

## Занятие семинарского типа № 9

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Имобилизованные биологические объекты в биотехнологическом производстве антибиотиков

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Понятие об иммобилизованных ферментах

В основе современной инженерной энзимологии лежит применение иммобилизованных ферментов и ферментных систем.

Ферменты представляют собой катализаторы биологического происхождения. К наиболее значимым свойствам ферментов относятся высокая активность и специфичность (селективность) их действия.

При этом живые организмы содержат сотни и тысячи ферментов, основная функция которых заключается в регуляции практически всех химических реакций, определяющих жизнедеятельность организма. К таким химическим реакциям, катализируемым ферментами, относятся: окисление и восстановление, перенос функциональных групп от одних молекул на другие, гидролиз, реакции с участием двойных связей, изомеризация, синтез сложных соединений и т.п.

В настоящее время получены данные, что в природе обнаружено свыше 3000 различных специфических ферментов. Однако, технологическое применение ферментов связано с рядом ограничений, обусловленных следующими причинами:

1. большие трудозатраты на отделение ферментов от исходных агентов (при этом, как правило, ферменты используются однократно);
2. высокая лабильность ферментов;
3. значительная трудоемкость и сложность процедуры выделения и очистки ферментов, определяющие высокую стоимость их производства.

Сравнительно недавно (всего несколько десятков лет назад) четко определились основные пути преодоления указанных трудностей. Они, прежде всего, связаны с получением иммобилизованных ферментов и иммобилизованных целых клеток микроорганизмов, растений и животных.

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

Иммобилизация обеспечивает возможность многократного продолжительного использования биообъекта (фермента, мультиэнзимных комплек-

сов, целых клеток). В этой связи, иммобилизация ферментов представляет собой их перевод в нерастворимое состояние с частичным или полным сохранением каталитической активности.

К основным преимуществам иммобилизованных биообъектов относятся:

1. многократность использования ферментов и клеток в наиболее продуктивной фазе их развития;
2. снижение количества отходов производства;
3. повышение качества целевого продукта;
4. упрощается схема выделения и очистки целевого продукта;
5. биотехнологический процесс становится более стандартным и прогнозируемым;
6. повышение стабильности к воздействию факторов внешней среды.

Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют следующие методы:

1. Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы.
2. Захват фермента в структуру геля или полимера.
3. Ковалентная сшивка (сшивание) молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункционального реагента.
4. Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях.
5. Микрокапсулирование ферментов.

Иммобилизация биообъектов, как правило, приводит к совершенствованию технологических процессов. В частности, в результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества, свойственные гетерогенным катализаторам – их можно легко удалять из реакционной смеси (отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) путем фильтрации. Кроме того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов в непрерывный режим, используя колонны или проточные аппараты с иммобилизованными ферментами.

## **2. Носители для иммобилизации ферментов**

Для получения иммобилизованных ферментов используют большое количество носителей органической и неорганической природы.

Основные требования, предъявляемые к носителям, которые могут использоваться для иммобилизации ферментов:

- ✓ высокая химическая и биологическая стабильность;
- ✓ высокая механическая прочность;
- ✓ достаточная проницаемость для субстратов и продуктов реакции;
- ✓ большая удельная поверхность, высокая пористость;
- ✓ возможность придания необходимой физической формы (гранул, трубок, листов и т.п.);

- ✓ легкая активация (переведение в реакционноспособную форму);
- ✓ высокая гидрофильность, позволяющая проводить реакции связывания с ферментом в водной среде;
- ✓ доступность;
- ✓ экономичность.

Отсутствие в природе универсальных носителей, обладающих всеми перечисленными свойствами, обуславливает широкий ассортимент материалов, применяемых для иммобилизации ферментов.

### **Характеристика для иммобилизации ферментов**

**Органические полимерные носители**, используемые в настоящее время, можно разделить на две группы: природные и синтетические полимерные носители.

При этом природные синтетические носители, в свою очередь, подразделяется на три подгруппы в соответствии с их биохимической классификацией:

- ✓ полисахаридные носители;
- ✓ белковые носители;
- ✓ липидные носители.

Синтетические полимерные носители также могут быть классифицированы на несколько групп: полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные и т.п.

Кроме выше указанных требований, к рассматриваемым носителям предъявляются и дополнительные требования, обусловленные методом иммобилизации, свойствами иммобилизуемого фермента, а также способом дальнейшего использования получаемого ферментного препарата:

- ✓ при ковалентной иммобилизации носитель должен связываться только с теми функциональными группами на молекуле фермента, которые не ответственны за осуществление катализа;
- ✓ носители для иммобилизации не должны оказывать ингибирующее воздействие на фермент.

Применение природных полимеров в качестве носителей обуславливается их доступностью, наличием свободных функциональных групп, легко вступающих в разнообразные химические реакции, а также их высокой гидрофильностью.

При этом к недостаткам природных носителей как матриц для иммобилизации ферментов относятся: неустойчивость к воздействию посторонней микрофлоры и относительно высокая стоимость большинства из них.

Полисахариды. Наиболее часто для иммобилизации ферментов используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные.

Целлюлоза отличается высокой степенью гидрофильности и наличием большого числа гидроксильных групп, что обуславливает легкость ее модификации путем введения различных заместителей. Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют, что делает ее относительно экономичным и удобным носителем для иммобилизации различных ферментов.

Гранулированная целлюлоза легко превращается в различные ионообменные производные. Однако, она неустойчива к воздействию сильных кислот, щелочей и некоторых окислителей, что ограничивает области ее практического применения.

Хитин представляет собой природный аминополисахарид, некоторым образом сходный с целлюлозой. Хитин является компонентом наружного скелета ракообразных и насекомых, а также он входит в состав оболочек некоторых грибов. При этом, являясь отходом промышленной переработки креветок и крабов, данное химическое соединение имеется в достаточном количестве и одновременно отличается низкой стоимостью.

Хитин обладает пористой структурой, не растворяется в воде, разбавленных кислотах и щелочах, а также в органических растворителях. В результате обработки щелочами хитин превращается в хитозан, который очень эффективен в качестве носителя. В связи с тем, что препараты иммобилизованных ферментов, приготовленные с использованием хитозана, обладают высокой каталитической активностью и устойчивы к микробной контаминации.

Декстран представляет собой разветвленный полисахарид бактериального происхождения, содержащий остатки глюкозы. Гели, приготовленные на его основе, выпускаются различными зарубежными фирмами и широко используются для иммобилизации биообъектов (ферментов, мультиферментных систем, целых клеток). Некоторые из них известны под названием "сефадекс" (Швеция) и "молселект" (Венгрия).

Гели, приготовленные на основе декстрана, отличаются высокой стабильностью в отношении различных химических агентов, что обуславливает их широкое применение в разного рода научных исследованиях и на производстве.

К группе декстранов может быть отнесен и крахмал, представляющий собой смесь полисахаридов, основным компонентом которой является амилоза и амилопектин. Посредством определенной химической обработки из крахмала получен новый носитель – губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью к ферментам, гидролизующим полисахариды.

Агароза – широко используется в качестве носителя для иммобилизации ферментов. Однако, данный носитель для иммобилизации ферментов отличается высокой стоимостью, что заставляет разрабатывать различные его модификации с целью получения легко регенерируемых форм, обуславливающих возможность его многократного применения. Гели, получаемые на основе агарозы, выпускаются различными зарубежными фирмами под торговым названием "сефароза".

