існує небезпека, що білок приєднається до носія у такій конформації, що відрізняється від нативної. У цьому випадку каталітична активність ферменту може істотно змінитися або взагалі зникнути.

Відмінності у конформації нативного й іммобілізованого ферментів можуть бути обумовлені:

1. Хімічною модифікацією яких-небудь важливих для структури функціональних груп білка й не пов'язане із самим процесом іммобілізації ферменту. Для виключення цього фактору необхідно вибрати відповідний метод іммобілізації, який не впливає на функціональні групи у білку. Крім того, інколи фермент необхідно захистити від інактивації на стадії іммобілізації простим додаванням субстрату або іншого специфічного ліганду, що дозволяє одержувати препарати з більш високою питомою каталітичною активністю.

2. Неспецифічними взаємодіями (електростатичними, гідрофобними, водневими зв'язками) між ферментом і носієм, які призводять до денатурації. Іноді достатньо замінити носій на інертний до білку (полісахаридної природи, поліакриламід та ін.). Якщо заміна носія є небажаною, то віддаляють білкові молекули від поверхні носія за рахунок збільшення довжини зшиваючого агенту. При цьому, як правило, вдається послабити несприятливий для ферменту вплив носія.

3. Великою кількістю зв'язків між ферментом і носієм.

Також може виникнути ситуація, коли в результаті іммобілізації конформація ферменту практично не змінюється, але порушується динаміка конформаційних змін у білку. Так, у білків, пов'язаних з носіями, можуть уповільнюватися необхідні для каталізу конформаційні переходи, зменшуватися кількість конформаційних стадій та глибина їх протікання. Причиною цього є неспецифічні взаємодії функціональних груп білка з носієм. Для їх уникнення необхідно проводити іммобілізацію на інертних носіях.

6.3 Ефекти розподілу реагентів у каталізі іммобілізованими ферментами

Розподіл субстрату. В умовах рівноважного розподілу субстрату між розчином і ферментвмісною матрицею показник $K_{M,уяв.}$ визначається наступним виразом:

$$K_{M,ум} = K_M * P \quad (2)$$

де, K_M – значення константи Міхаеліса реакції, що каталізується вільним (неіммобілізованим) ферментом; P – коефіцієнт розподілу субстрату, що розраховується за формулою:

$$P = \frac{[S]^p}{[S]^n} \quad (3)$$

де, $[S]^p$ і $[S]^n$ — концентрації субстрату в розчині й у матриці носія відповідно.

З рівняння (1) видно, що при високих концентраціях субстрату ефекти розподілу не відіграють суттєвої ролі, оскільки в цьому випадку швидкість ферментативної реакції не залежить від концентрації субстрату. Якщо ж концентрація субстрату невисока то аналіз рівнянь (1)-(3) показує, що концентрування субстрату в матриці ($P < 1$) приводить до зменшення значення $K_{M,уяв.}$ тобто до зростання швидкості ферментативної реакції. У тих же випадках, коли $P > 1$, швидкість ферментативної реакції зменшується внаслідок зростання $K_{M,уяв.}$

Нерівномірність розподілу субстрату в системі обумовлена його взаємодією з матрицею за рахунок, наприклад, електростатичних сил, водневих зв'язків, гідрофобних взаємодій тощо.

Дифузійні обмеження в каталізі іммобілізованими ферментами. Якщо молекула ферменту перебуває на поверхні (чи всередині) частки носія, то для протікання ферментативної реакції необхідно, щоб молекула субстрату підійшла до поверхні частки, та протифундувала всередину.

Якщо ферментативна реакція в поверхневих шарах частки протікає швидше, ніж субстрат з розчину підходить до поверхні, то через нетривалий час навколо частки утвориться зона, збіднена субстратом. У результаті швидкість ферментативної реакції буде визначатися швидкістю масопереносу субстрату до частки. У цьому випадку роблять висновок, що *процес контролюється зовнішньою дифузією*.

Якщо масоперенесення субстрату проходить швидше, ніж протікає ферментативна реакція на поверхні частки, то може виникнути інший тип дифузійних ускладнень. Зокрема, якщо розмір частки носія великий, а фермент дуже активний (або велика його щільність усередині частки), то практично весь субстрат витратиться вже в приповерхневих шарах носія, а глибинні області будуть збіднені субстратом. Це свідчить, що *процес контролюється внутрішньою дифузією*.

Якщо дифузія субстрату як до поверхневого шару, так і у внутрішні області частки проходить досить швидко, загальна швидкість перетворення

субстрату визначається безпосередньо ферментативною реакцією. У цьому випадку говорять про *кінетично контрольований процес*.

Врахування дифузійних факторів є одним із найбільш складних питань в каталізі іммобілізованими ферментами.

6.4. Експериментальні критерії каталізу за участю іммобілізованих ферментів

Залежність швидкості ферментативної реакції від концентрації субстрату. В умовах насичення іммобілізованого ферменту субстратом, тобто при досить високих його концентраціях, ферментативний процес не може контролюватись дифузією субстрату, і, отже, реакція протікає у кінетичній області. Однак, у міру зменшення концентрації субстрату підвищується ймовірність переходу реакційної системи в дифузійну область. Тому за експериментальною залежністю V від S у координатах Лайнуївера - Берка спостерігається чітко виражений перехід: при концентраціях субстрату вищих, ніж значення в точці переходу (тобто при низьких значеннях $1/[S]$) реакція проходить у кінетичному режимі - пряма 1, а при низьких концентраціях субстрату (високих значеннях $1/[S]$) у дифузійному режим – пряма 2. Таким чином, якщо для іммобілізованого ферменту в координатах Лайнуївера - Берка отримана залежність, аналогічна представленій на рис. 9, це є істотним доказом того, що дифузія відіграє в процесі важливу роль.

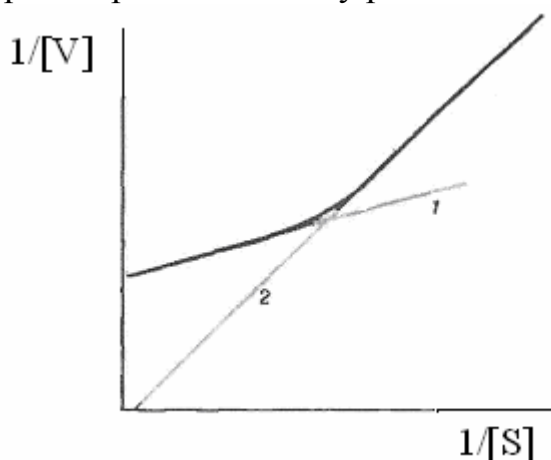


Рис. 9 Гіпотетична залежність швидкості реакції, каталізуємої іммобілізованим ферментом, від концентрації субстрату

Температурні залежності. Припускають, що після іммобілізації ферменту на носії його термостабільність збільшиться й, отже, дія буде пролонгованою. Однак, заздалегідь важко передбачити який саме метод іммобілізації сприятиме такому ефекту. Вплив температури на активність ферменту вивчають, вимірюючи початкову швидкість ферментативної реакції за різних температур. Збільшення температурного оптимуму іммобілізованого ферменту не обов'язково означає збільшення термостабільності.

Після іммобілізації температурний оптимум ферменту може збільшитися на 10-20°C, однак за високої температури біокаталізатор може проявляти термолабільність та швидко втрачати свою активність, хоча початкова швидкість реакції при цьому зростає.

Незначна залежність швидкості реакції, що каталізується іммобілізованим ферментом, від температури може вказувати на протікання процесу в дифузійному режимі.

pH-ефекти в каталізі іммобілізованими ферментами. З ферментативної кінетики добре відомо, що швидкості реакцій за участю ферментів у гомогенному розчині сильно залежать від значення pH. Це обумовлено тим, що в каталізі беруть участь функціональні групи білка.

Розподіл протонів. Наприклад, якщо для роботи з іммобілізованим на поліелектролітному носії ферментом значення pH у зовнішньому розчині вибрати рівним 8 (оптимум дії ферменту в гомогенному розчині), то через ефект розподілу протонів усередині поліелектролітної матриці воно буде іншим. Так, якщо фермент іммобілізований на поліаніонному носії, то всередині нього концентрація протонів вища, ніж у зовнішньому розчині (зміщення в бік більш кислих значень pH). При використанні полікатионного носія pH зміщується в лужну сторону. Це призведе до того, що фермент, іммобілізований як на полікатионному, так і на поліаніонному носії, буде працювати не з повною ефективністю, хоча значення pH у зовнішньому розчині відповідає оптимуму його каталітичної активності.

Таким чином, зміщення pH-залежностей активності іммобілізованих ферментів, обумовлене розподілом протонів, спостерігається тільки в розведених буферних розчинах з низькою іонною силою. З іншого боку, залежність зміщення pH-оптимуму активності від іонної сили свідчить, що розподіл протонів між розчином і носієм відіграє важливу роль у каталізі іммобілізованим препаратом ферменту.

Обмеження дифузії протонів у системі з іммобілізованим ферментом. Полімерний носій, на якому іммобілізований фермент, може перешкоджати вільній дифузії протонів усередину частки носія. Це зумовлено тим, що всередині частки носія істотно загальмована дифузія протонів за механізмом, характерним для гомогенного розчину. Оскільки концентрація протонів у системі, зазвичай, незначна (10^{-7} моль/л або нижче), то навіть невеликий надлишок (або, навпаки, дефіцит), обумовлений гальмуванням дифузії, може викликати помітні зміни pH всередині частки. Це, у свою чергу, призведе до істотної зміни pH-залежності каталітичної активності, особливо для тих ферментативних реакцій, у яких протони є субстратом або продуктом (як, наприклад, при дії гідролаз, дегідрогеназ, кіназ та інших ферментів).

