

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,  
стандартизації та біотехнології**

**Кафедра генетики, годівлі тварин та біотехнології**

### **Імобілізовані ферменти і клітини**

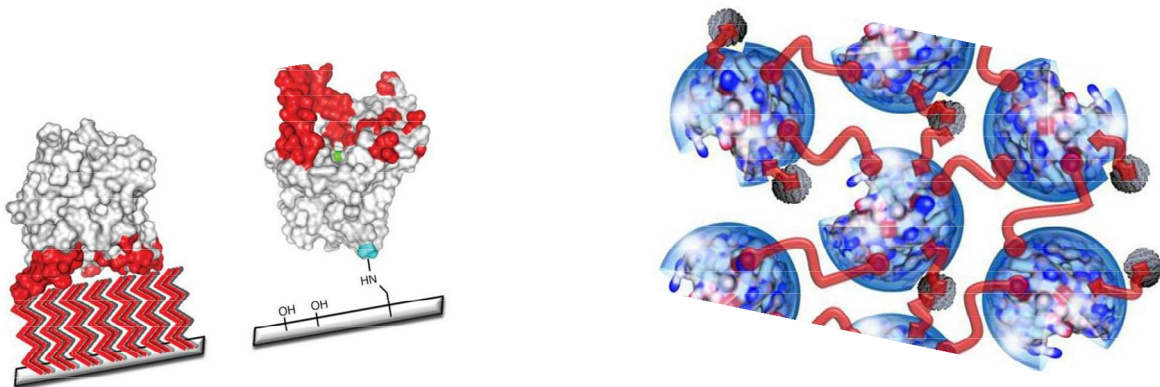
**методичні рекомендації**

**для самостійного вивчення дисципліни**

**і виконання лабораторно-практичних робіт**

**для здобувачів вищої освіти денної форми навчання**

**СВО «Магістр», освітня спеціальність 162 – «Біотехнології та біоінженерія»**



**УДК 57.083.12**  
**I-53**

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “ 30 ” січня 2020 р., протокол № 6.

Укладач:

**О. І. Юлевич** – доцент кафедри генетики, годівлі тварин та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцент

Рецензенти:

**О. А. Горбенко** – канд. техн. наук, доцент, завідувач кафедри агроінженерії Миколаївського національного аграрного університету

**С. П. Кот** – канд. біол. наук, доцент, завідувач кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету

## З М І С Т

ВСТУП	4
1. Лабораторна робота 1. Імобілізовані ферменти – біологічні каталізатори, сфери їх застосування	5
2. Лабораторна робота 2. Структура, властивості та механізм дії біокаталізаторів	9
3. Лабораторна робота 3. Фізичні методи іммобілізації ферментів	18
4. Лабораторна робота 4. Хімічні методи іммобілізації ферментів	28
5. Лабораторна робота 5. Носії для іммобілізації ферментів. Вимоги до носіїв	36
6. Лабораторна робота 6. Характеристика носіїв для іммобілізації	41
7. Лабораторна робота 7. Вплив іммобілізації ферментів на їх властивості	50
8. Лабораторна робота 8. Ефекти інгібування й активації в каталізі іммобілізованими ферментами	54
9. Лабораторна робота 9. Характеристика, фізіологія та промислове використання іммобілізованих клітин мікроорганізмів	60
10. Лабораторна робота 10. Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів	68
11. Лабораторна робота 11. Особливості культивування клітин рослин. Способи іммобілізації рослинних клітин	72
12. Лабораторна робота 12. Методи визначення життєздатності іммобілізованих рослинних клітин. Особливості фізіології іммобілізованих рослинних клітин	76
13. Лабораторна робота 13. Методи виділення та іммобілізації клітин тваринного походження	80
14. Лабораторна робота 14. Промислові реактори для процесів за участю клітин тварин	86
15. Лабораторна робота 15. Застосування іммобілізованих ферментів і клітин	90
Список використаної літератури	94

## ВСТУП

У багатьох випадках розробка практичних методів, що включають в якості компонента біологічний елемент, залежить від здатності стабілізувати або зберегти цей біологічний елемент, будь то велика молекула або частка. В останні роки набір способів збереження активності біологічних об'єктів значно розширився, в розробці цих способів іммобілізація грає все більшу роль. Іммобілізація – це процес фіксації біооб'єкта за допомогою фізико-хімічних сил на носії.

Іммобілізація входить у дисципліну, що має назву «біотехнологія». Цей розділ науки, ґрунтуючись на останніх досягненнях у галузі мікробіології, біохімії, фізіології і молекулярної генетики, однією зі своїх цілей ставить використання процесів, що протікають під дією ферментів, для отримання необхідних людині продуктів. Висока специфічність ферментативного каталізу забезпечує великий вихід продукту і дозволяє створити практично безвідходні виробництва. Ефективність ферментативних процесів, які використовуються в самих різних областях людської діяльності (медицина, енергетика, харчова промисловість, мікроелектроніка), вдалося збільшити за допомогою іммобілізованих препаратів. Іммобілізовані ферменти та ін. біопрепарати виявляються більш стабільними і можуть використовуватися неодноразово.

Однак потрібно зазначити, що застосування іммобілізованих препаратів індивідуальних ферментів виявилось менш успішним, ніж сподівалися. Як недоліки слід назвати нестабільність ферменту в процесі роботи і здатність каталізувати одну єдину реакцію. Крім того, для практичних цілей можуть використовуватися лише ті ферменти, які не вимагають регенерації кофакторів.

Недоліки, характерні для процесу іммобілізації ферментів, сприяли розвитку інтересу до використання потенційних можливостей клітинного метаболізму, тобто використання цілих клітин. Використання іммобілізованих клітин дозволяє уникнути необхідності виділення і очищення необхідних ферментів. Оскільки клітини мікроорганізмів є дійсно нескінченним джерелом найрізноманітніших ферментів, природно, що в першу чергу саме вони були використані для іммобілізації.

Жива клітина, на відміну від ферменту, являє собою готовий біотехнологічний реактор, в якому реалізуються не тільки процеси, що призводять до утворення кінцевого продукту, але і ряд інших, що сприяють підтриманню каталітичної ефективності системи на високому рівні (наприклад, регенерація кофакторів).

Дослідження в області іммобілізації ферментів і клітин надзвичайно важливі і, мабуть, збережуть своє значення в доступному для огляду майбутньому. Розвиток інженерної ензимології і способів модифікації клітин все більшою мірою буде залежати від результатів цих досліджень.

## **Лабораторна робота 1**

### **Імобілізовані ферменти – біологічні каталізатори, сфери їх застосування**

Оснoву життєдіяльності живих організмів становлять хімічні процеси. Вони відбуваються з величезною швидкістю під дією ферментів – біологічних каталізаторів білкової природи, які синтезуються в процесі життєдіяльності всіх живих організмів і забезпечують синтез, розпад і взаємоперетворення різноманітних органічних сполук.

Термін "ферменти" ("fermentum" (лат.) – закваска, дріжджі, та "fermentatio" – бродіння) або "ензими" (enzyme (грец.) – у дріжджах, у заквасці) був запропонований на початку XVII ст. голландським вченим Ван Гельмонтом під час вивчення процесу спиртового бродіння. У кінці XVII ст. дослідженнями Р. Реомюра та Л. Спаланцані щодо впливу шлункового соку хижих птахів на м'ясо було показано, що розчинення м'яса – це хімічний, а не механічний процес, а в 1836 році Т. Шванн виявив у вмісті шлункового соку фермент пепсин, який перетравлював білки м'яса. Російський вчений К.С. Кірхгоф вперше показав участь хімічних речовин (ферментів) солоду у перетворенні крохмалю на цукор. Російський фізіолог І.П. Павлов вважав ферменти «збудниками всіх хімічних перетворень». На початку XX ст. він вперше довів, що ферменти можуть існувати в організмі в неактивній формі – і дослідив перетворення проферменту трипсиногену на фермент трипсин за участі ентерокінази. Новий етап у розвитку вчення про ферменти наступив у 1926 р., коли американський біохімік Дж. Самнер отримав з насіння конвалії кристалічний препарат ферменту уреазу. У 1930 р. Д. Нортроп виділив кристалічний пепсин, а згодом трипсин і хімотрипсин. З цього періоду стало загальноприйнятим твердження, що ензими мають білкову природу.

У кінці XIX ст. Е. Фішер, вивчаючи властивості ферментів, висунув положення, що субстрат підходить до ферменту як «ключ до замка», дослідження специфічності ферментів і сьогодні є важливим науковим завданням.

На початку XX століття з'явилися роботи, присвячені кінетиці ферментативних реакцій, згодом були сформульовані теорії механізму їх дії, регуляції ферментативної активності; все це дало поштовх для становлення «ензимології» як науки, її активний розвиток у тісному зв'язку з органічною, неорганічною та фізичною хімією, фізіологією, токсикологією, мікробіологією, генетикою, фармакологією, ботанікою тощо відбувається й зараз. Завданнями ензимології є вивчення ролі ферментів у прискоренні хімічних реакцій, що відбуваються в організмі; дослідження їх структури, механізму дії, кінетичних характеристик і регуляції активності; виділення та очищення ферментів.

На даний час за допомогою спеціальних хімічних методів для багатьох білків-ферментів з'ясовано їх амінокислотна послідовність, охарактеризовано декілька тисяч ферментів, понад тисячу з них отримано в хімічно чистому вигляді.

Вивчення ферментів має величезне значення для будь-якої фундаментальної та прикладної галузі біології, хімічної, харчової та фармацевтичної індустрії, зайнятих приготуванням каталізаторів, антибіотиків, вітамінів, амінокислот, пептонів та інших біологічно активних речовин, які використовують у народному господарстві та медицині.

У процесі каталізу беруть участь наступні функціональні групи ферментів: СООН-групи дикарбонових амінокислот,  $\text{NH}_2$ -групи лізину, SH-групи цистеїну та дисульфідні цистину, ОН-групи серину та треоніну, гуанідинові групи аргініну, імідазольні групи гістидину, тіоефірні групи метіоніну, фенольні групи тирозину, гідрофобні ланцюги аліфатичних амінокислот і ароматичне кільце фенілаланіну. Фізико-хімічні властивості вказаних амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга фермента визначають контакт із відповідним субстратом та його перетворення. Гідрофобні радикали амінокислот мають спорідненість до неполярних ділянок субстрату. Полярні групи проявляють кислотні, основні або спряжені кислотно-основні (наприклад, гістидин) властивості. Зсув рН середовища викликає зміни їх кислотно-основних властивостей і сприяє контакту з різними групами субстрату.

Водні розчини ферментів є стійкими та гомогенними і можуть тривалий час зберігатися, не випадаючи в осад (не коагулювати), тобто мають властивості справжніх розчинів. Одночасно з тим, за рахунок високої молекулярної маси ферментів, їх розчинам притаманні властивості й колоїдних систем.

*Подібність і відмінність між ферментами та небіологічними каталізаторами.* Ферменти та каталізатори небілкової природи підлягають загальним законам каталізу та мають низку спільних властивостей:

- прискорюють лише енергетично можливі реакції, тобто вони не змінюють константу рівноваги та величину вільної енергії;
- збільшують швидкість хімічної реакції шляхом зниження її енергії активації та, у такий спосіб, наближають реакцію до точки термодинамічної рівноваги;
- не впливають на напрям зворотної реакції, яка визначається співвідношенням концентрацій субстратів і кінцевих продуктів;
- не впливають на положення рівноваги зворотної реакції, а лише пришвидшують її досягнення;
- не входять до складу кінцевих продуктів реакції і виходять з реакції в незміненому вигляді, проте, у низці випадків можуть модифікуватися і навіть розпадатися під впливом кінцевих продуктів реакції (наприклад, цитохром Р-450);
- не витрачаються в процесі каталізу, вивільняючись, вони можуть знову реагувати з новими молекулами субстрату.

Однак, для ферментів характерні і специфічні властивості, які відрізняють їх від інших каталізаторів. Ці відмінності пов'язані з особливостями будови ферментів, які є складними білковими молекулами:

1. Ефективність ферментів вища, ніж небілкових каталізаторів: швидкість перебігу реакції за участю ферментів зростає в  $10^8$ – $10^{20}$  разів (фермент уреаза прискорює гідроліз сечовини в  $10^{14}$  разів), вони діють у мізерних концентраціях

(молекула реніну, який синтезується в шлунку теляти, перетворює за 10 хв при температурі 37°C  $10^6$  молекул казеїногену).

2. Ферменти мають високу специфічність дії, яка зумовлена унікальною структурою активного центра, а також конформаційною та електростатичною комплементарністю між молекулами субстрату та фермента. Кожний фермент каталітично прискорює, зазвичай, одну хімічну реакцію або ж групу реакцій одного типу. Висока специфічність дозволяє ферментам брати участь у регуляції обміну речовин і направляти його в певному напрямі.

3. Активність ферментів може суттєво змінюватися під впливом сполук, які прискорюють (активатори) та сповільнюють (інгібітори) швидкість каталізованої реакції, що дає можливість координувати метаболічні процеси, спрямовані на відтворення живої матерії, підтримання постійності гомеостазу та пристосування до умов середовища.

4. Термочутливість ферментів: ферменти каталізують хімічні реакції при невисокій температурі (37-40°C); її зростання призводить до денатурації білкової молекули фермента та, відповідно, зниження швидкості реакції або повної її зупинки. При температурі 100°C майже всі ферменти втрачають свою активність. Зниження температури нижче оптимальної тимчасово сповільнює активність фермента внаслідок зменшення швидкості дифузії молекул.

5. Залежність активності ферментів від рН середовища: ферменти зазвичай найактивніші в межах вузької концентрації іонів  $H^+$  (фізіологічне значення рН=6,0-8,0). Виключення становлять пепсин (оптимум рН = 2,0) та аргіназа (оптимум рН = 10,0). Зміна рН середовища впливає на стан і ступінь іонізації кислотних і основних груп, які входять до складу ферменту в цілому та його активного центра зокрема, що впливає на третинну структуру білка та формування активного фермент-субстратного комплексу.

6. У випадку, коли ферментативний процес являє собою низку послідовних реакцій (метаболічні шляхи) дія ферментів строго впорядкована: продукт однієї ферментативної реакції слугує субстратом для іншої. Їх активність змінюється залежно від потреб організму в кінцевому продукті.

### Завдання

1. Скласти таблицю історичного розвитку вчення про ферменти за формою (табл. 1):

*Таблиця 1*

### Історичний розвиток вчення про ферменти

Рік	Подія
Початок XVII ст.	Був запропонований термін "ферменти" голландським вченим Ван Гельмонтом під час вивчення процесу спиртового бродіння.
Кінець XVII ст.	Дослідженнями Р. Реомюра та Л. Спаланцані було показано, що розчинення м'яса – це хімічний, а не механічний процес.

## 2. Порівняйте ферменти з неорганічними каталізаторами:

А – схожість з неорганічними каталізаторами;	1. Здатні до регуляції активності.
	2. Прискорюють тільки термодинамічно можливі реакції.
	3. Не витрачаються в ході реакції.
	4. Мають високу каталітичну активність.
Б – відмінності від неорганічних каталізаторів.	5. Не змішують рівновагу хімічної реакції.
	6. Діють в м'яких умовах (Т, рН).
	7. Мають високу специфічність дії.

