

Занятие семинарского типа № 6

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Методы иммобилизации ферментов и целых клеток. Области практического применения иммобилизованных биологических объектов

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

Широкие перспективы открылись перед инженерной энзимологией в результате создания нового типа биоорганического катализатора – иммобилизованных ферментов. Термин «иммобилизованные ферменты» узаконен сравнительно недавно в 1974 г. Сандэрмом и Реем, хотя еще в 1916 г. Нельсон и Гриффин показали, что инвертаза, адсорбированная на угле или алюмогеле, сохраняет свою каталитическую активность. Однако, начало целенаправленных исследований, ориентированных на создание такого рода стабилизированных ферментных катализаторов, относится к середине XX в., при этом ощутимые успехи достигнуты в последние 20–25 лет.

Иммобилизация – 1. процесс прикрепления ферментов к поверхности природных или синтетических материалов, включение их в полимерные материалы, полые волокна и мембранные капсулы, поперечная химическая сшивка;

2. 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.

Иммобилизацию также можно охарактеризовать как физическое разделение катализаторов и растворителя, в ходе которого молекулы субстрата и продукта легко обмениваются между фазами. Разделение может быть достигнуто адсорбционным или ковалентным связыванием фермента с нерастворимыми носителями или связыванием отдельных молекул фермента с образованием агрегатов.

При иммобилизации ферментов происходит стабилизация их каталитической активности, т.к. данный процесс препятствует денатурации белков. Иммобилизованный фермент, имеющий ограниченную возможность для конформационных перестроек, быстрее растворимого находит кратчайший путь к функционально активной конформации. Иммобилизованные ферменты приобретают, помимо стабильности, отдельные свойства, не характерные для их свободного состояния, например, возможность функционировать в неводной среде, более широкий диапазон оптимума по температуре и рН. В результате иммобилизации фермент из разряда гомогенных катализаторов переходит в разряд гетерогенных, т.е. находится в фазе, не связанной ни с исходным субстратом, ни с образуемым продуктом. Это позволяет организовать на базе иммобилизованных ферментов различные эффективные биотехнологические процессы многократного периодического или непрерывного действия с использованием принципа взаимодействия подвижной и неподвижной фаз.

Длительность сохранения каталитической активности и ряд свойств ферментов определяются правильностью выбора носителя, метода и условий проведения иммобилизации. Существует несколько принципиально разных подходов, позволяющих связать фермент с носителем: адсорбционные методы, методы химического связывания на поверхности, методы механического включения или захвата, методы химического присоединения.

Промышленные методы получения иммобилизованных ферментов должны быть простыми, доступными и экономичными, а получаемые иммобилизованные ферменты

должны иметь высокую удельную активность и обладать большой стабильностью при функционировании.

Однако, внедрение иммобилизованных ферментов в промышленности происходило медленно, причина этого заключалась в том, что многие проекты начали разрабатываться без предварительного изучения потребностей уже существующего промышленного производства, а также спроса и предложения рынка. Если, например, для получения какого-то определенного вещества промышленность уже выпускала в товарном количестве достаточно дешевые растворимые ферменты, то новые технологии с использованием иммобилизованных ферментов заранее были обречены на неудачу, но все же новые открывающиеся возможности успешного применения иммобилизованных ферментов благодаря таким их свойствам, как активность и стабильность, позволяют предположить перспективность развития данного направления инженерной энзимологии.

Методы иммобилизации ферментов

1. Химическая иммобилизация

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 аминокислотными группами фермента и карбоксильными группами носителя или, наоборот, – между карбоксильными группами фермента и аминокислотными 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 («поясок»).

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. Определенные успехи в данном направлении достигнуты при применении в клинике иммобилизованных протеаз в качестве фибринолитических и противовоспалительных препаратов. Особое значение в этой связи имеют разработка и внедрение в клинику стрептодеказы.

Стрептодеказа для инъекций – лекарственный препарат пролонгированного действия для тромболитической терапии, полученный на основе иммобилизованного фибринолизина (стрептокиназы). В качестве водорастворимого полимера-носителя для иммобилизации стрептокиназы использован декстран с М.м. 60000, выпускаемый под названием полиглюкин. Предварительное активирование полиглюкина проводят калия периодатом при комнатной температуре и перемешивании раствора в течение 1 ч. Очистку окисленного полиглюкина от примесей осуществляют хроматографической адсорбцией. Для иммобилизации стрептокиназы к ее раствору приливают раствор окисленного полиглюкина (рН 8,7) и перемешивают в течение 1 ч. Аминогруппы стрептокиназы и альдегидные группы окисленного полиглюкина взаимодействуют с образованием азометиловой связи. Эту смесь охлаждают до 4 °С. Последующее восстановление стрептодеказы проводят при добавлении к реакционной массе натрия боргидрата и перемешивании в течение 1 ч при 4 °С. Азометилловые связи между полимером и белком восстанавливаются, а избыток альдегидных групп полимера до гидроксильных. После определения фибринолитической активности раствор концентрируют методом ультрафильтрации. Концентрат стерилизуют методом фильтрации и подвергают сублимационной сушке.

Перспективным направлением является модификация полимерами гемоглобина человека с целью создания кровезаменителей с газотранспортной функцией. Основной целью исследований по применению растворов гемоглобина является получение такого лекарственного препарата, который бы имел повышенное сродство к кислороду, длительно не выводится из кровяного русла и не обладал бы групповыми и иммунными свойствами, характерными для крови. Так, был разработан метод ковалентного присоединения водорастворимого сополимера винилпирролидона и аллилглицерилового эфира к молекуле гемоглобина, но исследования по использованию модифицированного гемоглобина в качестве кровезаменителя только начинают проводиться на животных и еще далеки от клинического применения на больных.

Более простым, не требующим предварительной модификации носителя и быстрым методом иммобилизации является металлохелатный метод, заключающийся в иммобилизации ферментов на носителях из полимеров гидроксидов металлов (титана, циркония, олова, железа). Гидроксильные группы вытесняются из координационной сферы того или иного металла функциональными группами фермента, в результате между носителем и ферментом возникает координационная или ковалентная связь. Успех метода определяется рядом условий: в молекуле фермента должны присутствовать группы, играющие роль лигандов и способные стерически контактировать с атомами металла: данные группы должны быть удалены от активного центра. Метод применяют в разных вариантах, с использованием органических и неорганических носителей, включая

ионообменные носители. Природа комплекса может существенно влиять на активность и операционную стабильность иммобилизованного фермента.

Сравнительно новой разновидностью металлохелатного метода является иммобилизация ферментов на основе гидроксидов переходных металлов. Молекулы фермента закрепляются на поверхности носителя путем образования хелатов. Для реализации данного метода, кроме фермента, необходимо наличие еще одного реагента – гидроксида металла.

Недостатком метода иммобилизации ферментов на основе ковалентного присоединения является необходимость использования больших количеств катализатора. Кроме того, химическая модификация, которой подвергаются ферменты в процессе иммобилизации, может существенно снижать их каталитическую активность. Избежать этого можно при использовании методов иммобилизации путем включения ферментов в полимерную структуру.

Иммобилизация методом поперечных сшивок (химическое присоединение) заключается в химическом связывании молекул ферментов между собой путем образования поперечных сшивок. Для образования сшивок применяют различные агенты, несущие две или более реакционноспособные группы, осуществляющие поперечную сшивку ферментов за счет эпокси- и иминогрупп (например, эпоксиполиимины). В качестве сшивающих агентов применяют глутаровый альдегид, гексаметилендиизоцианат, хлорпроизводные триазины. Данный метод отличается простотой реализации и позволяет производить сшивку различных по структуре ферментов, а также ферментов с целыми клеткам. Однако часто при сшивке может наблюдаться существенное снижение активности катализатора.

