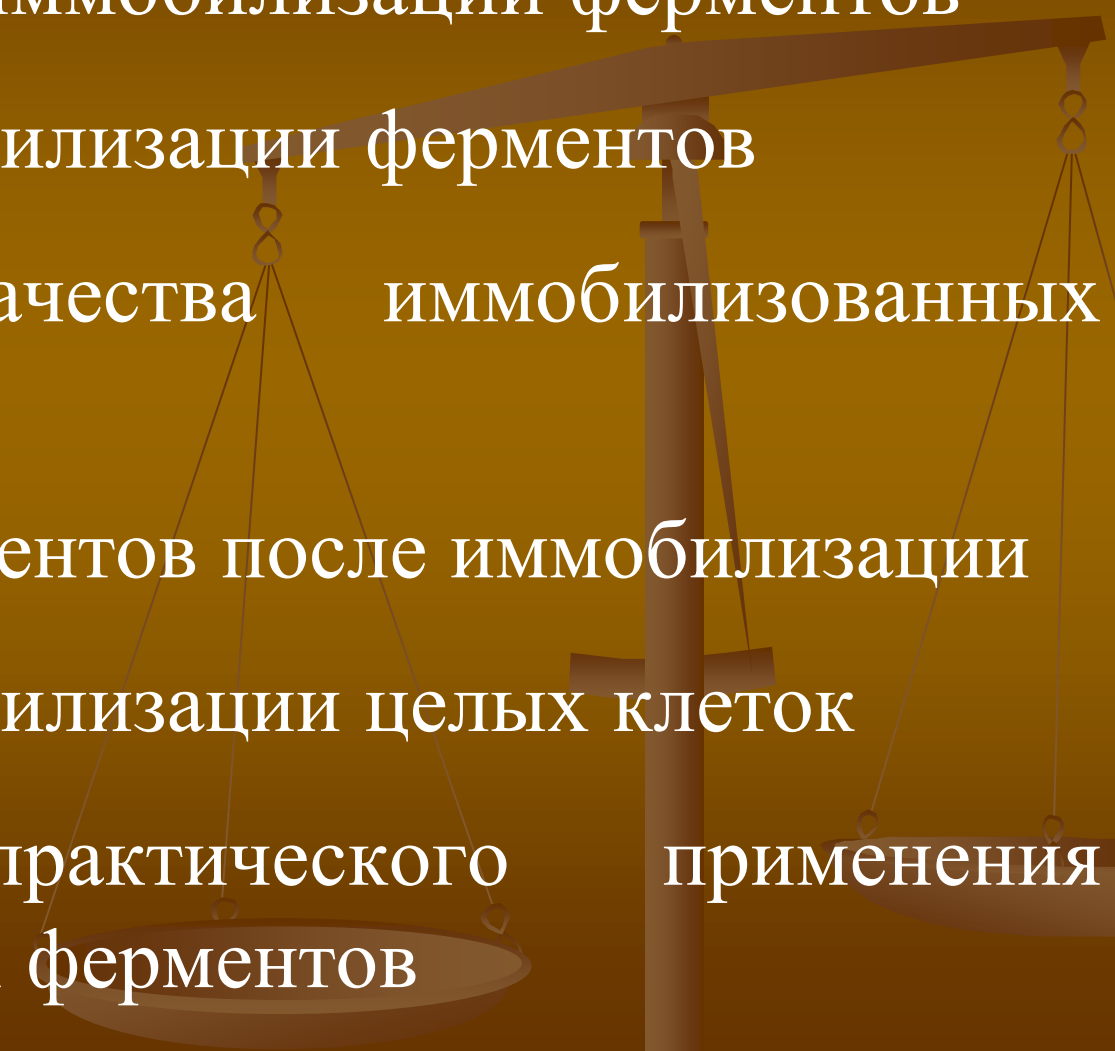


ЛЕКЦИЯ № 5

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ И ФЕРМЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология» (профиль «Генетика») при изучении дисциплины «Введение в биотехнологию»

1. Понятие об иммобилизованных ферментах
 2. Носители для иммобилизации ферментов
 3. Методы иммобилизации ферментов
 4. Оценка качества иммобилизованных ферментов
 5. Свойства ферментов после иммобилизации
 6. Методы иммобилизации целых клеток
 7. Сферы практического применения иммобилизованных ферментов
- 

1. ПОНЯТИЕ ОБ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТАХ

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ – система методов получения, очистки, стабилизации и применения ферментов.

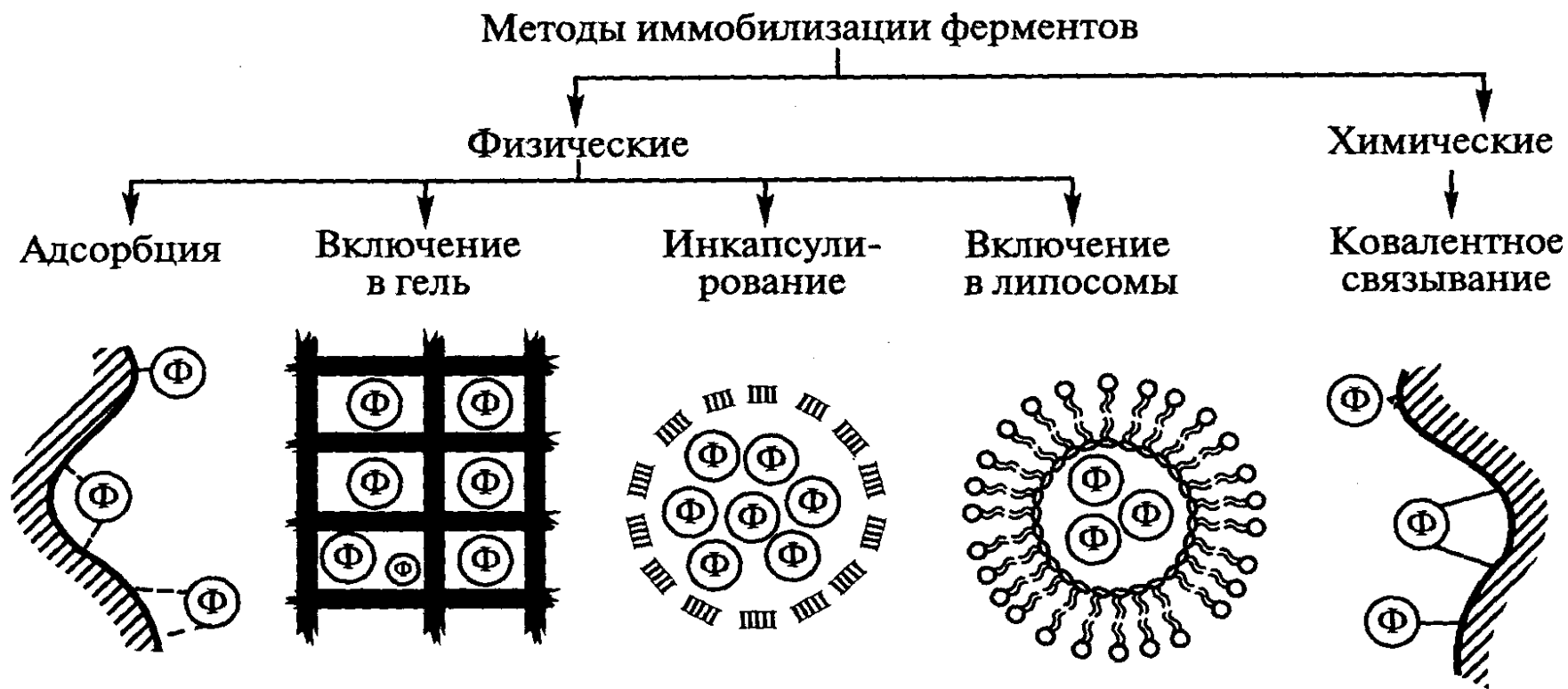
Основной задачей инженерной энзимологии является конструирование биоорганических катализаторов с заданными свойствами на основе ферментов или ферментных комплексов и разработка на их базе различных эффективных и экологически чистых биотехнологических процессов.