### Контрольні запитання

1. Вкажіть промислові процеси із застосуванням іммобілізованих ферментів у різних галузях промислової діяльності: харчовій, фармацевтичній, текстильній, та ін., сільському господарстві, органічному синтезі, хімічному аналізі та ін.
2. Вкажіть препарати іммобілізованих ферментів, які застосовують у медицині (ліпосоми; мікрокапсули; водорозчинні препарати; ферменти, включені у тіні еритроцитів).
3. Перерахуйте функції білків-ферментів в організмі.
4. З'ясуйте відмінність дії ферментів від дії небілкових каталізаторів.
5. Вкажіть функціональні групи ферментів, які беруть участь у процесі каталізу

## Лабораторна робота 2

### Структура, властивості та механізм дії біокаталізаторів



За хімічною будовою білки є поліпептидами. Внаслідок взаємодії функціональних груп поліпептиду між собою і з оточуючим середовищем він набуває специфічної просторової форми. Тільки в цій формі він є біологічно активним. Для спрощення опису просторової форми білкових молекул користуються поняттям про рівні структурної організації (Ліндерстрем-Ланг).

*Первинна структура.* Первинна структура білків - це порядок розташування амінокислотних залишків в нерозгалуженому поліпептидному ланцюгу.

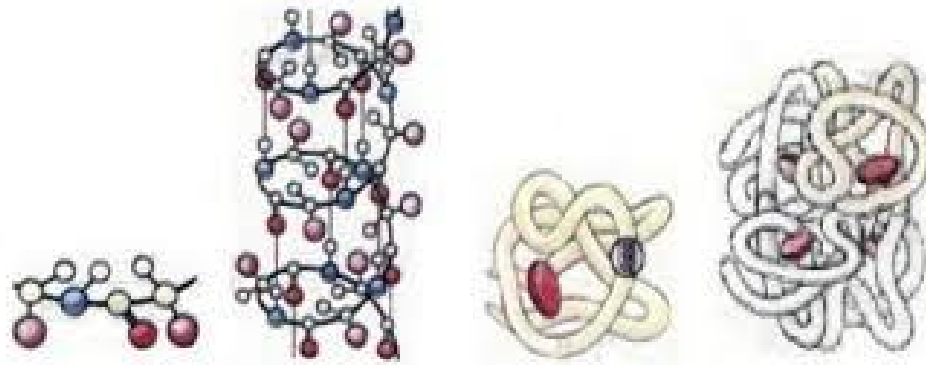
*Вторинна структура* білка - це регулярна укладка поліпептидного ланцюга, стабілізована водневими зв'язками між пептидними групами. Щільність упаковки цієї структури така ж, як і у кристалів. Тому білки називають аперіодичними кристалами. Для різних білків ступінь і характер спіралізації відрізняються.

*Третинна структура* – це трьохмірна укладка поліпептидного ланцюга, яка стабілізується внутрішньомолекулярними взаємодіями радикалів амінокислотних залишків. Внаслідок вільного обертання навколо  $\alpha$ -вуглецевих атомів радикали можуть по-різному орієнтуватись у просторі, утворюючи зв'язки зі спорідненими групами і забезпечуючи термодинамічно вигідну укладку молекули.

У глобулярних білках поліпептидний ланцюг містить багато гідрофільних полярних радикалів, які орієнтуються назовні глобули, до оточуючого водного середовища, утворюючи водневі зв'язки з молекулами води. Гідрофобні радикали переважно занурюються всередину глобули, уникаючи контактів із водним середовищем, і утворюють між собою гідрофобні зв'язки. Оскільки кожний радикал є полярним (гідрофільним), або неполярним (гідрофобним), то водневі і гідрофобні зв'язки відіграють вирішальну роль у формуванні глобули. Утворена компактна кулеподібна структура стабілізується більш міцними йонними та дисульфідними зв'язками.

Велика кількість білків складається більше, як з одного поліпептидного ланцюга. *Четвертинна структура* характеризує спосіб об'єднання поліпептидних ланцюгів у молекулі такого білку. Наявність четвертинної структури у того чи іншого білка можна прогнозувати за його кількісним складом. Як правило, окремі поліпептидні ланцюги містять від 100 до 300 залишків амінокислот і мають молекулярну масу 12000 - 36000. Якщо молекулярна маса більша 50000, то можна вважати, що білок складається з декількох поліпептидів.

Білки, які мають четвертинну структуру, називаються олігомерами або мультимерами, а ланцюги, з яких вони утворені, – протомерами або субодинаціями (рис. 1).



Первинна структура Вторинна структура Третинна структура Четвертинна структура

### Рис. 1. Рівні структурної організації білків

*Хімічна природа ферментів.* На сьогодні встановлено, що ферменти – це речовини білкової природи. Підтвердженням цього є факт втрати ферментами бродіння своєї активності під час кип'ятіння, що було досліджено ще Л.Пастером. Кип'ятіння спричинює незворотну денатурацію білка-ферменту, внаслідок чого останній втрачає здатність каталізувати хімічну реакцію. Як відомо, білки теж при кип'ятінні денатурують і втрачають свої біологічні властивості. Дія на ферменти різних фізичних і хімічних чинників, таких як вплив УФ- і рентгенівського опромінення, ультразвуку, мінеральних кислот, лугів, алкалоїдних реактивів, солей важких металів тощо теж спричинює денатурацію ферментів (так само як і білків) і втрату їх каталітичної активності. В основі денатурації лежить руйнування зв'язків, що стабілізують вищі структури фермента-білка (четвертинну, третинну, вторинну) і, як наслідок, випадання його в осад. Це свідчить про те, що просторова структура білка впливає на виявлення його ферментативної активності. Аналогічно до білків, ферменти під час гідролізу розпадаються на амінокислоти. Доказом білкової природи ферментів слугує виділення їх у чистому вигляді в формі кристалів білка. На сьогодні отримано понад 1000 кристалічних ферментів. Структура багатьох із них досліджена детально методами рентгеноструктурного аналізу, ядерного магнітного резонансу, електронного парамагнітного резонансу тощо.

Конформація ферменту істотно визначає його біологічну активність. Численні експериментальні факти свідчать про те, що фермент здатний виконувати властиву йому каталітичну функцію тільки перебуваючи в певній тривимірній структурі. Цей принцип, зокрема, ліг в основу двох моделей фермент-субстратної взаємодії: так званої моделі «замку і ключа», запропонованої Фішером, і загальноприйнятої в даний час теорії індукованої відповідності, висунутої в середині минулого століття Кошландом.

У теорії Фішера активний центр розглядається як жорстка структура, суворо комплементарна структурі субстрату.

Відповідно до теорії Кошланда, вихідна структура активного центру ферменту не відповідає строго субстрату. Однак присутність субстрату індукує структурні зміни активного центру, що забезпечують зв'язування субстрату. Одночасно з цим відбувається зміна структури субстрату, завдяки чому досягається його компліментарність зміненому активному центру.

Зв'язування субстрату в активному центрі ферменту забезпечується слабкими нековалентними взаємодіями (водневими зв'язками, електростатичними взаємодіями, вандер-ваальсовими взаємодіями і гідрофобними зв'язками) і супроводжується зменшенням вільної енергії системи.

*Ферменти – прості білки* являють собою поліпептидні ланцюги, які при гідролізі розпадаються до амінокислот, їх ще називають однокомпонентними. До них належать пепсин, трипсин, уреаза, рибонуклеаза тощо.

*Ферменти – складні білки* крім поліпептидних ланцюгів містять небілкову частину, їх називають двокомпонентними. Білкову частину двокомпонентних ферментів називають апоферментом (забезпечує специфічність дії та відповідає за вибір типу хімічного перетворення субстрату), а небілкову – кофактором (служує акцептором і донором хімічних груп, атомів і електронів у каталітичній ділянці активного центра ферменту). Молекула складного ферменту в цілому називається голо-, або холоферментом (рис. 2).



Рис. 2. Структура складного фермента

Для здійснення каталітичної активності багато ферментів потребують присутності *коферментів і кофакторів*.

Роль *кофакторів* можуть відігравати біоорганічні сполуки різної хімічної природи або іони металів ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+} - Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+} - Cu^{1+}$  т.і.). Іони металів зв'язані з апоферментом або входять до складу небілкової простетичної групи найчастіше порфіринового кільця гемінових ферментів (цитохромів, пероксидаз, каталази). Ферменти, які міцно зв'язані з іонами металів і не втрачають цього зв'язку за умов виділення та фракціонування ферменту, називаються *металоферментами*.

У деяких випадках іони металів не входять до складу ферментів як інтегральні структурні компоненти, а виконують лише функцію їх активаторів.

*Коферменти* (коензими) – біоорганічні сполуки небілкової природи, що є необхідними для дії ферменту, тобто перетворення субстрату в каталітичному акті. Більшість із них є похідними вітамінів – органічних речовин, невеликі кількості яких організм повинен отримувати з їжею.

Коферменти можуть сполучатися з білковою частиною (апоферментом) нековалентними фізико-хімічними або ковалентними зв'язками (в останньому випадку вони є *простетичними групами* ферментного білка – флавінові коферменти, піридоксальфосфат, ліпоєва кислота тощо); деколи коферменти утворюють комплекси з апоферментом лише в ході каталітичного процесу (НАД, НАДФ).

### **Класифікація коферментів**

За *хімічною природою* коферменти підрозділяють на:

- похідні вітамінів, зокрема: вітаміну В1 – тіаміндифосфат; вітаміну В2 – флавінмононуклеотид (ФМН); вітаміну В6 – піридоксальфосфат, піридоксамінфосфат; пантотенової кислоти – коензим А; вітаміну В12 – метилкобаламін, дезоксиаденозилкобаламін; вітаміну Н (біотину) – карбоксибіотин; фолієвої кислоти — тетрагідрофолієва кислота;
- динуклеотиди (похідні нікотинаміду – НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>; похідний рибофлавіну — ФАД);
- нуклеотиди – похідні пуринів та піримідинів (АТФ, АДФ, ЦТФ, ЦДФ, УТФ, УДФ);
- комплекси порфіринів з іонами металів.

За *типом реакції*, яку вони каталізують, коферменти поділяють на:

- коферменти, що є переносниками атомів водню та електронів.
- коферменти, що є переносниками різних хімічних груп.
- коферменти синтезу, ізомеризації та розщеплення вуглець-вуглецевих зв'язків.

#### *Структура найбільш поширених коферментів*

Коферменти – похідні вітаміну РР (нікотинаміду) (входять до складу дегідрогеназ): нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД<sup>+</sup>) та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ<sup>+</sup>).

Коферменти – похідні вітаміну В2 (рибофлавіну) (входять до складу дегідрогеназ та оксидаз): флавінаденіндинуклеотид (ФАД), флавінмононуклеотид (ФМН).

Піридоксальві коферменти – похідні вітаміну В6 (піридоксину) (входять до складу амінотрансфераз, декарбоксілаз): піридоксин (піридоксол), піридоксальфосфат, піридоксамінфосфат.

Металопорфірини – коферменти цитохромів: металопорфіринові структури цитохромів а (А), b (В), с (С). (Me<sup>2+</sup>: залізо в цитохромах b та с, мідь – у цитохромі а).

Кофермент ацилювання – похідний пантотенової кислоти: коензим А (КоА).

Коферменти – похідні фолієвої кислоти (коферменти в реакціях переносу та оксидоредукції одновуглецевих радикалів): 5,6,7,8 – тетрагідрофолієва кислота.

Ліпоєва кислота – (кофермент у реакціях окислювального декарбоксілювання α-кетокислот): ліпоєва кислота (6,8-дитіооктанова кислота).

Тіаміндифосфат – похідний вітаміну В1 (кофермент у реакціях декарбоксілювання α-кетокислот, транскетотазній реакції): тіаміндифосфат.

Кофермент карбоксибіотин (кофермент реакцій карбоксилювання): карбоксибіотин.

Коферменти – похідні вітаміну В12: метилкобаламін (кофермент у реакціях метилювання), дезоксиаденозилкобаламін (кофермент у реакціях ізомеризації, спряжених із внутрішньомолекулярним переносом гідридного іона).

Для ферментів характерна специфічність дії і субстратна специфічність. Під *специфічністю дії* розуміють здатність ферменту з багатьох можливих з даними субстратом реакцій прискорювати лише одну. Наприклад, з однією і тією ж амінокислотою можливі три різні реакції, кожна з яких каталізується окремим ферментом. Так, оксидаза  $\alpha$ -амінокислот забезпечує окисне відщеплення аміаку від амінокислоти з утворенням  $\alpha$ -кетокислот; декарбоксилаза  $\alpha$ -амінокислот здійснює декарбоксилювання амінокислоти з утворенням первинного аміну і  $\text{CO}_2$ ; трансаміназа переносить аміногрупу на  $\alpha$ -кетокислоті з утворенням іншої амінокислоти відповідної  $\alpha$ -кетокислоти.

*Субстратна специфічність* може бути абсолютною, відносною (групова субстратна специфічність) і недостатньою. Ферменти з абсолютною субстратною специфічністю зустрічаються досить рідко. До подібних ферментів відносяться фумарази (фумарова кислота +  $\text{H}_2\text{O}$  = яблучна кислота) і уреаза (сечовина +  $\text{H}_2\text{O}$  = аміак +  $\text{CO}_2$ ).

Ферменти, що володіють відносною субстратною специфічністю, здатні каталізувати одну і ту ж реакцію з багатьма близькими за хімічною структурою сполуками. Причому хімічні перетворення близьких за структурою речовин йдуть, як правило, з різною швидкістю. Наприклад, фосфомоноестераза (фосфатаза) розщеплює  $\beta$ -гліцерофосфат з більшою швидкістю, ніж  $\alpha$ -гліцерофосфат.

До ферментів з недостатньо вираженою специфічністю належить ксантінальдегідоксидаза. Цей фермент каталізує дегідрування формальдегідгідрата і ксантінгідрата – різних за хімічною структурою сполук. Відібраний від субстратів водень переноситься на кисень з утворенням перексиду водню.

На підставі специфічності дії і субстратної специфічності виділяють шість класів ферментів.

*1-й клас. Оксидоредуктази* – ферменти, що каталізують окисно-відновні реакції різних типів. До оксидоредуктаз належать дегідрогенази — ферменти, що каталізують реакції дегідрогенування (відщеплення гідрогену), оксидази, що окислюють субстрати шляхом приєднання кисню, цитохроми — переносники електронів, тощо.

*2-й клас. Трансферази* – ферменти, що каталізують реакції міжмолекулярного переносу хімічних груп. Трансферази поділяють на амінотрансферази, метилтрансферази, ацилтрансферази, фосфотрансферази, глікозилтрансферази — ферменти, що переносять амінні, метильні, ацильні, фосфатні, глікозильні групи, відповідно. До трансфераз належать також кінази, зокрема протеїнкінази – ферменти, що каталізують фосфорилування субстратів за рахунок фосфатного залишку АТФ.

*3-й клас. Гідролази* – ферменти, що каталізують реакції гідролізу, тобто, розщеплення субстратів за участю молекули води. Гідролази здатні розщеплювати складноєфірні, пептидні, глікозидні та інші зв'язки — естерази, пептидази та протеази, глікозидази.

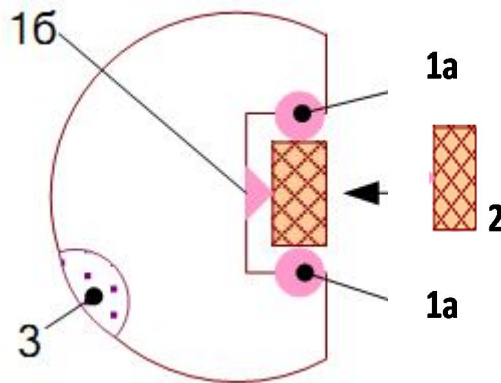
*4-й клас. Ліази* – ферменти, що каталізують реакції розщеплення ковалентних зв'язків між атомами С, О, N, S негідролітичним шляхом. До ліаз

належать декарбоксілази – ферменти, що відщеплюють від органічних кислот карбоксильну групу у вигляді  $\text{CO}_2$ ; альдолази, що розщеплюють вуглець-вуглецеві зв'язки з утворенням альдегідів; дегідратази, які відщеплюють від субстратів молекулу води з утворенням подвійного зв'язку.