2. Физическая иммобилизация

2.1. Иммобилизация ферментов методом адсорбции

Простейший и наиболее старый способ иммобилизации заключается в адсорбции фермента на твердом носителе неорганической (силикагель, пористое стекло, керамика, песок, обожженная глина, гидроокиси титана, циркония, железа, окись алюминия, активированный уголь и т.п.) или органической (хитин, целлюлоза, полиэтилен, ионообменные смолы, вспененная резина, полиуретан и т.п.) природы.

Неорганические носители обладают хорошими механическими свойствами.

Имеется тенденция к всё большему применению в качестве матриц для адсорбции ферментов материалов, получаемых путем прививки одного полимера к другому.

Одним из методов широко практикуемой ныне иммобилизации дрожжевых/бактериальных клеток для получения этанола служит их сорбция за счет ионных сил на микропористой ионообменной смоле. Клетки дрожжей, адсорбированные на керамике и т.п., обладают большей дыхательной активностью, чем свободные дрожжевые клетки.

В современных разработках прослеживается тенденция к использованию синтетических крупнопористых материалов, своеобразных «губок», впитывающих клеточную массу. Распространенным «губчатым» материалом служит полиуретан, образующий твердую «пену» с открытыми ячейками. Этот материал в виде мелко нарезанных частиц помещают в биореактор с клетками. Клетки, проникая в ячейки носителя, быстро растут. Такая система применяется при очистке сточных вод. Данный пример свидетельствует о простоте рассматриваемого метода иммобилизации, который сводится к добавлению частиц носителя в перемешиваемую суспензию клеток или пропусканию такой суспензии через колонку с частицами носителя.

Насколько разнообразны материалы, применяемые для адсорбции ферментов, настолько различны механизмы и прочность связывания фермента с носителем.

Характеризуя эти связи можно говорить о широком их спектре, от простого обрастания носителя до образования полярных, ионных и ковалентных связей.

Процедура иммобилизации путем адсорции состоит в смешивании в определенных условиях фермента с носителем и инкубации полученной смеси. Затем проводят отделение нерастворимого компонента смеси от растворимого путем фильтрования и центрифугирования. В процессе адсорбции фермента на носителе при их взаимодействии возникают солевые связи, а также другие слабые взаимодействия (водородные, ван-дер-ваальсовы). Адсорбция – мягкий метод иммобилизации, при котором влияние носителя на активность фермента минимально, поэтому, как правило, ферменты сохраняют свою активность. Недостатком данного метода является непрочность связей, поэтому при незначительном изменении условий среды (температуры, 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. 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 теряют 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.

2.2. Иммобилизация ферментов путем включения в структуру геля

Гели – структурированные коллоидные системы с жидкой дисперсионной средой, студенистые тела, механические свойства которых в большей или меньшей степени подобные механическим свойствам твердых тел. Частицы дисперсной фазы соединены между собой в рыхлую пространственную сетку, содержащую в своих ячейках дисперсионную среду, лишая текучести систему в целом. Типичные гели образуются при коагуляции зольей, когда контакты между частицами легко и обратимо разрушаются при механических и тепловых воздействиях. Гели с водной дисперсионной средой называются гидрогелями, с углеводородной – органогелями. Высушиванием гелей можно получить аэрогели – хрупкие микропористые тела, используемые как сорбенты и носители.

Большое распространение получил физический метод иммобилизации ферментов – включение в полимерные гели, заключающийся 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. Для низкомолекулярных субстратов такой гель проницаем, поэтому активность фермента по отношению к таким субстратам сохраняется, но в случае высокомолекулярных субстратов метод не пригоден.

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 использовать нельзя. 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 полиакриламидный гель (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 под действием γ -излучения. Такой радиационно-химический метод имеет ряд преимуществ: система не загрязняется продуктами распада инициатора полимеризации и можно обойтись без сшивающего реагента, т.к. сшивка полимерных цепей идет прямо под действием облучения. Кроме ПААГ, используют гели поливинилового спирта, поливинилпирролидона, 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. В этой связи на первом этапе смешивают растворы фермента и мономеров этих полисахаридов, далее смесь с помощью дозирующего устройства вносят в раствор, содержащий ионы Ca^{2+} и Ba^{2+} (для альгината) или Al^{3+} , Fe^{3+} , K^+ или 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. 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 иммобилизованы химотрипсин, глюкозооксидаза и др.

При использовании метода конденсационной сополимеризации один из мономеров, например, акриламид, предварительно сополимеризуют с N-акрилоксидамином 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.

Интересна попытка, получить многослойную систему иммобилизованных ферментов, где слои фермента, чередуются со слоями инертного геля.

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.

При внутривенном или внутрибрюшинном введении крысам аспарагиназы, включенной в ПААГ или метакрилатный гель, происходит снижение уровня аспарагина в крови, накопление частичек геля в клетках ретикуло-эндотелиальной системы, образование фиброзных пленок на поверхности геля. Описано применение метакрилатного геля с включением в него тромбина и карбоксипептидазы для остановки поверхностных кровотечений и инактивации продуктов интоксикации, вызванной этанолом. Исследуется возможность применения гемосовместимых гидрогелей на основе метакрилатных или метакрилоильных производных для покрытия внутренней поверхности искусственных кровеносных сосудов. Имеются примеры успешного применения ферментов, включенных в гель, в медицинской биохимии. Так, в биохимических лабораториях для проявления электрофореграмм успешно используют ферменты, иммобилизованные в ПААГ: для проявления фосфоглюкомутазы применяют пленку, содержащую глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, а для пиропфосфорилазы – пленку с глюкозо-6-фосфатгидрогеназой и фосфоглюкомутазой.

2.3. Иммобилизация ферментов методом микрокапсулирования

Привлекательной для использования является иммобилизация ферментов методом инкапсулирования. Главным в этом методе является не создание физических или химических сил, необходимых для связывания катализатора с носителем, а удержание раствора, окружающего фермент. Микрокапсулирование ферментов состоит во включении их водных растворов в полупроницаемые мембраны, не проницаемые для высокомолекулярных соединений и клеток, но через которые могут проникать низкомолекулярные вещества. 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. Так, микрокапсулированная каталаза, введенная внутривенно или внутрибрюшинно мышам с наследственным нарушением синтеза этого фермента, эффективно снижала содержание перборатов в крови и имела более длительный период жизни в организме, чем свободный фермент.

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 восстановлением 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 форменные элементы крови включены такие ферменты, как β -глюкозидаза, β -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. Перспективным может оказаться использование микрокапсулированных ферментов для удаления мочевины – одного из токсичных метаболитов клетки. Так, одним из способов является превращение мочевины под действием микрокапсулированной уреазы в аммоний и углерода диоксид, вторым – использование экстракорпорального шунта, снабженного микрокапсулами с мультиферментными рециркулирующими комплексами, с помощью которых благодаря сложной цепи рециркулирующих реакций, мочевина и аммоний превращаются в аминокислоты (глутамат, оксиглутамат, аланин).

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

Поиск материалов для формирования микрокапсул осуществляется в 2 направлениях:

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

Практическое применение микрокапсулированных ферментов реализуется в 2 направлениях: введение интракорпорально в кровяное русло и применение в экстракорпоральных шунтах, когда через определенный объем микрокапсул перегоняется кровь больного человека (аппарат «искусственная почка»).

Методы получения микрокапсул подразделяются на 3 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.

Получение микрокапсул методом диспергирования проводят с применением установки, представляющей собой реактор, снабженный мешалкой и рубашкой. В реактор наливают подсолнечное масло и нагревают до 40 °С. Желатин растворяют в воде с предварительным набуханием и нагреванием. Микрокапсулируемое вещество смешивают с раствором желатина. Полученную смесь тонкой струей подают в реактор с работающей мешалкой, от скорости вращения которой зависит размер микрокапсул. Масло в реакторе охлаждают подачей в рубашку холодной воды. Микрокапсулы отделяют от масла процеживанием, промывают спиртом и сушат на воздухе в течение 24–48 ч.