Наприклад, фермент, іммобілізований на носії, каталізує реакцію, що супроводжується утворенням протонів за відсутності буферного розчину. Після початку реакції в матриці починають накопичуватися протони, що призводить до появи градієнта концентрації протонів і наступної їх дифузії із частки у зовнішній розчин. Однак, якщо дифузія загальмована, то протони накопичуються всередині частки й спричиняють зниження pH у мікрооточенні

ферменту. Це, в свою чергу, впливає на швидкість ферментативної реакції, і, в результаті, на швидкість виділення протонів – продукту ферментативної реакції. Якщо рН всередині частки до початку реакції вище рН-оптимуму ферменту, то протони, які утворюються в ході реакції, знижують рН, підвищуючи тим самим швидкість ферментативної реакції (швидкість виділення протонів). У такій системі буде спостерігатися явище автокаталізу. Стаціонарного стану система досягне лише за умови значного підвищення концентрації протонів, що незначно впливатиме на швидкість ферментативної реакції.

Прискорення дифузії протонів у присутності буферних розчинів. Якщо система з іммобілізованим ферментом діє в присутності компонентів буферного розчину, які, зв'язуючи протони (утворюються в ході реакції), можуть переносити їх, видаляючи мікрооточення ферменту. Обумовлено це тим, що на межі розподілу частка носія – розчин створюється градієнт концентрації, що призводить до дифузії протонів.

Таким чином, додавання буферних розчинів у систему з іммобілізованим ферментом може "знімати" обмеження в дифузії протонів і призводити до збільшення ферментативної активності в області деяких значень рН.

Поєднання ефектів розподілу й дифузії протонів. Якщо в системі з іммобілізованим ферментом одночасно мають місце ефекти розподілу протонів і обмеження їх дифузії, то заздалегідь важко передбачити рН-залежності активності. Обидва цих фактори можуть діяти взаємопогоджувано: як синергісти (тобто підсилювати один одного), або як антагоністи (послаблювати дію один одного).

Можливо кілька варіантів: фермент іммобілізований на поліаніонному, полікатионному або нейтральному носії, і реакція, яку він каталізує протікає з виділенням або поглинанням протонів, або взагалі не супроводжується зміною їх концентрації.

Стеричні обмеження в каталізі іммобілізованими ферментами обумовлені тим, що просторова сітка матриці, у якій іммобілізований фермент, може перешкоджати просуванню молекул субстрату. У результаті активні центри частини ферментних молекул виявляються недоступними для субстрату. Це призводить до зниження концентрації активного ферменту і, як наслідок, - до зменшення швидкості ферментативної реакції. Отже, хоча істинні каталітичні параметри й не змінилися, фермент не може повністю виявити свою потенційну активність.

Зменшення каталітичної активності ферменту за рахунок стеричних факторів проявляється особливо часто у випадку високомолекулярних субстратів. Тому при створенні біокаталізаторів, що діють на білки, нуклеїнові кислоти та інші природні біополімери, надається перевага іммобілізації ферментів на водорозчинних носіях з невеликою молекулярною масою.

Стеричні обмеження іноді вдається зменшити або навіть повністю усунути шляхом деградації носіїв під дією хімічних реагентів (м'якою обробкою окислювачами, кислотами тощо) або спеціальними ферментами

(декстраназою, целюлазою та ін.). При цьому важливо, щоб така обробка не вплинула на первинну структуру і не порушила просторову організацію ферментів, що пришиті до носія.

Ефекти інгібування й активації в каталізі іммобілізованими ферментами. Полімерний носій може вносити свою специфіку й у дію таких регуляторів ферментативної активності, як інгібітори й активатори.

Низькомолекулярні інгібітори й активатори. Вплив низькомолекулярного інгібітору на фермент визначається, в основному, розподілом молекул інгібітору між фазою носія й розчином. Дифузійні обмеження не змінюють характер інгібування ферменту після досягнення стаціонарного стану.

Якщо інгібітор і полімерний носій однойменно заряджені, то ступінь інгібування знижується (порівняно з гомогенним розчином), а якщо протилежно заряджені – зростає. Якщо в останньому випадку субстрат має однаковий заряд з носієм, то ступінь інгібування ще більше збільшується. Аналіз цих систем показує, що у всіх випадках кінетика дії іммобілізованих ферментів, ускладнена інгібуванням, описується рівнянням Міхаеліса - Ментен.

При сильному обмеженні дифузії субстрату іммобілізований фермент може взагалі не реагувати на додавання інгібітору, і швидкість реакції визначається швидкістю дифузії субстрату. При досить високих концентраціях субстрату процес може перейти в кінетичну область і присутність інгібітору стає помітною. Якщо ж дифузія субстрату обмежена незначно, то інгібітор буде пригнічувати активність іммобілізованого ферменту.

Високомолекулярні інгібітори. Активність деяких ферментів *in vivo*, у першу чергу протеаз, регулюється інгібіторами білкової природи з молекулярними масами близько 10000 і вище. Їх дія на іммобілізовані ферменти може ускладнюватися як дифузійними обмеженнями, так і стеричними ускладненнями. Обидва цих ефекти будуть перешкоджати контакту молекули інгібітору з ферментом і, тим самим, зменшувати ефективність інгібування.

Інгібування продуктом реакції. При обмеженні дифузії продукту не може бути справедливим припущення про рівномірний розподіл інгібітору в фазах вільного розчину й носія.

Інгібування продуктом реакції може призвести до таких кінетичних наслідків:

1. Концентрація продукту-інгібітору в мікрооточенні ферменту повинна бути істотно вище, ніж у вільному розчині. Отже, іммобілізований фермент може помітно інгібуватися навіть тоді, коли концентрація продукту в зовнішньому розчині невисока;

2. Всередині дифузійних обмежень продукту концентрація субстрату буде зменшуватися в напрямку до центру частки, а концентрація продукту, навпаки, збільшуватися в тому ж напрямку. Тобто, ступінь інгібування

іммобілізованого ферменту, що перебуває в глибині частки носія, буде істотно вищим, ніж на межі розподілу із зовнішнім розчином.

Залежно від того, за яким механізмом відбувається інгібування продуктом, змінюється значення максимальної швидкості ферментативної реакції. Якщо продукт – конкурентний інгібітор, то при високих концентраціях субстрату вдається подолати й обмеження дифузії, та інгібування продуктом. У випадку неконкурентного інгібування продуктом оптимальне значення швидкості реакції (в умовах насичення ферменту субстратом) ніколи не досягне значення V . Чим ефективніше носій перешкоджає вільній дифузії, тим більш істотні розходження в цих значеннях будуть спостерігатися.

Отже, дифузійні обмеження відіграють роль своєрідного кінетичного буфера стосовно екзогенного ефектору (інгібітору або активатору).

Гістерезисні й коливальні явища в каталізі іммобілізованими ферментами. Дифузійні обмеження в каталізі іммобілізованими ферментами можуть призводити до принципово нових явищ, які не спостерігалися раніше для ферментів у гомогенних розчинах. Причини виникнення *гістерезисних і коливальних процесів* зручно простежити на прикладі інгібування ферменту субстратом.

Залежність ферментативної активності від концентрації субстрату визначається двома взаємозалежними факторами: ступенем дифузійних обмежень субстрату і його концентрацією у вільному розчині. При цьому чим вища концентрація субстрату й чим нижча вихідна активність ферменту, тим більш ймовірно, що ферментативна реакція буде протікати в кінетичному режимі. Тому, збільшення концентрації субстрату, що супроводжується зниженням ферментативної активності може викликати різкий перехід реакції з дифузійного режиму в кінетичний.

Відповідно до першого закону Фіка швидкість переносу субстрату до ферменту прямопропорційна концентрації субстрату на поверхні носія. Реакція, що каталізується іммобілізованим ферментом досягає стаціонарного стану, коли швидкість переносу субстрату до ферменту дорівнює швидкості його ферментативної трансформації.

Аналіз умов, при яких можуть спостерігатися гістерезисні й коливальні явища, показав, що для їх виникнення необхідно, щоб фермент активувався або інгібувався (субстратом або продуктом), а процес був дифузійно контрольованим.

Контрольні запитання

1. За якими кінетичними параметрами ферментативної реакції вивчають властивості іммобілізованих ферментів?
2. Яким параметром характеризують спорідненість ферменту до субстрату?
3. Як впливає іммобілізація на стан ферменту?

4. Які дифузійні фактори визначають при каталізі іммобілізованими ферментами?

5. За якими експериментальними критеріями характеризують каталіз за участю іммобілізованих ферментів?

6. Які причини виникнення гістерезисних і коливальних процесів у каталізі ферментами?

7. МЕТОДИ ІММОБІЛІЗАЦІЇ КЛІТИН МІКРООРГАНІЗМІВ

У 70-ті роки ХХ століття з'явилися перші публікації про іммобілізацію клітин мікроорганізмів, а перше промислове застосування іммобілізованих клітин для одержання аспарагінової кислоти було здійснено в Японії в 1974 році.

Іммобілізовані клітини мають ряд переваг як перед іммобілізованими ферментами, так і порівняно з вільними клітинами:

- відсутність витрат на виділення та очищення ферментів;
- зниження витрат на виділення і очищення продуктів реакції;
- більш високу активність і стабільність;
- можливість створення безперервних і напівбезперервних автоматизованих процесів;
- здатність до тривалого функціонування поліферментних систем без екзогенних кофакторів.

Для іммобілізації можуть бути використані клітини в різному стані: живі чи різного ступеню пошкодження. Одностадійні реакції можуть здійснювати як живі, так і пошкоджені клітини. Поліферментні реакції проводять з використанням живих клітин, які можуть тривалий час регенерувати АТФ і коферменти (НАДФ, НАД).

Проблема використання ферментативної активності іммобілізованих мікроорганізмів налічує більш ніж 150-літню історію – швидкий спосіб одержання оцту був оснований на застосуванні мікроорганізмів, адсорбованих на деревній стружці. Методи іммобілізації клітин подібні до методів іммобілізації ферментів.

Хімічний метод оснований на утворенні ковалентних зв'язків з активованим носієм, на поперечному зшиванні клітин за рахунок активних груп у клітинній оболонці з біфункціональними реагентами (наприклад, глутаровим альдегідом).

