

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

1. Общая характеристика иммобилизованных ферментов.
2. Классификация носителей для ферментов.
3. Классификация методов иммобилизации ферментов.
4. Применение иммобилизованных ферментов.
5. Иммобилизация клеток.

1. Общая характеристика иммобилизованных ферментов

Ферменты – вещества белковой природы и поэтому **неустойчивы при хранении**, а также **чувствительны к тепловым воздействиям**.

Кроме того, ферменты **не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции**. Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов.

Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов. Начало этому методу было положено в 1916 году, когда Дж. Нельсон и Е. Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность.

Термин «иммобилизованные ферменты» узаконен в 1971 году, и означает **любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве**.

Иммобилизация (immobilization) – фиксация низкомолекулярных лигандов, макромолекул, клеточных органелл или клеток на определенном носителе.

При **иммобилизации** фермент закрепляют на поверхности или внутри твердой подложки, которую легко удаляют из реакционной смеси после завершения ферментации. Фермент может быть использован повторно, что существенно снижает стоимость процесса.

Преимущество иммобилизации заключается в том, что **фермент** становится более стабильным, вероятно, за счет ограничения его способности денатурировать при изменениях pH, температуры и растворителей. Например, иммобилизованная глюкозоизомераза стабильна при 65 °С в течение года, тогда как в растворе она денатурирует при 45 °С за несколько часов.

Иммобилизованный фермент можно использовать для непрерывного (открытого) производства, пропуская реагенты через фермент и собирая продукт на конечном этапе.

Сущность иммобилизации ферментов – это прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему. Прикрепление фермента к носителю осуществляется адсорбционно, химической связью или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (в капсулу и тому подобное). При этом допускается прикрепление фермента только **за счет функциональных групп, не входящих в активный центр фермента и не участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса.**

Носитель фермента или матрица может иметь вид зернистого материала, волокнистой структуры, пластинчатой поверхности, пленок или тканей, полых волокон, трубочек, капсул и т. д. Имеет значение размер частиц носителя. Важно иметь большую поверхность, поэтому рекомендуются небольшие частицы диаметром 0,1-0,2 мм. Носитель фермента может быть как природное вещество, так и синтетический полимер.

Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками

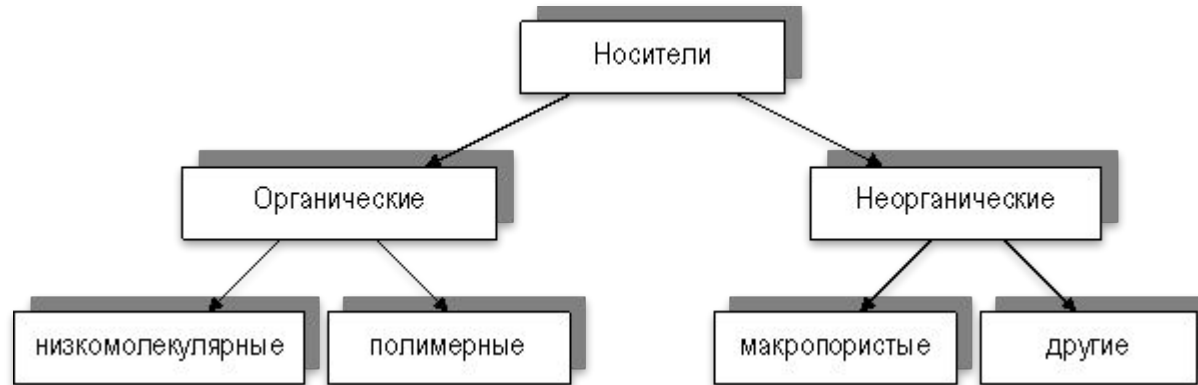
- 1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.**
- 2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.**
- 3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.**
- 4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук. Иммобилизовать ферменты можно как путем связывания на нерастворимых носителях, так и путем внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными соединениями, а также путем присоединения к растворимому полимеру.**

2. Классификация носителей для ферментов

Для получения иммобилизованных ферментов используется ограниченное число как органических, так и неорганических носителей. К носителям предъявляются следующие требования:

- высокая химическая и биологическая стойкость;
- высокая химическая прочность;
- достаточная проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность;
- возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран);
- легкая активация;
- высокая гидрофильность;
- невысокая стоимость.