Получение микрокапсул методом диспергирования: в емкость наливают 1 % раствор метилцеллюлозы и нагревают до 35 °С. Масло какао расплавляют до жидкого состояния, вносят вещество, включаемое в оболочку, и получают суспензию, которую тонкой струйкой при перемешивании подают в емкость. Резко охлаждают жидкость, помещая ее на лед. Полученная дисперсия может служить концентратом микрокапсул. Микрокапсулы можно отделить, промывая на сите холодной водой.

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 высокомолекулярном веществе). Снижению растворимости способствует изменение таких параметров системы, как температура, pH 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 (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 междуфазной 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.

Пример получения микрокапсул химическим методом: в масле растворяют лекарственное вещество, мономера (метилметакрилат) и инициатора полимеризации (перекись бензоила). Полученный раствор для возбуждения реакции полимеризации нагревают в течение 15–20 мин. при 55 °С и вливают в водный раствор эмульгатора. При этом образуется эмульсия типа м/в, которую выдерживают для завершения процесса полимеризации в течение 4 ч. Полученный полиметилметакрилат, нерастворимый в масле образует вокруг капель последнего оболочку. Микрокапсулы отделяют, промывают и сушат.

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.

2.4. Включение ферментов в волокна

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.

Для получения волокон первого типа различные полимеры (целлюлоза, нитроцеллюлоза и т.п.) растворяют в органическом растворителе, эмульгируют с раствором или суспензией фермента, затем смесь продавливают через мелкое сито. Образующиеся волокна представляют собой полимерные гели, которые содержат в своей структуре водный раствор фермента. На кинетические характеристики фермента, заключенного в волокна, оказывают существенное влияние диффузионные барьеры для субстрата и продукта реакции. В этой связи уровень активности фермента, включенного в волокна, ниже, чем в нативном состоянии. С другой стороны, стабильность фермента, заключенного в волокно, выше, чем фермента в растворе. В настоящее время число ферментов, иммобилизованных в волокна, достигает более 50. Волокна успешно используют и для включения мультиферментных систем.

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

Так, установлено, что присоединение экстракорпоральных шунтов, содержащих аспарагиназу, иммобилизованную в волокнах или трубках из триацетата целлюлозы и дакрона, приводило к полному удалению аспарагина из кровяного русла животных. При использовании иммобилизованных ферментов для удаления токсичных метаболитов доказано, что уреазы, включенная в волокна из триацетата целлюлозы, химически сшитая с помощью глутарового альдегида с нейлоновыми трубками, эффективно снижала уровень мочевины в крови у животных.

Осуществляются попытки использовать полые волокна или трубки в качестве протезов сосудов.

Имеются примеры успешного применения ферментов, иммобилизованных в трубках или волокнах, в медицинской практике для диагностических целей. Использование клинического анализатора с уреазой, иммобилизованной на нейлоновых трубках, показало его высокую эффективность при непрерывном определении мочевины и цитруллина в сыворотке пациентов по сравнению с традиционно применяемыми биохимическими методами. При этом иммобилизованный фермент оставался стабильным в течение 4 мес. и позволил провести более 2000 определений.

В последние годы установлено, что полые волокна, содержащие в своем составе микро- и ультрапористые мембраны, могут выполнять роль искусственных капиллярных подложек при культивировании клеточных культур млекопитающих. Реакторы, состоящие из таких волокон с соответствующими культурами, могут быть использованы как искусственные органы в виде экстракорпоральных шунтов, а также для наработки гормонов, вакцин и антител с целью их терапевтического и диагностического использования. Кроме того, показано, что мембраны полых волокон являются хорошими субстратами для роста микробных популяций. Разработка этого направления может послужить основой для создания нового типа биореактора.

2.5. Включение ферментов в липосомы

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

Таким образом, липосомы обеспечивают контролируемое высвобождение лекарственного вещества и позволяют применять его в более высоких дозах. Кроме того, липосомы имеют тенденцию накапливаться в определенных тканях (печень, селезёнка, 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 терапевтического эффекта 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 веществ в клетки путем диффузии, слияния или эндоцитоза. Заключение 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).

Липосомы в зависимости от целей исследования готовят из фосфотидилхолина (яичный лецитин). В лабораторных условиях возможно получение липосом из лецитина, выделенного из яичного желтка. В основе выделения лежит избирательное растворение лецитина в органических растворителях: яичные желтки отделяют от белка, гомогенизируют в течение 10 мин. с 400 мл ацетона и оставляют на ночь в холодильнике. Осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин. в течение 20 мин. Осадок вновь суспендируют с 400 мл ацетона и вновь отделяют центрифугированием. Осадок наносят тонким слоем на фильтровальную бумагу и высушивают до исчезновения запаха ацетона в течение 1–2 ч. Лецитин в ацетоне нерастворим, а другие липиды переходят в раствор. Высушенный порошок заливают 200 мл смеси хлороформ-метанола (1:1) или хлороформ-этанола (2:1). Проводят экстрагирование при перемешивании в течение 30 мин. Раствор центрифугируют при 3000 об/мин. в течение 20 мин. Обработку осадка повторяют. Центрифугаты объединяют и выпаривают на роторном испарителе. После выпаривания смеси фосфолипидов растворяют в 50 мл петролейного эфира, добавляют 20-кратный объем ацетона, перемешивают и оставляют на ночь. Осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера, растворяют в 50 мл петролейного эфира и повторяют осаждение. Полученную смесь растворяют в хлороформе, концентрируют до 10–20%.

Методы приготовления липосом

Приготовление липосом методом ручного встряхивания: 100 мг хроматографически чистого лецитина растворяют в 50 мл хлороформа в колбе вместимостью 200 мл и присоединяют ее к роторному испарителю. При пониженном давлении проводят выпаривание органического растворителя, при этом на стенках колбы остается пленка сухого лецитина. 5 мл 0,01 М фосфатного буферного раствора (рН 7,5), содержащего полученный материал вносят в колбу и оставляют на 1–2 ч при комнатной температуре для набухания фосфолипидов. Для получения гомогенной суспензии липосом в колбу вносят несколько стеклянных бусинок и энергично встряхивают в течение 5 мин. Если взвесь озвучить при следующих параметрах процесса: частота – 20 кГц, мощность – 200

Вт, экспозиция – 30 мин., то образуются очень мелкие, однородные по размеру липосомы. Данный метод позволяет вводить в липосомы низкомолекулярные вещества.

Приготовление липосом методом впрыскивания: 50 мг яичного лецитина растворяют в 1 мл 96 % этанола. Этанольный раствор липидов набирают в шприц и быстро вводят в 15 мл раствора вводимого материала (в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,5)). Полноценное образование липосом происходит при температуре водной фазы выше температуры фазового перехода фосфолипидов с постоянным перемешиванием на магнитной мешалке, игла шприца должна быть максимально погружена в водную фазу. При этом включается 2,5 % материала, для увеличения степени включения полученный препарат липосом перед отделением от невключившегося материала замораживают при температуре -20 – -40 °С. Через 48 ч нагревают до комнатной температуры и производят отделение липосом от оставшегося материала. В результате замораживания и оттаивания материала увеличивается процент включения материала в 2,5–3,5 раза.

Приготовление липосом методом выпаривания и обращения фаз: 30 мг липидов растворяют в 3 мл эфира или смеси эфира с хлороформом (2:1). В круглодонную колбу роторного испарителя вносят 1 мл раствора включаемого материала в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,5) и раствор липидов в органической фазе, затем обрабатывая полученную смесь ультразвуком (частота – 20 кГц, мощность – 200 Вт) получают эмульсию типа «вода в масле». Колбу с эмульсией присоединяют к роторному испарителю и постепенно удаляют органический растворитель. Об окончании выпаривания судят по образованию геля в колбе и исчезновению запаха органического растворителя. Колбу снимают с испарителя, а к образовавшемуся гелю прибавляют 5 мл 0,01 М фосфатного буфера и встряхивают до образования гомогенной суспензии липосом. Липосомы характеризуются высокой степенью включения – до 50–60 %.