До фізичних методів відносяться адсорбція і агрегація.

Хімічні методи використовуються рідше, порівняно з іншими, та є малоприсаєднаними для іммобілізації живих клітин. Найбільш поширеним методом є включення клітин до складу гелів, мембран і волокон. Іммобілізація клітин включенням у різні гелі, мембрани, волокна оснований на хімічних і фізичних взаємодіях. При такому способі іммобілізації клітини можуть зберігати життєздатність та, за наявності поживного середовища, розмножуватися у приповерхневих шарах гелів.

Біокаталітична активність цілих іммобілізованих клітин на сьогодні може бути використана в різних галузях науки і техніки:

- при біосинтезі та трансформації таких сполук, як амінокислоти, органічні кислоти, антибіотики, стероїди, вуглеводи, вуглеводні, нуклеотиди і нуклеозиди;

- у пивоварінні та виноробстві;
- при очищенні стічних і природних вод;
- при вилученні металів із стічних вод;
- при асиміляції сонячної енергії;
- при виготовленні водневих сонячних елементів;
- в азотфіксації;
- з аналітичною метою при виготовленні електродів.

Найбільшу кількість досліджень по іммобілізації клітин мікроорганізмів проведено японськими дослідниками. Особливих успіхів досягнуто в галузі синтезу амінокислот, органічних кислот і антибіотиків. Іммобілізувати можна не тільки клітини мікроорганізмів, а й клітини рослинних та тваринних тканин, використовуючи їх для синтезу фізіологічно активних сполук.

7.1 Адсорбція мікроорганізмів на нерозчинних носіях

У випадку адсорбційної іммобілізації використовується природна здатність багатьох мікроорганізмів закріплюватися на різноманітних твердих або желеподібних носіях і продовжувати свою життєдіяльність у стані обмеженої рухливості. При цьому процедура штучної іммобілізації передбачає найчастіше просте пропускання суспензії клітин через реактор з адсорбентом.

Недолік даного методу – незначна міцність утримання клітин і обмежена кількість біомаси, що адсорбується одиницею носія. Ці недоліки значною мірою можна усунути при використанні крупнопористих носіїв (пористого скла, кераміки тощо). Величина пор при цьому повинна в кілька разів перевищувати розмір клітин.

Різнманітність властивостей поверхні клітин і адсорбентів обумовлює різні механізми адсорбційної взаємодії та різні види сил адгезії. Адгезія клітин на адсорбенті визначається такими причинами:

- утворенням хімічних зв'язків між поверхнею клітин і адсорбенту (хемосорбція);
- іон-іонними взаємодіями, утворенням іонних пар і триплетів;
- електростатичними взаємодіями заряджених поверхонь клітин і адсорбенту;
- силами Ван-дер-ваальса;
- впливом електролітів, гідратаційними ефектами, капілярними силами;
- флокуляцією та коагуляцією;

- гідрофобними взаємодіями;
- біоспецифічною адсорбцією.

7.2 Імобілізація мікроорганізмів за допомогою біоспецифічної адсорбції

Цей вид імобілізації клітин базується на використанні носіїв з прищепленими афінними лігандами, які утворюють міцні комплекси з відповідними їм рецепторами на поверхні клітин. Афінна взаємодія характерна для таких пар, як фермент-субстрат (інгібітор, кофактор), антиген-антитіло, акцептор-рецептор. Природа афінної взаємодії в принципі базується на іонних, електростатичних чи Ван-дер-ваальсових силах, тільки носить, в залежності від деяких випадків, кооперативний характер.

В якості матриці, яку піддають модифікації для отримання афінного адсорбенту, можна використовувати поліакриламід, сефадекси, агарозу, целюлозу, силікати. Лігандами можуть бути нуклеїнові кислоти (ДНК, полігоморибонуклеотиди), нуклеотиди, білки (альбумін, колаген, казеїн), лектини (рослинні і тваринні). Ліганди до матриці носія прищеплюють, як правило, за допомогою ковалентних зв'язків чи адсорбцією, тобто перед імобілізацією клітин проводять імобілізацію лігандів на носії, використовуючи для цього весь арсенал прийомів імобілізації білків та інших макромолекул.

Афінні методи імобілізації знайшли широке застосування для тваринних клітин. Імобілізація за допомогою біоспецифічної адсорбції клітин мікроорганізмів проводиться лише в окремих випадках. Так, клітини *S.cerevisiae* та *C. utilis*, які мають в складі клітинної стінки α -маннан, були імобілізовані на канкавалін А-прищепленому неорганічному адсорбенті; клітини *Pseudomonas* sp. імобілізували на пластинках з полістиролу з адсорбованим бичачим сироватковим альбуміном; клітини *Rhizobium trifolii* – на адсорбентах, вкритих рослинними лектинами.

У природних умовах клітини багатьох мікроорганізмів імобілізовані саме за рахунок афінної взаємодії (наприклад, симбіоз бобових рослин з азотфіксуючими бактеріями, імобілізованими на лектинах).

7.3 Методи ковалентної імобілізації клітин на нерозчинних носіях

Оскільки поверхня клітини будь-якого мікроорганізму володіє доступними реакційно здатними угрупованнями ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{SH}$ та ін.) то, підбираючи сприятливих для них „хімічних партнерів”, закріплених на нерозчинній матриці, можливо прикріпити клітину до носія ковалентними зв'язками. Головною вимогою до такого типу імобілізації є м'які умови процесу (рН, температура, розчинник) та відсутність у системі речовин, що пригнічують необхідні ферментативні системи мікроорганізмів. Останнє відноситься не лише до використовуваних реагентів, але й до сполук, що переходять у рідку фазу в результаті як самої реакції угруповань клітин з

функціями хемосорбенту, так і до продуктів побічних реакцій, що протікають паралельно.

Практично всі відомі з публікацій приклади ковалентної іммобілізації клітин на носії є або повторенням, або модифікацією відомих хімічних фіксацій на нерозчинній підложці речовин білкової природи (ферментів).

Як матрицю носія для ковалентної іммобілізації клітин використовують різноманітні неорганічні, органічні і композиційні матеріали: скло, кераміку, оксиди металів, біополімери типу целюлози (чи її похідні), гелі на основі природних і синтетичних полімерів, плівки, мембрани, волокна, а також вкриті шаром органічного полімеру неорганічні сорбенти тощо.

За умови, якщо обраний для ковалентної іммобілізації мікроорганізмів матеріал не містить необхідних функціональних угруповань, використовують спеціальні прийоми модифікації. Наприклад, обробка кремнеземних сорбентів чи оксидів металів γ -амінопропілтриетиленоксисиланом дає можливість прищепити до неорганічної матриці аліфатичні первинні аміногрупи; модифікація целюлози монохлороцтовою кислотою утворює карбоксилвмісну похідну, а нанесення тонкого шару желатини на частки інвертного носія створює на його поверхні покриття з властивими білкам хімічними угрупованнями.

Для ковалентного закріплення клітин на носії використовується один з наступних прийомів:

- змішування клітин і часток носія та додавання відповідного біфункціонального реагенту, який виступає в ролі змішувача. При цьому одночасно з закріпленням клітин на носії повинно відбуватися їх зшивання один з одним. Однак, використовувані агенти (наприклад, глутаровий альдегід, диізоціанати, карбодиміди тощо), як правило, доволі токсичні для клітин;

- попереднє приготування носія, що містить на доступній для контакту з клітинами поверхні реакційно здатні угруповання, а потім - додавання суспензії мікроорганізмів. Вплив використовуваних речовин на мікроорганізм, зазвичай, не суттєвий (або взагалі відсутній), тому даний прийом іммобілізації є кращим для живих клітин.

У більшості випадків ковалентної іммобілізації клітин на носії використовують хімічні реакції за участю аміногруп компонентів поверхні клітини (реакція утворення альдимінних зв'язків, N-ацилювання, N-алкілювання).

При фізіологічних значеннях рН аналогічним чином реагують з даними носіями і $-SH$ групи клітин, але, так як їх кількість завжди на порядок нижча вмісту $-NH_2$ груп, ковалентна фіксація мікроорганізму відбувається переважно по його аміногрупах.

Дослідження показали, що приєднані ковалентним альдимінним зв'язком до нерозчинного носія клітини повністю зберігали свою життєздатність, а збільшення довжини проміжного угруповання між матрицею і альдегідними функціями дозволило іммобілізувати приблизно в

два рази більше клітин, ніж на такому ж носії, але після одностадійної модифікації диальдегідом. За допомогою електронної мікроскопії вдалося продемонструвати факт багатоточкової зшивки цих поверхонь, що зрозуміло, оскільки при дотику клітини з носієм площа контакту достатньо велика і охоплює велику кількість активних в даній реакції угруповань поверхонь мікроорганізму і підложки.

На іммобілізацію живих клітин впливає природа угруповання (X та НХ). Не дивлячись на достатньо м'які умови самого процесу іммобілізації і початкову відсутність у системі токсичних для мікроорганізмів речовин, на їх життєздатність можуть впливати розчинні продукти реакції, здатні отруїти клітину. Так, наприклад, при ковалентному приєднанні культури *Micrococcus luteus* до –COOH груп носія (частки карбоксиметилцелюлози), заздалегідь обробленого кародиїмідом і відмитого від надлишку реагенту, спостерігалась загибель клітин, але L-гістидин-аміак-ліаза ферментативна активність зберігалась. Ймовірно, похідна сполука заміщеної сечовини, що виділялась в рідку фазу при взаємодії угруповань клітин і хемосорбента, виявилась токсичною для мікроорганізмів.

Також на клітини мікроорганізми виявляють токсичну дію карбодіїмідні реагенти (при цьому знижується ферментативна активність). Однак, якщо активований карбодіїмідом носій і клітина розділені містком (типу гліцину чи аланіну) і клітина не контактує з токсичним реагентом, то активність її може бути збережена.