ПРЕИМУЩЕСТВА ГЕТЕРОГЕННЫХ КАТАЛИЗАТОРОВ


- ✓ Легко отделяются от реакционной среды, что обеспечивает возможность их многократного использования и получения целевых продуктов, незагрязненных ферментами.
- ✓ Позволяют вести процесс непрерывно, что с технологической и экономической точки зрения выгоднее, чем проведение периодического процесса.
- ✓ Носитель может оказывать сильное влияние на стабильность и активность фермента.
- ✓ Образование дополнительных связей белок – носитель позволяет направленно влиять на химическое окружение белковой молекулы и в определенных пределах изменять кинетические характеристики ферментативной реакции, в результате иммобилизованные ферменты становятся более защищенными, что позволяет проводить химические реакции с участием ферментов в органических растворителях.

1. ПОНЯТИЕ ОБ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТАХ

ИММОБИЛИЗАЦИЯ – ограничение подвижности молекул ферментов, их конформационных построек, основанное на физико-химических принципах, позволяющих закрепить структуру фермента так, чтобы активный центр его молекулы сохранял свою работоспособность (каталитическую активность) в течение длительного времени, не подвергаясь структурным изменениям, приводящим к нарушению его конфигурации.



ТРЕБОВАНИЯ К НОСИТЕЛЯМ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

- ✓ Нерастворимость
 - ✓ Химическая стойкость
 - ✓ Устойчивость к биологическому разрушению
 - ✓ Высокая емкость по ферменту
 - ✓ Высокая проницаемость для субстрата и продуктов реакции (создание минимальных диффузионных затруднений для достижения субстратом активного центра фермента)
 - ✓ Механическая прочность в условиях гидродинамических потоков, обеспечивающих транспорт субстратов и продуктов
 - ✓ Обеспечение возможности протекания раствора субстрата через слой биокатализатора. Это свидетельствует о том, что носитель может быть легко превращен в гранулы и другие частицы, одинаковые по форме и размерам
 - ✓ Наличие химически активных групп, обеспечивающих химическое связывание (хемосорбцию) фермента с поверхностью носителя
- 

КЛАССИФИКАЦИЯ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

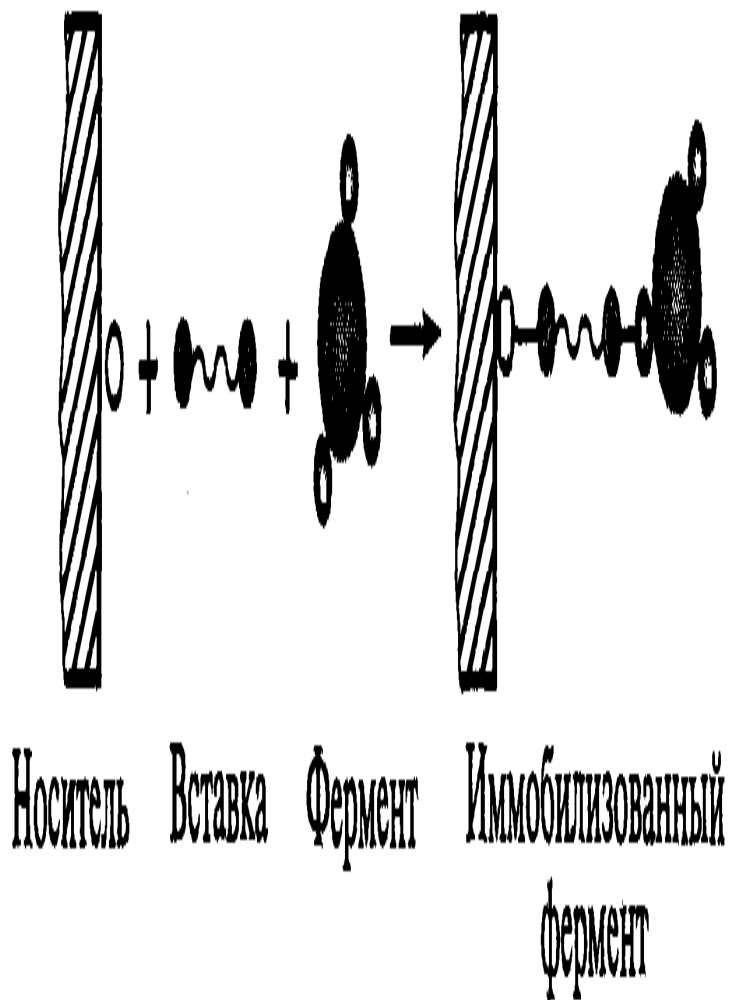
I. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ НОСИТЕЛИ: материалы из стекла, глины, керамики, графитовой сажи, силикагеля, оксиды металлов

II. ОРГАНИЧЕСКИЕ НОСИТЕЛИ:

✓ **природные носители:** белковые, полисахаридные, липидные носители

✓ **синтетические носители:** полиамидные, полиэфирные, полиметиленовые, полиуретановые, поливиниловые носители

ХИМИЧЕСКАЯ ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ



При ковалентной иммобилизации молекула фермента обволакивается макромолекулой полимера в результате образования между ними 6–10 ковалентных связей. Такое многоточечное взаимодействие фермента с носителем делает его конформацию более жесткой и менее подвижной. Фермент оказывается заключенным в полимерную оболочку, имеющую вид петель и достаточно хорошо проницаемую для высокомолекулярных субстратов («открытые» макромолекулярные капсулы).