Методы отделения липосом от невключившегося материала. Диализ применяют для отделения липосом от невключившегося низкомолекулярного материала, молекулы которого способны проходить через диализную мембрану. Суспензию липосом помещают в диализный целлофановый мешок. В качестве диализирующего раствора используют буфер, взятый для приготовления липосом в объеме, превышающем объем суспензии липосом в 50–100 раз. Диализ осуществляют на холоде (4 °С). Для полного удаления материала, невключающегося в липосомы, достаточно 3–4 смен буфера.

Ультрацентрифугирование обеспечивает одновременное отделение невключившегося материала и концентрирование липосом. Недостатком данного метода является: продолжительность и трудоемкость.

Ультрафильтрация применяется с целью концентрирования взвеси липосом.

Методы контроля образования липосом: определение процента включения материала в липосомы проводят, используя количественные методы анализа действующих веществ. Для этой цели определяют содержание действующего вещества, взятого для включения в липосомы, содержащего липосом, а также невключающегося вещества. Невключающийся материал отделяют от липосом методом диализа и оценивают количественно. Для определения содержания вещества в липосомах их предварительно разрушают детергентами – тритоном X-100 в концентрации 0,5–1 %. Если материал, включенный в липосомы, не инактивируется хлороформом, то липосомальный препарат обрабатывают хлороформом. При этом температура среды составляет 4 °С. К 4 объемам взвеси липосом добавляют 1 объем хлороформа и интенсивно встряхивают в течение 5 мин. По содержанию действующего вещества в липосомах рассчитывают процент его включения к общему количеству вещества, взятого в опыт.

Сферы применения иммобилизованных ферментов

В настоящее время известны реакции ферментативного превращения практически всех основных классов органических соединений. Особенно успешно биокаталитические приемы применяются в таких процессах, как получение оптически активных аминокислот,

органических кислот; модификация антибиотиков, стероидных соединений, алкалоидов; синтез пептидов, простагландинов, олиго- и полинуклеотидов, нуклеозидтрифосфатов; введение радиоактивной метки в белки, пептиды, аминокислоты и нуклеиновые кислоты; получение фосфолипидов и переработка растительного липидного сырья; специфическое расщепление биополимеров и т.д.

I. Применение иммобилизованных ферментов в медицинской практике

Иммобилизованные ферменты – основа одного из главных направлений современной биотехнологии. В настоящее время с их помощью уже производятся в больших количествах многие ценные продукты. В первую очередь, это разнообразные БАВ. Так, в медицинской практике активно используются индивидуальные аминокислоты, но, как правило, при их химическом синтезе получается смесь природной и неприродной (левой и правой) форм аминокислоты, а организм может усваивать только природную, левую форму. Разделить такие смеси проще с помощью ферментов.

Широко используется в медицине способность ферментов реагировать на строго определенные вещества – на этом основаны новые высокочувствительные методы анализа, применяемые, в частности, в диагностике. Так, если человек болен, то его иммунная система вырабатывает определенные антитела – с помощью ферментов можно их определить; при этом можно обнаружить и сами возбудители заболевания.

Ферменты значительно упрощают анализ крови: если для биохимического анализа необходимо взять целую пробирку крови, то разработанный в последние годы иммуноферментный метод позволяет ограничиваться всего одной каплей, чтобы определить содержание около 50 веществ одновременно.

Иммобилизованные ферменты находят применение и в качестве лекарственных препаратов. Так, группа ученых под руководством академика Чазова Е.И. создала иммобилизованный ферментный препарат стрептодеказы для растворения тромбов при лечении инфаркта миокарда, после введения которого тромб, если его захватить вовремя, почти бесследно исчезает. Это очень важное и серьезное достижение ферментной технологии.

I.1. Применение иммобилизованных ферментов при производстве полусинтетических β -лактамных антибиотиков

Значительное влияние на развитие медицины оказало открытие пенициллина. Природные пенициллины вырабатываются некоторыми видами зеленой плесени (*Penicillium*). Они являются производными 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), а именно амиды, образованные разными органическими кислотами и аминогруппой 6-АПК. При этом сама 6-АПК обладает незначительной антибиотической активностью.

Важный элемент строения 6-АПК – наличие β -лактамного цикла, характерного и для других антибиотиков (например, цефалоспоринов). Вследствие наличия данного структурного элемента рассматриваемые соединения относят к классу β -лактамных антибиотиков.

Оказалось, что при введении в среду, на которой растет *Penicillium chrysogenum*, карбоновых кислот или их производных преимущественно образуется тот пенициллин, который содержит боковую цепь введенной кислоты. Полученные таким способом пенициллины называют биосинтетическими. Данный метод достаточно эффективен. Так, в присутствии фенилуксусной кислоты и пара-оксифенилуксусной кислоты получают бензил- и пара-оксибензилпенициллины соответственно, а в присутствии феноксиуксусной кислоты – феноксипенициллин, обладающий ценным свойством: он устойчивее к расщеплению под действием кислот, поэтому его можно принимать внутрь в форме таблеток.

Однако многие перспективные пенициллины получить биосинтетическим путем не удастся из-за того, что вводимые предшественники вовлекаются в неконтролируемые

побочные процессы. Выход был найден, когда биохимики предложили получать полусинтетические пенициллины. 6-АПК вступает в реакцию ацетилирования хлорангидами карбоновых кислот, образуя при этом любые требуемые аналоги пенициллина.

Химический синтез 6-АПК слишком трудоемок для промышленного использования. Экономичный источник 6-АПК – биосинтетический бензилпенициллин, гидролиз которого приводит к ее образованию. Однако химический гидролиз бензилпенициллина идет не по амидной связи с 6-аминогруппой, а по более лабильной амидной связи напряженного β -лактамного кольца. В данном случае на помощь приходит уникальная специфичность ферментного катализа: под действием фермента пенициллинамидазы происходит расщепление только требуемой связи и не затрагивается β -лактамное кольцо.

В результате изучения кинетики и механизма действия пенициллинамидазы, способов ее иммобилизации и стабилизации установлено, что она легко включается в ПААГ, модифицированный глутаровым альдегидом, и обладает высокой стабильностью. В последние годы процесс с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы внедрен в производство, что открыло доступ к широкомасштабному производству многих полусинтетических пенициллинов, обладающих высокой устойчивостью в кислых средах, высокой активностью по отношению к большому количеству микроорганизмов, низкой токсичностью для организма человека, устойчивостью к ферменту β -лактамазе, гидролизующему (в отличие от пенициллинамидазы) расщепление лактамного цикла, приводящее к потере антибиотической активности. Первое крупнотоннажное производство в СССР, основанное на применении иммобилизованных ферментов, вступило в строй в 1976 г. на Саранском заводе медицинских препаратов: здесь с помощью пенициллинамидазы налажен выпуск 6-АПК, необходимой для синтеза ряда антибиотиков пенициллинового ряда. В создании данной технологии принимали участие сотрудники ВНИИ антибиотиков, Таллиннского политехнического института, МГУ, а также специалисты Рижского и Саранского заводов медпрепаратов.

Кроме того, пенициллинамидазе присуща уникальная специфичность и по отношению к гидролизу цефалоспоринов: отщепляется только боковая группа, а β -лактамный цикл остается не тронутым. Это использовано для создания второго технологического процесса – получения 7-аминодезацетоксицефалоспориновой кислоты (7-АДЦК) гидролизом соответствующего фенилацетатного производного. Таким образом, открывается путь к получению очень перспективных лекарственных средств на основе полусинтетических цефалоспоринов.