Для приєднання люмінісцентних бактерій *Photobacterium fischeri* до модифікованої поліетиленової плівки було використано м'які умови іммобілізації. Спочатку за допомогою радіаційної щепленої полімеризації на плівці був створений шар поліметакрилхлориду, хлорангідридні функції якого при іммобілізації клітин реагували з –NH₂ групами поверхні мікроорганізмів. Соляна кислота, яка виділялась, нейтралізовувалась забуференим середовищем і практично не впливала на клітини.

Реакції N-алкілювання аміногруп клітин з відповідними активними угрупованнями хемосорбента також використовувались для ковалентної іммобілізації мікроорганізмів на носії. Наприклад, для приєднання клітин *Aspergillus niger* за епоксидними угрупованнями зшитого сополімера гліцидилметакрилата і метилметакрилата.

Запропоновано метод ковалентного зв'язування клітин з силікагелем, активованим солями перехідних металів. Перевагою силікагелю є відсутність набухання в різних розчинниках і водних розчинах, висока механічна міцність, стійкість до дії мікроорганізмів.

Важливо, що в результаті такої реакції не змінюється склад рідкої фази – в неї не переходять речовини, здатні несприятливо впливати на клітини. Обмеження у використанні даного способу іммобілізації мікроорганізмів зумовлено необхідністю підтримання під час взаємодії клітин з носієм нейтрального чи слаболужного значення рН середовища, оскільки епоксиди реагують з непротонованими –NH₂ групами. Тому для

ацидофільних культур мікроорганізмів умови тривалої експозиції в таких середовищах можуть виявитись невідповідними.

На сьогодні метод ковалентної іммобілізації клітин мікроорганізмів на нерозчинних носіях не дуже поширений у використанні. Галуззю застосування таких біокаталізаторів є переважно вузькоспеціалізовані, невеликі за обсягом системи типу заснованих на іммобілізованих клітинах чутливих елементів біодатчиків.

7.4 Методи штучної агломерації клітин мікроорганізмів

Способи формування відносно великих (порівняно з одиночними клітинами) і механічно досить міцних мікробних асоціатів, що за своїми властивостями задовольняли б вимогам, що висувуються до часток іммобілізованих біокаталізаторів, засновані на загальних принципах закріплення мікроорганізмів на носії: це *адсорбція* (біоспецифічна, неспецифічна або їхнє сполучення), або *хімічна зшивка*. У ролі носія тут виступає клітина, з'єднана із сусідніми клітинами стійкими в часі зв'язками. Деякі автори називають цей варіант "іммобілізацією без носія", маючи на увазі відсутність у системі виконуючого функцію носія додаткового неклітинного матеріалу.

Технологічно найбільш простий випадок – самофлюкуляція. Відомо, що багато мікроорганізмів здатні агрегувати із суспензій з високим вмістом біомаси, утворюючи так звані флокули (біофлокули). Ця властивість притаманна штамам дріжджів, бактерій, деяким міцеліальним культурам.

Універсальних прийомів одержання флокул з характеристиками (сукупністю фізико-механічних властивостей, біологічної продуктивності, стабільності функціонування), що підходять для роботи в звичайних реакторах, не існує.

Головними перевагами самофлюкуляції перед іншими методами іммобілізації клітин є:

- відсутність істотних стресових впливів на організми (це дозволяє використовувати одержуваний каталізатор у процесах, де необхідна погоджена робота ферментних систем живої клітини);
- можливість досягнення значних питомих концентрацій маси в реакторі (сприяє високій продуктивності технологічної системи в цілому).

Показано, що в ряді випадків механічна міцність флокул цілком достатня для функціонування у колоночних реакторах витіснення і, навіть, у реакторах, заснованих на псевдозрідженні, де частки піддавалися рушійним навантаженням. Проте самофлюкуляція і висока стабільність флокул – поєднання властивостей, що не часто зустрічається.

Для підбору умов виникнення флокул потрібно мати досвід практичної роботи з конкретною культурою, так, у більшості випадків, у таких експериментах переважає емпіричний підхід. Наприклад, один зі штамів термотолерантних дріжджів *Saccharomyces uvarum*, що не був здатний у звичайних умовах до самофлюкуляції, вдалося стимулювати до

цього процесу за рахунок правильного підбору складу поживного середовища і режиму інкубації. Через 48 год після внесення суспензії клітин у колоночний реактор при використанні спеціально підібраних умов утворювалися флокули діаметром від 1 до 3 мм, що містили порядка 3-10 КУО/мл. За три наступні доби розміри часток збільшувалися до 3 – 5 мм, а концентрація біомаси вже складала $15 \cdot 10^9$ КУО/мл. Одержаний таким способом біокатализатор з високою швидкістю зброджував глюкозу в етанол. Однак, в одержуваній на виході із колонки барді завжди були присутні вільні клітини, що вимивалися (їх відокремлювали від рідини центрифугуванням і знову періодично повертали в реактор). Отже, цей факт свідчить про недостатню міцність зв'язків між мікроорганізмами в об'ємі флокулярних часток.

Нерідко утворення агрегатів клітин можна викликати зміною яких-небудь параметрів їх культивування (зниженням аерації або короткочасним тепловим впливом), спеціально підібраними умовами для сушіння біомаси, а також обробкою суспензій клітин флокулянтами (флокулюючими агентами), тобто речовинами, що сприяють асоціації мікроорганізмів.

Наведена флокуляція клітин має місце при додаванні до їх суспензії сполук, які нековалентно взаємодіють із клітинною стінкою і викликають зміни заряду, локалізованого на зовнішній поверхні цієї стінки. Роль подібних агентів здатні виконувати поліелектроліти, що утворюють з біополімерами поверхні клітини слабодисоціюючі поліелектролітні комплекси. При цьому нейтралізується сумарний заряд зовнішніх угруповань клітинної стінки, знижується її гідрофільність, що викликає інтенсивне злипання часток (коалесценцію колоїдів). Причому, практично однакового ефекту вдається досягнути і з використанням полікатионів (взаємодіють з негативно зарядженими угрупованнями клітин) і поліаніонів (нейтралізують позитивні заряди компонентів зовнішньої поверхні клітинної стінки мікроорганізму). В обох випадках обробка поліелектролітами призводить до флокуляції.

В якості флокулюючих агентів використовують водорозчинні синтетичні поліаміни (полікатиони) або частково гідролізований поліакриламід (сополімер акриламиду з акріловою кислотою – полікатион). Однак, при формуванні зазначених біофлокул досить складно одержати частки з прийнятними для великомасштабної технології характеристиками (міцністю, розмірами, формою).

Незважаючи на досить м'які умови одержання флокул за допомогою коалесціюючих клітин поліелектролітів, інколи відбувається істотне зниження біологічної активності асоційованих таким способом мікроорганізмів. Наприклад, подібний ефект спостерігався для культур мікроскопічних грибів (*Fusarium moniliforme*, *Gloeoceroospora sorghi*, *Stemphylium loti*), що володіють здатністю омиляти CN-іони до формаміда. Після обробки флокулянтом ціанідгідролазна активність отриманих біокатализаторів складала всього 23 – 32 % від активності інтактною біомаси. Очевидно, цей факт свідчить про зміни в метаболізмі клітин, спричинені

зміною сумарного заряду поверхні клітин, що може впливати на транспорт поживних речовин.

Описані вище варіанти штучної агломерації клітин мікроорганізмів засновані на нековалентних контактах клітин у межах іммобілізованого біокатализатора. Природно, що ковалентні зв'язки набагато стійкіші, тому методи хімічного зшивання набули більш широкого поширення, порівняно з флокуляцією або самофлокуляцією клітин.

7.5 Іммобілізація клітин мікроорганізмів у масі носія

Метод включення клітин у полімери різної природи застосовується як у лабораторному, так і в промисловому масштабі. При цьому як носій використовують природні полімери (каррагінан, агар, желатину, хітозан, колаген, різні пектини) і синтетичні (поліакриламідний гель, фото чутливі полімери, поліуретани, полівініловий спирт та ін.). Залежно від їх механічних властивостей і характеру проведеного процесу полімери можуть використовуватися в різній формі: гранул, мембран, волокон.

Під визначенням «гель» розуміють систему полімер-розчинник, просторова сітка якої стабілізована по всьому своєму об'єму стійкими в часі міжмолекулярними зв'язками. Природа цих зв'язків визначається хімічною будовою гелеутворювачів і способами одержання відповідних гелів. Розрізняють дві великі групи селективних систем: ковалентно-зшиті й нековалентні гелі.

Просторова сітка ковалентно-зшитих гелів утворена міжмолекулярними зв'язками (хімічні сітки). Приклади таких матеріалів є поліакриламідні гелі, силікагель, гелі типу сефадексів, полістирольні іонообмінні смоли та ін.

Для одержання утримуючого клітини гелю на основі мономерних сполук необхідно суспендувати у його розчині певну кількість біомаси й викликати процес розгалуженої полімеризації або поліконденсації, у якому точками розгалуження, а в результаті вузлами сітки стають ланки бі- або поліфункціональних мономерів, що вбудовуються у лінійний ланцюг.

У нековалентних гелях просторова сітка підтримується за рахунок сил нековалентної природи (водневі зв'язки, гідрофобні взаємодії, зони утворення кристалів; це – фізичні сітки). Прикладами таких систем є гелі желатини, агару й агарози, крохмалю та ін. Даним селективним матрицям властиве оборотне плавлення – застигання при зміні температури, тому їх зазвичай називають термооборотними. Для іммобілізації клітин мікроорганізмів часто використовуються ще так звані монотропні гелі, у яких роль містків між макромолекулами, що володіють поліелектролітичними властивостями, виконують іони.

Живі клітини мікроорганізмів, введені у каррагінан, інтенсивно розмножуються у присутності поживного середовища і є активною поліферментною системою, що регенерує коферменти й необхідні ферменти. Процеси одержання сорбози, ізoleyцину та етанолу здійснені у

лабораторному масштабі за допомогою живих клітин у каррагінані. Виявилося, що мікроорганізми ростуть у такому гелі з тією ж швидкістю, що й вільні клітини, або з більшою швидкістю.