Агар представляет собой природный полисахарид, выделяемый из клеточных стенок некоторых морских водорослей. Его точный химический состав полностью не изучен. В то же время установлено, что в его состав входят, по крайней мере, два полисахарида – агароза и агаропектин. К преимуществам агара относится его невысокая стоимость и низкая токсичность. Некоторые производные агара отличаются высокой механической прочностью и устойчивостью в щелочной среде, что явилось основанием отнести данный носитель к почти идеальным матрицам для иммобилизации ферментов.

Другими полисахаридами, получаемыми из морских водорослей, являются альгиновые кислоты и их соли, которые после некоторой модификации применяются для иммобилизации ферментов, клеток и клеточных органелл.

Гепарин представляет собой кислый полисахарид, успешно применяющийся для получения водорастворимых препаратов иммобилизованных ферментов, используемых в медицинской практике.

Синтетические полимерные носители. Огромное разнообразие синтетических полимеров обеспечивает их широкое использование в качестве носителей для иммобилизации ферментов. Синтетические полимерные носители используются для иммобилизации ферментов различными способами, а также для получения гелей и микрокапсул.

Полимеры на основе стирола. Полимеры данного типа являются основой для получения ионообменных материалов, а также для изготовления микро- и макропористых материалов, используемых для адсорбционной иммобилизации биообъектов.

Полимеры на основе производных акриловой кислоты. Одним из производных акриловой кислоты, широко применяющимся в качестве носителя, является акриламид. В настоящее время широко применяется метод иммобилизации ферментов и целых клеток путем их включения в полиакриламидный гель (ПААГ). При этом процентное содержание данного полимера определяет пористость и жесткость получаемого геля. Некоторыми фирмами выпускаются носители смешанного типа, изготавливаемые на основе ПААГ и агарозы.

К полиамидным носителям относятся группа различных полимеров с повторяющейся амидной группировкой. Основным преимуществом носителей данного типа является то, что они могут быть получены в различной физической форме: в виде гранул, порошков, волокон, мембран, трубок и т.п. При этом широкое применение таких носителей, особенно для медицинских целей, обусловлено также их биологической инертностью и стабильностью к воздействию биологических факторов.

Основными качествами, определяющими широкое внедрение неорганических носителей в производственные процессы, является легкость их регенерации и возможность придания им любой физической конфигурации. Они могут применяться как в виде порошков, шариков, так и в виде монолитов. При этом они могут быть как пористыми, так и сплошными (непористыми).

К основным преимуществам носителей на основе микропористых кремнеземов относятся: механическая прочность, химическая инертность по

отношению к большинству органических растворителей, наличие жесткого скелета (каркаса) с заданным размером пор, а также высокая устойчивость к воздействию микроорганизмов. Недостатками кремнеземов как носителей для иммобилизации ферментов является возможность их использования в ограниченном диапазоне значений pH, а также явление неспецифической сорбции на их поверхности. Однако, последний недостаток может быть устранен за счет различных модифицирующих воздействий. Еще одним существенным ограничением в использовании кремнеземов в качестве носителей для иммобилизации ферментов является их высокая стоимость. При этом в результате модификации стоимость данных носителей еще больше возрастает, поэтому их внедрение в промышленное производство значительно ограничено.

В этой связи, более пригодными для промышленного использования могут оказаться природные алюмосиликаты – глины и пористая керамика, в состав которой, помимо алюмосиликатов, входят окислы титана, циркония или другие добавки.

Кроме того, следует отметить и такие широко распространенные носители, как уголь и графитированная сажа. Весьма перспективными носителями являются матрицы, изготавливаемые на основе металлов и их оксидов, которые характеризуются высокой механической прочностью, относительной экономичностью, стабильностью и хорошими гидродинамическими свойствами.

### **3. Методы иммобилизации ферментов**

#### **Химическая иммобилизация**

Иммобилизация ферментов путем образования ковалентной связи с носителем в настоящее время является доминирующим способом получения биокатализаторов пролонгированного действия. Первые работы в этом направлении относятся к 1949 г.

Различают два основных метода химической иммобилизации ферментов:

1. иммобилизация на носителе любого типа за счет образования ковалентных связей;
2. поперечная сшивка молекул белка без носителя с помощью специальных реагентов.

Методы образования ковалентной связи между носителем и белком классифицируют по типам происходящих химических реакций. Наиболее часто используются следующие виды химических реакций: реакции диазосочетания, ацилирования, окислительно-восстановительные и радикальные реакции, а также смешанные методы.

Методы химического связывания имеют долгую историю и реализуются в разных модификациях. Практически все функциональные группы белков

могут быть использованы для связывания катализатора с носителем. Широкое применение нашли реакции, приводящие (в присутствии водоотнимающего агента) к образованию пептидных связей между аминок группами фермента и карбоксильными группами носителя или, наоборот, – между карбоксильными группами фермента и аминок группами носителя. В качестве водоотнимающего агента используют дициклогексилкарбодиимид, сшивающим агентом может служить бромциан. Возможно проведение сшивки и без участия сшивающих агентов. Перспективным подходом в развитии данного метода является использование в качестве носителя привитых полимеров. Прививая к поверхности полимерного материала боковые ветви, можно регулировать его свойства и влиять на реакционную способность за счет создания на поверхности носителя микроструктур, оптимальных для стабильного функционирования биокатализатора. Примером такого подхода служит применение полиэтилена с привитыми поливиниловым спиртом или полиакриловой кислотой. С целью снижения диффузионных затруднений между субстратом и ферментом, а также для облегчения оттока образующихся продуктов, при иммобилизации можно выводить фермент из микроструктуры молекулы носителя. Фермент присоединяют к поверхности носителя через некоторую, определенной длины, химическую последовательность – спейсер.

Иммобилизация путем химической сшивки фермента с носителем характеризуется высокой эффективностью и прочностью связи. Для предотвращения снижения каталитической активности фермента место сшивки удаляют от активного центра катализатора, и присоединение проводят не по белковой части молекулы, а по углеводной.

Одним из эффективных методов иммобилизации с образованием химических связей считают образование ковалентных связей между молекулой носителя и катализатором. Для ковалентного присоединения носитель, как правило, необходимо предварительно активировать (активацию аффинных носителей проводят бромцианом).

При ковалентной иммобилизации молекула фермента обволакивается макромолекулой полимера в результате образования между ними 6–10 ковалентных связей. Многоточечное взаимодействие фермента с носителем делает его конформацию более жесткой и менее подвижной, за счет этого идет увеличение стабильности к термоденатурации. Фермент оказывается заключенным в полимерную оболочку, имеющую вид петель, хорошо проницаемую для высокомолекулярных субстратов. Такие структуры называют «открытые» макромолекулярные капсулы.

В настоящее время в качестве высокомолекулярных матриц используют большое количество природных и синтетических полимеров различной природы. Наиболее перспективным в смысле сохранения каталитической активности фермента, низкой токсичности и биосовместимости оказались полисахариды (декстрины, альгинаты, пектины), а также синтетические полимеры на основе винилпирролидона, полиэтиленгликоля и др.

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, менее выраженным побочным действием по сравнению с нативными ферментами, снижением антигенных, иммуногенных и аллергических свойств. Эти преимущества иммобилизованных ферментов открывают широкие перспективы для их клинического использования.

## **Физические методы иммобилизации**

### **Адсорбционная иммобилизация**

Адсорбционная иммобилизация является наиболее известным из всех существующих способов иммобилизации ферментов.