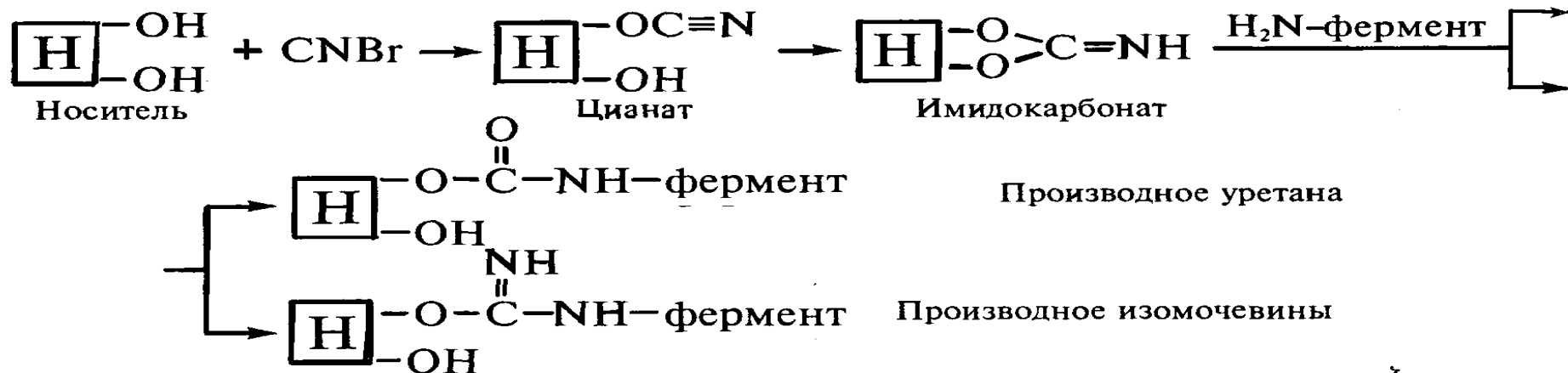
Преимущества метода: водорастворимые полимерные производные ферментов характеризуются повышенной стабильностью по отношению к нагреванию и тканевым ингибиторам, увеличенным временем циркуляции в кровотоке, что обуславливает пролонгирование их действия в организме, оказывает менее выраженное побочное действие по сравнению с нативными ферментами, снижением антигенных, иммуногенных и аллергических свойств.

Недостатки метода: существенное увеличение стоимости ферментного катализатора.

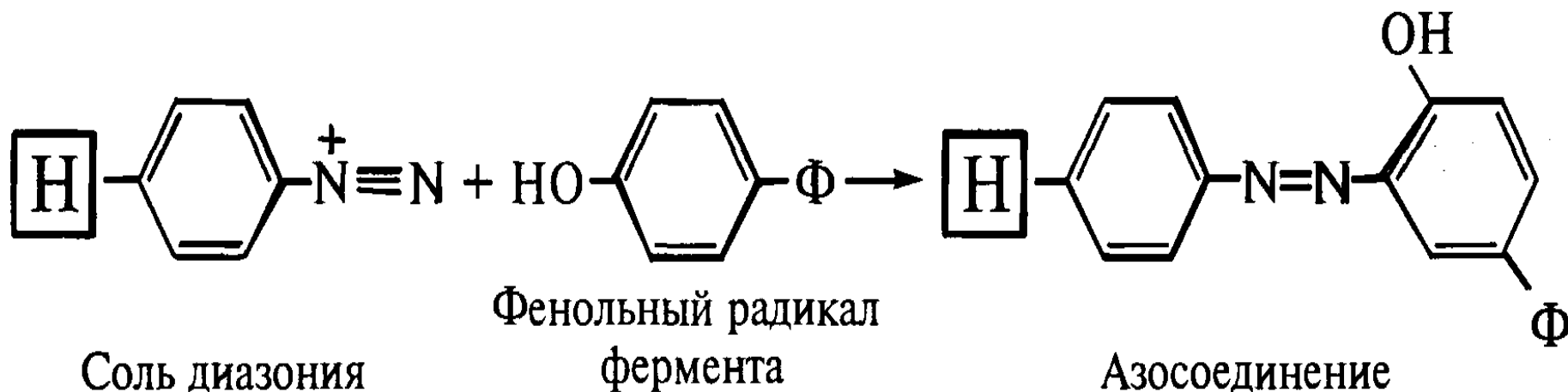
3. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ХИМИЧЕСКОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ

I. Иммуобилизация ферментов на носителях, обладающих гидроксигруппами (бромциановый метод)



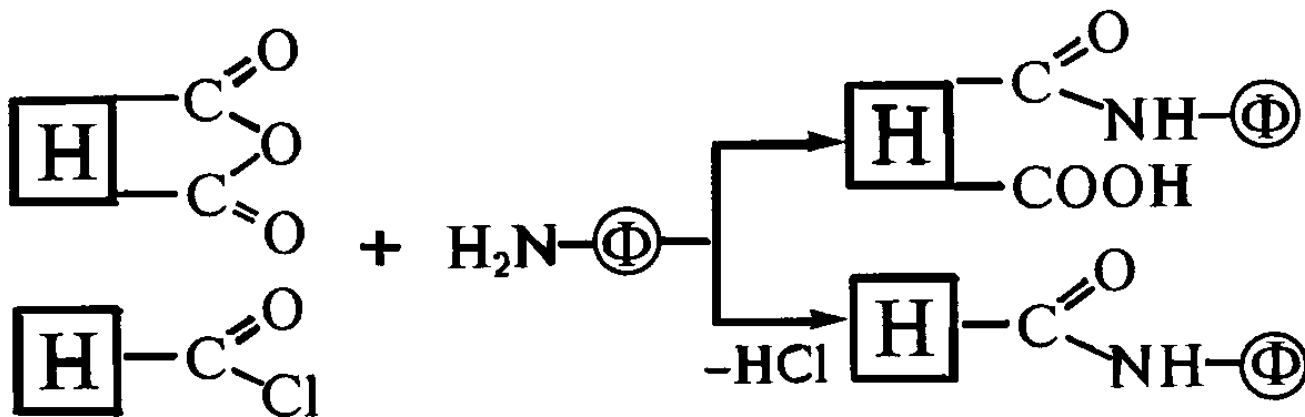
II. Иммуобилизация ферментов на носителях, обладающих аминогруппами (реакции азосочетания)