*5-й клас. Ізомерази* – ферменти, що каталізують реакції ізомеризації субстратів (рацемізації, епімеризації, внутрішньомолекулярної оксидоредукції тощо) – рацемази, епімерази тощо.

*6-й клас. Лігази (синтетази)* – ферменти, що каталізують реакції синтезу біомолекул, тобто утворення нових хімічних зв'язків за рахунок енергії АТФ.

*Функціонально активні ділянки ферментів.* Біологічна функція як простих, так і складних ферментів обумовлена наявністю в них функціональних ділянок (рис. 3). Під час ферментативної реакції відбувається взаємодія ферменту та субстрату (ліганда, який взаємодіє з ферментом) з утворенням проміжних фермент-субстратних комплексів (ФСК). Ділянка молекули ферменту, до якої приєднується субстрат, називається активним центром.



**Рис. 3. Функціонально активні ділянки ферменту:** 1а – контактні ділянки, 1б – каталітична ділянка, 2 – субстрат, 3 – алостеричний центр

Активний центр простого фермента – це тривимірне утворення, здебільшого щілиноподібної форми, яке представлене сукупністю бічних радикалів амінокислотних залишків, що дуже часто знаходяться на певній відстані в лінійній послідовності поліпептидного ланцюга. У складних ферментах активний центр може містити кофактор, а бічні радикали створюють умови для правильної конформації активного центра, орієнтації та перетворення субстрату. Проте, саме білок у складному ферменті організовує ефективне функціонування кофактора. Так, гем у комплексі з глобіном виявляє свою схильність до участі в окисно-відновних перетвореннях; у складі каталази він забезпечує відновлення  $\text{H}_2\text{O}_2$ , тоді як у складі цитохрому гем виконує роль переносника електронів, змінюючи при цьому валентність заліза. У ферментах із четвертинною структурою кількість активних центрів, зазвичай, співпадає з числом субодиниць.

Оскільки субстрат сполучається з активним центром у кількох точках і це, своєю чергою, забезпечує високу вибірковість зв'язування (виявляється відповідність субстрату й активного центра) і орієнтацію субстрату, необхідного для каталізу. Крім активного центра, у ферментах може знаходитися

алостеричний центр (або центри) (грец. allos – інший і steros – просторовий, структурний). Він просторово розділений з активним центром і являє собою ділянку молекули ферменту, з якою зв'язуються так звані модулятори або алостеричні ефектори, які за своєю природою різняться з субстратами.

Вони змінюють третинну, а іноді й четвертинну структуру молекули ферменту, конформацію активного центра, спричинюючи в такий спосіб пришвидшення (активатори) або сповільнення (інгібітори) ферментативної реакції. Такими ефекторами можуть бути гормони та їх похідні, метаболіти, медіатори тощо.

### Завдання

1. Скласти таблицю коферментів та відповідних вітамінів за формою:

Таблиця 2

### Коферменти та відповідні їм вітаміни

Кофермент	Вітамін-попередник	Функція	Фермент
Піридоксаль-фосфат			
Тіамін-дифосфат			
Кофермент А			
Тетрагідро-фолієва кислота			
Біотин			
НАД <sup>+</sup> , НАДФ <sup>+</sup>			
ФМН, ФАД			
Метилкобаламін, 5-дезоксиденозилкобаламін			
Ліпоєва кислота			

### 2. Відповісти на питання:

а) *Визначте тип специфічності дії ферментів (букви), що каталізують реакції (цифри):*

а) абсолютна, б) відносна групова, в) абсолютна групова, г) стереохімічна.

1) трипсин каталізує гідроліз пептидних зв'язків, утворених карбоксильною групою лізину та аргініну, 2) протеосубтилін каталізує гідроліз пептидних зв'язків, 3) уреаза каталізує гідроліз одного субстрату – сечовини, 4) гексокіназа каталізує фосфорилування лише D-моносахаридів.

б) Ферменти, що мають абсолютну специфічність каталізують:

а) один тип реакції, б) перетворення одного субстрату, в) перетворення подібних за будовою сполук, г) перетворення субстратів, що мають один тип зв'язку.

в) Оберіть найбільш вірне визначення активного центра ферменту:

а) невелика ділянка ферменту, б) ділянка ферменту, яка містить кофермент, в) ділянка ферменту, яка взаємодіє з субстратом реакції та бере участь у каталізі. г) ділянка ферменту, яка взаємодіє з продуктом реакції.

г) До складу лактатдегідрогенази входить:

а) НАД, б) ФАД, в) ФМН, г) КоА

д) Які вітаміни (букви) входять до складу коферментів (цифри):

а) тіамін, б) рибофлавін, в) пантотенова кислота, г) ніацин.

1) ФАД, 2) ТПФ, 3) КоА, 4) НАД

е) До складу яких коферментів входить АМФ (аденозинмонофосфат):

а) ТПФ, б) НАД, в) ФАД, г) КоА

є) Визначте клас ферментів (букви), що каталізують реакції (цифри):

а) гідролази, б) оксидоредуктази, в) лігази (синтетази), г) ізомерази.

1) Глюкозо-6-фосфат  $\rightleftharpoons$  фруктозо-6-фосфат

2) мальтоза +  $H_2O$   $\rightarrow$  2 глюкоза

4) піруват +  $CO_2$  + АТФ  $\rightarrow$  оксалоацетат + АДФ +  $\Phi_H$

3) лактат +  $НАД^+$   $\rightleftharpoons$  піруват + НАДН +  $H^+$

ж) Розподіліть вітаміни за класами:

а) піридоксин, б) ретинол, в)  $\alpha$ -токоферол, г) аскорбінова кислота,

д) тіамін, е) рибофлавін, є) ергокальциферол.

1) водорозчинні, 2) жиророзчинні

и) Знайдіть відповідність класу ферментів (букви) та визначень реакцій, що вони каталізують (цифри):

а) оксидоредуктази, б) трансферази, в) гідролази, г) лігази.

1) міжмолекулярне перенесення груп атомів, 2) окисно-відновні,

3) синтезу з використанням енергії АТФ, 4) гідролітичного розщеплення.

і) Визначте відповідність коферментів (букви) та ферментів (цифри):

а) НАД, б) КоА, в) ТПФ, г) піридоксальфосфат, д) ФАД.

4) аспартатаміотрансфераза, 2) лактатдегідрогеназа,

3) ацилтрансфераза, 4) піруват-декарбоксилаза,

5) сукцинатдегідрогеназа.



к) Знайдіть відповідність коферментів (букви) та реакцій, що відбуваються за їхньої участі (цифри):

а) кофермент А, б) піридоксальфосфат, в) ФАД, г) біотин.

1) карбоксилювання, 2) окисно-відновні, 3) ацилювання, 4) переамінування.

л) Оберіть властивості ферментів, що зумовлені їхньою білковою природою:

а) залежність активності від рН, б) залежність активності від температури, в) субстратна специфічність, г) наявність ізоферментів.

### Контрольні запитання

1. Доведіть білкову природу ферментів, дайте їм характеристику як каталізаторам.
2. Яка роль ферментів в організмі?
3. Якими властивостями володіють ферменти?
4. Як впливають на активність ферментів фізичні й хімічні фактори?
5. Чим обумовлена специфічність дії ферментів? Види специфічності.
6. Охарактеризуйте функціонально активні ділянки ферментів (активний та алостеричний центри).
7. Дайте визначення коферментам, вкажіть їх класифікацію, наведіть приклади.
8. Назвіть класи ферментів і притаманні їм типи реакцій.

### Лабораторна робота 3 Фізичні методи іммобілізації ферментів

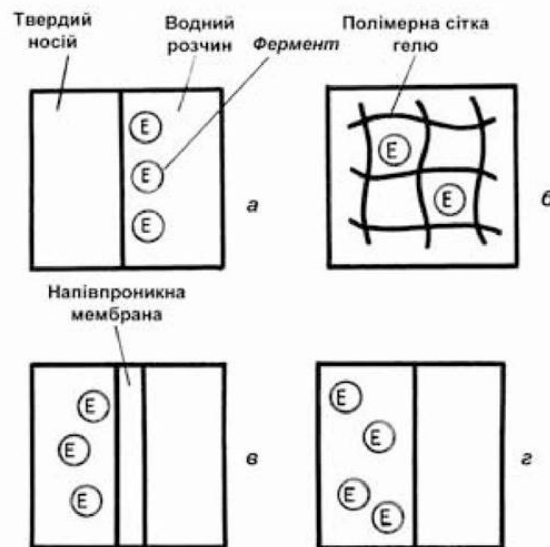
Фізичні методи полягають у зв'язуванні ферменту без участі ковалентних зв'язків. Вони поділяються на два типи: адсорбційні і механічні. При адсорбційній іммобілізації фермент утримується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних та водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій. При механічному способі іммобілізації відбувається включення ферменту в гелі, які зшиті поперечними зв'язками, включення ферменту в

мікрокапсули, волокна, мембрани тощо. Фізичні методи іммобілізації прості, швидкі й ефективні. Вони широко застосовуються в інженерній ензимології.

Виділяють чотири таких типи зв'язування ферментів (рис. 4):

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

Найпростіший метод іммобілізації ферментів – це адсорбція на нерозчинному носії (див. рис. 4,а). Процедура іммобілізації полягає в змішуванні при придатних умовах ферменту і носія, інкубації і відділенні нерозчинного компонента суміші від розчинного компонента центрифугуванням або фільтруванням. Головний недолік цього методу полягає в тому, що фермент може зв'язуватися з носієм недостатньо міцно.



**Рис. 4. Способи фізичної іммобілізації ферментів** (за Березіним І.В. та ін., 1987): а – адсорбція на нерозчинних носіях; б – включення в пори гелю; в – відділення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани; г – використання двофазного реакційного середовища

Іммобілізація ферментів адсорбцією на нерозчинних носіях передбачає контакт водного розчину ферменту з носіями органічної і неорганічної природи. Утримання адсорбованої молекули ферменту на поверхні носія забезпечується за рахунок неспецифічних ван-дер-ваальсових взаємодій, електростатичних взаємодій, водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій між носієм і поверхневими групами білка-ферменту. Тип зв'язку залежить від природи носія і функціональних груп на поверхні молекули ферменту.

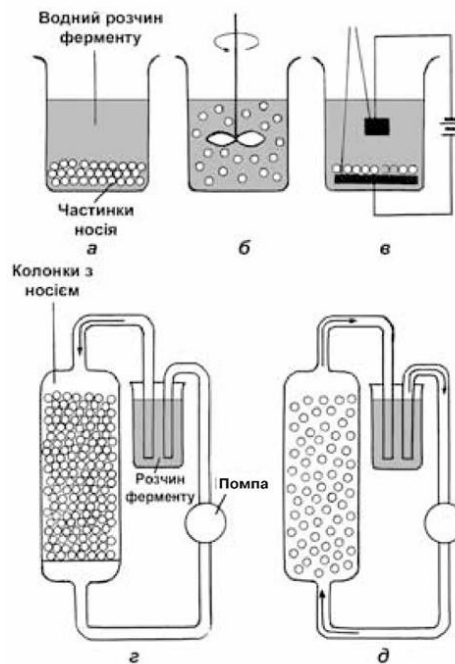
На практиці для одержання іммобілізованих адсорбцією ферментів використовуються такі методичні підходи:

*Статичний метод* (рис. 5 а) найбільш простий і полягає в тому, що носій додають у водний розчин ферменту і одержану суміш залишають на певний час без перемішування. Іммобілізація досягається за рахунок довільної дифузії ферменту до поверхні носія з подальшою адсорбцією.

*Спосіб з перемішуванням*, або динамічний метод. При ньому носій суспендується в розчині ферменту і одержана суміш безперервно перемішується за допомогою магнітного чи механічного змішувача, або на лабораторній гойдалці (рис. 5 б).

Відокремлення іммобілізованого ферменту проводиться шляхом фільтрування або центрифугування. Після відмивання неадсорбованого ферменту препарат готовий до використання.

*Метод електроосадження*. У цьому випадку в розчин ферменту занурюють два електроди з нанесеним на поверхню одного з них шару носія. При вмиканні електричного струму молекули ферменту завдяки наявним на їх поверхні зарядженим групам починають переміщуватися в розчині й осаджуються на поверхні носія (рис. 5 в).



**Рис. 5. Способи адсорбційної іммобілізації ферментів**  
(за Березінін І.В. та ін., 1987)

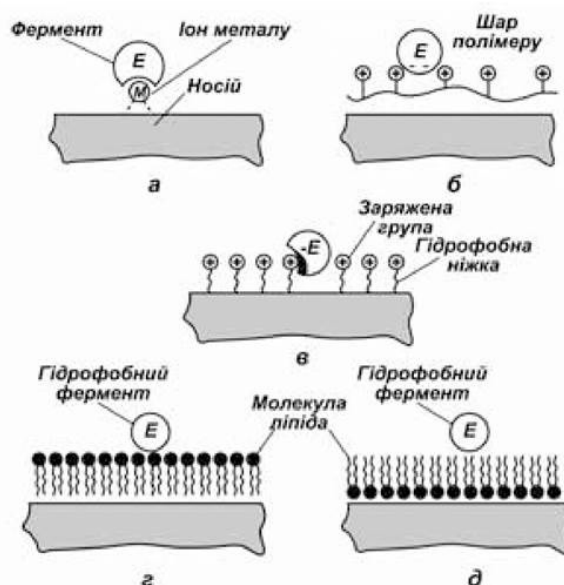
*Метод нанесення в колонці*. Найбільш зручний для технологічного використання іммобілізованого ферменту. Через колонку, заповнену носієм, за допомогою помпи прокачують розчин ферменту, причому швидкість потоку має бути такою, щоб частинки були у завислому стані, утворюючи «кип'ячий шар». Промивку теж проводять у колонці (рис. 5 г, д).

Процес адсорбції і міцність зв'язування ферменту з носієм значною мірою залежить від умов проведення іммобілізації. Основними факторами, які впливають на адсорбцію ферменту, є питома поверхня і пористість носія, значення рН та іонної сили розчину ферменту, його концентрація і температура проведення процесу адсорбції.

Ефективність сорбції може бути підвищена використанням попередньо модифікованих носіїв і ферментів. Попередня модифікація носія у багатьох випадках дозволяє суттєво підвищити міцність зв'язування ферменту на матриці.

Модифікуючими агентами для носіїв виступають гідروفобні речовини, розчини іонів металокомплексоутворювачів, а також речовини з великою кількістю груп, здатних до електростатичної взаємодії з білковою глобулою.

1. *Обробка носіїв іонами металів* (Ti, Sn, Zn, V, Fe) підвищує міцність зв'язування ферменту з носієм за рахунок утворення комплексу білка з іонами металів. Іон металу відіграє роль містка, який з'єднує молекулу ферменту з носієм (рис. 6 а). Цей метод ефективний при іммобілізації різних ферментів на таких носіях, як, наприклад, целюлоза, нейлон, скло, фільтрувальний папір тощо.