Так, еще в 1916 г. Дж. Нельсон и Э. Гриффин провели успешную иммобилизацию инвертазы путем адсорбции на активированном угле и геле гидроксида алюминия.

В настоящее время адсорбционная иммобилизация, благодаря целому ряду преимуществ, является одним из наиболее распространенных способов получения иммобилизованных ферментных препаратов промышленного значения.

Носители для адсорбционной иммобилизации можно разделить на две основные группы – неорганические и органические. В качестве неорганических носителей, в основном, используются кремнезем, оксиды алюминия, титана и других металлов, различные природные алюмосиликаты (глины), пористое стекло, керамика, активированный уголь и др.

Среди органических носителей наибольшее распространение получили различные полисахариды и полимерные ионообменные смолы, коллаген.

Обычно носители используют в виде порошков, мелких шариков и гранул. В некоторых случаях для снижения гидродинамического сопротивления носители изготавливают в форме монолитов, пронизанных большим числом узких параллельных каналов, разделенных тонкими стенками. К важнейшим характеристикам носителей относятся: удельная поверхность, размер пор, механическая прочность и химическая стабильность.

Процедура иммобилизации с помощью адсорбции состоит в смешивании в определенных условиях фермента с носителем и дальнейшей инкубации полученной смеси. Затем проводят отделение нерастворимого компонента смеси от растворимого с помощью фильтрации или центрифугирования.

В процессе адсорбции фермента на носителе при их взаимодействии образуются солевые связи, а также другие слабые взаимодействия (водородные, ван-дер-ваальсовы).

Адсорбция представляет собой мягкий метод иммобилизации, при котором влияние носителя на каталитическую активность фермента незначительно, поэтому, как правило, ферменты сохраняют свою активность.



Недостатком данного метода иммобилизации является невысокая прочность связей, поэтому при незначительном изменении условий среды (температуры, значение рН, ионной силы, концентрации продукта) возможна десорбция фермента с поверхности носителя.

Более прочными являются связи, основанные на ионном взаимодействии, когда адсорбция поддерживается при определенных значениях рН и ионной силе раствора, омывающего фермент. Для ионной адсорбции применяют разные носители. В случае, если необходимо регенерировать биокатализатор, то заменой раствора можно десорбировать фермент, т.е. взаимодействия биокатализатора и носителя могут быть поставлены под контроль технолога. Однако, взаимодействия между биокатализатором и носителем утрачивают прочность при высокой ионной силе раствора, например, при получении аспарагиновой кислоты из фумарата аммония. В этих условиях надежнее адсорбция на принципах дисперсионных (гидрофобных) взаимодействий. Аспартазу, используемую для получения аспарагиновой кислоты, адсорбируют на хлопчатобумажной ткани, к поверхности которой пришиты гидрофобные алкильные или арильные группы.

### **Иммобилизация ферментов путем включения в структуру геля**

Сущность данного метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. При этом среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не покидает полимерную матрицу и не выходит в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удержание фермента в структуре геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями.

При иммобилизации ферментов, необходимо чтобы активные группы матрицы не блокировали каталитический центр фермента, а условия иммобилизации не приводили к потере его активности. Определенные ограничения на данный способ налагают и особенности субстрата. В случае высокомолекулярных субстратов данный метод иммобилизации не используют. Если матрица несет на себе заряды, то заряд субстрата влияет на кинетические параметры реакции: разноименные заряды на носителе и субстрате увеличивают скорость реакции, катализируемой иммобилизованными ферментами, одноименные заряды ее снижают и могут быть причиной потери активности.

Важную роль играет распределение субстрата между фазами иммобилизованного фермента и раствора. Ограниченная доступность субстрата к активному центру может привести к изменению специфичности последнего. Особенно это характерно для высокомолекулярных субстратов, которые из-за малого коэффициента диффузии медленно переходят в фазу иммобилизованных ферментов, что приводит к относительному увеличению скоростей других реакций с участием субстратов меньших размеров.

Наибольшее распространение получил метод включения ферментов в ПААГ. 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  $\gamma$ -излучения. Такой радиационно-химический метод полимеризации отличается следующими преимуществами: система не загрязняется продуктами распада инициатора полимеризации и можно обойтись без сшивающего реагента, т.к. сшивка полимерных цепей происходит непосредственно под действием облучения. Кроме ПААГ, используют гели поливинилового спирта (ПВС), поливинилпирролидона (ПВП), полиметакриловой кислоты и др.

При использовании желатины или агар-агара вначале подогревают их растворы, затем охлаждают и вносят фермент. В процессе охлаждения происходит формирование геля. Полимеризация альгината происходит в присутствии некоторых катионов металлов. В этой связи, на первом этапе смешивают растворы фермента и мономеров этих полисахаридов, далее смесь с помощью дозирующего устройства вносят в раствор, содержащий ионы  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Ba}^{2+}$  (для альгината) и  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{K}^+$  или  $\text{Mo}^{2+}$  (для каррагинана), при этом образуются сферические полимерные частицы в виде гранул.

Гели в зависимости от природы используемого полимерного материала отличаются по ряду показателей. Так, гели ПААГ недостаточно прочные, но этого можно избежать при использовании ПААГ, содержащего жесткую арматуру из керамики. При увеличении степени сшивки с целью придания большей прочности гелю возникают проблемы диффузионных затруднений.

Альгинатные гели отличаются высокой прочностью и хорошими гидродинамическими свойствами, что не создает препятствий для притока к активным центрам молекул ферментов субстрата и оттоку образуемого продукта реакции. При работе с альгинатом кальция важно отсутствие в иммобилизационной системе хелатирующих агентов (фосфатов, цитратов), которые, связывая кальций, разрушают структуру геля.

В последние годы широкое распространение получили методы привитой и конденсационной сополимеризации («двойной иммобилизации»).

В первом случае вначале проводят модификацию фермента каким-нибудь подходящим носителем (сефадекс, альгинат кальция, неорганические соли, природные полимеры и др.), затем этот комплекс сополимеризуют с другими носителями (ПААГ, целлюлоза, крахмал, сефароза). Таким путем были иммобилизованы химотрипсин, глюкозооксидаза и др.

При использовании метода конденсационной сополимеризации один из мономеров, например, акриламид, предварительно сополимеризуют с N-акрилоксидиамином и низкомолекулярным диамином (цистамин, триэтилентетрамин), затем добавляют фермент и проводят дальнейшую полимеризацию. В смесь дополнительно могут быть добавлены и соответственно включены в гель субстраты, кофакторы, протекторы окисления и др. Удобство и

применимость данного способа продемонстрированы на более, чем 60 ферментах разных классов.

Таким образом, при использовании гелей для иммобилизации ферментов, как правило, получают препараты с хорошими механическими свойствами и высокой активностью, которые, в то же время, отличаются рядом недостатков, ограничивающих возможность их практического применения. К ним относятся: затрудненность диффузии субстрата в гель, невозможность использовать высокомолекулярные субстраты, проблема накопления больших количеств полимера в организме животных и человека при введении иммобилизованного в гель фермента в кровяное русло.

### **Иммобилизация ферментов с использованием полупроницаемых оболочек (мембран)**

Общий принцип, составляющий основу данного способа иммобилизации, состоит в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой мембраной, которая легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но представляет собой непреодолимый барьер для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой.

### **Микрокапсулирование**

Данный способ иммобилизации разработан Т. Чангом (1964 г.). Его сущность заключается в том, что водный раствор фермента включают внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (мембраной).