Включення у альгінаті належить до м'яких методів іммобілізації – клітини залишаються живими й можуть здійснювати полі ферментні процеси.

Великий інтерес становить можливість включення клітин рослинних і тваринних тканин у Са-альгінатний гель і здійснення з їх допомогою процесів трансформації й біосинтезу.

Іммобілізація клітин і ферментів з включенням в гель відноситься до механічних методів. Гель, в який включають клітини, як правило, складається зі сферичних часток. Включення живих клітин вимагає м'яких умов іммобілізації, носій повинен представляти систему відкритих пор з хорошими умовами для газообміну.

Включення клітин в поліакриламідний гель. Поліакриламід (ПАА) - носій, що найчастіше використовується для включення ферменту, оскільки не має іонно-обмінних властивостей, тому при іммобілізації значення рН практично не змінюється. Для утримання включених білків з носієм потрібно мати високу міру зшивання носія, тобто повна полімеризація. Важливим чинником при цьому являється видалення кисню з розчину.

Включення клітин в гель кальцію альгінату. Альгінат – основний структурний полісахарид бурих морських водоростей. Моновалентні катіони полісахариду навіть у низьких концентраціях утворюють в'язкий розчин у присутності двовалентних катіонів, особливо кальцію, що сприяло широкому застосуванню альгінату для іммобілізації живих клітин. Іони кальцію можна замінити іншими двовалентними катіонами, наприклад барієм. Важливим є також відсутність в системі хелатуючих агентів, таких, як фосфати і цитрати, що руйнують структуру гелю, зв'язуючи кальцій.

Включення клітин в гелі карагеніну. Карагеніни – гетероциклічні полісахариди, що містять ефіри ст - D -галактопіранозил сірчаної кислоти. У водному розчині карагенін (гель) при додаванні іонів кальцію утворює нерозчинну фракцію.

Включення клітин в гелі агару. Препарати клітин, включених в агар, як і в каррагенін, отримують у вигляді сферичних часток. Іммобілізацію проводять у розчині, нагрітому до температури, при якій агар залишається рідким. Потім додають клітини і суміш охолоджують до утворення гелю, як і у випадку з каррагеніном, клітини мають бути стійкі до нагрівання при 40 °С. Іммобілізацію проводять у реакторі при безперервному режимі з перемішуванням або в реакторах, що працюють в режимі псевдорозрідження.

Контрольні запитання

1. Які матеріали використовують як матрицю для ковалентної іммобілізації клітин мікроорганізмів?
2. Які існують варіанти ковалентного закріплення клітин на носії?

3. Охарактеризуйте фактори, що впливають на процес ковалентної іммобілізації.

4. Які переваги методів штучної агломерації клітин мікроорганізмів порівняно з іншими методами іммобілізації?

5. Які умови впливають на процес самофлокуляції клітин мікроорганізмів?

6. Як відбувається іммобілізація клітин включенням у масу носія? Які носії при цьому використовують?

8. ФІЗІОЛОГІЯ ІММОБІЛІЗОВАНИХ КЛІТИН ПОРІВНЯНО З НАТИВНИМИ

На сьогодні накопичено значний експериментальний матеріал, що свідчить про збільшення стабільності іммобілізованих клітин порівняно з вільно існуючими мікроорганізмами. Стабільність виражається в більш тривалому активному функціонуванні клітин, при цьому відзначається розширення рН- і температурних оптимумів, велика стійкість до негативних впливів навколишнього середовища. Показано, що іммобілізовані клітини інгібуються більш високими концентраціями утворених ними продуктів, ніж вільні клітини. Відмічено значно більшу стабільність іммобілізованих рекомбінантних клітин, продукуючих бета-галактозидазу, і стабільність іммобілізованих клітин відносно копіювання плазмід.

Фактори, що визначають стабільність та інші характеристики іммобілізованих клітин:

1. метаболізм використовуваних клітин, щільність і рівномірність розподілу в носії;

2. властивості носія (матриці або підкладки);

3. природа мікрооточення навколо клітини;

4. властивості середовища, що оточує біокатализатор.

Таким чином, зміна фізіології і метаболізму клітин в іммобілізованому стані є наслідком не самої іммобілізації, тобто позбавлення руху клітин, а зміною фізико-хімічних параметрів їх навколишнього середовища.

Труднощі роботи з іммобілізованими клітинами, на відміну від іммобілізованих ферментів:

- додатковий дифузійний бар'єр – клітинна стінка;
- утворення побічних продуктів реакції.

Ці труднощі можна подолати, більше того, можливість зміни проникності клітинної стінки в результаті іммобілізації чи після неї призводить в ряді випадків до підвищення ферментативної активності іммобілізованих клітин, до зменшення побічних продуктів порівняно з вільним станом.

При дослідженні властивостей іммобілізованих культур порівняно з вільними клітинами в ряді випадків відмічено:

- зміну температурного оптимуму в сторону більш високих температур або його розширення;

- підвищення чи зниження теплової стабільності.

Швидкість росту бактерій різних видів залежить від природу субстрату і можливості його сорбції н носії. Так швидкість росту штаму адсорбованого на гранульованому активованому вугіллі, зростає більш ніж у 10 разів при рості на глутаматі (адсорбованому на поверхні вугілля) і не змінюється при рості на глюкозі (не адсорбованій на носії).

У адсорбованих на вуглеводмісних носіях дріжджових клітин спостерігалася активація внутрішньоклітинної інвертази у 1,5 – 1,8 рази і зростання оксигеназної активності у адсорбованих родококів в 3,7 рази порівняно з аналогічними показниками для суспендованих клітин.

При вивченні метаболічної активності іммобілізованих дріжджів було виявлено активацію енергетичного метаболізму а також збільшення кількості як запасних поживних речовин (глікогену і трегалози), так і структурних полісахаридів (глюкану і манану) та підвищення вмісту насичених жирних кислот. Іммобілізація виявляє вплив на властивості плазматичної мембрани, що може бути причиною змін в ряді транспортних систем.

Біологічно чутливі елементи біосенсорах можуть бути представлені не лише іммобілізованими ферментами, а й цілими клітинами. При формуванні рецепторного елементу біосенсора використовують різні методи іммобілізації мікроорганізмів (включення в гелі, використання синтетичних мембран, а також адгезію і хімічне прикріплення клітин одна до одної або до носія за допомогою біфункціональних реагентів.

Наприклад, клітини *Saccharomyces cerevisiae* можуть інтенсивно розвиватися в ПААГ. Нова популяція обумовлює високу і стабільну активність. Слід відмітити особливість іммобілізованих клітин – їх здатність розмножуватись за рахунок лізису частини клітин при проведенні трансформацій на голодному середовищі. Останнє дуже важливо, так як, очевидно, являється однією з причин стабільності іммобілізованої клітинної системи. Популяція клітин, що вирости в гелі за рахунок продуктів лізису або в присутності поживного середовища, не піддавалися впливу мономерів і полімеризації, тому вона більш активна, довше зберігає життєздатність і активність.

Джерелом протиріч служать труднощі в одержанні експериментальних даних по тривалій експлуатації вільних клітин. Ні періодичні, ні безперервні умови культивування вільних клітин не можна вважати оптимальними для перевірки можливості їхнього тривалого функціонування. У періодичній культурі вичерпуються з часом поживні компоненти середовища, накопичуються продукти метаболізму. Перенос клітин у свіже поживне середовище з їхнім відділенням від культуральної рідини може негативно відбиватись на стані клітини.

Контрольні запитання

1. Як змінюються фізіологічні особливості іммобілізованих клітин порівняно з нативними?

2. Які фактори визначають стабільність іммобілізованих клітин?
3. У чому полягають труднощі при використанні іммобілізованих клітин, порівняно з нативними?

9. АПАРАТУРНЕ ОФОРМЛЕННЯ ПРОЦЕСІВ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ ФЕРМЕНТАМИ І КЛІТИНАМИ

У промисловості вже на початку 80-х було реалізовано 4 широкомасштабні технології на основі іммобілізованих ферментів (глюкозоізомерази, аміноацилази, пеніцилази і лактази). Однак, ще на початку ХХ-го століття стало відомо, що деякі ферменти, якщо їх адсорбувати на твердому носії (такому, як вугілля або силікагель), зберігають свою каталітичну активність.

9.1. Одержання глюкозо-фруктозних сиропів

Ізомеризація глюкози в фруктозу під дією іммобілізованої глюкозоізомерази представляє собою найбільш крупномасштабний процес за участю іммобілізованих ферментів.

Фермент глюкозоізомераза каталізує перетворення глюкози в суміш глюкози та фруктози, які містяться в реакційній системі до кінця реакції приблизно в однакових кількостях. Ця суміш по солодкості відповідає звичайному або інвертному цукру. Глюкозо-фруктозна суміш надходить на ринок, як правило, у вигляді сиропів. Використовується при виробництві тонізуючих напоїв, морозива, кондитерських виробів тощо.

Технологічне рішення процесу. Найбільш розповсюджений технологічний варіант – реактори у вигляді колон з направленням потоку зверху в низ. Висота колони досягає 5 м. Рекомендується використовувати більш чисту вихідну сировину (глюкозні сиропи). Після проходження колонки з іммобілізованим ферментом утворений глюкозо-фруктозний сироп послідовно пропускають через катіонообмінник та аніонообмінник для видалення солей із реакційної суміші. При неправильній роботі реактора впродовж 40 діб мікробної контамінації системи не було виявлено, що пояснюється високою температурою (60 °C) процесу. Тривалість напівактивації іммобілізованого ферменту складає 36 діб.

9.2 Розділення рацемічних сумішей амінокислот

Одержання оптично активних амінокислот розділенням їх рацемічних (оптично неактивних) сумішей з використанням іммобілізованої аміноацилази – перший процес у світі, який впроваджено на промисловому рівні (на прикладі отримання L-метионіну в Японії, 1969 р.).