**Рис. 6. Адсорбційна іммобілізація ферментів на попередньо модифікованих носіях (за Березіним І.В. та ін., 1987)**

2. *Модифікація гідрофобними сполуками* теж сприяє підвищенню ефективності сорбції, що забезпечується гідрофобними взаємодіями між модифікатором і неполярними ділянками на поверхні білкової глобули (рис. 6 в). Із носіїв найчастіше використовуються різні агарози, які ковалентно модифіковані гідрофобними групами (алкільними, фенільними та ін.); поліцукристі носії, модифіковані таніном та інші. На кінці такої гідрофобної «ніжки» може бути присутня й заряджена група, завдяки чому забезпечується взаємодія з ферментом одночасно за рахунок електростатичних і гідрофобних сил.

3. *Обробка носія речовинами, молекули яких містять велику кількість функціональних груп*, здатних взаємодіяти з групами на поверхні білкової глобули за рахунок електростатичних сил і водневих зв'язків (рис. 6 б). Наприклад, полімеризація на поверхні носія силохрому акрілової кислоти, вінілацетата та ін. з подальшою хімічною модифікацією полімера приводить до утворення носія з високою поверхневою концентрацією функціональних груп

(гідроксильних, аміноалкільних, аміноарильних і гідразидних), здатних до електростатичної взаємодії з білковою глобулою.

Як модифікатор часто використовується також альбумін, який наноситься на носій шляхом адсорбції, а потім піддається денатурації нагріванням.

Модифікація носія, окрім підвищення ефективності сорбції, часто забезпечує також покращення каталітичних властивостей іммобілізованого ферменту за рахунок створення для його молекул сприятливого мікрооточення. Крім того, інколи без попередньої модифікації носія взагалі не вдається зберегти каталітичну активність ферменту при адсорбційній іммобілізації.

Аналогічна проблема часто виникає при адсорбційній іммобілізації ферментів, яким для нормального функціонування необхідна наявність в активному центрі іона металу.

При іммобілізації металозалежних ферментів може відбутися вихід іона металу з активного центру ферменту і його зв'язування на поверхні носія, що супроводжується частковою або повною втратою його каталітичної активності. Це небажане явище можна усунути шляхом обробки носія розчином, який містить іони відповідного металу, а отже, насичить центри сорбції іонів металів на носії.

*Переваги і недоліки методу.* Іммобілізація ферментів шляхом адсорбції широко розповсюджена. Метод простий, доступний, дешевий, а носії, які використовуються для проведення адсорбції, порівняно недорогі. Іммобілізовані шляхом адсорбції ферменти в більшості випадків мають високу каталітичну активність і переваги в технологічному плані.

Одним із суттєвих недоліків методу є десорбція ферменту, тобто сповзання його з носія, що призводить до втрати дорогого біокаталізатора та забруднення кінцевого продукту, який одержують. Частіше це трапляється в момент додавання субстрату до іммобілізованого ферменту. До інших недоліків можна віднести низький вихід зв'язаного ферменту з розрахунку на одиницю маси носія, а також часткову або повну його інактивацію.

Крім того, недоліком адсорбційного методу іммобілізації є неможливість дати загальні рекомендації, які дозволили б заздалегідь зробити правильний вибір носія і оптимальних умов проведення процесу іммобілізації конкретного ферменту. Це завдання доводиться щоразу вирішувати заново, використовуючи метод проб і помилок.

#### ***Методи механічного включення молекул ферменту в структуру носія.***

*Іммобілізація ферментів шляхом включення в гелі.* Суть цього методу іммобілізації полягає в тому, що фермент включається у тривимірну сітку із тісно переплетених полімерних ланцюгів, які утворюють гель. Утримання молекул ферменту відбувається за рахунок того, що середня відстань між сусідніми ланцюгами в гелі менша за молекули включеного ферменту, тому він не може полишити полімерну матрицю і вийти в розчин. Певну роль в утриманні ферменту в сітці гелю відіграють іонні і водневі зв'язки, які виникають між ферментом і носієм. Простір між полімерними ланцюгами в гелі заповнений водою, на частку якої зазвичай припадає значна частина загального об'єму гелю.

Гелі можуть бути як органічної, так і неорганічної природи. Неорганічні – це силікагель, гель фосфату кальцію. З органічних використовуються гелі природних поліцукрів (крохмалю, агар-агару, агарози карагінана тощо), природних білків — колагену, а також синтетичних полімерів.

Ефективність включення ферменту в гелі досягається при оптимальному поєднанні розмірів пор гелю і молекули ферменту та оптимізації мікрооточення ферменту.

Для підвищення механічної міцності носіїв і більш міцного утримування включеного в них ферменту використовується обробка матриць біфункціональними зшиваючими реагентами, які здатні взаємодіяти з функціональними групами ферменту.

Перевагою методу є його простота, можливість одержання іммобілізованих препаратів у будь-якій формі (сферичні частинки, плівки та ін.), універсальність, тобто можливість використання для іммобілізації будь-яких біологічно активних речовин, поліферментних систем і навіть клітин. Одержані препарати стабільні, оскільки захищені гелем від несприятливих зовнішніх впливів, у тому числі і від бактеріального забруднення, оскільки крупні бактеріальні клітини не можуть проникнути у дрібнопористу матрицю.

Недоліком одержаних таким методом препаратів є певні дифузні труднощі при взаємодії ферменту з субстратом. А коли субстратом є високомолекулярна сполука, то цей спосіб іммобілізації взагалі не може бути використаний.

*Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок (мембран).* Загальний принцип, який лежить в основі цього способу, полягає в тому, що водний розчин ферменту відділяється від водного розчину субстрату напівпроникною мембраною, яка є непроникною для ферменту й інших високомолекулярних сполук, але дає можливість вільно дифундувати через неї низькомолекулярним речовинам – субстратам і продуктам реакції (рис. 7). Фермент бере участь у каталітичній реакції, перебуваючи у нативному стані в розчині і, утримуючись мембраною, легко може бути відокремлений від продуктів реакції.

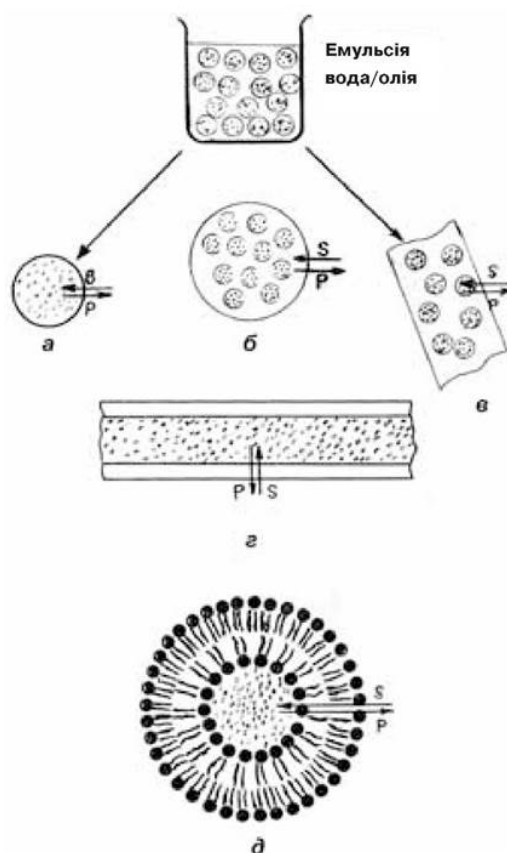
*Мікрокапсулювання.* Суть його полягає в тому, що водний розчин ферменту включають всередину мікрокапсул – замкнених сферичних пухирців з тонкою полімерною стінкою – мембраною. Залежно від способу одержання розміри мікрокапсул складають десятки або сотні мікрометрів, а товщина мембрани – соті-десяті долі мікрометра при діаметрі пор близько декількох нанометрів.

Метод мікрокапсулювання особливо зручний для іммобілізації поліферментних систем і може бути придатним для іммобілізації інших БАР, клітинних органел та інших субодиниць клітини, гомогенатів тканин тощо.

*Включення ферменту у волокна.* Це аналогічний мікрокапсулюванню метод, який відрізняється від мікрокапсулювання головним чином формою одержаних препаратів. У першому випадку утворюються сферичні мікрокапсули, а в другому – нитки.

Основа методу полягає у розчиненні волокноутворюючого полімеру (похідні целюлози, полівінілхлорид, полі-N-метилглутамат) в органічному

розчиннику, емульгації одержаного розчину з розчином або суспензією ферменту і протисненні емульсії через фільтри в рідину, яка викликає коагуляцію (наприклад, толуол).



**Рис. 7. Імобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок** (за Березіним І.В. та ін., 1987): а – мікрокапсулювання; б, в – включення у волокна; г – включення у порожнисті нитки з напівпроникними стінками; д – включення в ліпосоми; крапками позначені молекули ферменту; символами S і P субстрат та продукт ферментативної реакції відповідно

Одержані волокна – це пористі полімерні гелі, які містять гомогенну дисперсію невеликих крапель водного розчину ферменту розміром близько 1 мкм. Змінюючи умови процесу коагуляції, можна змінювати розмір пор у волокнах та кількість включеного ферменту. Однак не всі ферменти можуть бути інкапсульовані у волокнах. Перешкодою є жорсткі умови обробки (контакт з органічними розчинниками).

Для іммобілізації можуть використовуватись і одержані промисловістю *готові полімерні порожнисті волокна*, які застосовуються для очищення білків методом діалізу (рис. 7 г). Їх виготовляють з природних і синтетичних полімерів (целюлоза, полівінілхлорид, поліакриламід).

Для проведення ферментативної реакції волокна, заповнені розчином ферменту, занурюють у розчин субстрату, який дифундує через мембрану всередину волокна.

Недоліком методу є можливість використання тільки низькомолекулярних субстратів. Волокна, як і мікрокапсули, придатні для іммобілізації поліферментних систем, клітин, клітинних фрагментів.

Перевагою методу є його простота. Ферментомісткі волокна мають високу механічну міцність.

*Включення ферменту в ліпосоми.* Цей метод може використовуватись для іммобілізації практично всіх біологічно активних речовин, а одержані препарати широко застосовуються в медицині, а також для проведення фундаментальних досліджень, оскільки такі системи близькі до природних мембран і їх вивчення може дати цінну інформацію про ферментативні процеси в клітині.

Ліпосоми – це концентричні бішарові замкнуті ліпідні мембрани. Існують декілька способів їх одержання (рис. 7 д). У простішому випадку розчин ліпідів (зазвичай лецитину) розчиняють в органічному розчиннику, який упарюють у вакуумі, а на стінках посудини залишається тонка плівка ліпідів. Вона диспергується у водному середовищі, в якому міститься фермент (БАР), з утворенням сферичних капсул – ліпосом. Спосіб інкапсулювання (іммобілізації) ферментів (або інших БАР) в ліпосомах зводиться таким чином до диспергування ліпідної плівки у присутності розчину ферменту.

У другому варіанті методу розчин ліпідів в органічному розчиннику нашаровують на поверхню водного розчину ферменту, після чого органічний розчинник видаляють шляхом випарювання в потоці інертного газу, а ліпідну плівку, що утворилась, диспергують у водному розчині.

Характер взаємодії включеного білка-ферменту з ліпідними шарами різноманітний. Частина молекул взаємодіє із внутрішніми ліпідними шарами, частково проникаючи в них, а інші молекули ферменту можуть адсорбуватись на зовнішній поверхні ліпосом.

Сучасні методи одержання ліпосом дають можливість включати в них майже 50% ферменту, який знаходиться в розчині, причому практично без втрати каталітичної активності.

*Іммобілізація ферментів з використанням систем двофазового типу.* Відмінною рисою цього способу іммобілізації є те, що обмеження вільного переміщення ферменту в об'ємі системи досягається не за рахунок його взаємодії із жорстким носієм (сорбентом, гелем або мембраною), а внаслідок його здатності розчинятися тільки в одній із фаз двофазової системи, наприклад типу «вода — органічний розчинник, що не змішується з водою» (рис. 4 г). В таких системах фермент присутній тільки в одній фазі, а продукт ферментативної реакції зосереджується у другій. Метод простий, однак використання його обмежується низькою швидкістю процесу, можливістю інактивації ферменту на межі розділення фаз, а також переходом ферменту в протилежну фазу, що призводить до забруднення продукту і втрати дорогого каталізатора. Перевагою систем такого типу є можливість перетворення макромолекулярних субстратів.

Отже, перевагою методів механічного включення є те, що іммобілізована біологічно активна речовина захищена від несприятливих зовнішніх впливів шаром носія, що дає можливість одержати стабільні іммобілізовані препарати.



Недоліком є неспецифічні взаємодії між включеним ферментом і носієм, а також можливі міжмолекулярні взаємодії білків, що спричинює їх автоліз.

### Завдання.

1. Перерахуйте типи взаємодій (сил), за рахунок яких здійснюється адсорбційна іммобілізація.

2. Виберіть *вірні* твердження:

1) адсорбційна іммобілізація біокатализатора може здійснюватися за рахунок електричних сил;

2) при незворотній іммобілізації відбувається утворення ковалентних зв'язків;

3) іммобілізація в масі носія забезпечується тільки за рахунок механічного знерухомилення;

4) мікрокапсулювання є одним із способів іммобілізації в масі носія;

5) мікрокапсули, отримані методом диспергування, мають строго однакові розміри;

6) при іммобілізації ферментів металохелатним способом групи, здатні виступати в ролі лігандів, повинні перебувати в області активного центру ферменту;

7) іммобілізація на поверхні носія є незворотною.

3. Виберіть *невірні* твердження:

1) адсорбційна іммобілізація біокатализатора може здійснюватися за рахунок електричних сил;

2) при незворотній іммобілізації відбувається утворення ковалентних зв'язків;

3) іммобілізація в масі носія забезпечується тільки за рахунок механічного знерухомилення;

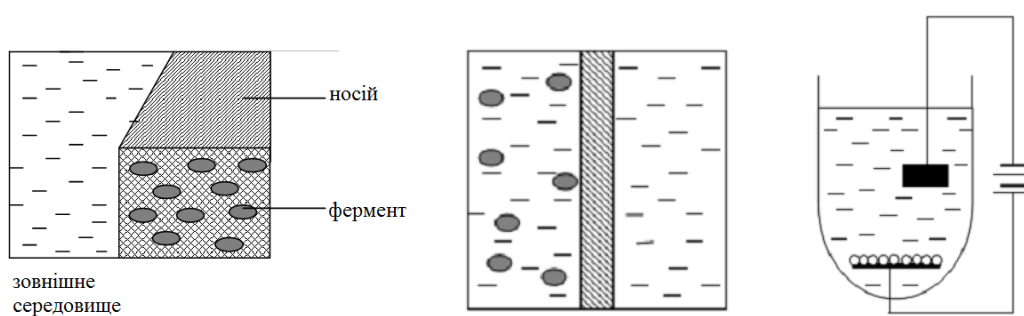
4) мікрокапсулювання є одним із способів іммобілізації в масі носія;

5) мікрокапсули, отримані методом диспергування, мають строго однакові розміри;

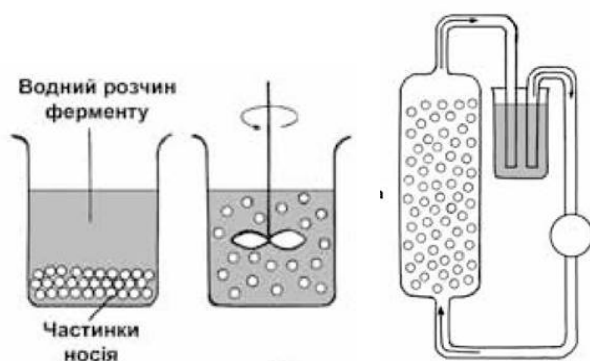
6) при іммобілізації ферментів металохелатним способом групи, здатні виступати в ролі лігандів, не повинні знаходитися в області активного центру ферменту;

7) іммобілізація на поверхні носія може бути тільки незворотною.