В зависимости от условий получения размер микрокапсул изменяется от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров, а толщина мембраны составляет сотые – десятые доли микрометра при диаметре порядка нескольких нанометров.

Наличие ультратонкой мембраны позволяет создать высокие концентрации ферментов в малых объемах раствора, находящегося в микрокапсуле, сохранить стабильность и биологическую активность инкапсулированных ферментов. Использование фермента в высоких концентрациях, а также большие значения отношения площади поверхности микрокапсул к их объему обеспечивают быструю диффузию низкомолекулярного субстрата из внешней среды к ферменту и продукта реакции из внутреннего объема микрокапсул в межкапсулярное пространство.

Получены и исследованы микрокапсулированные формы целого ряда ферментов, катализирующих различные превращения низкомолекулярных субстратов.

Идеальным материалом с точки зрения биологической утилизации микрокапсул в организме человека и животных могут быть природные мембраны клеток крови. Фермент при относительно мягких условиях может быть заключен в частично иммобилизованные клетки крови с последующим восста-

новлением целостности их мембран. Поскольку размер ферментных элементов крови мал, а время их жизни в кровяном русле велико, такие микрокапсулы могут беспрепятственно и длительно циркулировать в крови. В ферментные элементы крови включены такие ферменты, как  $\beta$ -глюкозидаза,  $\beta$ -галактозидаза и др. Все иммобилизованные в клетки крови ферменты имеют постоянные каталитические параметры и отличаются большей устойчивостью к повышению температур.

Перспективно применение микрокапсул, содержащих ферменты, экстракорпорально через шунты или камеры. Одно из преимуществ состоит в том, что в данном случае не происходит контакта фермента с иммунокомпетентными клетками, тем самым, исключается возможность сенсibilизации организма со всеми неблагоприятными последствиями. Кроме того, применение вне организма исключает накопление в нем искусственных клеток и снимает проблему разрушения и утилизации полимерных материалов. Благодаря ультратонкой полупроницаемой мембране с высоким значением отношения площади поверхности микрокапсул к их объему, скорость диффузии низкомолекулярных веществ через микрокапсулы выше, чем через диализную мембрану в аппарате искусственная почка. Принцип энзиматического превращения токсичных метаболитов с помощью микрокапсулированных ферментов разрабатывается для применения в аппаратах искусственная почка и искусственная печень.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что микрокапсулированный фермент характеризуется следующими преимуществами: повышается его стабильность и соответственно срок действия. В этой связи, для успешного практического использования микрокапсул важно, чтобы оболочка мембраны была легко проницаемой для низкомолекулярных субстратов и продуктов реакции, атромбогенной, биосовместимой и биodeградирующей.

Поиск материалов для формирования микрокапсул осуществляется в двух направлениях:

- ✓ испытание синтетических материалов (нитрат целлюлозы, нейлон, ПААГ и др.), часть из которых являются биodeградируемыми;
- ✓ испытание биodeградируемых природных материалов (поперечно сшитые белки, нейтральные липиды, мембраны эритроцитов и др.).

Методы получения микрокапсул подразделяются на три группы: физические (механические), физико-химические и химические.

К физическим методам относятся методы механического нанесения оболочки на твердые и жидкие частицы лекарственного вещества. Наиболее распространенными способами физического микрокапсулирования являются: дражирование, распыление, диспергирование, напыление в псевдооживленном слое.

Физико-химические методы микрокапсулирования основаны на явлении коацервации (явление образования двухфазной системы, когда в результате расплавления одна фаза представляет собой раствор высокомолекулярного соединения в растворителе, а другая – раствор растворителя в высокомолеку-

лярном веществе). Снижению растворимости способствует изменение таких параметров системы, как температура, значение рН среды, ионная сила, число добавок к системе.

Коацервация при взаимодействии раствора полимера и низкомолекулярного вещества называется простой. В ее основе лежит физико-химический механизм снижения растворения молекул и отделение воды от такого рода молекулярных слоев при помощи водоотнимающих средств.

Коацервация при взаимодействии двух и более полимеров называется комплексной или сложной. При этом образование сложных коацерватов сопровождается взаимодействием между положительными и отрицательными зарядами молекул.

Химические методы микрокапсулирования основаны на реакциях полимеризации и поликонденсации на границе раздела двух несмешивающихся жидкостей. В результате межфазной полимеризации мономеров на границе раздела дисперсионной среды (вода) и дисперсной фазы (масло) возникает твердая оболочка полимера, образующая шарообразную микрокапсулу, ядром которой могут быть растительные, животные, минеральные и синтетические масла, суспензии лекарственных веществ.

К методу инкапсулирования близок метод обращения мицелл. Фермент включают в замкнутую структуру и ПАВ (липид, детергент), содержащую микроскопическую каплю воды. Фермент функционирует на границе раздела двух фаз: органической, находящейся в биореакторе, и водной, заключенной в обращенную мицеллу.

### **Включение фермента в структуру волокон**

От микрокапсулирования данный способ иммобилизации, предложенный Д. Динелли (1972), отличается, главным образом, формой получаемых препаратов: в первом случае образуются сферические микрокапсулы, а во втором – нити (волокна).

Сущность данного способа иммобилизации заключается в том, что эмульсию водного раствора фермента в органическом растворе волокнообразующего полимера продавливают через фильтры в жидкость (например, толуол), вызывающую коагуляцию полимера. Полученные волокна представляют собой пористые полимерные гели, содержащие гомогенную дисперсию небольших капель водного раствора фермента размером около 1 мкм.

Ферментсодержащие волокна обладают высокой механической прочностью, например, из них можно изготовить ткань, которая будет обладать ферментативной активностью. в некоторых случаях для дополнительного повышения механической прочности волокна заключают в тонкую полиамидную оболочку.

В настоящее время число ферментов, иммобилизованных в волокна, составляет более 50. Кроме того, волокна успешно используют и для включения мультиферментных систем.

Значительный интерес представляет включение ферментов в полые волокна. Волокна данного типа изготавливаются из природных или синтетиче-

ских полимеров (поливинилхлорид, целлюлоза, ПАА и др.). Раствор фермента вводят во внутренний объем полых волокон и «запечатывают» волокно с обоих концов. Фермент в полости волокон не претерпевает каких-либо химических модификаций, поэтому сохраняет свою каталитическую активность и свойства. Полые волокна состоят из основной массы полимерной матрицы, имеющей внутреннюю полую область, контактирующую с полупроницаемой мембраной. Внешний и внутренний диаметры волокон составляют несколько сотен мкм, толщина мембраны лежит в пределах десятых долей мкм. Полые волокна большого размера называются трубками. Каталитические свойства ферментов, включенных в волокна или трубки, используются в медицине в двух направлениях:

1) в экстракорпоральных шунтах: при терапии различных субстрат-зависимых опухолей и для детоксикации организма при разных патологических состояниях;

2) в ферментативных реакторах: при диагностических определениях концентрации метаболитов крови.

### **Включение ферментов в липосомы**

Липосомы впервые открыты А. Бенхемом в начале 60-х гг. XX в.

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

Липосомы, благодаря особенностям своей структуры, могут использоваться для доставки, как гидрофильных (заключенных в водные бислои), так и гидрофобных (заключенные в липидные бислои) лекарственных веществ.