Ацил-DL-амінокислоти, одержані відомим хімічним синтезом, піддають дії ферменту аміноацилази. Фермент гідролізує тільки один ізомер, який призводить до утворення незаміщеної L-амінокислоти, залишаючи

нерозщепленою ацил-D-амінокислоту. Дані речовини мають різну розчинність і легко відділяються одна від одної. Ацил-D-амінокислоту рацемізують у суміші ацил-DL-амінокислот і весь процес повторюють спочатку. Оскільки аміноацилаза має чутливість до будови білкового ланцюга амінокислот, процес розділення рацематів може бути використаний для широкого кола амінокислот.

Технологічне рішення процесу. Препарат іммобілізованої аміноацилази попередньо готують таким чином: 1000 л ДЕАЕ – сефадекса перемішують з 1100 – 1700 л водного розчину аміноацилази при 35 °С та рН 7,0 впродовж 10 год. Після фільтрації іммобілізований препарат промивають водою. Вихід активності по відношенню до попереднього розчиненого ферменту складає 50 – 60 %.

Колона з іммобілізованою аміноацилазою зберігає більш ніж 60 % попередньої активності після місяця роботи, тривалість напівінактивації колони – 65 діб. Форма колони (відношення висоти до діаметру) не впливає на ефективність процесу. Регенерація каталізатора в колоні протікає шляхом додаванням свіжого розчину ферменту, який знову адсорбується на носії. Стійкість полімерного носія настільки висока, що його можна повторно використовувати в колоні більш ніж 8 років без заміни.

При використанні іммобілізованого ферменту процес очищення продукту простіший та вихід більший, ніж за використання розчинного ферменту. Тому для отримання тієї ж кількості L-амінокислоти потрібна менша кількість вихідного рацемату та затрати на нього зменшуються. Ціна аміноацилази суттєво знижується для іммобілізованого ферменту завдяки підвищенню його стабільності. Оскільки процес з іммобілізованими ферментами майже повністю автоматичний, затрати на працю також набагато нижчі. Вартість процесу з іммобілізованою аміноацилазою складає близько 60 % від вартості процесу з розчинним ферментом.

9.3 Одержання L-аспарагінової кислоти

Аспартаза каталізує приєднання аміаку по подвійному зв'язку фумаратової кислоти. При цьому L-аспарагінову кислоту одержують в одну стадію. Позитивні результати були отримані при використанні в якості каталізатора цілих клітин мікроорганізмів, іммобілізованих у полімерному гелі.

Технологічне рішення процесу. Вихідною сировиною для синтезу аспарагінової кислоти є фумарат амонію. Розчин фумарату амонію (концентрацією 1 моль/л), який містить 0,001 моль/л хлористого магнію, пропускають при рН 8,5 та температурі 37 °С через колонну з іммобілізованими клітинами *E.coli* (швидкість потоку 0,6 об/год). В типовому варіанті на виході одержують 2400 л аспарагінової кислоти, яку доводять до рН 2,8 добавленням 60 %-ою H_2SO_4 при 90 °С і потім охолоджують до 15 °С та витримують протягом 2 год. При цьому L-аспарагінову кислоту, що кристалізується, збирають центрифугуванням та промивають водою.

Продукт не потребує наступної перекристалізації та її вихід складає 3048 кг (95,5 % від теоретичного). Процес майже повністю автоматизований та проводиться у безперервному режимі. Швидкість утворення аспарагінової кислоти в даному процесі не залежить від форми колони в інтервалі відношення висоти до діаметру.

Тривалість напівактивації каталізатора (іммобілізованих в поліакриламідному гелі клітини *E.coli*) – 110 діб.

9.4 Одержання L-яблучної кислоти

Промислове одержання L-яблучної кислоти за допомогою іммобілізованих мікробних клітин, які містять фумаразу, здійснюється з 1973р.

Яблучна кислота широко користується попитом на світовому ринку як заміник лимонної кислоти в продуктах харчування та фармацевтичних препаратах. Хімічним шляхом (гідролізом ангідриду яблучної кислоти) одержують рацемічну суміш оптичних ізомерів яблучної кислоти. мікробіологічним синтезом одержують оптично активний L-ізомер, який є дороговартісним для широкого промислового виробництва. Також, L – яблучну кислоту можна отримати ферментативним шляхом – гідратацією фумаратової кислоти під дією фумарази. Реакція проходить до встановлення у системі рівноваги, при якій близько 80 % фумаратової кислоти перетворюється в яблучну.

Препарати іммобілізованого ферменту (клітин). Для виробництва використовують клітини, які містять фумаразу, іммобілізовані в поліакриламідному гелі. Для уникнення побічної реакції утворення янтарної кислоти (яка важко відділяється від фумаратової кислоти, що не прореагувала) іммобілізовані клітини обробляють детергентами (екстракт жовчних кислот у концентрації 0,2 %) при 37 °С, рН 7,5, впродовж 20 год. Порівняно з інтактними клітинами (тривалість напівінактивації фумарази 6 діб) іммобілізовані клітини суттєво стабільніші (тривалість їх напівінактивації складає 55 діб при 35 °С).

Інші підприємства виробляють іммобілізовану фумаразу, де фермент включений у поліволоконна триацетату целюлози. Такий препарат зберігає близько 40 % активності. Іммобілізований фермент характеризується достатньою стабільністю при зберіганні та в умовах реакції, яка перевищує стабільність нативного ферменту.

Технологічні умови процесу. Одні компанії використовують колону з іммобілізованими клітинами. Розчин на вході містить фумарат натрію у концентрації 1 моль/л, температура 37 °С; швидкість потоку 0,2 об/хв; рН 7,0. Вихід L-яблучної кислоти складає 70 % від теоретичного. Іншими компаніями-виробниками передбачено процес відділення яблучної кислоти від фумаратової шляхом осадження солями кальцію.

9.5 Модифікація антибіотиків

Використання іммобілізованих ферментів та клітин у біотехнологічних процесах базується на здешевленні вихідного продукту. З іншої сторони, існує технологія отримання дороговартісних препаратів, але таких, що потребуються у невеликих кількостях (наприклад, антибіотики). До важливих відносять напівсинтетичні пеніциліни (похідні 6-амінопеніцилінової кислоти, діацелюваною формою бензилпеніциліна).

На сьогодні освоєно цілий ряд промислових способів, в яких використовується пеніцилінамілаза, іммобілізована, наприклад, за допомогою бромистого ціаніду на сефадексі G – 200 або шляхом включення у волокна триацетату целюлози. Фермент поміщають у реактор періодичної дії або реактори з нерухомим шаром. Пізніше для цього процесу почали використовувати цілі клітини *E.coli*, іммобілізовані шляхом включення їх в поліакриламідний гель.

9.6 Основні вимоги до апаратурного оформлення технологічних процесів

До принципового апаратурного оформлення технологічних процесів, які здійснюють за допомогою іммобілізованих ферментів, передбачається використання таких апаратів:

- реактора з перемішуванням періодичної дії;
- колонки з насадкою із фіксованого ферменту;
- реактора з перемішуванням безперервної дії, оформленого у вигляді апарату ультрафільтрації або колонок з псевдорозрідженим шаром.

Процеси легкі в реалізації, але при цьому втрачається одна із переваг іммобілізованого ферменту – можливість створювати безперервні процеси.

Переваги використання колонок: безперервність дії, малий знос препарату. Основні труднощі пов'язані з високою гідродинамічною напругою колонок. Однак, гідродинаміку колонок можна покращити розділенням на секції за допомогою піддонів або змішуванням препарату із скляними кульками.

Реактори з ультрафільтрами або колонки з псевдорозрідженим шаром перспективні, але дороговартісні. Їх використання ефективне при гідролізі нерозчинного субстрату (крохмалю, целюлози).

Контрольні запитання

1. Як одержують глюкозо-фруктозні сиропи за участю іммобілізованих ферментів?
2. В чому полягають технологічні особливості розділення рацемічних сумішей з використанням іммобілізованих ферментів?
3. Яке застосування іммобілізованих ферментів при отриманні аспарагінової і яблучної кислот?

4. Охарактеризуйте апаратне оформлення технологічних процесів за участю іммобілізованих ферментів?

5. У яких технологічних процесах використовують іммобілізовані клітини мікроорганізмів?

10. ТЕХНОЛОГІЧНІ ПРОЦЕСИ З ІММОБІЛІЗОВАНИМИ КЛІТИНАМИ

На сьогодні клітини мікроорганізмів досить широко використовують в різних галузях. Очевидно, що біокатализатори на основі іммобілізованих клітин, що володіють усіма перевагами гетерогенних каталізаторів, практично ідеально підходять для досягнення цілей і задач біотехнології.

Серед напрямів використання іммобілізованих клітин виділяють такі:

- трансформація і біосинтез органічних сполук;
- використання іммобілізованих клітин і органел для процесів фотосинтезу, біокаталізу, очистки стічних вод від природних і чужорідних забруднень, зберігання культур в іммобілізованому стані, використання іммобілізованих клітин в медицині і біології для аналітичних цілей тощо.

Відзначимо, що чимала роль у якості іммобілізованих біокатализаторів належить іммобілізованим ферментам: уже відомо кілька яскравих прикладів їхнього промислового застосування. Однак, використання іммобілізованих препаратів індивідуальних ферментів виявилось менш успішним, ніж очікувалося. Це обумовлено рядом причин, найважливішими серед яких є низька операційна стабільність, здатність каталізувати тільки одну реакцію, можливість уживання лише тих ферментів, що не вимагають регенерації кофакторів. Використання іммобілізованих клітин дозволяє уникнути очищення необхідних ферментів, стабільність ферментів у нативному оточенні усередині клітини збільшується, здійснюється тривала безперервна регенерація кофакторів.