4. Як називаються зазначені на рисунках способи іммобілізації:



5. Як називаються зазначені на рисунках способи адсорбційної іммобілізації:



6. Скласти таблицю щодо переваг та недоліків фізичних методів іммобілізації ферментів за формою:

Таблиця 3

**Переваги та недоліки фізичних методів іммобілізації ферментів**

Спосіб іммобілізації	Переваги	Недоліки
Адсорбція на нерозчинних носіях		
Включення в пори гелю		
Відділення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани		
Використання двофазного реакційного середовища		
Іммобілізація ферментів з використанням напівпроникних оболонок		

Мікрокапсулювання		
Включення ферменту у волокна		
Включення ферменту в готові полімерні порожнисті волокна		
Включення ферменту в ліпосоми		

### Контрольні запитання

1. У чому полягає різниця між адсорбційними і механічними способами іммобілізації ферментів?
2. Які методи використовуються для одержання іммобілізованих адсорбцією ферментів?
3. За рахунок чого попередня модифікація носія дозволяє підвищити міцність зв'язування ферменту на матриці?
4. Що таке «ліпосома»? Які способи їх отримання існують?
5. З чого виготовляють промислові полімерні порожнисті волокна для іммобілізації ферментів?

### Лабораторна робота 4 Хімічні методи іммобілізації ферментів

На відміну від фізичної іммобілізації хімічна заснована на утворенні ковалентного зв'язку між молекулою білка і матеріалом матриці. Гетерогенні біокаталізатори, отримані шляхом ковалентної іммобілізації, мають, принаймні, дві важливі переваги.

По-перше, ковалентний зв'язок ферменту з носієм забезпечує високу міцність зв'язування біомолекули з поверхнею. При широкому варіюванні умов

каталітичної реакції фермент не десорбується з поверхні носія і не забруднює цільових продуктів реакції, що каталізує. Це особливо важливо при реалізації процесів медичного та харчового призначення, а також для забезпечення стійких, відтворюваних результатів в аналітичних системах.

По-друге, хімічна іммобілізація ферментів здатна призводити до суттєвого підвищення стабільності біокаталізатора, а найчастіше, і до зростання його каталітичної активності внаслідок закріплення активної конформації білка.

Ковалентна іммобілізація здійснюється в результаті хімічної реакції між реакційноздатними функціональними групами ферменту і твердої матриці. У той час як функціональні групи для іммобілізації на поверхні носія можуть бути обрані відносно вільно, хімічна модифікація ферменту, як правило, призводить до зниження його біологічної активності. У зв'язку з цим, однією з головних умов при виборі способу прикріплення ферменту до поверхні носія є максимальне збереження біологічної активності біокаталізатора. Для цього реакцію необхідно проводити в якомога більш м'яких умовах, щоб не допустити денатурацію білкової молекули. Крім того, щоб уникнути втрати біологічної активності, реакційні групи, які беруть участь у зв'язуванні біомолекули, повинні бути по можливості віддалені від її активного центру. Сформований ковалентний зв'язок повинний бути стабільним у широкому діапазоні експериментальних умов, а залишкові після реакції іммобілізації функціональні групи сорбенту повинні бути дезактивовані.

Як правило, макромолекули білка зв'язуються з поверхнею сорбенту статично, за рахунок формування декількох ковалентних зв'язків. З одного боку, таке багаточкове приєднання зменшує ризик відщеплення пов'язаної біомолекули і сприяє стабілізації її структури, але з іншого – може призводити до деформації нативної конформації біомолекули, що, в свою чергу, здатне відобразитися на біологічній активності ферменту. Ковалентна іммобілізація білків здійснюється за рахунок бічних функціональних груп амінокислот.

Хімічна іммобілізація ферментів часто є досить простим процесом, однак при виборі стратегії іммобілізації необхідно враховувати наявні активні групи на поверхні носія. Сорбенти, які містять на поверхні власні реакційно здатні функціональні групи (епоксидні, альдегідні, активовані ефірні або вінілазлактонні), можуть бути модифіковані безпосередньо за рахунок реакції з аміногрупами біомолекул (рис. 8).

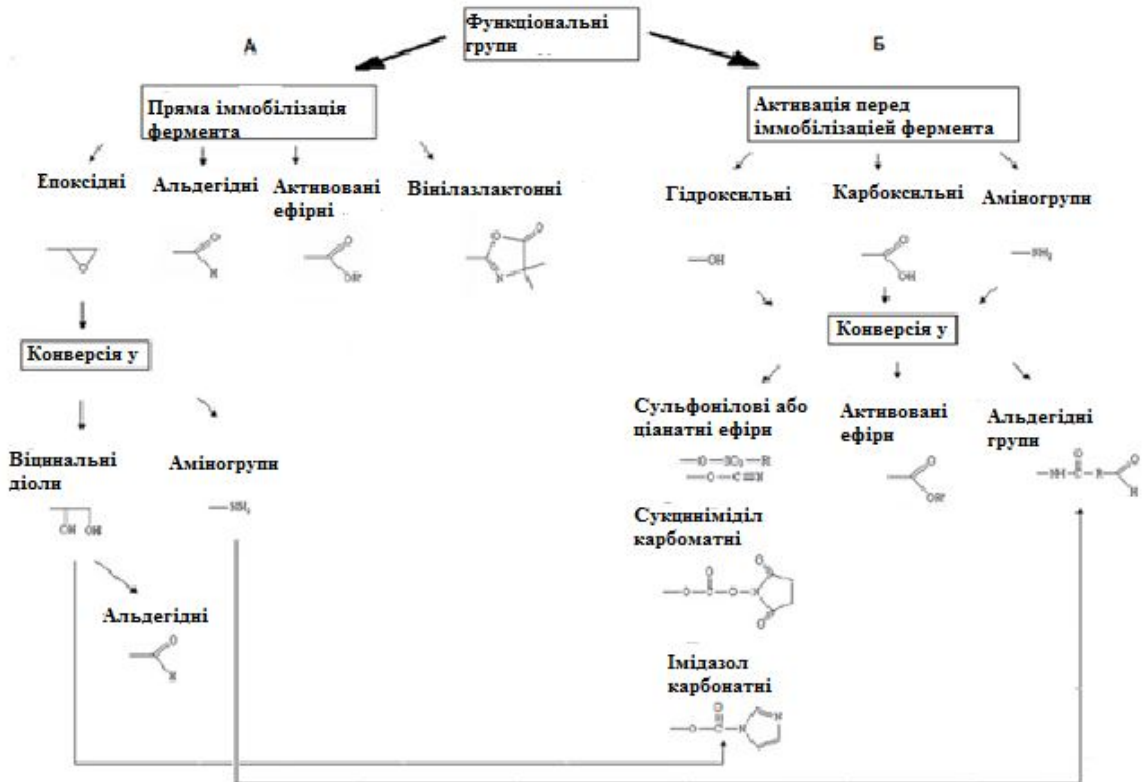


Рис. 8. Функціональні групи поверхні, що найчастіше використовують для ковалентної іммобілізації біомолекул

Один з найпоширеніших і простих підходів – це іммобілізація ферментів на поверхні матеріалів, що містять різні реакційнодатні групи, за допомогою їх прямої реакції з аміногрупами ферменту (рис. 9).

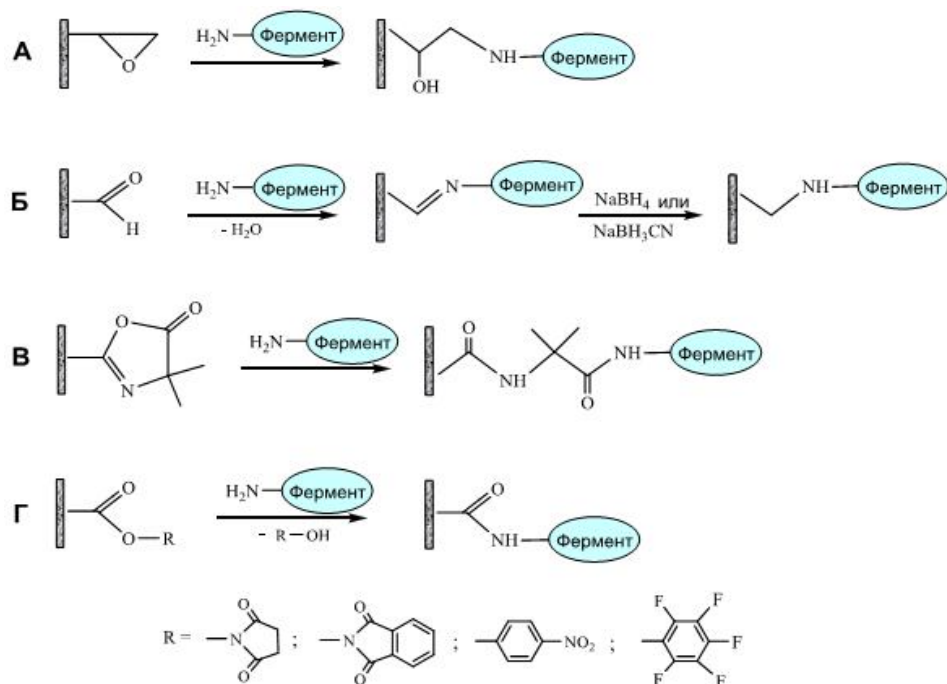


Рис. 9. Методи іммобілізації ферментів на поверхні матеріалів, що містять різні реакційнодатні групи: А - епоксидні, Б - альдегідні, В - вінїлазлактонні, Г - активовані складноєфірні групи

При відсутності необхідних груп для безпосереднього проведення процесу іммобілізації доводиться включати додаткові стадії. Зокрема, крім прямого прикріплення ферменту до поверхні носія можна виділити ще три способи ковалентної іммобілізації, в основі яких лежить: (1) активація функціональних груп носія, (2) активація функціональних груп ферменту, і (3) використання бі-або поліфункціональних агентів.

*Активація функціональних груп носія.* В даному випадку модифікації піддаються функціональні групи, що розташовані на поверхні матриці. Методи, які використовуються для активації того чи іншого носія, безпосередньо пов'язані з його хімічною природою і зумовлені наявністю в складі носія тих чи інших груп, здатних до модифікації. Найбільш поширеними є методи модифікації поверхні, що містить карбоксильні, гідроксильні та аміногрупи. При необхідності також може проводитися конверсія епоксидних груп носія в більш реакційноздатні альдегідні або аміногрупи (рис. 10).

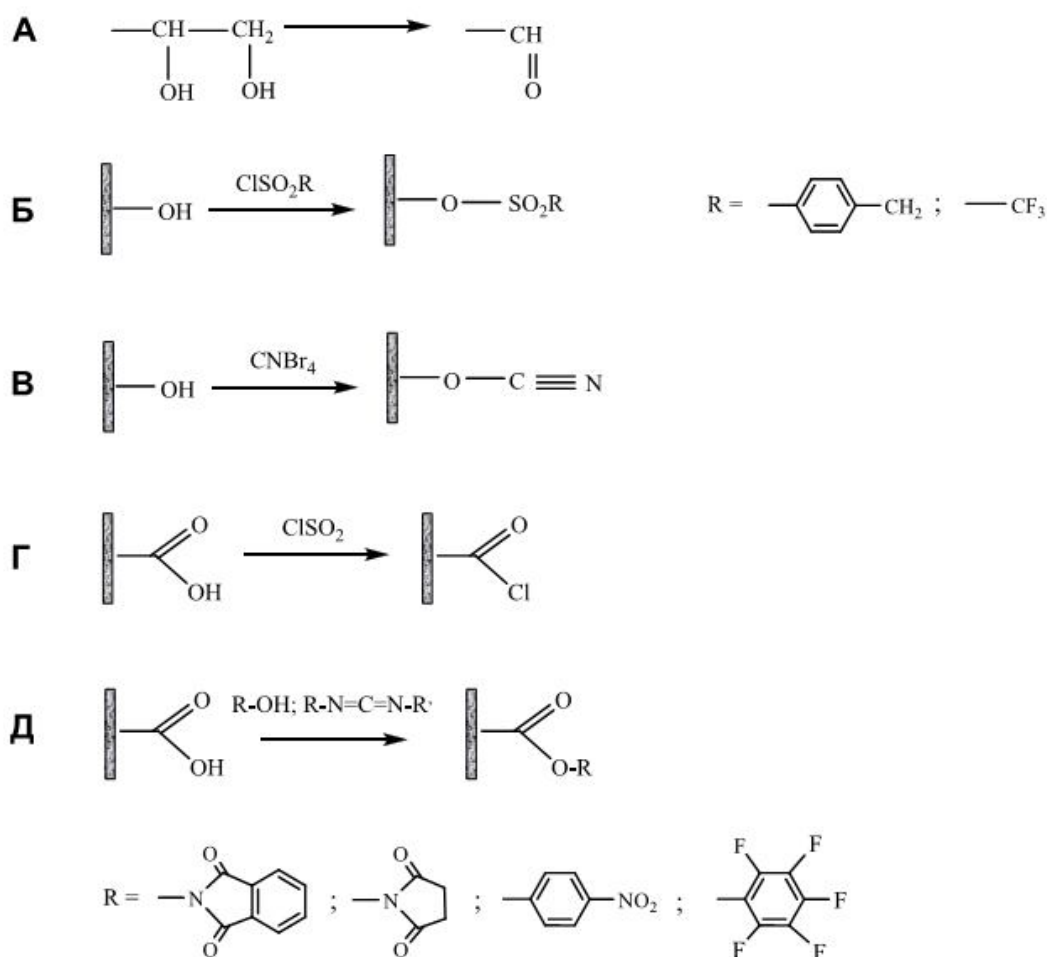
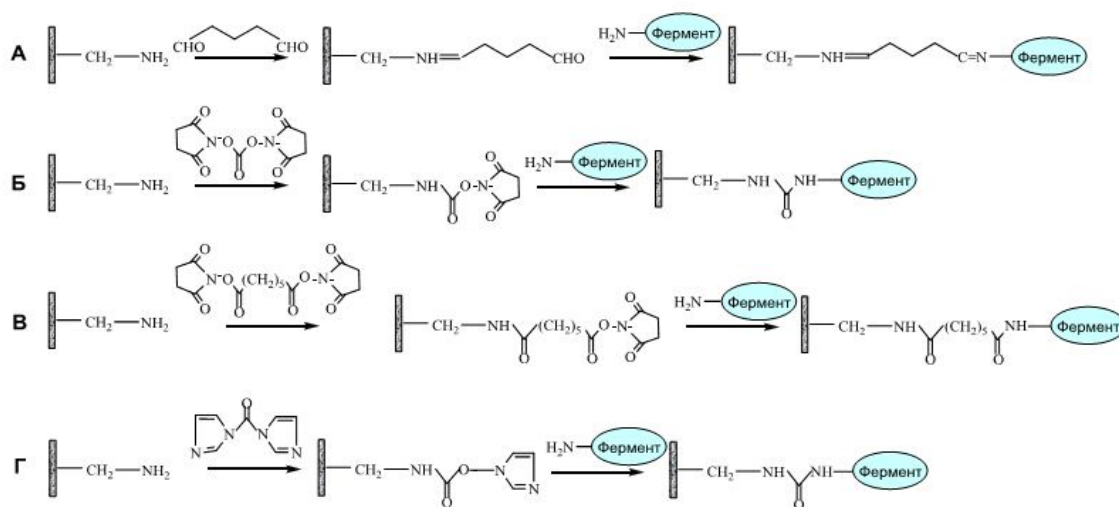


Рис. 10. Методи модифікації матеріалів, що містять гідроксильні (А, Б, В) і карбоксильні групи (Г, Д).