Структура липосом напоминает клеточную мембрану. В этой связи, липосомы являются физиологическим материалом, который организм может легко утилизировать, они легко проникают через различные физиологические барьеры и усиливают процесс адсорбции лекарственного препарата в организме. Лекарственные препараты, заключенные внутрь липосом, не диффундируют, поэтому при их введении не наблюдаются иммунные и другие системные реакции организма. Липосомы распадаются естественным путем, высвобождая заключенное в них лекарственное вещество.

В этой связи, липосомы обеспечивают контролируемое высвобождение лекарственного вещества и позволяют применять его в более высоких дозах. Кроме того, липосомы имеют тенденцию накапливаться в определенных тканях (печень, селезенка, лёгкие и т.п.), что позволяет осуществлять целенаправленный транспорт лекарственных веществ к органам-мишеням.

Липосомы можно вводить перорально и парентерально. При этом в большинстве случаев отмечено повышение терапевтической эффективности и пролонгированное действие лекарственных веществ, что обусловлено их задержкой в системе циркуляции и замедленным разрушением ферментами плазмы.

Фосфолипиды липосомальной мембраны используются организмом как компоненты клеточных мембран или вовлекаются в метаболизм. Наличие липидной мембраны, сходной по составу и структуре с цитоплазматической облегчает проникновение лекарственных веществ в клетки путем диффузии, слияния или эндоцитоза.

Инкапсулирование лекарственных веществ в липосомы позволяет снизить их побочное действие.

Кроме того, липосомы усиливают проникающую способность активных ингредиентов в кожу, поэтому перспективно их использование в дерматологии.

В липосомы включают известные лекарственные препараты: противоопухолевые антибиотики, вакцины, ферменты.

Существуют различные методы приготовления липосом, позволяющие получать везикулы разного размера, состава, структуры и внутреннего объема. Выбор того или иного метода определяется целью работы, природой включенного БАВ и его расположением в липосомах (во внутреннем водном объеме или на липосомальной мембране).

#### **4. Иммобилизация целых клеток**

В последнее время получило широкое распространение применение иммобилизованных клеток микроорганизмов, содержащих естественный набор ферментов. Преимущество иммобилизованных клеток, в сравнении с иммобилизованными ферментами, заключается в том, что при их использовании: исключаются стадии выделения, очистки и иммобилизации ферментов, которые обходятся производству значительно дороже в осуществлении полного технологического процесса. Ферменты в микроорганизме находятся в своем естественном окружении (они термостабильны, работают более длительно, в течение длительного времени сохраняют свои каталитические свойства, они не уступают иммобилизованным ферментам в свойствах гетерогенных биокатализаторов).

Иммобилизация целых клеток микроорганизмов проводится аналогично иммобилизации ферментов, предотвращая их размножение, увеличивая сохранность и срок работы в качестве биокатализатора по сравнению с необработанными клетками.

Иммобилизации могут подвергаться клетки, находящиеся в разных состояниях: живые, поврежденные и мертвые. Их выбор зависит от типа катализируемой реакции. Многостадийные процессы, происходящие с участием разных ферментов и коферментов (НАД, НАДФ и др.), осуществляются только живыми клетками, тогда как одностадийные реакции можно проводить с помощью поврежденных и даже мертвых клеток

Разработано несколько методов иммобилизации клеток микроорганизмов.

Химические методы (ковалентное и поперечное связывание) основаны на образовании ковалентных связей между реакционно-способными группа-

ми носителя. Данные методы позволяют получить системы с высокой каталитической активностью.

Следует отметить, что бифункциональные реагенты, как правило, токсичны для живых клеток, что ведет к утрате ими механизмов биосинтеза белка и регенерации коферментов, поэтому непосредственный контакт клеток с ними нежелателен. Избежать этого можно, проводя обработку носителя такими веществами до прикрепления клеток.

Поврежденные или мертвые клетки, катализирующие одностадийные процессы, привязывают друг к другу с помощью полифункциональных агентов типа альдегидов или аминов. Такую процедуру называют химическим поперечным связыванием.

В целом, для живых клеток химические методы мало пригодны, поэтому используются редко.

Механические методы – эффективные методы получения «живых» иммобилизованных клеток, основанные на процессах их включения в природные и синтетические гели путем перевода раствора полимеров в твердую фазу за счет фазового перехода.

Растворы многих природных и некоторых синтетических полимеров при охлаждении образуют устойчивые водонепроницаемые гели. При этом клетки, представляющие собой частицы размером 1 мкм и выше, оказываются заключенными в ячейки полимерной сетки, проницаемой для субстрата и продуктов реакции, но не для клеток.

В данном случае процесс иммобилизации осуществляется в мягких условиях, клетки сохраняют основные свои физиологические функции: возможность дыхания и синтеза АТФ, способность к биосинтезу белка и регенерации ферментов, к регенерации кофакторов и реализации многоступенчатых процессов.

Как и в случае ферментов, процедуру включения проводят в процессе полимеризации, при гелеобразовании раствора полимера или пропитывая готовый блок геля клеточной суспензией.

Наиболее универсальным методом иммобилизации клеток является их включение в структуру ПААГ, гарантирующее равномерное распределение клеток по внешнему объему носителя. Обычно применяют гель в виде гранул. К преимуществам такого геля относятся: простота приготовления, доступность, экономичность, возможность включать клетки любого размера в любом количестве, достаточная фиксация клеток, прочность гранул на истирание и биологическая инертность.

В качестве носителя для иммобилизации клеток применяют и ПВС, образующий криогели при охлаждении раствора полимера за счет процессов криоструктурирования. Процесс иммобилизации клеток в криогели отличается простотой, происходит без участия токсичных химических агентов.

Примером "мягкой" иммобилизации служит включение клеток в альгинатный гель. Моновалентные катионы полисахарида даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор в присутствии двухвалентных катионов, особенно кальция, что способствовало широкому применению альгината



для иммобилизации живых клеток. В данном случае важно отсутствие в системе хелатирующих агентов (фосфатов, цитратов), разрушающих структуру геля, связывая кальций.

Препараты клеток, включенные в агар, как и в каррагинин, получают в виде сферических частиц. Иммобилизацию проводят в растворе, нагретом до температуры, при которой агар остается жидким. Затем добавляют клетки, смесь охлаждают до образования геля.

Клетки, включенные в полисахаридные гели, сохраняют жизнеспособность в течение длительного времени, могут размножаться в поверхностных слоях полимера. Способность таких гелей к растворению позволяет осуществлять количественный учет клеток, находящихся в ячейках. Недостатком таких носителей для иммобилизации клеток является то, что большинство полисахаридных гелей отличаются низкой механической прочностью.

К физическим методам иммобилизации относятся адсорбция и агрегация. Иммобилизация микробных клеток путем адсорбции уже более 100 лет применяется в процессах сбраживания углеводов до этанола, окисления этанола до ацетата и др.

В данном случае в качестве адсорбентов могут быть использованы органические и неорганические носители.

Физические методы иммобилизации основаны на способности клеток слипаться друг с другом или адсорбироваться на подходящих поверхностях. Степень закрепления клеток на носителе зависит от химической природы адсорбента, его формы, характера клеточной поверхности и условий проведения процедур иммобилизации.

Проводя аналогии с иммобилизацией ферментов, многие ученые считали, что физическая сорбция клеток на носителе не может обеспечить ни высокой клеточной нагрузки, ни прочного связывания биоматериала с адсорбентом. Однако, в ряде работ показано, что при определенных условиях адгезионной иммобилизацией можно практически необратимо сорбировать на 1 г носителя до 1 г влажной биомассы. Причем даже при высокой скорости потока субстрата клетки удерживаются на поверхности сорбента.