Можливості клітинного метаболізму з погляду перетворення одних речовин в інші набагато ширші, ніж при використанні окремого ферменту або навіть мультиферментної системи, це дозволяє здійснювати набагато більш складні синтези, трансформації, деструкції, багатостадійні сполучені процеси. У більшості випадків необхідно підтримувати цілісність і життєздатність клітин, а також зберігати їх у тій фазі розвитку, у якій синтезуються необхідні клітинні ферменти, нарешті, варто враховувати і можливість протікання небажаних (побічних) процесів.

Перевагами використання іммобілізованих клітин порівняно з іммобілізованими ферментами, а також вільними клітинами є такі:

- здешевлення процесу завдяки підвищенню продуктивності праці та автоматизації,
- збільшення виходу цільового продукту;
- здешевлення біокатализатора внаслідок відсутності потреби у виділенні індивідуальних ферментів;

- можливість здійснення багатоступневих процесів, у тому числі тих, при яких потрібна регенерація кофакторів;
- збереження природного мікрооточення і конформаційної стабільності ферментів усередині клітин і, отже, більш високого виходу по активності ферментів, що знаходяться усередині клітини;
- можливість реактивувати іммобілізовані клітини (наприклад, змінюючи склад поживного середовища);
- підвищена активність біокатализатора на основі іммобілізованих клітин (завдяки можливості вибору фази росту клітин).

Таким чином, іммобілізовані клітини можна використовувати практично у всіх відомих на сьогодні біотехнологічних процесах для одержання цінних продуктів.

Одержання мікробних поверхнево-активних речовин. До мікробних поверхнево-активних речовин (ПАВ) відносять не лише мікробні полісахариди, а й різні екстрацелюлярні біополімери на основі моно- і дисахаридів, з'єднаних з жирними кислотами, а також глікопротеїни. Продуцентами ПАВ є мікроорганізми *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Corinebacterium*, *Brevibacterium*, *Noocardia*, *Rhodococcus*, *Candida* sp. і т.д.

Мікробні ПАВ знаходять застосування в біотехнології завдяки здатності знижувати міжфазний натяг на границі розділу фаз вода-вуглеводні, емульгувати і солюбілізувати останні, змінювати властивості клітинної поверхні з гідрофобної на гідрофільну. Мікробні ПАВ можна використовувати як стабілізатори емульсій вуглеводнів або як деемульгатори (для руйнування емульсій нафти у воді або води в нафті, емульсії вуглеводнів, стабілізовані аніонними, катіонними і неіоногенними синтетичними ПАВ). Перспективи застосування мікробних ПАВ пов'язані з проблемами утилізації й окислювання мікроорганізмами вуглеводнів нафти:

- можуть бути використані як детергенти для очищення нафтоналивних ємностей, так як вони більш здатні до біодеградації, на відміну від синтетичних детергентів;
- для очищення нафтових забруднень на морях, у річках і ґрунтах, у відстійниках і очисних спорудах;
- для підвищення нафтовидобутку. Наприклад, диспергований у воді мікробний трегалозоліпід (0,1-1,0 г/л) при змішуванні з нафтоносним піском забезпечує практично повне виділення сирої нафти.

Масове застосування мікробних ПАВ для очищення морської води від нафтових забруднень, а також для збільшення віддачі нафтоносних шарів передбачає не тільки обробку відповідних об'єктів або територій культуральною рідиною відповідних мікроорганізмів-продуцентів ПАВ (отриманих у результаті заводських ферментаційних процесів і доставлених до місця застосування), але й введення мікроорганізмів безпосередньо в нафтові родовища або водні лагуни.

У таких випадках мова йде про життєдіяльність закріплених на поверхні твердих часток або рідкої плівки мікроорганізмів. Однак, виникає

проблема адаптації продуцентів і забезпечення умов, необхідних для їх розвитку і біосинтезу ПАВ у необхідних кількостях.

Для моделювання умов іммобілізації мікроорганізмів-продуцентів ПАВ, близьких до природних, у лабораторній практиці використовують адсорбційну іммобілізацію на глині, піску, активованому мулі, цеолітах, склотканині, скляних кільцях з нанесеною органічною гідрофобною фазою. Важливе значення мають розміри пор, величина питомої поверхні часток адсорбенту, а також природа поверхні носія, так як при іммобілізації необхідно одночасно забезпечити умови закріплення клітин мікроорганізмів на поверхні адсорбенту та створити такі умови, що не перешкоджають виходові мікробних ПАВ у навколишнє середовище.

Одержання ферментів. Залежно від області застосування до ферментів висувають різні вимоги: чистота, склад, джерело одержання. Для медичних цілей використовують, звичайно, високоочищені індивідуальні ферменти, а, наприклад, для переробки лігноцелюлозних відходів цілком придатні неочищені багатокомпонентні ферментні препарати.

Джерелами ферментів можуть бути мікроорганізми, тканини різних тварин, рослини. Найбільш доступним і практично необмеженим джерелом ферментів у промисловому масштабі є мікроорганізми, з яких можна виділити будь-які з відомих ферментів, створити умови для регуляції їх біосинтезу. Деякі ферментні препарати (целюлази, геміцелюлази, глюкозоізомераза) можуть бути отримані лише мікробіологічним синтезом.

Промислово важливими є такі позаклітинні ферменти: амілази, целюлази, геміцелюлази, пуллулази, декстраназа, пектинази, лактаза, ліпази, протеази. Внутрішньоклітинні ферменти (глюкозооксидазу, каталазу, аспарагіназу, пеніциллінацилазу, інвертазу, β -галактозидазу, глюкозоізомеразу), виділення яких вимагає руйнування клітинної стінки мікроорганізму-продуцента, одержувати за допомогою іммобілізованих мікроорганізмів недоцільно. Однак, іммобілізовані клітини мікроорганізмів, що синтезують ендоферменти широко застосовуються у біотехнології як своєрідні капсули-носії таких ферментів.

Іммобілізовані мікроорганізми були використані для одержання α -амілази. Для цього застосовували бактерії *Bacillus subtilis* і *B. arayloliuefaciens*.

Іммобілізацію клітин *Bacillus subtilis* здійснювали шляхом включення в 5 %-ний ПААГ (оптимальний вміст клітин у гелі складав 5 – 7,5 %). Біосинтез проводили в колоночному проточному реакторі, через який проходив розчинний субстрат (м'ясний екстракт і розчинний крохмаль). Активність глюкоамілази на виході з реактора складала до 15 000 од/мл і зберігалася на цьому рівні протягом 6–7 діб.

B. amyloliquefaciens іммобілізували адсорбцією на аніонообмінній смолі Амберліт ХЕ 352 з діаметром пор 7 мкм шляхом рециркуляції клітин через стовпчик з адсорбентом. Як субстрат використовували суміш дріжджового екстракту і розчинного крохмалю. Активність α -амілази

складала до 3000 тис. од/мл при швидкості розведення 2 – 4 год і не зменшувалася впродовж 10 діб.

За допомогою адсорбційних методів іммобілізували рекомбінантний штам *E.coli*, здатний до синтезу і секреції термостабільної α -амілази, що містить ген з *B.stearothermophilus*, який кодує синтез цього ферменту. Іммобілізація здійснювалася на пінополіуретані. Здатність до біосинтезу α -амілази штамом зберігалася незмінною протягом декількох діб (за температури 55 °C).

Одержання етанолу. Перспективи зростання виробництва етанолу зумовлюють широке використання іммобілізованих клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (та інших дріжджів-сахароміцетів), *Kluyveromyces fragile* та *K. Lactis*, (зброджують лактозу) та бактерій *Zyotomonas mobilis* (здатні приблизно в два рази швидше, ніж дріжджі, здійснювати процес ферментації).

Якщо для промислових процесів на основі вільних клітин дріжджів продуктивність по етанолу дорівнює 1-10 г/л·год і час повного зброджування близько 5-6 год при концентрації цукрів 5-10 %, то для іммобілізованих клітин дріжджів ці параметри становлять приблизно 50 г/л·год, 1 год і 15-30%, а для іммобілізованих бактерій продуктивність збільшується до 100 г/л·год, хоча концентрація цукрів не перевищує 15%. Продуктивність процесу може бути збільшена і до 150-200 г/л·год етанолу, однак при цьому не вдається досягти повної конверсії цукрів. Експлуатація біокаталізаторів на основі іммобілізованих клітин триває в ряді випадків до 12 міс.

Використання біореакторів із біоплівкою було досліджено для підвищення економічності та вдосконалення процесу виробництва етанолу. Іммобілізація мікробних клітин для бродіння була розроблена для усунення гальмування, обумовленого високою концентрацією субстрату і продукту, а також для підвищення продуктивності і прибутковості виробництва етанолу. Показано, що використання біореакторів із іммобілізованими клітинами *Zyotomonas mobilis* підвищили вихід етанолу удвічі.

Розроблено біореактори з іммобілізованими клітинами *Saccharomyces cerevisiae*, шляхом включення їх у Са-альгінатний гель. При порівнянні даного процесу з виробництвом етанолу за допомогою вільних клітин дріжджів показана можливість налагодження безперервного процесу виробництва етанолу у реакторі з іммобілізованими клітинами з набагато вищою концентрацією субстрату, ніж у звичайній технології виробництва. Так, в останній при концентрації глюкози 50 г/л вже спостерігалось сильне інгібування процесу; порівняно з технологією іммобілізованих клітин, коли інгібування не спостерігалось навіть при концентрації 150 г/л глюкози. Було відмічено підвищення виходу етанолу на 38 % (47 г/л) порівняно з звичайною технологією виробництва; споживання глюкози було на рівні 82-85 %, що є досить високим показником. Отже, кількість виробленого етанолу у реакторі з іммобілізованими клітинами збільшилась у 5 разів, а концентрація субстрату (глюкози) може бути безперешкодно збільшена удвічі – до 50 г/л, що не буде гальмувати процес.