Следует отметить, что пенициллинамидаза, как и любой химический катализатор, не смещает равновесия, а только увеличивает скорость его достижения. Данный фермент катализирует как прямую реакцию (гидролиз), так и обратную (синтез антибиотика). Это обстоятельство и используется для ферментативного синтеза целевого продукта. Водный раствор, содержащий 6-АПК или 7-АДЦК, и соответствующую органическую кислоту, приводят в контакт с иммобилизованной пенициллинамидазой. Через некоторое время в растворе образуется равновесное количество антибиотика. Преимущество данного метода заключается в его простоте, а основной недостаток – низкая скорость процесса, обусловленная его высокой специфичностью.

1.2. Разделение рацематов аминокислот

Аминокислоты используют в медицине, сельском хозяйстве, прикладной микробиологии и во многих отраслях науки. Они необходимы как компонент питания, при недостаточности какой-либо из природных аминокислот, как составная часть внутреннего питания больных людей, для создания лекарственных и биохимических соединений и т.д. Все аминокислоты усваиваются в организме только в L-форме, попадание в организм D-формы крайне нежелательно.

L- и D-формы – энантиомеры, разновидность изомеров, являющихся зеркальными отражениями друг друга. Смесь L- и D-форм в равных количествах называют рацемической. Ей присущи все свойства чистого вещества, т.к. L- и D-изомеры во всех отношениях идентичны, кроме тех случаев, когда они вступают во взаимодействие с другим асимметрическим объектом.

Химический синтез аминокислот – давно решенная задача. Однако в результате химического синтеза получают рацемическую смесь аминокислот, следовательно, необходима дополнительная стадия разделения энантиомеров. Чисто химически это сделать очень трудно. В то же время ферменты способны «узнавать», а значит и по-разному реагировать на L- и D-формы аминокислот или их производные. При расщеплении энантиомеров фермент, как правило, быстро реагирует с L-изомером, совершенно не затрагивая D-форму. Это обстоятельство, т.е. энантиоселективность, положено в основу ферментативного разделения рацемических смесей аминокислот.

Вероятно, первым биореактором, в котором использовали иммобилизованный фермент в промышленном масштабе, был именно биореактор для разделения рацемических смесей D, L-аминокислот, введенный в эксплуатацию в Японии (1969 г.), с аминокислотазой, иммобилизованной на сефадексе. С 1969 г. таким путем осуществляется промышленное производство таких незаменимых аминокислот, как: L-метионина, L-фенилаланина, L-валина, L-аланина.

Промышленный процесс реализуется следующим образом: исходными веществами служат модифицированные по аминокислотной группе D, L-аминокислоты, полученные в результате химического синтеза. На эту смесь воздействуют иммобилизованной аминокислотазой, которая гидролизует амидную связь только у L-изомера. В результате образуется свободная L-аминокислота, обладающая более высокой растворимостью, чем D-амидное производное. Образовавшаяся смесь свободной L-аминокислоты и ацилированной D-аминокислоты разделяют физическими методами, основанными на их различной растворимости. D-изомер, оставшийся после разделения, обычно при повышенной температуре рацемизируют (превращают в исходную D, L-смесь) и снова пускают в реакцию с аминокислотазой. В итоге добиваются высокой концентрации L-аминокислоты. Фермент аминокислотаза малочувствителен к типу аминокислоты, поэтому одна установка с иммобилизованным ферментом может использоваться для получения разных L-аминокислот. Иммобилизацию аминокислотазы проводят адсорбцией на специально подобранном полимерном носителе. Когда ее активность снижается, в биореактор добавляют свежую порцию фермента, которая тут же адсорбируется на носителе.

1.3. Применение перевязочных средств с иммобилизованными лекарственными средствами

Для лечения гнойных ран предложено множество разных способов и схем, но до сих пор эта задача остается сложной и не до конца решенной. Большое количество больных с острыми воспалительными заболеваниями, гнойными послеоперационными осложнениями, а также преобладание в ране микрофлоры, малочувствительной или нечувствительной к антибиотикам, заставляют искать новые способы терапии.

Активное хирургическое лечение гнойных ран не исключает традиционного лечения под повязкой, весьма распространенного в клинической практике. Однако ватно-марлевые перевязочные средства нередко оказываются индифферентными к раневому процессу, а порой и ухудшают его лечение. Ворсистость, высокая степень адгезии к ране, отсутствие дренирующих свойств при сорбции гнойного отделяемого и ряд других параметров не обеспечивают благоприятных условий для заживления ран.

Среди множества методов местного лечения гнойных ран одним из наиболее признанных является сорбционно-аппликационная терапия, основанная на очищении инфицированных ран за счет физической сорбции. С течением времени стали очевидны преимущества сорбционно-аппликационного метода: эффективность, доступность,

простота, относительная экономичность, возможность влиять на течение раневого процесса за счет дифференциации сорбентов, отсутствие аллергических и других побочных явлений. Все это стимулировало развитие исследований в области создания новых видов сорбционных материалов.

Создание перевязочных средств на основе биологически активных полимерных материалов ознаменовало новую эру в лечении ран, т.к. они позволяют вводить лекарственные средства непосредственно в гнойную рану, а главное – обеспечивать терапевтически эффективную и постоянную их концентрацию в очаге гнойной инфекции.

Перспективным направлением является иммобилизация лекарственных средств на матрице, обеспечивающей пролонгированную подачу лекарственного препарата при однократном местном применении. Рассмотрим некоторые примеры.

По мнению Самодумовой И.М. с соавт. (1988 г.), полиметилсилоксан (ПМС) по своим структурно-сорбционным свойствам отличается рядом преимуществ перед другими сорбентами и пригоден в качестве матрицы, т.к. обладает высоким сродством к веществам органической природы, и при иммобилизации на нем некоторые вещества проявляют гидрофильные свойства, что активизирует местную детоксикацию пораженных тканей. Недостаток ПМС заключается в том, что при аппликации на рану происходит его высушивание, исчезает влажная среда, необходимая для регенераторных процессов. Местное применение антибиотиков, ферментов, анестетиков, иммобилизованных на ПМС, позволяет сократить продолжительность лечения и пребывания в стационаре, как минимум, на 40–50 %. Поверхность ожога или трофической язвы становится пригодной к пластике в 2 раза быстрее, чем при лечении обычными методами, приживаемость лоскутов кожи составляет 90–98 %. На 2–3-и сутки от начала лечения отмечают резкое уменьшение отека окружающих тканей, количества раневого отделяемого, длительное и стойкое снижение интенсивности болевого синдрома.

С целью подавления имеющейся в ране микрофлоры, предупреждения вторичного инфицирования, борьбы с ожоговым шоком и общей интоксикации на всех этапах медицинской эвакуации предложен углеродминеральный сорбент СУМС-1, поглощающий грамположительную и грамотрицательную микрофлору, высоко- и среднемoleкулярные токсины, продукты распада микроорганизмов и тканей. Фурагин, йодпирин и диоксидин, адсорбированные на СУМС-1, воздействуют на большинство известных микроорганизмов в течение 2–3 суток, что важно при транспортировке пострадавших. Аппликационно-сорбционные способы лечения гнойных ран мягких тканей и ожогов позволяют в 2–4 раза быстрее снизить количество микроорганизмов в 1 г тканей и в 3–4 раза сократить процент присоединения вторичной инфекции.

Исследованиями Саркисяна А.Г. и соавт. установлено, что шарики полиметилметакрилата «Септопал», применяемые при лечении гнойных осложнений у травматических и ортопедических больных, высвобождают входящий в его состав гентамицин в таком количестве, которое необходимо для подавления местного антибактериального действия.

В числе биологически активных гидрофильных сорбентов следует отметить лизосорб, созданный на основе сшитого поливинилового спирта с иммобилизованным на нем террилитином и антибиотиками неомицином и полимиксином. Ряд публикаций свидетельствуют о высоком терапевтическом эффекте данного сорбента при лечении гнойно-некротических ран (послеоперационных нагноений, трофических язв и ожогов).