Влияние иммобилизации на жизнедеятельность клеток. Иммобилизация в зависимости от способа и условий проведения оказывает различное влияние, причем изменениям подвергаются морфология и физиология клеток.

При адсорбции основную роль играют специфика условий на поверхности раздела фаз, тип носителя и клеток. В ряде случаев адсорбенты предохраняют клетки от вредных воздействий, связывая токсины, вырабатываемые микроорганизмами.

При использовании химической иммобилизации часто наблюдается снижение биохимической активности клеток, вследствие повреждения клеточной стенки сшивающими агентами.

Включение микробных клеток в гели по-разному отражается на их каталитической активности. В одних случаях иммобилизация вызывает лизис

клеток, в других – микроорганизмы остаются активными в течение нескольких суток.

Использование иммобилизованных клеток имеет смысл в том случае, когда это обеспечивает больший экономический эффект в сравнении с получением того же продукта с помощью свободных микроорганизмов. При этом экономический эффект может выражаться в повышении выхода целевого продукта, уменьшении расходов на ферментацию или очистку продукта, уменьшении количества отходов, уменьшении капитальных вложений и эксплуатационных расходов.

Из всех характеристик иммобилизованных клеток наибольшее технологическое значение имеют активность и стабильность препарата.

## 5. Сферы применения иммобилизованных биообъектов

Сферы применения иммобилизованных ферментов разнообразны – это тонкий органический синтез и преобразование энергии, ферментная аналитика и получение целевых продуктов, конверсия растительного сырья и создание лекарственных препаратов.

В настоящее время применение иммобилизованных ферментов является одним из важнейших и динамично развивающихся разделов современной биотехнологии. Объемы выпуска ферментов, применяющихся в промышленных процессах, непрерывно возрастают. При этом производство протеаз, глюкозоизомераз, ацилтрансфераз достигает сотен и тысяч кг/год.

Таблица 1

Иммобилизованные ферменты, используемые в промышленности			
Иммобилизованный фермент	Объемы выпуска, т/год	Получаемый продукт	Страна
Аминоацилаза	менее 5	L-аминокислоты	Япония
Аминоглюкозидаза	1	Глюкоза	Англия
Глюкозоизомеразы	1500–1750	Глюкозо-	Дания, Нидерланды, Япония
Гидантоиназа	менее 1	фруктозные сиропы	Япония
Лактаза	5	D-фенилглицин-	Япония
Нитрилаза	0.1	Лактозные гидроли-	Япония
Пенициллин	3–4	заты	Япония
G-ацилаза	1	Акриламид	Япония,
Пенициллин		6 АПК	Нидерланды
V-ацилаза		6 АПК	Англия, Австрия

Внедрение иммобилизованных ферментов в промышленные производство и организация на их основе принципиально новых, экологически чистых

и компактных биотехнологических процессов обеспечивает ощутимый экономический эффект. Для таких процессов разрабатывают специальные биореакторы, имеющие аналогию с реакторами для химических процессов с гетерогенным катализом. Имобилизованный фермент в таком биореакторе служит неподвижной фазой, через которую протекает субстрат, подлежащий биологической трансформации. При этом биореакторы бывают периодического и непрерывного действия.

Фермент, включенный в полимерную структуру, чаще всего представляет собой малые сферические частицы одинакового размера. Это обеспечивает большую площадь реакционной поверхности и, следовательно, улучшение диффузии. Сферические частицы или гранулы с ферментом максимально плотно упаковывают в аппарате. В результате этого концентрация каталитического агента, участвующего в биотехнологическом процессе, значительно выше по сравнению с ферментационными системами на основе микробных клеток. В данном случае повышение концентрации биокатализатора обеспечивает большую производительность аппарата и более высокий выход целевого продукта.

Одностадийные превращения субстрата с использованием иммобилизованных ферментов осуществляются обычно в проточных биореакторах с перемешиванием, псевдооживленным слоем, а также в биореакторах с полыми волокнами. Все представленные системы имеют определенные ограничения в части неравномерного распределения катализатора, а также перепадов давления.

Кроме того, применяют биореакторы колонного типа, биореакторы с перемешиванием на базе магнитной или подвесной мешалки. В биореакторах с перемешиванием возможно разрушение довольно мягких частиц геля.

Оригинальна конструкция биореактора «корзиночного» типа, в котором для предотвращения разрушения гранул перемешивание осуществляется за счет вращающейся проволочной «корзины», в ячейках которой иммобилизованы гранулы с включенным ферментом. В данном варианте реализованы два типа иммобилизации: полимерные гранулы с включенными молекулами фермента сами иммобилизованы в ячейках проволочной сетки.

Применяются также биореакторы периодического действия, без протока, в которых фермент, включенный в гель в виде монолитного блока, заполняет весь объем аппарата. В толще геля в процессе иммобилизации и формирования монолита или после завершения этого процесса для осуществления газо- и массообмена формируют вертикальные каналы.

Следует отметить, что эра биореакторов для иммобилизованных биокатализаторов только начинается; их конструкции непрерывно совершенствуются применительно к разным биотехнологическим процессам, реализуемым на их базе. Эти процессы относятся к сфере органического синтеза и медицины, конверсии растительного сырья и преобразования энергии, производства пищевых веществ и напитков.

В истории пищевой технологии, насчитывающей тысячелетия, иммобилизованные биокаталитические системы (ферменты, клетки) за последние

20–25 лет вписали совершенно новые страницы, обозначив принципиальные сдвиги в области самих технологий и в улучшении качества пищевых продуктов. Все большее применение в развитых странах находят биотехнологические процессы получения глюкозо-фруктозных сиропов, оптически активных L-аминокислот из рацемических смесей, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки, синтеза L-аспарагиновой и L-яблочной кислот из фумаровой кислоты.

Получение глюкозо-фруктозных сиропов, важный с точки зрения диетологии процесс, впервые был реализован в промышленности в 1973 г. американской компанией «Клинтон Корн». В настоящее время это один из крупнотоннажных промышленных процессов, базирующихся на использовании иммобилизованных ферментов.

Фруктоза, по сравнению с глюкозой, обладая более приятным вкусом, на 60–70 % слаще. Кроме того, метаболизм фруктозы в организме человека не связан с превращением инсулина, она менее вредна для зубов и т.п. Технологии получения глюкозо-фруктозных сиропов в короткий срок были разработаны и освоены в промышленных масштабах многими западными странами. В 1980 г. их выпуск составил 3,7 млн. тонн. Продукт с товарным названием «изоглюкоза» поступает на рынок в виде сиропов, содержащих глюкозу и фруктозу в соотношении, близком к 1:1; с использованием разделительных процессов типа жидкой хроматографии содержание фруктозы может быть повышено до 90 %.

Биохимическая сущность процесса сводится к превращению (изомеризации) глюкозы, предварительно полученной в результате гидролиза кукурузного или картофельного крахмала, во фруктозу под действием иммобилизованной глюкозоизомеразы. Данная реакция реализуется в одну стадию до тех пор, пока в реакционной смеси соотношение глюкозы и фруктозы практически не выровняется. В данном случае конечным продуктом может быть собственно глюкозо-фруктозный раствор (сироп) или фруктоза может быть выделена из раствора, а глюкоза – подвергнута дальнейшей изомеризации.