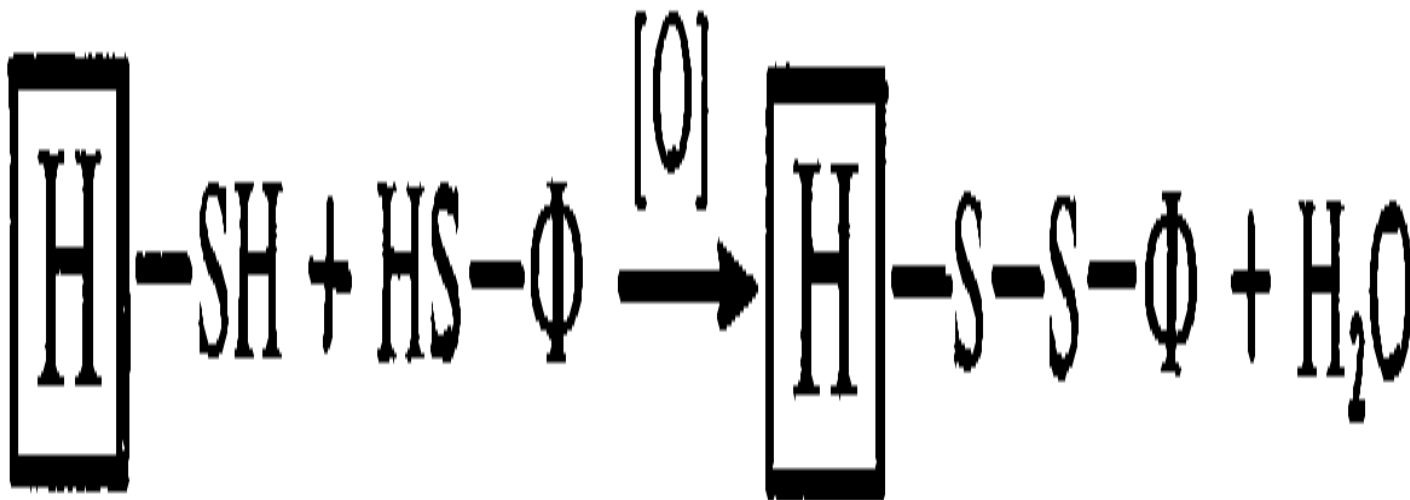
3. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ХИМИЧЕСКОЙ ИММОБИЛИЗАЦИИ

III. Иммуобилизация ферментов на носителях, обладающих активированными производными карбоксильной группы



IV. Иммуобилизация ферментов на носителях, обладающих сульфгидрильными группами



ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ МЕТОДОМ АДСОРБЦИИ

Простейший и наиболее старый способ иммобилизации состоит в **адсорбции фермента на носителе** неорганической (силикагель, окись алюминия, активированный уголь и т.п.) или органической (иониты, полисахариды и т.п.) природы.

Процедура иммобилизации ферментов методом адсорбции состоит в смешивании в определенных условиях фермента с носителем и инкубации полученной смеси. Затем при помощи фильтрования и центрифугирования проводят отделение нерастворимого компонента смеси от растворимого.

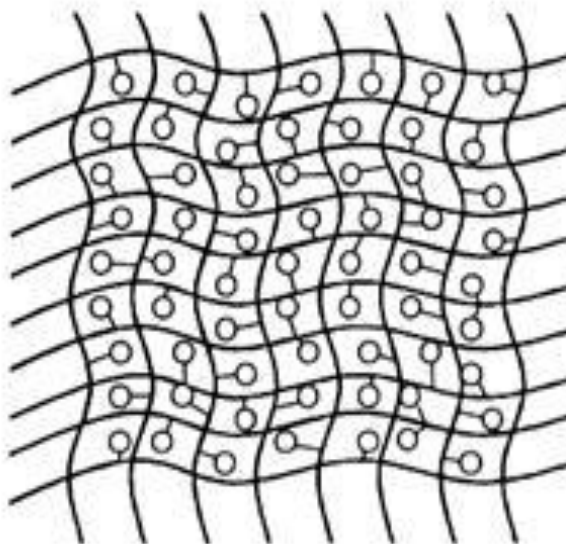
Преимущества метода: адсорбция – мягкий метод иммобилизации, при котором влияние носителя на активность фермента минимально.

Для **иммобилизации без химической сшивки** характерно слабое влияние носителя на свойства биокатализатора. Ферменты сохраняют свою природную активность, а клетки – жизнеспособность. В то же время, непрочный характер связи носителя с ферментом ведет к их десорбции, снижающей надежность метода. Это связано с тем, что сорбция обратима, она зависит от значения рН и ионной силы раствора, температуры, удельной поверхности и пористости носителя, концентрации субстрата и т.д. Еще одним недостатком данного способа является значительная неспецифическая сорбция посторонних веществ.

Относительно более прочными являются **ионные взаимодействия**, при которых адсорбция поддерживается при определенных значениях рН и ионной силы омывающего раствора.

3. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТЕМ ВКЛЮЧЕНИЯ В СТРУКТУРУ ГЕЛЯ



Иммобилизация ферментов путем включения в структуру гелей заключается в том, что фермент вводят в раствор мономера и подходящего сшивающего реагента, проводят полимеризацию, в результате образуется трехмерная сетка геля, в ячейках которой «застревают» крупные молекулы фермента.