Ще однією технологією виробництва спирту є коїмобілізація клітин *Saccharomyces diastaticus* та *Zymomonas mobilis*, при цьому субстратом служить крохмаль з маніоку. Імобілізацію клітин проводили у Са-альгінаті і вихід етанолу порівнювали з технологією, при якій використовували окремо імобілізовані культури *Saccharomyces diastaticus* та *Zymomonas mobilis* та вільні клітини змішаної культури. Для імобілізації змішаної культури клітин було перевірено різні концентрації клітин дріжджів та бактерій – 10 мг клітин на г гелю *Saccharomyces diastaticus* та 10 мг/г *Zymomonas mobilis*; 10 мг/г *Saccharomyces diastaticus* і 20 мг/г *Zymomonas mobilis*. Найвищий вихід етанолу спостерігався при використанні клітин у концентрації по 10 мг/г обох культур – 39,6 г/л. Результатом даної технології було те, що використання коїмобілізованих клітин дріжджів та бактерій підвищувало вихід етанолу ніж імобілізовані клітини *Saccharomyces diastaticus* окремо (46,7 г/л у порівнянні з 37,5 г/л). При повторному культивуванні коїмобілізованих клітин концентрація етанолу зросла до 53,5 г/л; гранули залишались стабільними протягом 7 послідовних використань. Протягом безперервної ферментації коїмобілізованих клітин у колонії реактора було отримано вихід етанолу на рівні 8,9 г/л на год.

Одержання біоетанолу можливо з використанням імобілізованих клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у кріогелі. Кріогель представляє собою 2-гідроксиетилцелюлозу, до якої додано триметиламоній хлорид, який виступає фотоініціатором. Для імобілізації культуру клітин у концентрації 10 % від загального об'єму суміші додавали до 2 %-ого водного розчину 2-гідроксиетилцелюлози при кімнатній температурі і перемішували. Потім суміш виливали у тефлонові посудини діаметром 2 см, при цьому утворювався шар товщиною 2,5 мм. Після цього посудини заморожували при -30 °С протягом 2 год. Наступним кроком було опромінення кріогелю УФ-світлом упродовж 2 хв з обох боків. Потім для активації клітин кріогель поміщали у качалочні колби з поживним середовищем та культивували при 30 °С протягом 20 год. Такі клітини у подальшому можна використовувати для ферментації.

Одним із останніх досліджень було отримання спирту з бурякової меляси за допомогою імобілізованих у Na-альгінатному гелі клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*. Дослідники перевірили вплив рН, розміру гранул та концентрації Na-альгінату на утворення спирту. Запропоновано для утворення етанолу з бурякової меляси використовувати гранули розміром 2,0-2,4 мм з концентрацією Na-альгінату 2,0 %, рН меляси має бути 3,9.

Одержання інших видів промислово цінної сировини. Гліцерин, n-бутанол, бутандіол, ізопропанол, ацетон можуть бути використані як промислова сировина, розчинники або паливо. Гліцерин отримують, використовуючи імобілізовані в Са-альгінаті дріжджі *S. cerevisiae* (запропонована можливість аеробного перетворення гліцерину в дигідроксиацетон імобілізованими в Са-альгінаті бактеріями *Gluconobacter oxydans*). N-бутанол і ацетон (у співвідношенні приблизно 5:1) отримують з цукрів за допомогою бактерій *Clostridium* sp. (*C. acetobutyricum*, *C.*

saccharobutyricum, *C. thermocellum* і деяких інших). N-бутанол і ізопропанол - при використанні *C. butyricum*; 2,3-бутандіол (і етанол) - *Clostridium* sp., *Bacillus* і *Aeromonas* sp.

У більшості випадків для іммобілізації цих мікроорганізмів застосовують методи включення в гелі альгінату або карагінану, для *A. hydrophila* як носій використаний гідроксид титану. Зазначені вище речовини знаходять застосування в якості добавок до бензину, при виробництві пластифікаторів, гідравлічних рідин, смол і пластмас, екстрактивних речовин і т.д. Також з n-бутанолу та 2,3-бутандіолу можна синтезувати бутадієновий каучук.

Також можливе отримання пропанолу, бутанолу, пентанолу і гексанолу, а також відповідних метилкетонів (пропану, бутану, пентану, гексану) за допомогою іммобілізованих в Са-альгінат метаноокислюючих мікроорганізмів *Methylococcus capsulatus* і *Metylosinus trichosporium*. В даний час найбільш розвинене виробництво n-бутанолу. Тим не менш ферментаційне виробництво (на основі вільних клітин) n-бутанолу скоротилося і переважає спосіб отримання його з дешевої, ніж крохмаль і м'яса, нафтохімічної сировини. Однак, безперечно, що з вичерпуванням запасів нафти увага знову буде звернена на можливість мікробіологічного синтезу з відновлюваної сировини.

Контрольні запитання

1. Які напрямки використання іммобілізованих клітин?
2. Які перспективи застосування іммобілізації для одержання мікробних поверхнево активних речовин?
3. Яке використання іммобілізованих клітин для одержання ферментів?
4. Які методи іммобілізації клітин використовують у процесі виробництва етанолу?
5. Які методи іммобілізації мікроорганізмів використовують при одержанні органічних розчинників?

ЗМІСТ

	Вступ	3
1.	Основні галузі застосування іммобілізованих ферментів.....	4
	Контрольні запитання.....	8
2.	Перспективи використання іммобілізованих клітин.....	8
	Контрольні запитання.....	10
3.	Методи іммобілізації ферментів.....	11
3.1	Фізичні методи іммобілізації	11
3.2	Хімічні методи іммобілізації	17
	Контрольні запитання.....	20
4.	Носії для іммобілізації ферментів. Вимоги до носіїв.....	20
	Контрольні запитання.....	24
5.	Активність іммобілізованих ферментів. Вплив іммобілізації на стабілізацію ферментів.....	24
5.1	Визначення активності іммобілізовано ферменту.....	24
5.2	Вплив різних факторів на ефективність адсорбційної іммобілізації ферментів.....	26
5.3	Способи підвищення стабільності іммобілізованих ферментів.....	27
	Контрольні запитання.....	29
6.	Кінетичні властивості іммобілізованих ферментів порівняно з розчинними ферментами.....	29
6.1	Кінетичні параметри ферментативних реакцій.....	29
6.2	Вплив іммобілізації на стан ферменту.....	30
6.3	Ефекти розподілу реагентів у каталізі іммобілізованими ферментами.....	31
6.4	Експериментальні критерії каталізу за участю іммобілізованих ферментів	32
	Контрольні запитання.....	36
7.	Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів.....	37
7.1	Адсорбція мікроорганізмів на нерозчинних носіях.....	38
7.2	Іммобілізація мікроорганізмів за допомогою біоспецифічної адсорбції.....	39
7.3	Методи ковалентної іммобілізації клітин на нерозчинних носіях.....	39
7.4	Методи штучної агломерації клітин мікроорганізмів.....	42
7.5	Іммобілізація клітин мікроорганізмів у масі носія	44
	Контрольні запитання.....	45
8.	Фізіологія іммобілізованих клітин порівняно з нативними.....	46
	Контрольні запитання.....	47
9.	Апаратурне оформлення процесів з іммобілізованими ферментами і клітинами.....	48
9.1	Одержання глюкозо-фруктозних сиропів.....	48
9.2	Розділення рацемічних сумішей амінокислот	48
9.3	Одержання L-аспарагінової кислоти.....	49
9.4	Одержання L-яблучної кислоти.....	50
9.5	Модифікація антибіотиків.....	51
9.6	Основні вимоги до апаратурного оформлення технологічних процесів.....	51
	Контрольні запитання.....	51
10.	Технологічні процеси з іммобілізованими клітинами.....	52
	Контрольні запитання.....	57
	Література.....	58

ЛІТЕРАТУРА

1. Березин И.В., Антонов В.К., Мартинек К. Имобилизованные ферменты. – М: Изд-во Моск. ун-та, Т.1. – 1976. – 242 с.
2. Биков В.А., Крилов И.А., Монако М.Н. Биотехнология. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М. Мир, 1987. – 143 с.
3. Биотехнология. Принципы и применение. / Под ред. И. Хиггинса, Д. Беста, Д. Джонса. – М: Мир, 1988. – 479 с.
4. Варфоломеев С.Д., К.Г. Гуревич. Биокинетика. Практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999 – С. 85 -100.
5. Введение в прикладную энзимологию / Под ред. И.В. Березина и К. Мартинека. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1982. – 382 с.
6. Дубровский В.С., Виестур Э.У. Метановое сбраживание сельскохозяйственных отходов. – Рига: Изв.АН Латв.ССР, 1988. – 303 с.
7. Звягинцев Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. – М.:Изд-во Моск. ун-та, 1973. – 143 с.
8. Имобилизованные клетки и ферменты. Методы./ Под ред. Д. Вудворта. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
9. Калюжный С.В., Пузанков А.Г., Варфоломеев С.Д. – Биогаз, проблемы и решения. – М.: Сер. Біотехнологія, 1988. – 176 с.
10. Синицин А.П., Райнина Е.И., Лозинський В.И. Имобилизованные клетки микроорганизмов. – М: Изд-во Моск. ун-та, 1994.– 288 с.
11. *Najafpour G.* Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae* // *Bioresource Technology*. – 2004. – V. 92. – P.251-260.

Навчальне видання

ІММОБІЛІЗОВАНІ ФЕРМЕНТИ І КЛІТИНИ В БІОТЕХНОЛОГІЇ

КОНСПЕКТ ЛЕКЦІЙ

для студентів спеціальності 8.05140101 «Промислова біотехнологія»
денної та заочної форм навчання

СХВАЛЕНО

на засіданні кафедри
біотехнології і мікробіології
як конспект лекцій
Протокол № 21
від 30.05.2011 р.

Укладачі: Грегірчак Наталія Миколаївна

Антонюк Марія Миколаївна

Видання подається в авторській редакції

Підп. до друку 12.07.11. Ум. друк. арк. 3,49. Наклад 40 пр.
Зам. № 150-11А

НУХТ. 01601 Київ-33, вул. Володимирська, 68
www.book.nuht.edu.ua

Свідоцтво про реєстрацію серія ДК № 1786 від 18.05.04 р.