Накопленные данные свидетельствуют о перспективности использования многочисленных вариантов местной сорбционной терапии для лечения гнойных ран различного генеза и локализации.

II. Имобилизованные ферменты и лечебное питание

Имобилизованные ферменты успешно используются и в химических процессах пищевой промышленности, в частности для получения глюкозы из крахмала, глюкозо-фруктозного сиропа, улучшения качества молока путем удаления из него лактозы и т.п.

Благодаря ферментативным методам начинает стираться грань между привычными пищевыми технологиями и промышленностью тонкого органического синтеза. Так, фирма «Cetus Corporation» в США разработала процесс, в результате которого образуется фруктоза (пищевой продукт) и окиси алкенов (полупродукт органического синтеза). Для этого глюкозу, полученную из крахмала, окисляют в присутствии иммобилизованной пиранозо-2-оксидазы до глюкозона, который затем с помощью водорода на палладиевом катализаторе превращают во фруктозу. На первой стадии в качестве побочного продукта образуется перекись водорода, используемая далее для микробиологического окисления этилена или пропилена в соответствующие эпоксиды. Таким образом, в данном технологическом цикле тесно переплетены между собой 3 синтетических метода: ферментативный (первая стадия), химический (вторая стадия) и микробиологический (третья стадия), сочетание которых обеспечивает высокую экономичность производства.

II.1. Удаление лактозы из молока с помощью иммобилизованных ферментов

Лактоза, присутствующая в молоке, легко усваивается детьми, особенно в младенческом возрасте, а вот у взрослых людей иногда наблюдается интолерантность к молоку, что обусловлено отсутствием лактазы в тонком кишечнике. После потребления молока такие люди страдают расстройствами желудка, вздутием и болями в нижней части живота. До сих пор нет ясности, является ли отсутствие лактазы наследственным. Данное заболевание особенно широко распространено в развивающихся странах, а ведь именно население этих стран особенно нуждается в таком экономически доступном и одновременно полноценном продукте питания, как молоко. Для того, чтобы у людей с подобными отклонениями молоко усваивалось, оно подвергается ферментативной обработке с помощью иммобилизованной лактазы.

В Италии с 1975 г. работает завод по переработке молока с помощью иммобилизованной лактазы в диетическое безлактозное молоко. Ежедневно предприятие выпускает 800 л данного диетического продукта.

Более того, осуществляют ферментативный гидролиз лактозы с целью дополнительного получения глюкозы. Дело в том, что при свертывании молока до 75 % лактозы остается в сыворотке, которую пропускают через колонну с иммобилизованной лактазой и после дополнительной очистки получают водный раствор смеси глюкозы и галактозы, который непосредственно можно использовать в пищевой промышленности.

II.2. Превращение глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы

Фруктоза – изомер глюкозы. Ее использование вместо сахара сулит массу преимуществ. Из-за большей сладости (фруктоза слаще глюкозы почти в 2 раза) ее можно применять в меньших количествах, что ведет к снижению калорийности продуктов, а это важно для диетологии. Фруктозу в отличие от глюкозы и сахарозы могут потреблять больные сахарным диабетом. Дело в том, что пути превращения фруктозы в человеческом организме совершенно иные, нежели глюкоза, и не связаны с наличием инсулина. К тому же фруктоза менее вредна для зубов.

Несмотря на эти положительные факторы, фруктозу до последнего времени применяли ограниченно из-за отсутствия разработок ее промышленного производства. Для того, чтобы увеличить сладость глюкозы в 2 раза, достаточно было бы ее химически превратить во фруктозу, но все попытки осуществить изомеризацию глюкозы во фруктозу химическим путем с помощью промышленных катализаторов окончились неудачей, поскольку при этом неспецифически образовывались темно окрашенные побочные

продукты с плохим вкусом. Очистка фруктозы от них слишком дорогостояща. Положение изменилось в 70-х гг. XX в., когда в производстве стали применять глюкоизомеразу, катализирующую взаимопревращения глюкозы во фруктозу. Данный внутриклеточный фермент микробиологического происхождения был открыт в 1957 г.

В 1960 г. в США запатентован ферментативный процесс превращения глюкозы во фруктозу.

В 1966 г. японская исследовательская лаборатория фирмы «Шива сити» описала промышленный процесс с использованием растворимой глюкоизомеразы. При промышленной изомеризации глюкозы в качестве конечного продукта получают не одну фруктозу, а смесь глюкозы и фруктозы (глюкозо-фруктозный сироп), отличающейся высокой сахаристостью.

В 1967 г. американская фирма «Клинтон крон процессинг компани» приступила к производству глюкозо-фруктозного сиропа из глюкозы с помощью растворимой глюкоизомеразы. Однако сироп содержал всего 15 % фруктозы. Кроме того, выяснилось, что процесс с участием глюкоизомеразы может быть рентабельным только при многократном использовании данного дорогостоящего фермента. Глюкоизомераза оказалась идеальным ферментом для иммобилизации: стабильна при высоких температурах, а т.к. субстрат (глюкоза) и продукт реакции (фруктоза) – очень небольшие молекулы, то не возникает проблем с их движением по колонке с иммобилизованным ферментом. Глюкоза и фруктоза не несут электростатического заряда, поэтому глюкоизомеразу можно было адсорбировать на заряженных группировках целлюлозы. В 1968 г. концерн «Клинтон» предложил периодический метод превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованного фермента, при котором выход фруктозы составил 42 %. В 1978 г. начался новый этап в развитии данного производства. Благодаря применению новых способов разделения удалось получить 55 % глюкозо-фруктозного сиропа.

Технология превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы заключается в следующем: в колонку высотой до 5 м загружают иммобилизованный фермент, например, в виде гранул, затем непрерывным потоком пускают водный раствор глюкозы. На выходе из колонки получают глюкозо-фруктозный сироп (концентрированный водный раствор примерно равных количеств глюкозы и фруктозы), который можно использовать непосредственно или предварительно отделив фруктозу, а оставшуюся глюкозу вновь подвергнуть изомеризации до смеси фруктозы и глюкозы и т.д.

III. Ферментные электроды на основе иммобилизованных ферментов

Иммобилизованные ферменты нашли применение в аналитической практике в виде ферментных электродов (датчиков или биосенсоров). В любом ферментном электроде обязательно есть собственно электрод, слой иммобилизованного тем или иным способом фермента и, зачастую, диализная полупроницаемая мембрана, предотвращающая диффузию фермента в раствор, но пропускающая низкомолекулярные соединения к поверхности электрода. Достаточно внести электрод в раствор, содержащий специфическое по отношению к ферментному электроду вещество (субстрат), и в приэлектродном слое происходит ферментативная реакция, продукты которой определяют с помощью того или иного электрохимического устройства. Присутствие на электроде фермента-биокатализатора с высокой специфичностью действия – позволяет определять наличие и концентрацию в сложной по составу смеси подчас одного – единственного вещества. В настоящее время с помощью биосенсора можно определить 10 соединений: глюкозу, лактат, этанол, лактозу, галактозу, сахарозу, α -амилазу, α -лизин, мочевую кислоту, холин.

Иммобилизованные ферменты применяются в автоматическом анализе биологических субстратов и лекарственных веществ. Они являются рабочей частью автоматических проточных анализаторов. Ферментные электроды позволяют проводить

непрерывный анализ веществ. На основе проточных анализаторов с иммобилизованными ферментами и ферментных электродов созданы биохимические автоматы, позволяющие в течение небольшого времени проводить обследование больших контингентов людей. Ферментные электроды применяют для непрерывного контроля загрязненности окружающей среды токсическими соединениями.