Классификация носителей для иммобилизованных ферментов



Органические носители (как низко-, так и высокомолекулярные) могут быть природного или синтетического происхождения.

Природные полимерные органические носители делят в соответствии с их биохимической классификацией на 3 группы: полисахаридные, белковые и липидные.

Большое значение природных полимеров в качестве носителей для иммобилизации объясняется их доступностью и наличием реакционно-способных функциональных групп, легко вступающих в химические реакции. Характерной особенностью этой группы носителей также является их высокая гидрофильность.

Недостаток природных полимеров - неустойчивость к воздействию

Синтетические полимеры также можно разделить на группы в связи с химическим строением основной цепи макромолекул: полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные.

Наиболее часто для иммобилизации используются такие полисахариды, как целлюлоза, декстран, агароза и их производные. Целлюлоза гидрофильна, имеет много гидроксильных групп, что позволяет модифицировать её, замещая эти группы.

Широко распространены носители на основе декстрана, выпускаемые под названием «сефадексы». При высушивании они легко сжимаются, в водном растворе сильно набухают. В этих носителях размер пор в геле регулируется степенью сшитости. К группе **декстранов** относят и крахмал.

Хорошим носителем считается **агар**. Его свойства улучшаются после химической сшивки, например, диэпоксидными соединениями. Такой агар становится устойчивым к нагреванию, прочен, легко модифицируется.

Белки в качестве носителей обладают рядом достоинств: вместительны, способны к биodeградации, могут применяться в качестве тонкой (толщиной 80 мкм) мембраны. Иммобилизацию ферментов на белковых носителях можно проводить как в отсутствие, так и в присутствии сшивающих агентов. К недостаткам белков в качестве носителей относят их высокую иммуногенность (**за исключением коллагена и фибрина**). Наиболее часто для иммобилизации используются структурные (кератин, фибрин, коллаген), двигательные (миозин) и транспортные (альбумин) белки.

Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, для получения гелей, микрокапсул. Полимеры на основе стирола применяются для сорбционной иммобилизации.

Очень интересную группу представляют полиамидные носители. Это группы различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой -C(O)-NH-. Например, полимеры на основе N-винилпирролидона используются для получения **иммобилизованных ферментов, способных медленно распадаться в организме**. Кроме того, **они биологически инертны**, что особенно важно при использовании в медицинских целях.

Существенным **недостатком** большинства полимерных носителей является их способность накапливаться в организме. В этом отношении предпочтение отдается природным полимерам, которые гидролизуются ферментами.