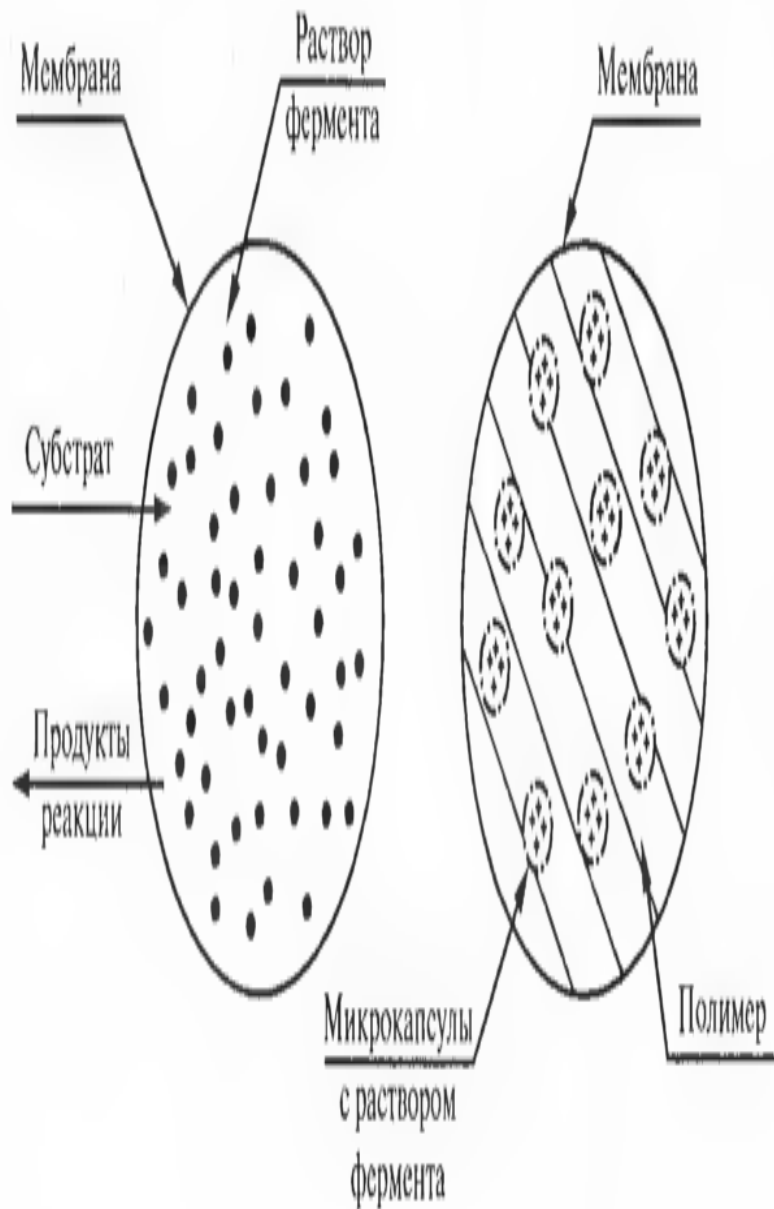
Сущность метода заключается в следующем: фермент вводят в раствор акриламида и сшивающего реагента бис-акриламида, добавляют инициатор полимеризации (тиосульфат аммония) и получают гель с иммобилизованным ферментом, который обычно используют в виде гранул. Полимеризацию можно проводить и без инициатора полимеризации под действием γ -излучения.

Преимущества метода: равномерное распределение фермента в объеме носителя; большинство гелевых матриц обладает высокой механической, химической, термической и биологической стабильностью и обеспечивает возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру. При таком способе иммобилизации фермент практически ни к чему не прикреплен, потому никаких стерических помех не испытывает; активный центр не блокирован; фермент надежно защищен от действия бактерий.

Недостатки метода:

затрудненность диффузии субстрата в гель, невозможность использовать высокомолекулярные субстраты, серьезная проблема накопления больших количеств полимера в организме животных и человека при введении таких структур в кровяное русло, а также фермент может вымываться из геля.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ ПУТЕМ МИКРОКАПСУЛИРОВАНИЯ



Микрокапсулирование ферментов состоит во включении их водных растворов в полупроницаемые мембраны, не проницаемых для ВМС и клеток, но через которые могут проникать низкомолекулярные вещества. Наличие ультратонкой мембраны позволяет создать высокие концентрации ферментов в малом объеме раствора, находящегося в микрокапсуле, и сохранить стабильность и биологическую активность инкапсулированных ферментов.

К достоинствам микрокапсулирования относятся: простота, универсальность и возможность многократного применения фермента. Кроме того, данным методом могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но мультиэнзимные комплексы, целые клетки и отдельные фрагменты клеток.

К недостаткам микрокапсулирования относится невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

Методы микрокапсулирования ферментов:

- ✓ **Физические (механические) методы:** дражирование, распыление, диспергирование, напыление в псевдооживленном слое
- ✓ **Физико-химические методы:** простая и сложная коацервация
- ✓ **Химические методы:** реакции полимеризации и поликонденсации

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В СТРУКТУРЕ ВОЛОКОН

Способ иммобилизации фермента в волокна заключается в том, что водный раствор фермента, заэмульгированный в органическом растворе волокнообразующего полимера (полихлорвинила или триацетата целлюлозы), продавливают через фильтры в жидкость, вызывающую коагуляцию полимера (толуол). При этом образуются полимерные, волокнистые, пористые нити, содержащие капли водного раствора фермента.