В будущем иммобилизованные ферменты найдут значительно более широкое применение, в составе ферментсодержащих электродов, используемых для мониторинга *in vitro* и *in vivo*. Многие подобные системы уже сконструированы, но в клинике пока не применяются. Так, в устройстве Апдайка и Хикса глюкозооксидаза нанесена на поверхность обычного платинового электрода. При этом, чем больше кислорода потребляется в реакции: Глюкоза + Кислород = Глюконовая кислота + Перекись водорода, тем меньше количество его регистрируется внутренней частью электрода. Недостаток данного устройства – ненадежность, что не позволяет его использовать как имплантируемый аппарат для постоянной регистрации содержания глюкозы. Эта проблема связана с наличием конкурентных отношений между глюкозой и кислородом в жидкостях тела, инактивацией фермента *in vivo*, сложностью калибровки и дрейфом характеристик электрода.

Ведущиеся исследования позволяют надеяться, что, усовершенствовав такие электроды с ферментами, со временем удастся создать датчик глюкозы для автономно работающего, полностью автоматического и небольшого по размеру протеза поджелудочной железы, необходимого для лечения больных диабетом. В этой связи особенно важны последние достижения в области разработки ферментсодержащих электродов. Так, исследователи, работающие в Крэнфилдском технологическом институте Оксфордского университета и в госпитале Гая в Лондоне, разрабатывают глюкозный электрод, в котором для переноса электронов от простетической группы глюкозооксидазы на графитовый электрод используется органический медиатор (ферроцен), т.е. процесс происходит без участия кислорода, который обычно выступает в роли конечного акцептора электронов, т.е. работа электрода не связана с кислородом, и поэтому он может оказаться полезным при создании имплантируемого устройства для больных диабетом, способного работать *in vivo*.

По-видимому, основные усилия в ближайшие несколько лет будут направлены на развитие технологии биодатчиков. Ферменты могут оказаться весьма полезными для контроля за концентрацией различных веществ, интересующих клиницистов промежуточных метаболитов, лекарственных препаратов и гормонов.

IV. Применение иммобилизованных ферментов в органическом синтезе

В настоящее время многие зарубежные фирмы занимаются созданием нового направления биотехнологии, основанного на катализе с применением иммобилизованных ферментов. Среди реализованных процессов можно отметить получение L-яблочной кислоты гидратацией фумаровой кислоты с помощью фумаразы и L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония под действием аспарагиназы. В последнем случае в биореакторе объемом 1 м³ ежедневно получают 1700 кг целевого продукта. Близок к промышленному воплощению синтез еще одной ценной аминокислоты – L-триптофана из индола и пирувата аммония.

Таким образом, ферменты могут использоваться для реализации промышленных процессов получения разных химических продуктов, которые сейчас получают сложными и дорогостоящими химическими способами. Так, окись пропилена – химически активное соединение, широко использующееся для синтеза эпоксидных смол, получают в результате сложного химического синтеза, что, в свою очередь, обуславливает и высокую стоимость эпоксидных смол. Хотя недавно обозначился новый путь получения окиси пропилена – ферментативный, отличающийся высокой эффективностью и экономической доступностью.

VI.1. Применение иммобилизованных ферментов в химии полимеров

Важным является налаживание сотрудничества представителей разных специальностей: биотехнологов, биохимиков, представителей полимерной химии и т.п., т.к. многие применяемые в настоящее время носители для иммобилизации ферментов обнаружены случайно, и не всегда являются самыми лучшими носителями. Необходимо научиться подбирать оптимальные носители для определенной цели, для определенного фермента, создавать такие носители, которые будут служить не просто опорой для фермента, но и могли бы выполнять за него часть «работы», например, концентрировать субстрат в непосредственной близости от его активного центра.

IV.2. Применение иммобилизованных ферментов для переработки целлюлозы

Больше половины углерода, накапливаемого тканями растений в ходе фотосинтеза, отлагается в них в виде целлюлозы и лигноцеллюлозы. Непосредственно использовать их организмы высших животных и человека не могут, но в природе существуют эффективные ферментные системы, позволяющие мобилизовать этот углерод в виде доступных организму соединений – сахаров. Для человечества было бы важно использовать такие процессы, чтобы изменить направление фиксации углерода в растительных тканях. Проблема эта непростая, т.к. целлюлоза и лигноцеллюлоза – субстраты сложные, и хотя о ферментах, участвующих в их гидролизе, известно довольно много, но еще недостаточно, чтобы можно было управлять этим процессом или создавать новые, более эффективные ферменты. В этой области нужно приложить еще много усилий, но успешное решение данной проблемы позволит получить новый источник ценных веществ.

«Ферментные комбинаты»

Очень перспективная область ферментной технологии – 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 относительно друг друга. Таким путем удастся значительно повысить эффективность их работы: образующиеся под действием одного фермента промежуточные продукты в такой системе сразу же поступают на другой фермент, что особенно важно, когда промежуточные продукты неустойчивы и легко разрушаются в окружающей среде, т.к. в данном случае они не выходят наружу, а сразу же перерабатываются.

Усовершенствование методов иммобилизации ферментов позволяет намного увеличить их стабильность. Если прикрепить фермент к носителю не в одной точке, а в нескольких, то у него заметно повышается термостабильность. Так, если обычно фермент не выдерживает увеличение температуры более чем до 65–66 °С, то теперь он может работать при 80 °С и более. Таким путем можно создать ферменты более устойчивыми и к высокому содержанию в среде солей или органических растворителей – последнее особенно важно для увеличения эффективности синтеза пептидов.

Для работы ферментов необходимы коферменты, присутствие которых является обязательным условием активности биокатализатора. Эти вещества имеют сложное строение и их получение – дорогостоящий процесс, и при этом вводить их в реакционную среду приходится в большом избытке. В последнее время разрабатываются методы, позволяющие прикреплять молекулу кофермента непосредственно к молекуле фермента. Больше того, кофермент можно «посадить» на гибкой «ножке» (небольшой линейной молекуле) рядом с активным центром фермента: «ножка» изгибается, кофермент приближается к активному центру, срабатывает там, а потом «ножка» разгибается, кофермент окисляется в среде или на электроде и снова готов к работе. В данном случае кофермент требуется в гораздо меньшем количестве, т.к. он используется намного

эффективнее. К тому же такая система гораздо устойчивее к ингибиторам реакции, поскольку кофактор «сидит» в непосредственной близости от активного центра фермента.

Иммобилизация целых клеток микроорганизмов и растений

Для многих биокаталитических процессов удобным оказалось использование в качестве катализатора целых клеток (микроорганизмов, растений и животных). Если сравнить ферменты и клетки, содержащие эти ферменты, то с технологической точки зрения, иммобилизованные клетки в ряде случаев предпочтительнее. Прежде всего, отсутствует трудоемкая и дорогостоящая стадия выделения ферментов. Методами генной инженерии можно получить клетки с исключительно высоким содержанием необходимого фермента. В клетках ферменты часто, но не всегда, гораздо стабильнее, чем в растворе или даже на матрице после их иммобилизации. В ряде случаев, когда в иммобилизованном состоянии сохраняются метаболизм и биосинтез белка, иммобилизованные клетки способны регенерировать ферменты и тем самым поддерживать высокий уровень активности в течение продолжительного времени.

При иммобилизации клетки сохраняют основной набор биохимических систем, в частности системы регенерации кофакторов, что обеспечивает возможность проведения многоступенчатых ферментных процессов. Это позволяет реализовать сложные многостадийные синтезы с участием большого числа ферментов. Данные преимущества обусловили большой интерес к иммобилизации клеток и созданию на этой основе гетерогенных катализаторов.

Иммобилизуются как живые, так и мертвые клетки, но в последнем случае ферменты должны быть еще активными.

Разработано несколько методов иммобилизации клеток, которые условно можно разделить на 3 категории:

1. иммобилизация за счет физической сорбции на поверхности носителя;
2. химическая иммобилизация за счет образования ковалентных связей между носителем и компонентами клетки;
3. включение в природные и синтетические гидрогели.