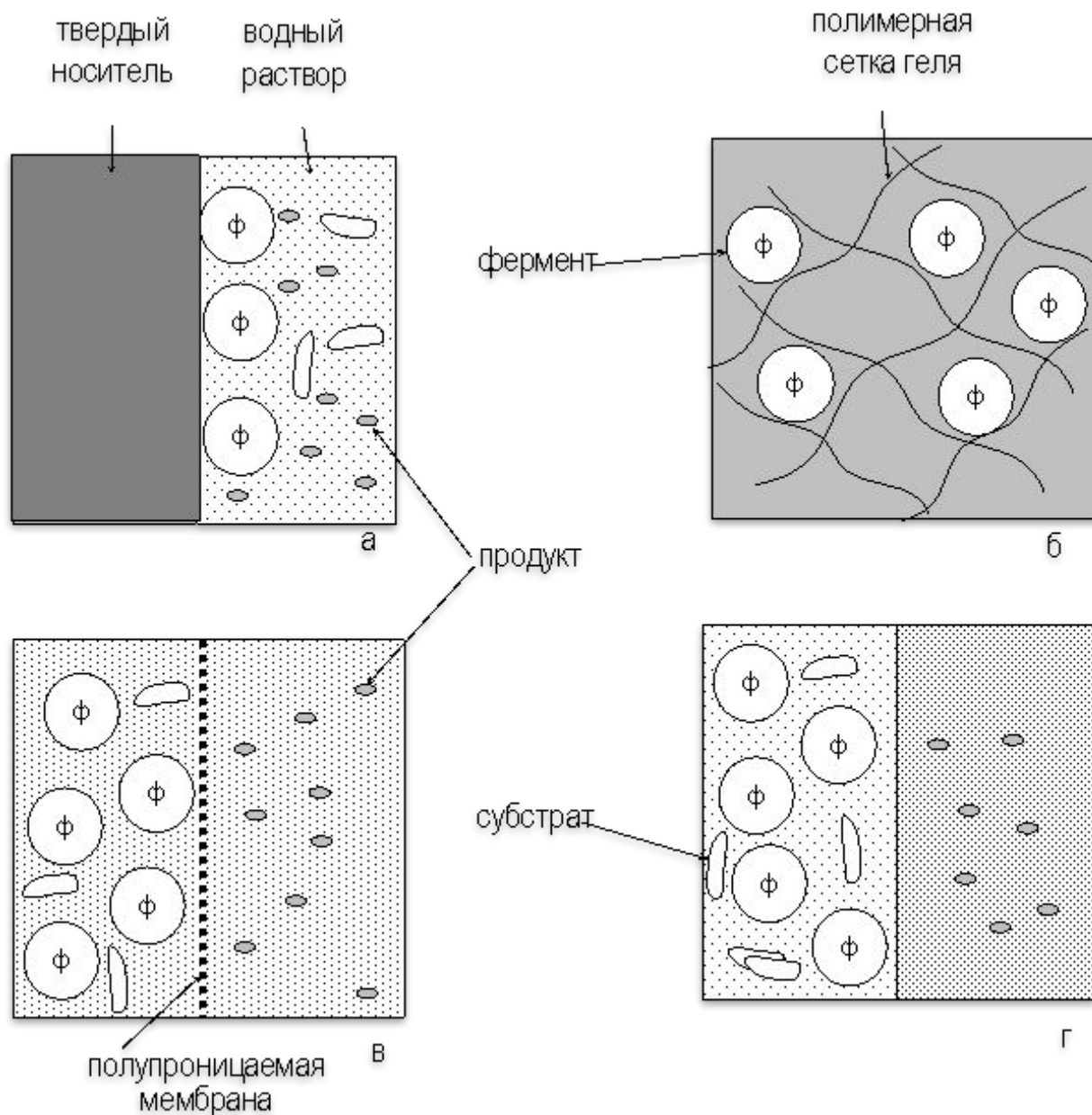
3. Классификация методов иммобилизации ферментов

Существует два основных метода иммобилизации ферментов:
физический и химический.

Физическая иммобилизация ферментов представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями.

Существует **четыре типа связывания** ферментов:

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включение в поры геля;
- пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны);
- включение в двухфазную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из фаз.



Способы иммобилизации ферментов:

а – адсорбция на нерастворимых носителях,

б – включение в поры геля,

в – отделение фермента с помощью полупроницаемой мембраны,

г – использование двухфазной реакционной среды

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из существующих способов иммобилизации ферментов, начало ей было положено **еще в 1916 г.**

Этот способ достаточно прост и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. После отмывки неадсорбировавшегося белка иммобилизованный фермент готов к использованию. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности молекулы фермента. Взаимодействия с носителем могут оказаться настолько сильными, что сорбция биокатализатора может сопровождаться разрушением его структуры.