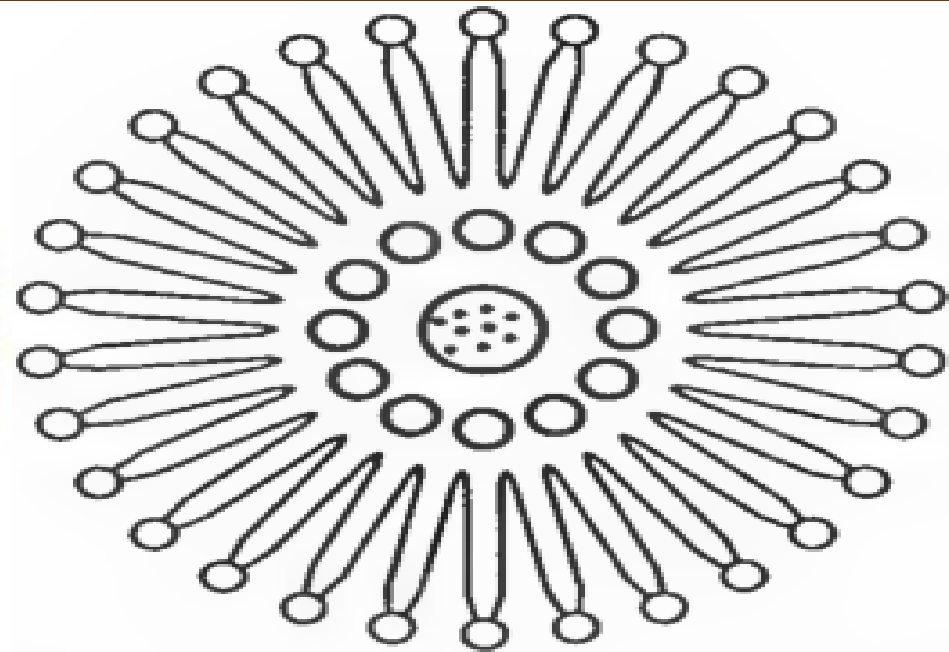
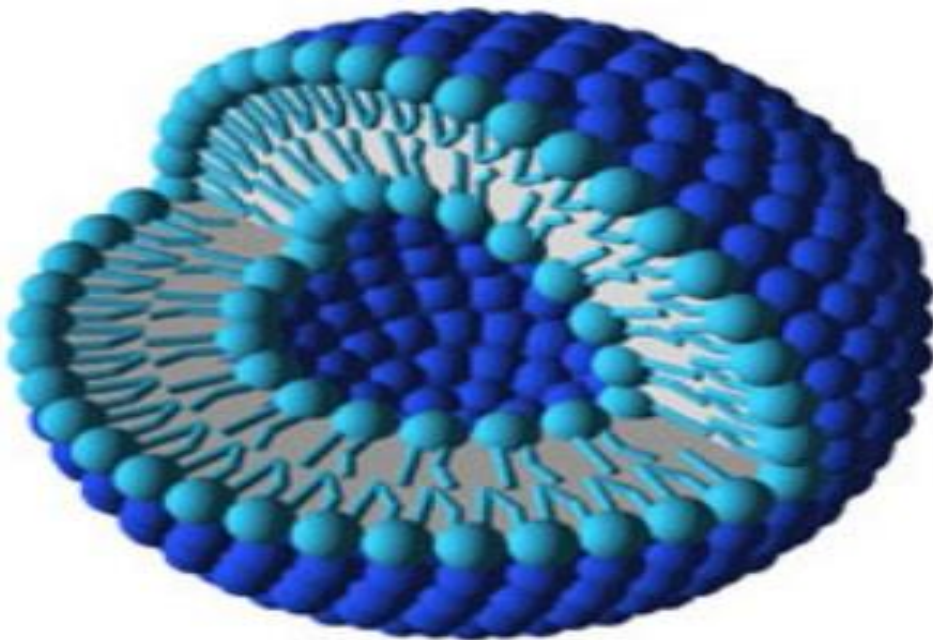
Фермент, включенный в волокно, может существовать в растворе, находясь непосредственно в окружении самого волокна — **обычные волокна** или в ограниченной его части (полый области) — **полые волокна**.

Преимущества и недостатки метода: такие структуры характеризуются высокой механической прочностью и могут использоваться для изготовления тканей, обладающих ферментативной активностью, применяющихся при лечении ожогов, раневых поверхностей и др.

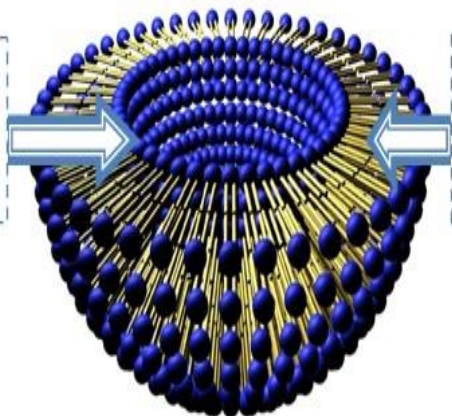
На кинетические характеристики фермента, заключенного в волокна, оказывают влияние диффузионные барьеры для субстрата и продукта реакции, поэтому уровень активности фермента, включенного в волокна, ниже, чем в нативном состоянии. С другой стороны, стабильность фермента, заключенного в волокно, выше, чем фермента в растворе.

3. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ В СТРУКТУРЕ ЛИПОСОМ



Водорастворимые биологически активные вещества и вода



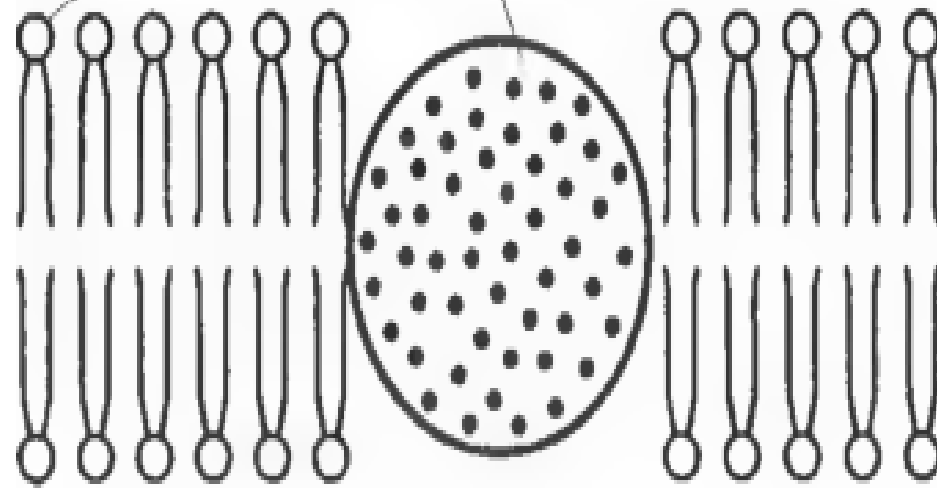
Жирорастворимые биологически активные вещества (витамины, масла и т.д.)

Включаются во внутренний объем

Включаются в межмембранное пространство

Липиды

Фермент



3. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

ЛИПОСОМЫ – искусственно полученные, замкнутые, сферические частицы, образованные бимолекулярными липидными слоями, чаще всего фосфолипидами, в пространстве, между которыми содержится среда формирования.

Структура липосом напоминает клеточную мембрану, поэтому они являются физиологическим материалом, который организм может легко утилизировать; они легко проникают через разные физиологические барьеры и усиливают процесс адсорбции лекарственных препаратов в организме, заключенные внутри липосом. Такие лекарственные препараты не диффундируют, поэтому при их введении не наблюдается иммунных и других системных реакций организма. Распадаются липосомы естественным путем, высвобождая заключенное в них лекарственное средство.