Данный процесс протекает непрерывно в реакционных колоннах высотой 5 м, заполненных слоем биокатализатора – иммобилизованного фермента в виде полимерных гранул, полых волокон, кусочков геля и т.д. Время полуинактивации фермента составляет от 20 до 50 суток, т.е. заменять или обновлять биокатализатор приходится 1 раз в 2–3 месяца. Производительность биореакторов варьирует от 1 до 9 т глюкозо-фруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента. По экономическим оценкам, выполненным на основе анализа производства глюкозо-фруктозных сиропов мощностью 120 тыс. т кукурузного зерна в год, производство такого типа экономичнее в 1,5 раза по сравнению с традиционным получением сахара из сахарной свеклы.

Датская компания «Ново» рекомендует в качестве лучших следующие параметры процесса: активность биокатализатора – 200 МЕ/г, высота слоя катализатора – 5 м, линейная скорость потока – 3,6 м/ч., производительность реактора – 400 т в сутки.

Корпорацией «Цетус» (США) разработан новая технология получения 100% фруктозы из глюкозных сиропов. На первом этапе глюкоза под действием иммобилизованной пиранозо-2-оксидазы окисляется в D-глюкозон, который на втором химическом этапе на палладиевом катализаторе практически со 100% выходом восстанавливается до фруктозы. В связи с данной разработкой, США планируют заменить на 30–40% потребление сахара такими фруктозными сиропами, а Япония – резко сократить экспорт сахара за счет биотехнологического процесса изомеризации глюкозы во фруктозу.

Получение L-аминокислот ферментативным разделением химических рацемических смесей D,L-аминокислот реализовано на промышленном уровне фирмой «Танабе Суйяку» в 1969 г. В качестве исходного сырья используют полученные в результате химического синтеза ацилированные D,L-аминокислоты (метионин, валин, фенилаланин, триптофан), раствор которых пропускают через колонку объемом 1 м<sup>3</sup>, заполненную иммобилизованной аминоацилазой. Фермент гидролизует L-ацилизомеры, после отщепления объемной ацил-группы более мелкие и растворимые молекулы L-аминокислот выводятся из биореактора через мембрану. В конечном счете в реакционной смеси остаются только ацил-D-аминокислоты, которые при нагревании вновь рацемизируются на D- и L-изомеры. Период полуинактивации фермента, иммобилизованного на полимерной смоле, составляет 65 дней. Периодически в колонку доливают свежую порцию раствора фермента, который вновь адсорбируется смолой. Время работы колонки без смены носителя составило более 8 лет.

В Италии фирмой «Сентрале дель Латте» в середине 80-х гг XX в. реализован первый коммерческий процесс получения безлактозного молока. Лактоза, присутствующая в достаточно больших количествах в молоке, плохо растворимая, вызывает кристаллизацию ряда молочных продуктов и кондитерских изделий, снижая их качество. Кроме того, некоторая часть населения не может употреблять нативное молоко вследствие недостаточности лактазы, фермента, гидролизующего молочный сахар с образованием глюкозы и галактозы. После такой обработки молоко приобретает качества диетического продукта. Масштабы производства безлактозного молока постоянно увеличиваются во многих европейских странах.

Получение сахаров из молочной сыворотки в процессе ферментативного гидролиза позволяет получать дополнительные количества сахаристых веществ из отходов молочного производства. Первые промышленные процессы гидролиза лактозы молочной сыворотки с использованием иммобилизованной лактазы осуществлены в 1980 г. в Англии и Франции. Предварительно деминерализованную сыворотку пастеризуют и затем пропускают через ферментационную колонку с иммобилизованной лактазой. Период полуинактивации фермента удается увеличить до 60 суток, мощность установок – 1000 л/ч при 80% конверсии лактозы. При этом получаемые глюкоза и галактоза превосходят по степени сладости обычные сахара в 1,5 раза при равных экономических показателях.

Получение L-яблочной кислоты ферментативным способом из L-аспарагиновой кислоты основано на использовании фумаразы, иммобилизованной в структуре геля. Яблочная кислота широко используется в пищевом и фармацевтическом производстве в качестве заменителя лимонной кислоты. Компанией «Танабе Суйяку» в результате иммобилизации фумаразы в карраген удалось повысить ее операционную стабильность при времени полуинактивации свыше 100 суток. При этом продуктивность процесса превращения фумаровой кислоты в яблочную возросла более, чем в 5 раз.

Получение L-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты возможно с использованием фермента аспартазы, иммобилизованного в геле. При этом время полуинактивации такого ферментного препарата составляет около 30 суток. Фермент, присоединяя аммиак к двойной связи фумаровой кислоты, в одну стадию образует оптически активную форму L-аспарагиновой кислоты. Данный процесс реализован и на основе иммобилизованных в структуре геля клеток микроорганизмов (с дополнительным химическим связыванием). В этом случае время полуинактивации аспартазы, присутствующей в клетках микроорганизмов, возросло до 120 суток. Такой технологический процесс практически полностью автоматизирован и реализуется в непрерывном режиме. Производительность установок составляет до 1,7 т/1 м<sup>3</sup> в сутки.

В настоящее время, помимо представленных и реализованных в промышленных масштабах технологических процессов, иммобилизованные ферменты широко используются в научных исследованиях при разработке новых биотехнологических процессов получения ценных продуктов. К ним относятся: процесс получения глюкозы из крахмала с участием амилазы и глюкозоамилазы, получение инвертного сахара (аналог глюкозо-фруктозных сиропов) из сахарозы с использованием инвертазы. В рамках диетологии разрабатываются процессы получения белковых гидролизатов заданного состава с участием иммобилизованных протеаз. Кроме того, осваиваются установки для непрерывного ферментативного получения глюкозы из различных целлюлозосодержащих отходов.

Высокие скорости протекания реакций в «мягких» условиях, уникальная специфичность и стереоспецифичность действия ферментов позволяет создавать на их основе эффективные и перспективные технологические процессы. В настоящее время успехи в тонком органическом синтезе на основе иммобилизованных ферментов особенно наглядны в сфере получения лекарственных препаратов (антибиотиков, стероидов, простагландинов и т.п.).

В частности, перспективно применения ферментативного катализа для получения ряда лекарственных веществ (простагландинов, тромбоксанов, простациклина и др.) из арахидоновой кислоты с использованием сложных полиферментных систем. В данном случае ключевым ферментом является простагландинэндопероксидсинтетаза, катализирующая трехсубстратную реакцию. В ходе реакции происходит сопряженное окисление арахидоновой кислоты кислородом и донором электронов в виде НАДН, триптофана, ферроцианида. Следует отметить, что исходный субстрат для осуществления та-

ких реакций, арахидоновая кислота, может быть получена из масел с использованием специфических фосфолипаз.

Интересным направлением являются разрабатываемые процессы превращения достаточно доступных субстратов (фумарата аммония, фенола, индола, пирувата аммония) в редкие аминокислоты (тирозин, фенилаланин, триптофан, 5-окситриптофан) с участием лиаз, процессы получения органических кислот из фумаровой, ферментативная модификация нуклеиновых кислот, синтез олиго- и полипептидов.