Преимуществом метода адсорбционной иммобилизации является доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в роли носителей. Им также можно придать любую конфигурацию и обеспечить требуемую пористость. Важным фактор - простота применяемых методик. При адсорбционном связывании можно решить и проблему очистки фермента, так как связывание белка с носителем во многих случаях достаточно специфическое. К сожалению, прочность связывания фермента с носителем не всегда достаточно высока, что ограничивает применение метода.

К недостаткам адсорбционной иммобилизации следует отнести отсутствие общих рекомендаций, позволяющих сделать правильный выбор носителя и оптимальных условий иммобилизации конкретного фермента.

Иммобилизации ферментов путем включения в гели. Суть этого метода иммобилизации состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой обычно приходится значительная часть всего объема геля. Например, широко применяемые гели полимеров акриловой кислоты в зависимости от концентрации полимера и его природы содержат от 50 до 90% воды.

Метод универсален, применим для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и клеток. Фермент, включенный в гель, **стабилен, надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу.** В то же время, эта матрица может создавать значительные препятствия для диффузии субстрата к ферменту, снижая каталитическую эффективность иммобилизованного препарата, поэтому для высокомолекулярных субстратов данный метод иммобилизации не применим вообще.

Для иммобилизации ферментов в геле существует два основных способа.

1 способ. Фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. В реакционную смесь часто добавляют также бифункциональные (образующие в молекуле две двойные связи) сшивающие агенты, которые придают образующемуся полимеру структуру трехмерной сетки. Фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. В реакционную смесь часто добавляют также бифункциональные (образующие в молекуле две двойные связи) сшивающие агенты, которые придают образующемуся полимеру структуру трехмерной сетки.

2 способ. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние. Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя.

Общий принцип **иммобилизации ферментов с использованием мембран** заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой.

К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получают нити) и включение в липосомы.

Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента. Метод, как и предыдущий, **достаточно универсален**, т.е. применим как ферментам, так и к клеткам, а также их фрагментам. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембраны удается избежать значительных диффузионных ограничений скорости ферментативных реакций.

Основной недостаток мембранных систем - невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

При **иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы** достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативного превращения распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в этих фазах. Природа фаз подбирается таким образом, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует. После завершения реакции эту фазу отделяют и извлекают из нее продукт, а фазу, содержащую фермент, вновь используют для проведения очередного процесса.

Одним из **важнейших преимуществ** систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

Главным отличительным признаком **химических методов иммобилизации** является то, что путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем.

Препараты иммобилизованных ферментов, полученные с применением химических методов, **обладают по крайней мере двумя важными достоинствами. Во-первых,** ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность образующегося конъюгата. При широком варьировании таких условий, как pH и температура, фермент не десорбируется с носителя и не загрязняет целевых продуктов катализируемой им реакции. Это особенно **важно при реализации процессов медицинского и пищевого назначения**, а также для обеспечения устойчивых, воспроизводимых результатов в аналитических системах.

Во-вторых, химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность.

При сопоставлении различных приемов иммобилизации химические методы для крупномасштабных биотехнологических процессов кажутся малопривлекательными из-за сложности и дороговизны.

В промышленных процессах обычно используются те или иные методы физической иммобилизации.

4. Применение иммобилизованных ферментов

Важный вклад иммобилизованные ферменты внесли в тонкий органический синтез, в анализ, в медицину, в процессы конверсии энергии, в пищевую и фармацевтическую промышленности.

Для синтетической органической химии важно то, что в двухфазных реакционных средах фермент сохраняет каталитическую активность даже при исключительно малом содержании воды, поэтому равновесие катализируемой реакции (выход продукта) экспериментатор может регулировать в широких пределах, подбирая нужный органический растворитель.

В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Иммобилизационные подходы способствуют решению проблемы направленного транспорта лекарств в организме.