*Активація ферменту.* Хоча молекули ферментів містять ряд функціональних груп, їх наявності не завжди буває достатньо для проведення того чи іншого процесу іммобілізації. Найбільш часто процес іммобілізації білків проводять за рахунок реакції з їх аміногрупами. Однак для деяких ферментів, що

містять в активному центрі залишки лізину, даний метод може бути не оптимальним, внаслідок ймовірності їх участі в реакції іммобілізації, а, отже, втрати активності іммобілізованого ферменту. В цьому випадку іммобілізацію проводять за рахунок попередньої модифікації карбоксильних груп аспарагінової і глутамінової кислот для подальшої реакції з аміногрупами, локалізованими на поверхні носія (рис. 10 (Г, Д)). Недоліком даного підходу є можливість зшивання глобул білка, що містять крім карбоксильних також і аміногрупи. Даний побічний ефект може бути мінімізований шляхом проведення реакції активації в розведених розчинах, при знижених температурах і в областях рН, які запобігають здійсненню реакції за участю аміногруп.

*Використання бі- або поліфункціональних агентів.* Часто для проведення ковалентної іммобілізації з використанням матриць, що містять функціональні групи непридатні для прямої реакції з аміногрупами ферментів, використовують проміжні поліфункціональні агенти. Дані сполуки мають містити, як мінімум, дві реакційноздатні групи, з яких одна потрібна для прикріплення до матриці, а друга – для зв'язування з молекулою ферменту. Найбільш широко використовуваними біфункціональними сполуками є глутаровий альдегід, 1,1-карбонілдіімідазол (КДІ), N,N'-дісукцініміділ карбонат (ДСК) або N,N'-дісукцініміділ суберат (ДСС). Схеми відповідних реакцій наведені на рисунку 11.

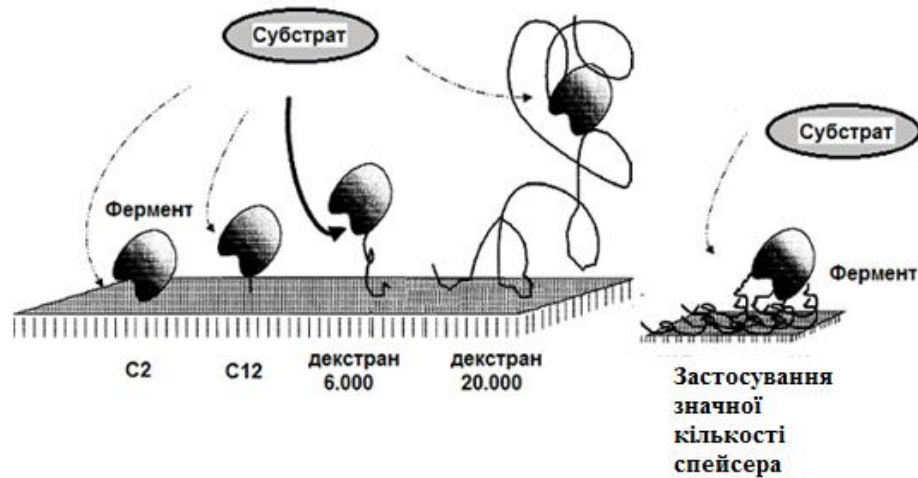


**Рис. 11. Схеми реакцій іммобілізації ферментів на поверхні матриць, що містять аміногрупи, за допомогою використання біфункціональних агентів:** А – глутарового альдегіду, Б – N,N'-дісукцініміділ карбонату, В – N,N'-дісукцініміділ суберата і Г - 1,1'-карбонілдіімідазол.

В даних випадках біфункціональні агенти крім основної функції також виконують роль коротких спейсерів, що дистанціюють фермент від поверхні носія, і, таким чином, що дозволяють мінімізувати стеричні труднощі в здійсненні каталітичного процесу, що зумовлюються присутністю ферменту на поверхні твердого носія.

За різноманітністю методичних прийомів цей спосіб незрівнянно багатший і гнучкіший за попередній за рахунок зшиваючого агента. По-перше, підбираючи

довжину зшиваючого агента (або підбираючи оптимальну суміш зшиваючих агентів різної довжини), можна змінювати каталітичні характеристики іммобілізованого ферменту (рис. 12).



**Рис. 12. Схема, що ілюструє розташування ферменту на поверхні, при іммобілізації через спейсери різної довжини**

По-друге, можна спеціально конструювати зшивку так, щоб вона містила зв'язок, лабільний за певних умов або такий, що специфічно розщеплюється певними реагентами (зокрема, ферментативно). Це дає ключ до контрольованого відокремлення іммобілізованого ферменту від носія, наприклад, при вирішенні проблем направленої транспорту ферментів у живому організмі.

Незалежно від кількості і хімічної природи компонентів, які використовуються в процесі іммобілізації, кількості і труднощів окремих стадій цього процесу, створюється одна із трьох моделей, до складу яких входить не більше трьох елементів: фермент (Ф), носій (Н) і зшиваючий бі- або поліфункціональний реагент (С, З), який називається «зшивка», «вставка», «спейсер», «ніжка» і займає проміжне положення між молекулами, що зшиваються.

Ковалентна іммобілізація можлива і в системах, які початково не містять носія, а тільки фермент і зшиваючий реагент (З-Ф). Носій (як тверде тіло) формується безпосередньо у процесі іммобілізації, або ж сам фермент слугує одночасно і носієм. Таким чином, відбувається ковалентне вшивання молекули ферменту в різні типи сіток (рис. 13). Ідея конструювання ферментних сіток (ретикуляція ферментів) впливає із поліфункціональної природи самої молекули ферменту, який має на поверхні, окрім активного центру, велику кількість реакційноздатних груп. При введенні в розчин ферменту біфункціонального зшиваючого реагента окремі молекули ферменту зшиваються одна з одною і утворюють сітку, в якій вузлами слугують самі молекули ферменту. Залежно від природи і кількості зшиваючого агента можна одержати як водорозчинні, так і водонерозчинні препарати.



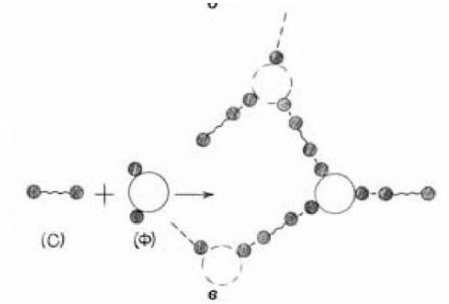


Рис. 13. Ковалентна іммобілізація ферментів у різні типи сіток

Приєднуючи до полімеру ті чи інші бічні гілки, можна гнучко регулювати його властивості і реакційну здатність, створювати на його поверхні мікрооточення, оптимальне для стабільного функціонування біокаталізатора.

Інший спосіб *ретикюляції* заснований на використанні ферментів, попередньо ковалентно модифікованих зшиваючим реагентом, який має подвійний зв'язок (наприклад, акрилоїлхлоридом). У цьому випадку при співполімеризації білкового макромономера з низькомолекулярними мономерами (наприклад, з акриламідом), утворюються сітчасті полімерні гелі, зшиті білком або додатковим зшиваючим мономером (наприклад, N, N-метиленбіс-акриламідом).

Зшивкою білка в об'ємі розчинника (співполімеризація) одержують тривимірний гель (рис. 14, а) у вигляді крупного однорідного блока, який можна механічно подрібнювати і використовувати у вигляді частинок у суспензіях.

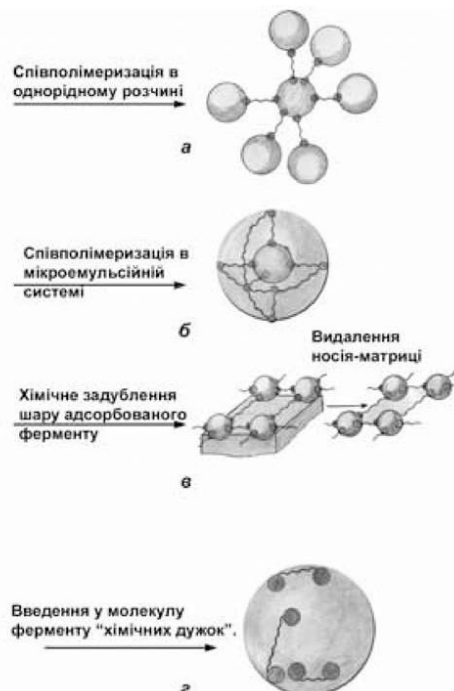


Рис. 14. Типи ретикюляції ферментів: а – міжмолекулярна трьохвірна сітка; б – сітчаста оболонка навколо молекули ферменту (молекулярно-іммобілізований фермент); в – міжмолекулярна двовірна сітка; г – внутрішньомолекулярна сітка із поліпептидних ланцюгів білка та «хімічних дужок»

Тривимірний гель можна готувати і безпосередньо у вигляді дрібних частинок сферичної форми шляхом емульсійної полімеризації. Емульсії одержують диспергуванням водного розчину, який містить мономер в органічному розчиннику, що не змішується з водою. В міцелярних системах розміри «крапельок», які містять модифікований фермент і мономер, можна варіювати і навіть одержувати їх близькими до власних розмірів молекул ферменту (рис. 14, б). Це нова якість іммобілізації – молекулярний рівень.

Процес ретикуляції може відбуватися не тільки в розчині ферменту, але й при використанні його іммобілізованих препаратів. Так, додаткова обробка адсорбційно іммобілізованого ферменту на інертному носії зшиваючим агентом призведе до підвищення міцності (задублення) препарату. Носій тут не бере участі в хімічній реакції, а слугує лише матрицею для організації шару (моношару) адсорбованого ферменту і зумовлює двовимірну направленість ретикуляції. До того ж, носій може бути взагалі видалений (наприклад, нітроцелюлозу розчиняють у метанолі) і таким чином одержують зшиту ферментну плівку (рис. 14, в).

Препарати молекулярно іммобілізованих ферментів можуть бути одержані, якщо обидві групи біфункціонального зшиваючого реагента взаємодіють з однією і тією самою молекулою білка – ферменту. Тут можна говорити про накладання «хімічних дужок», які внутрішньомолекулярно закріплюють структуру ферменту (рис. 14, г).

Головним завданням іммобілізації ферментів хімічним методом є максимальне збереження каталітичної функції ферменту шляхом використання функціональних груп, які не входять до активного центру ферменту і несуттєві для виявлення каталітичної активності, а також створення умов іммобілізації, які не викликають денатурації білкової молекули. Отже, при хімічній іммобілізації бажано захищати активний центр ферменту. Для цього можна використати різні захисні реагенти, субстрати, зворотні інгібітори тощо.

Загальною перевагою іммобілізованих хімічним методом препаратів є чітко визначені і контрольовані властивості, що дуже важливо при використанні їх у медицині і в аналітичній роботі.

Недоліком хімічних методів іммобілізації і одержаних таким методом препаратів є їх висока вартість, складність одержання і, в зв'язку з цим недоцільність їх використання у великомасштабних промислових процесах. З цією метою більш придатними препаратами є ті, що одержані фізичними методами іммобілізації і особливо шляхом адсорбції.

### **Завдання**

1. Скласти таблицю щодо переваг та недоліків хімічних методів іммобілізації ферментів за формою:

### Переваги та недоліки хімічних методів іммобілізації ферментів

Спосіб іммобілізації	Переваги	Недоліки
Ковалентні зв'язки між реактивними групами носія та ферменту		
Співполімеризаційний метод		
Металохелатний метод		

#### 2. Виберіть *вірні* твердження:

1. Носій не впливає на мікрооточення іммобілізованого ферменту
2. Для хімічної іммобілізації можуть використовуватись носії як органічної, так і неорганічної природи
3. Для хімічної іммобілізації можуть використовуватись носії тільки органічної природи
4. Реакційна здатність білка-ферменту визначається набором і кількістю розміщених ззовні білкової молекули функціональних груп
5. Зшиваючі реагенти не можуть бути побудовані із різних за хімічною природою ланок з неоднаковими за міцністю зв'язками між ними.
6. Ковалентна іммобілізація не можлива і в системах, які початково не містять носія, а тільки фермент і зшиваючий реагент
7. Утворення хімічних зв'язків між елементами можливе тільки за наявності специфічних реакційноздатних груп у всіх реагентів, що вступають у взаємодію: ферменту, носія і зшиваючого агента.
8. Загальним недоліком іммобілізованих хімічним методом препаратів є не чітко визначені і контрольовані властивості

#### Контрольні запитання

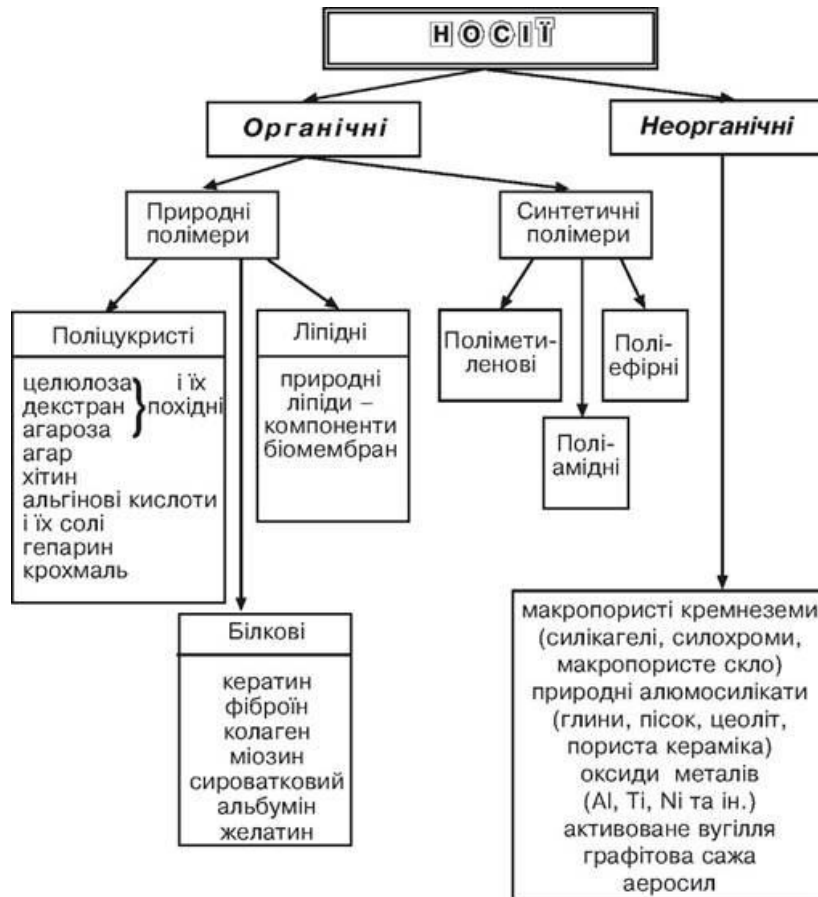
1. На чому базуються хімічні методи іммобілізації?
2. Які основні принципи конструювання ковалентно-іммобілізованих ферментів?
3. Які носії використовуються для хімічної іммобілізації?
4. Що таке зшиваючий реагент і з якою метою він використовується при іммобілізації ферментів?
5. Чим визначається реакційна здатність білка-ферменту? Які функціональні групи білка є найбільш реакційноздатними?
6. Які реакційноздатні групи використовуються як групи-мішені для ковалентної іммобілізації?
7. Яке головне завдання при іммобілізації ферментів хімічним методом?
8. Вкажіть недоліки і переваги хімічного методу іммобілізації?