Кроме того, с использованием иммобилизованных ферментов созданы процессы получения более эффективных аналогов известных антибиотиков пенициллинового ряда и цефалоспоринов, модификация которых химическим путем является очень сложной задачей. В частности, на основе иммобилизованной пенициллинамидазы реализован процесс эффективного деацилирования бензилпенициллина, являющегося сырьем для получения 6-аминопеницилановой кислоты (6-АПК). Это достаточно простой технологический процесс, протекающий в одну стадию при обычных условиях в диапазоне температур 10–40 °С. Промышленная реализация процесса получения 6-АПК привела к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их стоимости. На основе данного фермента разработан процесс получения 7-аминодезацетоксицефалоспоровой кислоты (7-АДЦК), представляющей собой ключевой субстрат для синтеза новых цефалоспоринов.

Начиная с середины 60-х гг. XX в. исследователи перешли от поиска новых антибиотиков к модификации структуры известных лекарственных препаратов. Особенно это было характерно для пенициллинов и цефалоспоринов, структура которых включает  $\beta$ -лактамное кольцо. В данном случае химическая модификация  $\beta$ -лактамного кольца ("добавление" к нему определенной химической группы) позволяет получить новые виды антибиотиков. Такие препараты антибиотиков получили название полусинтетических.

Как уже отмечалось выше, ключевым полупродуктом для получения полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда является 6-АПК.

Получение 6-АПК промышленным путем в результате химического гидролиза бензилпенициллина сопряжено с большими проблемами и трудностями, в связи со значительной лабильностью  $\beta$ -лактамного цикла его молекулы. Так, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1 %. Продуктивность такого процесса удалось увеличить, благодаря применению для гидролиза иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинацилазу. Данный фермент расщепляет именно ту амидную связь, которая необходима для образования 6-АПК.

Кроме того, пенициллинамидазе присуща уникальная специфичность и по отношению к гидролизу цефалоспоринов. В данном случае отщепляется только боковая группа, а  $\beta$ -лактамный цикл остается не затронутым. Это обстоятельство использовано для создания второго технологического процесса – получения 7-АДЦК путем гидролиза соответствующего фенилацетатного производного. В этой связи, открывается путь к получению очень перспек-

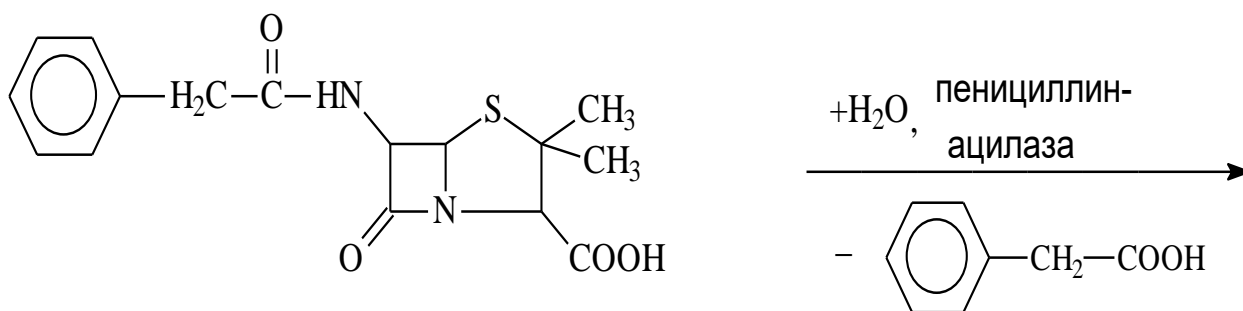
тивных лекарственных средств на основе полусинтетических цефалоспоринов.

Со второй половины 70-х гг. XX в. вся 6-АПК, выпускаемая в России, а также значительная часть 6-АПК, получаемая в Италии, производится с помощью иммобилизованных ферментов.

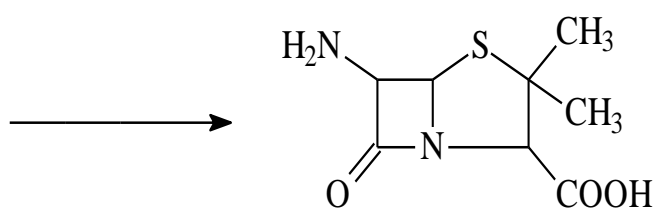
На итальянских фирмах применяют фермент, иммобилизованный путем включения клеток *E. coli* в волокна триацетата целлюлозы, на российских предприятиях используют бактериальные клетки, иммобилизованные в ПААГ.

Переход к технологии, связанной с применением иммобилизованных бактериальных клеток, обеспечивает высокий выход 6-АПК, составляющий порядка 80–85%.

По данным японских исследователей, время полуинактивации пенициллинацилазы, содержащейся в иммобилизованных в ПААГ бактериальных клетках, равно 42 суткам при температуре 30 °С или 17 суткам при температуре 40 °С.



Бензилпенициллин



6 - Аминопенициллановая кислота (6-АПК)

Внедрение в производство биокаталитической технологии получения 6-АПК способствовало значительному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

Для получения промышленных биокатализаторов с целью трансформации антибиотиков используют иммобилизацию клеток микроорганизмов путем их включения в ПААГ, сшитый глутаровым альдегидом, желатиновый гель, а также связывание с глицидилметакрилатом с помощью глутарового альдегида. По существу при трансформации антибиотиков из всего многооб-



разия ферментов клетки используется лишь один из них. В данном случае сохранять жизнеспособность клеткам не обязательно, активность биокатализатора можно увеличивать за счет разрушения клеточных оболочек, служащих диффузионными барьерами на пути субстрата к ферменту.

Однако, простота требований, предъявляемых к биосистеме, когда при иммобилизации отсутствует необходимость в сохранении жизнеспособности клеток, является только кажущейся. В частности, простое включение клеток *E. coli* в структуру геля приводит к быстрой инактивации биокатализатора вследствие вымывания фермента в процессе получения геля. В связи с этим, был разработан способ включения в ПААГ клеток, предварительно модифицированных в растворе мономеров путем сшивки бифункциональным реагентом.

При включении клеток *E. coli* в гели альгината по стандартной методике их содержимое конкурирует с полимером за связывание с ионами кальция. В данном случае результатом является лизис клеток, нарушение интактности клеточных структур. Стабильность такого биокатализатора иллюстрируют биокатализаторы фирмы "Спофа", полученные на основе разрушенных клеток *E. coli*.

Резкого увеличения стабильности удается достичь после "фиксирующей" модификации поверхности клеток до их контакта с раствором, содержащим ионы кальция. Такая фиксация резко изменяет картину ультраструктуры иммобилизованных клеток, их удается сохранить структурно неизменными.

Мягкое воздействие на клетки *E. coli* органическими растворителями, замещающими часть воды в клетке, приводит к изменению проницаемости клеточной стенки, увеличению доступа субстрата к внутриклеточным ферментам и ускорению вывода полученного продукта при одновременном сохранении целостности покровов клетки, и, как следствие, каталитическая активность биокатализатора и его стабильность существенно увеличиваются. Воздействие на клетки в процессе выращивания (температурный фактор, химические агенты) также позволяет получить микроорганизмы с повышенной проницаемостью клеточных оболочек. Активность и стабильность иммобилизованного биокатализатора на основе таких клеток увеличивается.

Для иммобилизации микроорганизмов, осуществляющих биосинтез антибиотиков, применяют разные методы – включение в ПААГ, гели альгината кальция, каррагинана, агара, коллагена, включение в полые волокна, адсорбция на цеолите, пенополиуретане, поликарбонате, нейлоне, полисульфоне, стали.

Таким образом, ферментативный органический синтез, находящийся в настоящее время на стадии становления и развития, имеет огромные перспективы для существенного расширения сферы применения в ближайшем будущем.