В медицине иммобилизованные ферменты используются также как лекарственные препараты, особенно в тех случаях, когда необходимо локальное воздействие. Кроме того, биокатализаторы широко используются в различных аппаратах для перфузионной очистки различных биологических жидкостей. Возможности и перспективы использования в медицине ферментов в иммобилизованном состоянии гораздо шире, чем достигнутые на сегодняшний день, именно на этом пути медицину ждет создание новых высокоэффективных методов лечения.

Иммобилизованные ферменты вносят ощутимый вклад в осуществление фотолиза воды и в биоэлектрокатализе.

Заслуживает внимание и использование иммобилизованных ферментов в процессах переработки лигноцеллюлозного сырья.

Иммобилизованные ферменты могут использоваться и как усилители слабых сигналов. На активный центр иммобилизованного фермента можно подействовать через носитель, подвергая последний ультразвуковой обработке, механическим нагрузкам или фотохимическим превращениям. Это позволяет регулировать каталитическую активность системы фермент - носитель под действием механических, ультразвуковых и световых сигналов. **На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии.**

Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов **внедрены прежде всего в пищевую и фармацевтическую промышленность.** В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут процессы получения глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L- аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и других продуктов.

5. Иммобилизация клеток

Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ как перед иммобилизованными ферментами, так и перед свободными клетками:

- отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов;
- снижение затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- более высокая активность и стабильность;
- возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных процессов;
- способность к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов.

Для иммобилизации могут быть использованы клетки в различном состоянии: живые и поврежденные в различной степени. Одностадийные реакции могут осуществлять и живые, и поврежденные клетки. Полиферментные реакции проводят с применением живых клеток, которые могут длительное время регенерировать АТФ и коферменты (НАДФ, НАД).

Методы иммобилизации клеток схожи с методами иммобилизации ферментов.

Химический метод основан на образовании ковалентных связей с активированным носителем, на поперечной сшивке клеток за счет активных групп в клеточной оболочке с бифункциональными реагентами (например, глутаровым альдегидом).

К физическим методам относятся адсорбция и агрегация.

Иммобилизация клеток путем включения в различные гели, мембраны, волокна основана на химических и физических взаимодействиях. Химические взаимодействия используются реже по сравнению с другими методами и **малопригодны для иммобилизации живых клеток**. Гораздо большее распространение получило включение клеток в состав гелей, мембран и волокон. При таком способе иммобилизации клетки могут сохранять жизнеспособность и в присутствии питательной среды размножаться в приповерхностных слоях гелей.

Два основных вида фосфолипаз:

A₂ – животного происхождения (поджелудочная железа свиньи). Отщепляет жирную кислоту во втором положении.