Впервые способ иммобилизации ферментов путем их включения в структуру липосом был применен Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 г.

Методы включения ферментов в структуру липосом:

1. Приготовление липосом методом ручного встряхивания
2. Приготовление липосом методом впрыскивания
3. Приготовление липосом методом выпаривания и обращения фаз

ПРИМЕРЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ФЕРМЕНТОВ РАЗНЫМИ СПОСОБАМИ

Адсорбция или ионный обмен	Каталаза, Рибонуклеаза, α -Глюкозидаза, Пепсин, Трипсин, Аспарагиназа
Включение в гель	Лактатдегидрогеназа, Глюкооксидаза, Пероксидаза, Гексакиназа, Рибонуклеаза, Холинэстераза, Щелочная фосфатаза, Кислая фосфатаза, α -Амилаза, Трипсин, Альдолаза
Поперечная «сшивка» с носителем	Лактатдегидрогеназа, Глюкооксидаза, Пероксидаза, Рибонуклеаза, Дезоксирибонуклеаза, Трипсин, Аденозинтрифосфатаза, Альдолаза
Прикрепление к носителю ковалентной связью (азидный метод)	Рибонуклеаза, Холинэстераза, Дезоксирибонуклеаза, Инвертаза, Трипсин, Аспарагиназа, Аденозинтрифосфатаза
Карбидный метод	Глюкозооксидаза, Пероксидаза, Рибонуклеаза, Щелочная фосфатаза, Дезоксирибонуклеаза, Трипсин
Бромциан-метод	Аспарагиназа, Ацетилхолинэстераза, Холинэстераза, Аспарагиназа
Метод диазотирования	Глюкооксидаза, Каталаза, Пероксидаза, Рибонуклеаза, Щелочная фосфатаза, α -Амилаза, Трипсин
Изотиоцианатный метод	α -Амилаза, Трипсин

4. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

При оценке метода иммобилизации обычно учитывают три характеристики биокатализатора:

- ✓ **ПОТЕРЯ АКТИВНОСТИ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ:** необходимо учитывать, что иммобилизация – это в некоторой степени «насилие» над ферментом, особенно, когда при иммобилизации применяют химические реагенты, экстремальные для фермента значения рН и температуры, поэтому сразу после иммобилизации суммарная активность фермента ниже, чем до нее.
- ✓ **СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТА ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ,** т.е. способность противостоять деградации в процессе последующей обработки и хранения. Наиболее надежно проверить образцы биокатализаторов при длительной работе, но на практике чаще всего применяют ускоренные методы старения и оценки стабильности.
- ✓ **АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ** зависит не только от потери активности, но также и от того, насколько активен был исходный фермент, т.е. на сколько хорошо и много удалось «включить» фермента в биокатализатор.

Разные оценки качества биокатализатора часто бывают противоречивыми, поэтому выбирать приходится на основе экономического сравнения – сколько продукта и с какой производительностью может «дать» тот или иной биокатализатор с учетом стоимости его получения.

1. СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРОЦЕССА

2. КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

3. СТАБИЛЬНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ



6. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ ЦЕЛЫХ КЛЕТОК

Непревзойденным «мастером» иммобилизации является целая клетка.

Ферменты, связанные в клетке естественным путем, без труда превосходят все искусственно иммобилизованные ферменты по активности и стабильности:

- ✓ Последовательное «включение» ферментных реакций в мультиферментных системах или регенерация коферментов не представляет для клетки никаких трудностей.
- ✓ Каждый фермент имеет в клетке оптимальную среду.
- ✓ Иммобилизованные клетки более предпочтительны, т.к. отсутствует трудоемкая и дорогостоящая стадия выделения и очистки ферментов.
- ✓ При иммобилизации клетки сохраняют основной набор биохимических систем, в частности системы регенерации кофакторов, это обеспечивает возможность проведения многоступенчатых ферментативных процессов, что позволяет реализовать сложные многостадийные синтезы с участием большого числа ферментов.

Иммобилизуются как живые, так и мертвые клетки. Однако в случае мертвых клеток ферменты должны быть еще активными.

В производстве чаще всего используют покоящиеся клетки. Растущие клетки нарушают структуру носителя, а образующиеся при делении дочерние клетки, покидая носитель, загрязняют целевой продукт. Для подавления роста иммобилизованных клеток растений используют дефицит фитогормонов, а рост клеток бактерий тормозят добавлением антибиотиков.

Методы иммобилизации клеток:

- ✓ Иммобилизация за счет физической сорбции на поверхности носителя
- ✓ Химическая иммобилизация за счет образования ковалентных связей между носителем и компонентами клеток
- ✓ Включение в природные и синтетические гидрогели

СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК

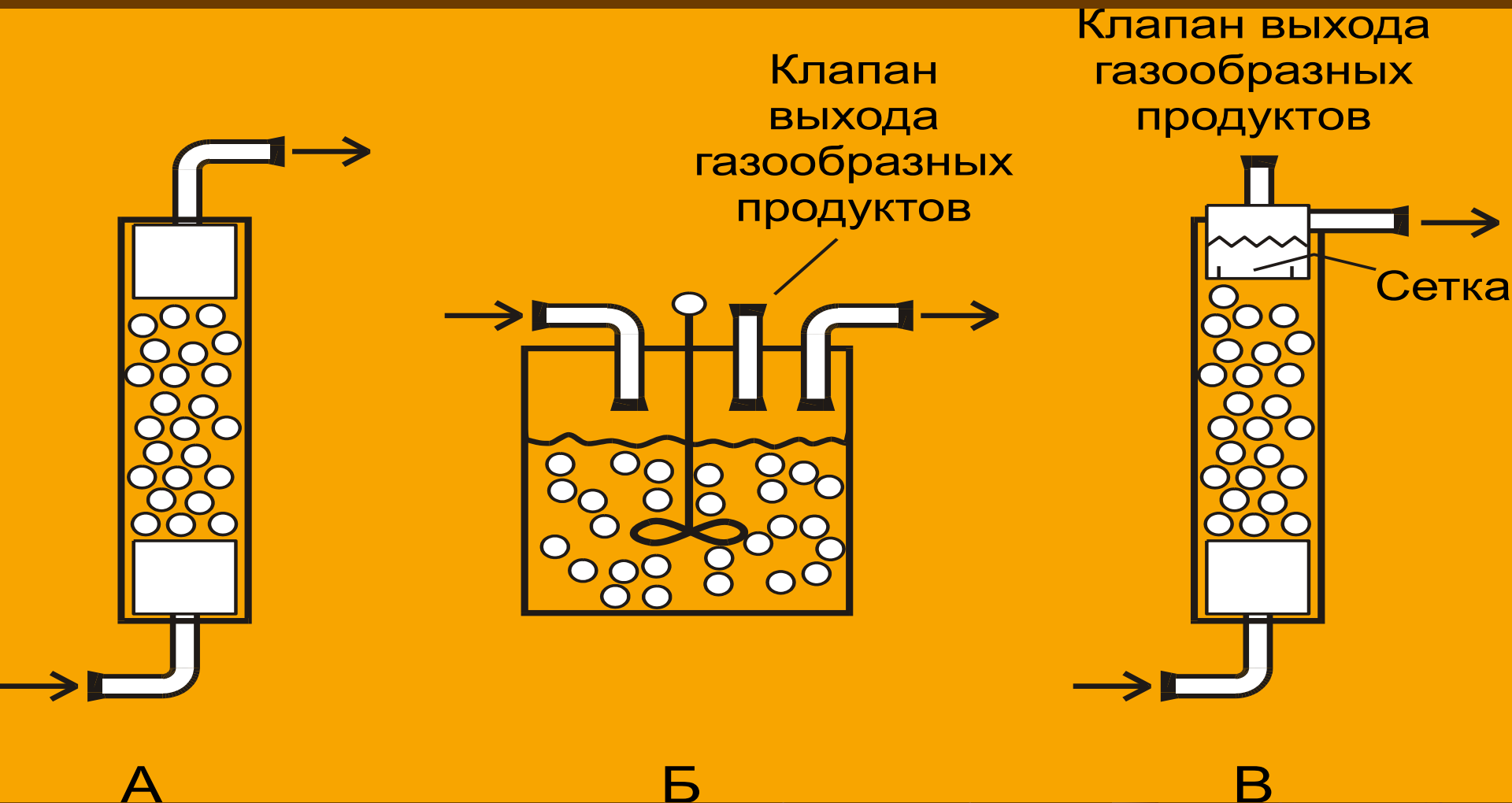
- ✓ Получение различных органических соединений путем трансформации или биосинтеза
- ✓ Пивоварение и виноделие
- ✓ Очистка сточных и природных вод от загрязнителей
- ✓ Извлечение металлов из сточных вод
- ✓ Ассимиляция солнечной энергии
- ✓ Изготовление водородных топливных элементов
- ✓ Азотфиксация
- ✓ В аналитических целях при изготовлении электродов



ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В ПРОИЗВОДСТВЕ

Иммобилизованный фермент	Объемы выпуска, т/г	Получаемый продукт	Страна
Аминоацилаза	менее 5	L-аминокислоты	Япония
Аминоглюкозидаза	1	Глюкоза	Англия
Глюкозоизомераза	1500 – 1750	Глюкозо-фруктозные сиропы	Дания, Нидерланды, Япония
Гидантоиназа	менее 1	D-фенилглицин-	Япония
Лактаза	5	Лактозные гидролизаты	Япония
Нитрилаза	0,1	Акриламид	Япония
Пенициллин-G-ацилаза	3 – 4	6-аминопенициллановая кислота	Япония, Нидерланды
Пенициллин-V-ацилаза	1	6-аминопенициллановая кислота	Англия, Австрия

ТИПЫ БИОРЕАКТОРОВ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ КАТАЛИЗАТОРАМИ



А – Биореактор колоночного типа

Б – Биореактор с перемешиванием

В – Модифицированный биореактор колоночного типа

СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

1. Имобилизованные ферменты как лекарственные препараты:

- а) Ферменты коррекции пищеварения (липазы, протеазы)
- б) Ферменты для наружного применения (протеазы)
- в) Тромболитические ферменты (стафилокиназа, стрептокиназа)
- г) Ферменты противоопухолевой терапии (лизиноксидаза, аспарагиназа)

2. Использование иммобилизованных ферментов при производстве полусинтетических β -лактамных антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины)

3. Получение аминокислот и разделение рацемических смесей аминокислот с помощью иммобилизованных ферментов (L-аспарагиновая кислота, L-аланин, L-метионин, L-фенилаланин, L-валин и др.)

4. Иммобилизованные ферменты в лечебном питании (для получения глюкозы из крахмала, для получения глюкозо-фруктозного сиропа, для улучшения качества молока путем удаления из него лактозы и т.п.)

5. Иммобилизованные ферменты в аналитической практике (ферментативный анализ метаболитов, анализ с применением биосенсоров, иммуноферментный анализ, анализ нуклеиновых кислот с применением полимеразной цепной реакции, биолюминесцентный анализ)

СХЕМА БИОСЕНСОРА



СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

6. Имобилизованные ферменты как биокатализаторы: альтернативные процессы получения химических соединений, в том числе крупнотоннажных продуктов тяжелого органического синтеза (продукты прямого селективного окисления предельных и непредельных углеводородов в ценные оксипродукты – хиральные эпоксиды, спирты, метилкетоны и дикарбоновые кислоты) и гибридные процессы, в которых одной из ключевых стадий является биохимическая конверсия субстрата, а также модернизации традиционных химических производств введением в производственный процесс биокаталитической стадии с участием ферментов или бактериальных клеток.

7. Применение иммобилизованных ферментов в органическом синтезе: получение L-яблочной кислоты, L-аспарагиновой кислоты, L-триптофана, тирозина, фенилаланина, эфиров аминокислот, окиси пропилена, аналогов антибиотиков пенициллинового и цефалоспоринового ряда, простагландинов, тромбоксанов, простациклина, органических кислот и др.

СФЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

8. Ферментные системы: создание ферментных систем, когда на одном и том же носителе, в непосредственной близости друг от друга, иммобилизуется два или большее количество ферментов, работающих последовательно. При этом можно добиться того, чтобы активные центры ферментов были определенным образом ориентированы друг относительно друга и таким путем удастся значительно повысить эффективность их работы.

9. Биокаталитические методы защиты окружающей среды: проблема охраны окружающей среды решается в двух направлениях – создание новых технологических процессов с минимальным уровнем отходов ксенобиотиков (химических соединений, нарушающих равновесие процессов в природе и вызывающих гибель живых организмов) и разработка высокоэффективных процессов деструкции ксенобиотиков с образованием продуктов, не токсичных для среды обитания.