## Лабораторна робота 5

### Носії для іммобілізації ферментів. Вимоги до носіїв

Для одержання іммобілізованих ферментів використовується величезна кількість носіїв (матриць, підкладок) як органічної, так і неорганічної природи.

Усі носії можна розділити на дві основні групи: органічні і неорганічні, які, у свою чергу, можуть бути як природними, так і синтетичними (рис. 15).



**Рис. 15. Класифікація носіїв, які використовуються для іммобілізації БАР**

*Вимоги до носіїв.* Виходячи з того, що властивості одержаних іммобілізованих ферментів залежать від властивостей носіїв, до них висуваються особливі вимоги:

- 1) висока хімічна і біологічна стійкість;
- 2) висока механічна міцність;
- 3) достатня проникність, велика питома поверхня, висока місткість, пористість;
- 4) можливість одержання у вигляді зручних у технологічному сенсі форм (гранул, мембран, трубок, листків тощо);
- 5) легке переведення у реакційноздатну форму (активація);
- 6) висока гідрофільність, яка забезпечує можливість проведення реакції зв'язування ферменту з носієм у водному середовищі;
- 7) невисока вартість.

До полімерних носіїв висувається низка додаткових вимог, обумовлених методом іммобілізації, властивостями ферменту, що іммобілізується, і способом подальшого використання препарату:

1) при ковалентній іммобілізації носій повинен зв'язуватися тільки з тими функціональними групами на білку, що не відповідають за каталіз, тобто розміщені на поверхні і не входять до активного центру;

2) вони не повинні впливати як інгібітори на фермент.

*Місткість носія* – це кількість ферменту, яка за допомогою фізичних чи хімічних методів іммобілізації може зв'язуватись з одиницею маси носія за контрольованих умов процесу іммобілізації (температура, рН, іонна сила розчину тощо).

Вона залежить від властивостей носія (питомої поверхні, пористості) і від того, з якими функціональними групами носія реагує фермент під час його іммобілізації. Так, при взаємодії білка-ферменту з нейлоновим носієм через аміногрупи місткість носія досягає 150 мг білка-ферменту на 1 г носія, а при зв'язуванні через СООН-групи – тільки 44-78 мг.

Для подолання деяких негативних властивостей або надання їм нових властивостей носії модифікують, тобто направлено їх змінюють. *Модифікація носіїв* передбачає обробку їх речовинами, які посилюють здатність зв'язувати фермент.

Відомо багато способів модифікації матриць і активування їх функціональних груп. Наприклад, такий недолік кремнеземних носіїв як висока розчинність вдається усунути шляхом модифікування властивостей їх поверхні – покриття плівкою алюмінію, гафнію, титану тощо. При цьому в десятки разів зменшується їх розчинність, а також усувається неспецифічна сорбція. Одним з істотних недоліків губчастого крохмалю є недостатня стійкість його проти дії гідролаз. Оброблена формальдегідом або глутаровим альдегідом молекула крохмалю модифікується за рахунок зшивок і стає стійкою проти гідролаз.

Модифікування поверхні носіїв дає змогу регулювати процес зв'язування їх із функціональними групами ферменту, а одержані іммобілізовані препарати характеризуються більшою стабільністю.

Найрозповсюдженішим модифікатором є глутаровий альдегід, який утворює амідний зв'язок між аміногрупою носія і карбоксильною групою ферменту. Він ще називається поперечно-зшиваючий агент (реагент).

Для одержання іммобілізованих ферментів із заздалегідь відомими властивостями найчастіше здійснюють активування поверхні модифікованого носія.

Активація носія – це обробка його поверхні фізичними або хімічними методами і речовинами з метою підвищення його місткості. При цьому на поверхні носія утворюються електрофільні групи (мінус-групи, наприклад,  $\text{COO}^-$ ), які мають високу реакційну здатність до нуклеофільних груп білка (наприклад, аміно- і сульфогідрильних груп –  $\text{NH}_3^+$  і  $\text{SH}^+$ ).

Активацію носіїв проводять з метою введення на поверхню електрофільних груп, які реакційноздатні стосовно до нуклеофільних груп білка (аміно- і SH-груп). Для цього, наприклад, вводять діазогрупи, альдегідні, імідоєфірні, азидні групи.

Як активатори носіїв використовуються діальдегіди, бромціан, ароматичні хінони, карбодіміди, хлортриазини, епоксиди, реактив Вудворда тощо.

Участь носія у створенні мікрооточення іммобілізованого ферменту відрізняється від розчинника. У зв'язку з цим вводиться поняття вільний розчин і мікрооточення ферменту. *Мікрооточення іммобілізованого ферменту* – це молекули та іони, що знаходяться дуже близько біля нього і впливають на його активність.

Носій впливає на мікрооточення іммобілізованого ферменту. Він може сприяти концентруванню на своїй поверхні або відштовхувати від неї молекули субстрату, продукту реакції, інгібітору, іонів водню та інших молекул і іонів, змінюючи при цьому їхній вміст у безпосередній близькості від ферменту. Іммобілізація супроводжується зміною багатьох параметрів ферментативної реакції (оптимумів температури і рН, константи Михаеліса, максимальної швидкості реакції та ін.).

Якщо фермент, іммобілізований на поліаніононому носії і діє на субстрат, який має позитивний заряд, то у зв'язку з електростатичною взаємодією концентрація субстрату у фазі вільного розчину і в мікрооточенні буде різною. Жоден з іонів, що є у розчині (субстрат,  $H^+$ ), не розподіляється рівномірно в системі.

Носій впливає також на мікрооточення ферменту в результаті обмежень, створюваних носієм для вільної дифузії молекул (субстрату, продукту, кофактора тощо) як у напрямі до ферменту, так і від нього. Дифузійні обмеження спричинюються внутрішньою або зовнішньою перешкодою.

Зовнішня дифузійна перешкода пов'язана з наявністю навколо носія шару, що не перемішується (шару Нернста), товщина якого залежить від швидкості, з якою розчинник перемішується навколо носія. Зі збільшенням швидкості зменшується величина протидії, створюваної зовнішньою дифузійною перешкодою. Речовини розчинника дифундують у шар Нернста завдяки пасивній молекулярній дифузії і конвекції.

Внутрішні дифузійні перешкоди виникають через обмеження, створювані самим носієм. Визначальною щодо швидкості дифузії є одна з дифузійних перешкод – внутрішня або зовнішня.

Однією з традиційних форм гетерогенних біокаталізаторів є проточні системи, отримані шляхом упаковки в колонку частинок носія, що несе іммобілізований фермент. Дрібні стаціонарні фази існують у вигляді пористих, що набухають, непористих, мікропеллікулярних, перфузійних, макропористих і гігапористих структур.

У разі *пористих частинок, що набухають*, пористість досягається за рахунок їх внесення в термодинамічно добрий розчинник, а пори забезпечуються полімерною сіткою слабо-зшитого сополімеру. Внутрішня структура таких частинок, як правило, містить тупикові пори, в результаті чого рідина всередині

них застоюється, і молекули речовини можуть проникнути в них і назад тільки за допомогою дифузії. У таких системах масоперенесення речовини контролюється швидкістю її проникнення в пори частинок стаціонарної фази. У середині пор мають місце суттєві дифузійні обмеження нормального масопереносу речовини між рідкою і твердою фазами. Таким чином, кількість перетвореного субстрату в продукт залежить в основному від молекулярної дифузії, розмірів пор і частинок, а також від швидкості потоку субстрату. У зв'язку з цим для колонок, упакованих частинками сорбенту, можливість використання високих швидкостей потоку рухомої фази істотно обмежена. По-перше, це пов'язано з тим, що при збільшенні даного параметра велика частина розчину субстрату протікає в міжчастинковому просторі, що неминуче призводить до погіршення ефективності біокаталізу. По-друге, збільшення швидкості потоку часто призводить до стиснення шару сорбенту, і, як наслідок, збільшення тиску в системі. В результаті, такі системи проявили себе як досить повільні і неефективні.

У разі використання *непористих частинок* через повну відсутність пір взаємодії між субстратом і локалізованим ферментом відбуваються тільки на поверхні частинок. В результаті чого відбувається дуже швидкий обмін молекулами між рідиною і твердою поверхнею. Щоб подолати проблему низької питомої площі поверхні і досягти високої ефективності, такі частинки, як правило, дуже малі, їх діаметр коливається в межах 1,5-3,0 мкм.

Схожі з непористими так звані *мікропеллікулярні* носії, які представляють собою непористі частинки, поверхня яких покрита тонким шаром пористого матеріалу, що служить для збільшення площі поверхні. Таким чином, дані структури не мають внутрішніх пір, обмежують швидкість проникнення субстрату до іммобілізованих біомолекул, при цьому їх іммобілізаційна ємність істотно вище в порівнянні з непористими частинками.

*Перфузійні і макропористі частки* на відміну від звичайних пористих містять мережу великих взаємопов'язаних пір, здатних до реалізації конвективного потоку, в результаті чого транспорт речовини всередині частинок значно полегшується потоком рухомої фази.

*Гіганористі частинки* були розроблені для збільшення ємності стаціонарних фаз типу перфузійних частинок, оскільки при збільшенні розміру пір, вона істотно падала. Такі частинки складаються з жорсткого скелета, що містить пори великого розміру, заповнені м'яким гелем, крізь які молекули транспортуються конвективним потоком рухомої фази. В цьому випадку іммобілізаційна ємність носія значно збільшувалася, однак транспорт речовини всередині частинок трохи ускладнювався в порівнянні з перфузійними частинками в зв'язку з присутністю всередині пір маси гелю.

**1. Вкажіть, які з наступних тверджень вірні, а які – ні. Якщо твердження невірне, поясніть чому?**

**А.** При ковалентній іммобілізації носій повинен зв'язуватися тільки з тими функціональними групами на білку, що не відповідають за каталіз, тобто розміщені на поверхні і не входять до активного центру.

**Б.** Клас природних полімерів можна поділити на групи відповідно до їх біохімічної класифікації: поліметіленові, поліамідні і поліефірні носії.

**В.** Модифікування поверхні носіїв дає змогу подолати процес зв'язування їх із функціональними групами ферменту, а одержані іммобілізовані препарати характеризуються більшою свободою.

**Г.** Зовнішня дифузійна перешкода пов'язана з наявністю навколо носія шару, що перемішується, товщина якого залежить від стабільності розчинника.

**Д.** Носій впливає на мікрооточення ферменту в результаті обмежень, створених носієм для вільної дифузії молекул (субстрату, продукту, кофактора тощо) як у напрямі до ферменту, так і від нього.

**Е.** Носій впливає на мікрооточення іммобілізованого ферменту. Він може сприяти концентруванню на своїй поверхні або відштовхувати від неї молекули субстрату, продукту реакції, інгібітору, іонів водню та інших молекул і іонів, змінюючи при цьому їхній вміст у безпосередній близькості від ферменту.

### **Контрольні запитання**

1. На які групи поділяють органічні носії?
2. Які види носіїв належать до природних?
3. Які додаткові вимоги висуваються до полімерних носіїв?
4. Від чого залежить місткість носія?
5. Для чого здійснюють модифікацію носія? В чому полягає її суть?
6. В чому полягає різниця між модифікацією і активацією носія?
7. Чим мікрооточення іммобілізованого ферменту відрізняється від розчинника?
8. Яким чином носій впливає також на мікрооточення ферменту?
9. В якому вигляді можуть існувати дрібні дисперсні фази носія в проточній системі?
10. В чому полягає різниця перфузійних і гігапористих частинок носія?



## Характеристика носіїв для іммобілізації

В процесі розвитку технології іммобілізованих ферментів було запропоновано велику кількість носіїв різної природи. Було показано, що носії здійснюють значний вплив на ефективність гетерогенного біокаталізу. Ідеальна матриця повинна мати високу хімічну і біологічну стійкість, достатню проникність для ферменту і субстратів (при створенні проточних форм), можливість отримання у вигляді зручних в технологічному відношенні форм, повинна бути досить гідрофільною, мати невисоку вартість, а також забезпечувати можливість отримання стабільного зв'язку між ферментом і поверхнею носія.

В даний час на світовому ринку представлений широкий спектр носіїв, придатних для іммобілізації біомолекул. Серед них можна виділити природні і синтетичні полімери, а також неорганічні носії.

З числа природних полімерних носіїв найбільшою популярністю користуються полісахариди, наприклад, агароза, целюлоза, декстран, і їх похідні, а також хітозан і агар. Велике значення полісахаридів в якості носіїв для іммобілізації ферментів пояснюється їх доступністю, наявністю реакційноздатних функціональних груп, високою гідрофільністю, що забезпечує бажане мікрооточення для багатьох ферментів. Основними недоліками є нестійкість до впливу мікроорганізмів і досить висока вартість.

Цього недоліку позбавлені синтетичні органічні полімерні матриці. Умовно за хімічною будовою основного ланцюга макромолекул їх можна розділити на кілька груп: поліметіленові, поліамідні і поліефірні. У літературі описані приклади використання в якості носіїв матеріалів на основі широкого спектру сополімерів, наприклад, полістиролу, поліакрилатів, поліметакрилатів, поліамідів, поліолефінів, сополімерів на основі малеїнового ангідриду і етилену або стирулу, поліальдегідів, поліпептидів і т.і.

Синтетичні носії можуть бути адаптовані до вимог практично будь-якого процесу іммобілізації. Реакційні групи можуть бути як уведені в процесі полімеризації шляхом відбору підходящих мономерів, так і отримані за допомогою полімераналогових перетворень функціональних груп полімеру. Таким чином, синтетичні полімерні носії можуть застосовуватися як для ковалентної, так і для фізичної іммобілізації ферментів.

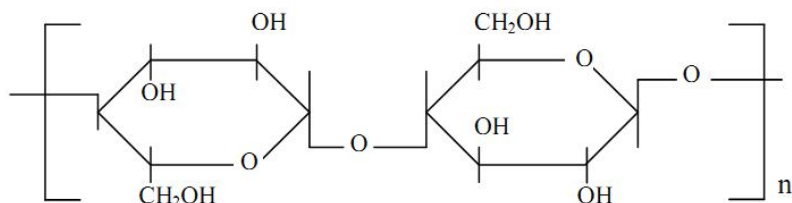
В якості неорганічних носіїв найбільш часто застосовують матеріали зі скла, глини, кераміки, графітової сажі, силікагелю, а також метали та оксиди металів. Неорганічні носії часто демонструють добрі механічні властивості, термостійкість і стійкість до впливу мікробів і органічних розчинників.

Істотним недоліком багатьох неорганічних носіїв є відсутність або присутність неактивних функціональних груп. Як наслідок, іммобілізація ферментів на поверхні таких матеріалів може обмежуватися або тільки фізичною адсорбцією, або вимагає додаткових стадій активації. Недоліком використання силікагелів, як носіїв для іммобілізації ферментів, є їх нестабільність у лужних середовищах, що обмежує їх застосування для роботи з ферментами, що мають рН оптимум у цій області.

**Природні носії.** Велике значення природних полімерів в якості носіїв для іммобілізації пояснюється їх доступністю і наявністю реакційно здатних функціональних груп (у вихідному або модифікованому препараті), що легко вступають у різні хімічні реакції, а також високу гідрофільність. До недоліків можна віднести нестійкість до впливу мікроорганізмів, відносно високу вартість багатьох із них.