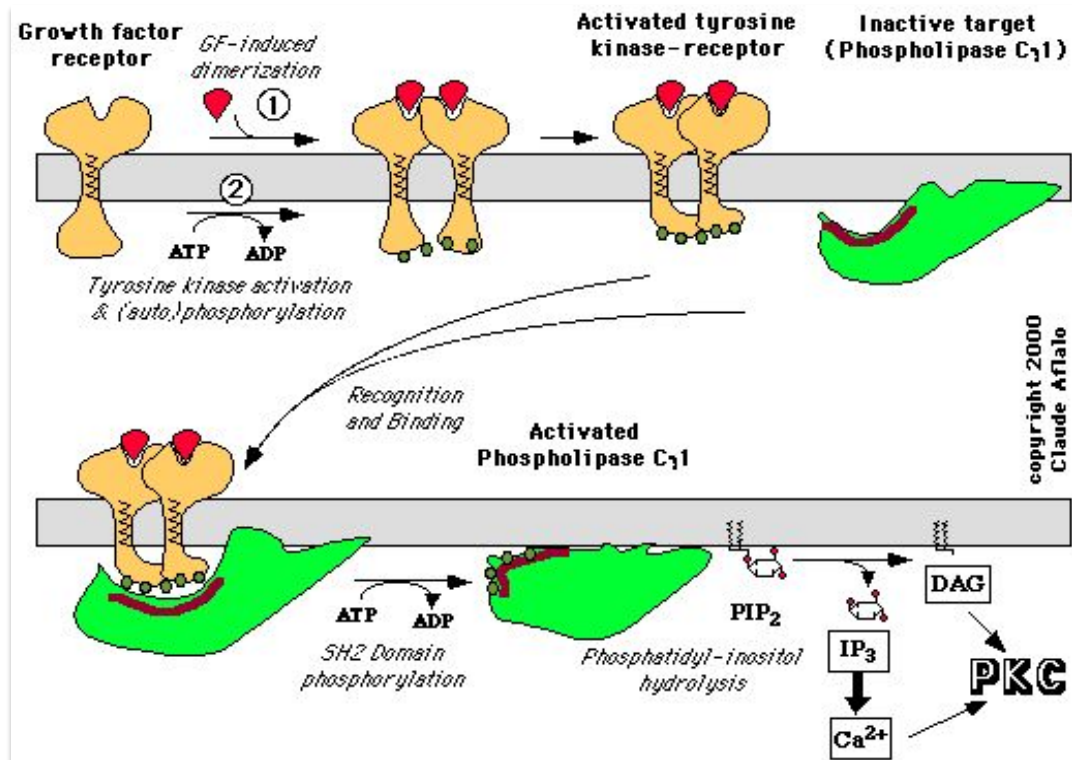
A₁ – микробного происхождения (грибы рода *Aspergillus oryzae*). Отщепляет жирную кислоту в первом положении.

Панкреатическая фосфолипаза A₂ относится к ферментам пищеварения и участвует в переваривании липидов пищи. Фосфолипазы яда участвуют в обездвиживании жертвы за счёт лизиса её клеток.

Внутриклеточные фосфолипазы, также как и внеклеточные, относятся к кальций-зависимым ферментам. Структурно они сильно отличаются от секретируемых фосфолипаз. Как правило, они значительно крупнее (более 700 аминокислот) и содержат С2 домен, который направляет фермент к клеточной мембране. Эти фосфолипазы в основном участвуют в клеточных сигнальных путях (таких как воспалительная реакция). Под действием фосфолипаз A₂ в клетке может образовываться арахидоновая кислота, предшественник эйкозаноидов, таких активных сигнальных молекул как лейкотриены и простагландины.

Грамотрицательные бактерии содержат на внешней мембране фосфолипазы A₂ с широким спектром специфичности. В кишечной палочке (*Escherichia coli*) этот фермент участвует в выбросе токсина бактериоцина из клетки за счёт повышенной проницаемости мембраны при увеличении уровня лизофосфолипидов и жирных кислот в мембране.

С развитием генной технологии было много интереса к экспрессии фосфолипазы A_2 . Первыми рекомбинантными микроорганизмами, несущими ген PLA_2S млекопитающих, были дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae*. Уровни экспрессии были слишком низкими, что является не актуальным для промышленности. Попытки получить высокий уровни экспрессии были предприняты с использованием мицелиарных грибов, таких как *Aspergillus*, секретирующие ряд ферментов в больших количествах.



Механизм воздействия фосфолипазы A₂ скорее всего заключается в повышении взаимодействия между белками и фосфолипидами, поэтому PLA₂ повышает устойчивость эмульсии. После обработки куриного желтка наблюдается структурная и функциональные изменения липопротеинов низкой плотности.

Вопросы для самоконтроля:

1. Дать определение ферментам.
2. Дать определение иммобилизации.
3. Сущность иммобилизации ферментов.
4. В чем преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками?
5. Классификация носителей для иммобилизованных ферментов.
6. Назовите основные методы иммобилизации ферментов.
7. Назовите типы связывания ферментов.
 - Иммобилизация ферментов путем включения в гели.
1. Применение иммобилизованных ферментов.
2. В чем преимущества иммобилизации клеток перед иммобилизованными ферментами?
3. Назовите два основных вида фосфолипаз.