В первом случае клетки сорбируются на поверхности твердого носителя с образованием разного рода нековалентных связей. Данный метод отличается простотой, однако не позволяет получить большую плотность заселения поверхности и тем самым ведет к относительно невысоким каталитическим активностям.

Химическая иммобилизация клеток предполагает использование разных химических бифункциональных агентов. Это позволяет получить системы с высокой каталитической активностью. Однако используемые реагенты обычно токсичны для клетки, что ведет к потере механизмов биосинтеза белка и регенерации кофакторов. В частности, для иммобилизации клеток широко используется процесс их включения в ПААГ. Процесс радикальной полимеризации, протекающий при образовании полимерного геля, идет с участием свободных радикалов, это приводит к гибели клеток, при этом сохраняется значительная доля ферментативной активности, что в ряде случаев является целью иммобилизации. Однако ожидать от клетки в данном состоянии способности проводить многостадийные синтезы не приходится.

Эффективные методы получения «живых» иммобилизованных клеток связаны с процессами 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, которые представляют собой частицы размером 1 мкм и выше, оказываются «арестованными» в матрице геля. Гели, как правило, обеспечивают высокий уровень диффузии субстратов и продуктов, а также полную невозможность для клеток покинуть матрицу геля. Процесс иммобилизации происходит в

мягких условиях, и клетки сохраняют основные физиологические функции, такие как: возможность дыхания (для аэробных организмов) и синтеза АТФ, способность к биосинтезу белка и регенерации ферментов, способность к регенерации кофакторов и осуществлению многоступенчатых синтетических процессов.

В качестве природных гелеобразователей используют полисахариды (агар, каррагенан, желатину). Синтетическим полимерным материалом, обладающим аналогичными свойствами, является поливиниловый спирт, образующий криогели при охлаждении раствора полимера за счет процессов криоструктурирования. Процесс иммобилизации клетки в криогели прост и проходит без участия каких-либо токсичных химических агентов. На первом этапе получают суспензию клеток в растворе полимера, на втором этапе путем понижения температуры осуществляют криоструктурирование с образованием гелевой структуры. Возникающие водонепроницаемые гели характеризуются устойчивостью до температуры 70–80 °С, высокой емкостью (до 10 % массы в криогелях может составлять масса клеток), высокой проницаемостью для субстратов и продуктов реакции. В процессе замораживания геля возникают микрокристаллы льда, которые при оттаивании формируют структуру пор. Полученные таким путем гетерогенные катализаторы обладают значительной стабильностью и способны сохранять каталитическую активность в течение нескольких лет. Это связано, по-видимому, с возможностями биосинтеза и регенерации ферментов.

Особые успехи в области иммобилизации клеток достигнуты в Японии. Профессору Сибате с сотр. принадлежат пионерские работы не только по иммобилизации ферментов, но и по фиксации на носителях целых клеток. Так, его группой разработан процесс синтеза аспарагиновой кислоты из фумаровой с помощью *E.coli*, иммобилизованной в геле. Таким путем ежегодно получают 600 т. аспарагиновой кислоты. При этом лишь через 120 суток активность аспартазы бактерий уменьшается вдвое. Сходный процесс с иммобилизованными клетками *Brevibacterium* позволяет ежегодно получать до 180 т. L-яблочной кислоты из фумаровой. В данных случаях используется один-единственный бактериальный фермент (аспартаза и фумараза).

Естественно, еще более пригодны иммобилизованные микроорганизмы для многоступенчатых процессов, например, широкие возможности открываются при производстве спирта с помощью иммобилизованных дрожжей. Этанол образуется из глюкозы в анаэробных условиях в результате многоступенчатой реакции, в которой используются системы регенерации АТФ и НАДФ. Японская компания «Киова Хакко» долгое время на опытных заводских установках с иммобилизованными клетками дрожжей получает 2400 л спирта в день из тростниково-сахарной массы. Производительность такого полностью автоматизированного процесса в 20 раз выше по сравнению с традиционными биореакторами периодического действия, причем затраты на электроэнергию и рабочую силу существенно ниже.

Возможности иммобилизованных клеток велики. Их можно использовать практически во всех известных в настоящее время биотехнологических процессах. По сравнению со свободноживущими клетками, иммобилизованные клетки обладают преимуществами. Так, при производстве аспарагиновой кислоты из фумаровой с помощью иммобилизованных клеток издержки производства снизились на 40 %, благодаря повышению производительности труда, экономии фондов заработной платы, автоматизации производства и повышению выхода целевого продукта.

Преимущества иммобилизованных клеток заключаются в том, что отпадает необходимость в очистке ферментов, причем активность и стабильность иммобилизованных клеток очень высока, с их участием легко осуществляются многоступенчатые процессы, при которых требуется регенерация коферментов, но с участием иммобилизованных клеток не удастся расщепить высокомолекулярные субстраты, т.к. они не могут преодолеть такого барьера, как клеточная мембрана. В этом случае можно было бы одновременно использовать клетки и внеклеточные ферменты.

Для аналитических целей можно подключить иммобилизованные клетки к сенсорам, но время измерения с помощью бактериальных сенсоров продолжительнее, чем в случае ферментных биосенсоров, вследствие длительной диффузии субстрата через мембраны клеток. Кроме того, бактериальные сенсоры менее чувствительны и часто не столь специфичны, как ферментные. Это делает ферментные сенсоры особенно удобными при определении таких сложных параметров, как общее число соединений, подвергающихся биодеградации. Для контроля состояния окружающей среды при определениях содержания кислорода в сточных водах в Японии используют микробиологический сенсор. Этот анализ занимает всего несколько минут вместо 5 дней, необходимых при традиционных определениях. Недостатком микроорганизмов является то, что в отличие от изолированных ферментов это сложные системы, причем в результате происходящего в них обмена веществ могут образовываться побочные продукты, которые должны быть впоследствии удалены. Кроме того, при применении ферментов на 1 г можно иммобилизовать приблизительно в 10 раз большую активность, чем при иммобилизации клеток, т.е. при том же количестве носителя преобразовывать больше субстрата.

Таким образом, иммобилизованные клетки в ближайшем будущем не смогут заменить иммобилизованные ферменты. Скорее, обе формы иммобилизованных на носителях биокатализаторов, дополняя друг друга, будут играть важную роль в промышленности завтрашнего дня.

Соиммобилизация

Под соиммобилизацией понимают совместную иммобилизацию различных биокатализаторов: двух или более ферментов, видов клеток, комбинаций ферментов и другие варианты.

Иммобилизация нескольких ферментов позволяет осуществить многостадийные процессы *in vitro*. Многостадийные процессы могут быть осуществлены также с использованием нескольких видов соиммобилизованных клеток, в частности смешанных культур микроорганизмов. Так, трансформация сорбозы в 2-кето-L-гулоновую кислоту, легко переводимую в результате химического окисления в аскорбиновую кислоту, происходит при участии соиммобилизованных клеток *Gluconobacter melanogenes* и *Pseudomonas syringia*.

Большое внимание уделяют соиммобилизации ферментов и клеток. При этом возможны 2 варианта:

1. клетки имеют ту же каталитическую активность, что и совместно с ней иммобилизованный фермент. Использование такой системы позволяет значительно ускорить реакцию и стабилизировать каталитическую активность;

2. клетки и фермент катализируют разные реакции. В этом случае возможно поэтапное преобразование субстрата в целевой продукт.

При соиммобилизации биокаталитических систем, в частности клеток с ферментами, встает проблема их функциональной совместимости. Так, попытка превратить крахмал во фруктозу с применением соиммобилизованных глюкоамилазы и бактериальных клеток с глюкоизомеразной активностью по схеме:



не удастся. Это объясняется несовпадением оптимумов рН для двух биокатализаторов.