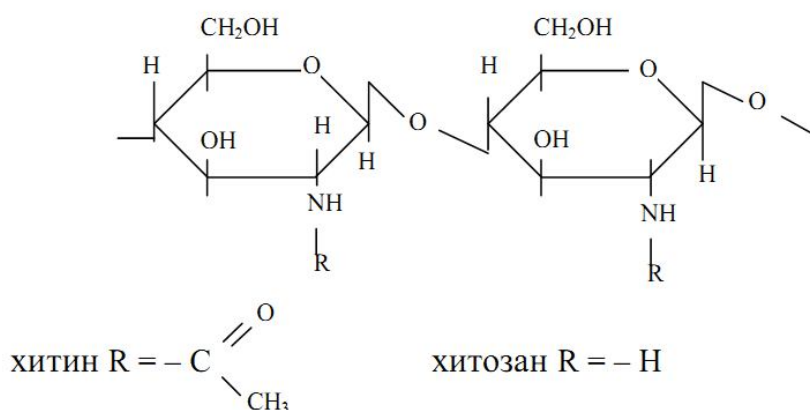
Полісахариди. Найбільш часто для іммобілізації використовують целюлозу, декстран, агарозу та їх похідні.

#### Целюлоза



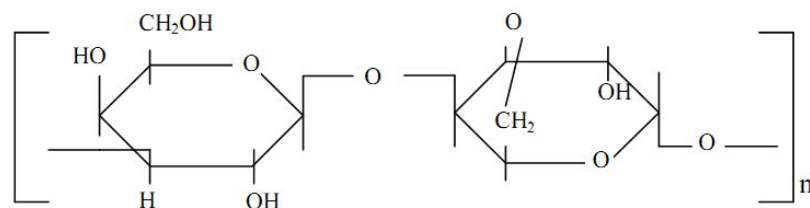
відрізняється високим ступенем гідрофільності, а наявність великої кількості гідроксильних груп дає можливість її легко модифікувати шляхом введення різних замісних груп.

До природних амінополісахаридів відноситься *хитин*. Його можна розглядати як целюлозу, в якій  $\text{CH}_2\text{OH}$ -група замінена ацетамідним залишком:



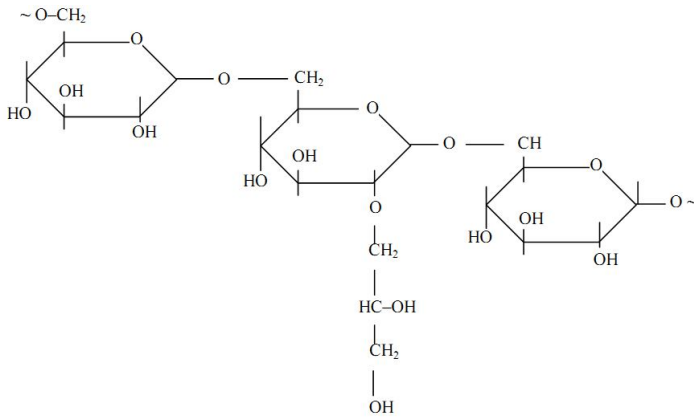
*Хитин* – основний компонент зовнішнього скелета ракоподібних, комах, а також клітинних оболонок деяких грибів. Ця сполука є відходом промислової переробки креветок і крабів, тому є у великих кількостях при відносно низькій вартості.

*Агароза* – полі-β-галактопіранозил-3,6-ангідро-α-L-галактопіраноза:

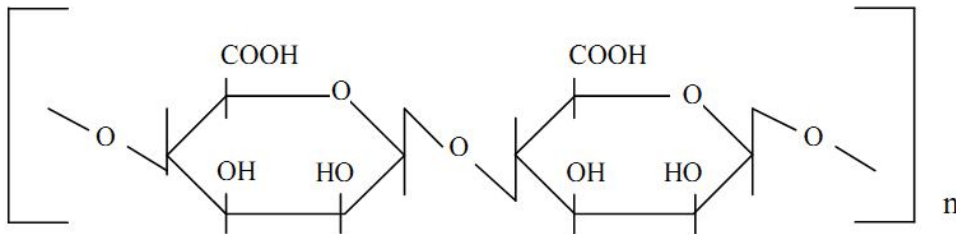


Вона широко використовується як носій для іммобілізації. Однак вартість її дуже висока, тому розробляються різні методи її модифікації з метою отримання форм, які легко регенеруються.

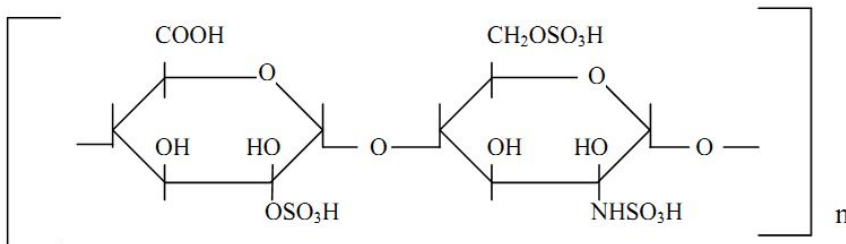
*Декстран* – полі-1,6- $\alpha$ -D-глюкопіранозил-D-глюкопіраноза – розгалужений полісахарид з бактеріальних джерел, що містить залишки глюкози.



*Альгінові кислоти та їх солі* – це полісахариди бурих морських водоростей, що складаються з пов'язаних  $\beta$ -1,4-зв'язками залишків D-маннуронової кислоти.



*Гепарин* є кислий полісахарид, що містить ланки сульфатованої D-глюкуронової кислоти (або L-ідуринової) і сульфатованого глюкозаміну (або N-ацетилглюкозамін):



Гепарин успішно застосовується для отримання водорозчинних препаратів іммобілізованих ферментів, що використовуються в медицині для введення *in vivo*.

*Білки* використовують в якості носіїв для іммобілізації ферментів. Відомо, що багато ферментів у клітині функціонують в тісному контакті з ліпідами і білками. Тому вважають, що вивчення поведінки ферментів, іммобілізованих на білкових матрицях, дозволить також краще зрозуміти закономірності функціонування ферментів *in vivo*. З точки зору практичної значущості важливими властивостями цих носіїв є висока місткість по відношенню до

ферментів і здатність до біодеградації, а також можливість застосування більшості з них (завдяки фібрилярній природі) у вигляді тонкої плівки (товщина 80 мкм). Імобілізацію на білкових носіях можна проводити як за присутності, так і відсутності зшиваючих агентів.

До недоліків білків як носіїв, зокрема для медичних препаратів, які використовуються *in vivo*, слід віднести високу імуногенність (виняток становлять колаген і фібрин).

Найбільш часто в якості носіїв застосовують структурні білки, такі як кератин, фіброїн, колаген; рухові білки, зокрема міозин, а також транспортні білки, наприклад сироватковий альбумін.

Ліпіди. Імобілізація ферментів на природних ліпідних носіях (конструювання ансамблів білок-ліпід) може розглядатися як наближення до живої клітини.

Для такої іммобілізації, як правило, використовуються природні ліпіди - компоненти біомембран. Зазвичай ліпідні носії застосовуються у вигляді моношарів на різних поверхнях або бішару (як правило, сферичної форми).

Ліпіди, що мають хоча б невелику полярну «головку», здатні утворювати мономолекулярну плівку на межі розділу фаз (вода-повітря, вода-неполярний розчинник). Ліпідні молекули в моношарі розташовані таким чином, що полярні «головки» занурені у водне середовище, а вуглеводні групи спрямовані в повітря або неполярне середовище. Така плівка здатна сорбувати білкові молекули. Вивчення моношарів ліпідів, що містять білок, допомагає також встановити природу взаємодії ліпідів і білків у біологічній мембрані.

Ліпідний моношар можна нанести на тверду підкладку (силікагель, сажа і т.д.). Як ліпідні матриці використовують зазвичай лецитин, фосфатиділетаноламін і холестерин. Можливість варіювати структуру і орієнтацію молекул в ліпідних шарах досягається підбором полярності носія і природи розчинника ліпиду, що використовується.

У якості природних носіїв використовуються *ліпосоми*. Розмір і форма ліпосом залежить від способу їх виготовлення, а також від таких факторів, як кислотність середовища, присутність неорганічних солей і природи ліпиду, який використовується.

Широке використання ліпосом як носіїв для іммобілізації ферментів і лікарських препаратів обумовлено простотою одержання і легкістю регенерації іммобілізованого препарату, а також можливістю застосування *in vivo*.

Синтетичні полімерні носії. Величезна різноманітність доступних синтетичних полімерів забезпечила їх широке використання у якості носіїв для іммобілізації ферментів. Вводячи в полімерні молекули різні функціональні групи, можна у широких межах змінювати фізичні і хімічні властивості носія.

Синтетичні полімери універсальні і можуть використовуватись як для ковалентної і сорбційної іммобілізації ферментів, так і для включення в структуру носія (в гелі, мікрокапсули, трубки).

Найбільш широко використовуються полімери на основі стиролу, похідних акрілової кислоти, полівінілового спирту, поліамідів, поліуретанів і ін. Структура і фізико-хімічні властивості синтетичних полімерних носіїв

абсолютно різні і варіюють у широких межах. Серед них є носії у вигляді сферичних частинок, гранул, порошків, мембран, трубок, пористі носії з макросітчастою, ізопористою і гетеропористою структурами, які використовуються як для сорбційної іммобілізації, так і для одержання гелей, мікрокапсул, або з високореакційними функціональними групами – для ковалентної іммобілізації.

*Полімери на основі стиролу.* Вони є основою для багатьох промислових марок іонообмінних матеріалів – Дауекс і Амберліт. Для сорбційної іммобілізації використовуються як мікропористі, так і макропористі носії, а також носії, які мають макросітчасту ізопористу і гетеропористу структури. Макросітчасті полістироли подібні до скла, вони мають стабільну структуру пор, не набухають у воді і мають високу механічну міцність. Немодифіковані полістирольні носії гідрофобні.

Введення реакційноздатних груп до складу синтетичних полімерів на основі стиролу дає можливість отримати нові види носіїв, придатних для хімічної іммобілізації.

*Полімери на основі похідних акрилової кислоти.* Одним із численних похідних акрилової кислоти, які широко використовуються для одержання полімерних гідрофільних носіїв, є акриламід. Його використовують для одержання гелю – поліакриламідний гель (ПААГ).

Носії випускаються у вигляді водної суспензії сферичних гранул і використовуються для синтезу афінних сорбентів і нековалентної іммобілізації ферментів.

Для ковалентної іммобілізації ферментів поліакриламідний носій активують одним із способів: або в готовий полімер долучають функціональні групи методом хімічної модифікації, або полімеризують відповідне функціональне похідне мономера.

Іншим похідним акрилової кислоти, що використовуються для одержання полімерних носіїв, є хлорангідрид метакрилової кислоти.

Більшість полімерів на основі акрилової кислоти не стійкі до впливу багатьох хімічних реагентів, а також набухають у воді і органічних розчинниках. Тому у випадках, коли необхідна жорстка структура носія, використовують змішаного типу носії – ультрагель типу АсА на основі синтетичного і природного полімерів. До синтетичних полімерів із жорсткою структурою належать сополімери похідних акрилової кислоти, які випускаються під назвою «сферон». Це макропористі полімерні гелі. Вони механічно міцні, хімічно і біологічно стійкі. Наявність гідроксильних груп на поверхні надає матриці схожість з сефарозою. Це дозволяє використовувати розроблені для сефарози методи активації носія.

*Поліамідні носії.* Це група різних гетероланцюгових полімерів із амідною групою, яка повторюється  $-C(O)-NH-$ . Один із способів їх одержання ґрунтується на гомополіконденсації амінокарбонових кислот – найлон-6, капрон. Окрім найлона-6, для іммобілізації використовуються поліізонітрил- найлон, поліаміноарилнайлон та ін. Амідні групи надають полімерам гідрофільності.

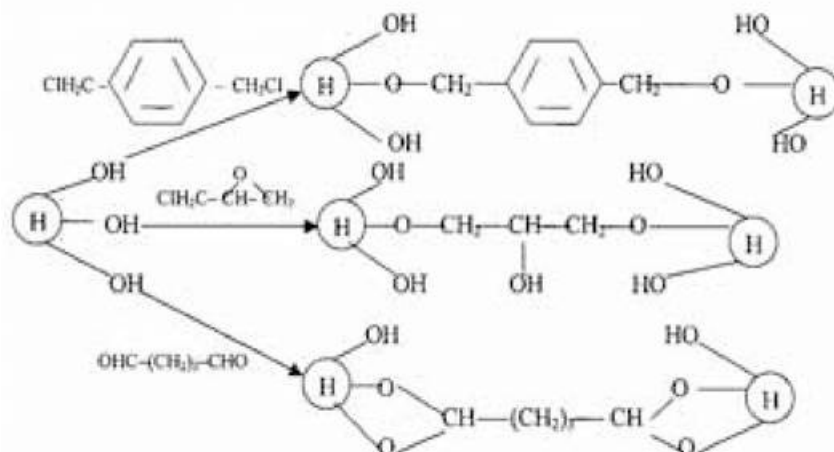
Для використання у якості носіїв поліаміди активують, частково гідролізуючи їх, з подальшою обробкою, наприклад, глутаровим альдегідом.

Головною перевагою носіїв цього типу є те, що вони можуть бути створені в різній фізичній формі: у вигляді гранул, порошоків, волокон, мембран, трубок тощо.

До групи поліамідних носіїв належать також полімери на основі N-вінілпіролідону.

Широке використання цих носіїв, перш за все для медичних потреб, обумовлено їх біологічною інертністю і стійкістю до впливу середовища. При використанні полівінілпіролідону і сополімерів на його основі одержані препарати іммобілізованих ферментів, які здатні повільно деградувати в організмі, причому швидкість розпаду залежить від природи другого мономера і концентрації зшиваючого агента у суміші.

*Носії на основі полівінілового спирту.* Ці носії мають високу реакційну здатність. Відповідна обробка дозволяє вводити в них різні функціональні групи: дісульфідні, альдегідні та ін. Для одержання гідрофільних гелів носії можуть бути зшиті глутаровим альдегідом у кислому середовищі, а в лужному – епіхлоргідрином або n-ксилилендіхлоридом:



До переваг носіїв на основі полівінілового спирту слід віднести, окрім високого вмісту реакційноздатних груп, велику місткість.

*Поліуретани.* Гідрофільні поліуретанові полімери містять угруповання  $\text{—NH—C(=O)—O—}$ . Вони є зручними матеріалами для включення ферментів у гель.

Процес іммобілізації у даному випадку полягає у простому змішуванні компонентів. Поліуретани мають більшу стійкість стосовно води, ніж поліаміди.

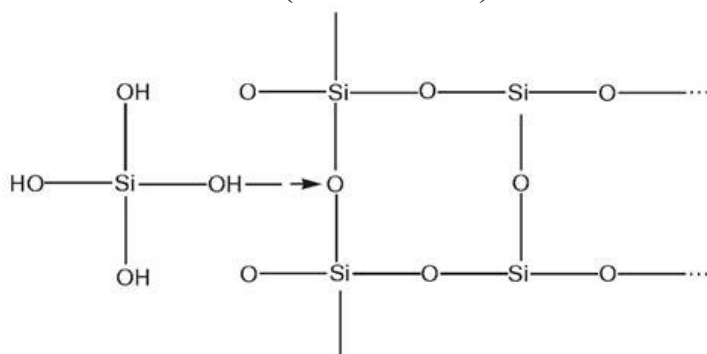
*Носії неорганічної природи.* Для іммобілізації ферментів використовуються різні неорганічні носії: макропористі кремнеземи – силікагель, силохром, макропористе скло; метали і їх оксиди: титан, залізо, алюміній; природні алюмосилікати – різні глини, цеоліти; пориста кераміка, активоване вугілля, сажа.

Основними якостями, які зумовлюють широке застосування неорганічних матеріалів у якості носіїв, є їх здатність до швидкої регенерації і можливість надання їм будь-якої конфігурації. Це перевага мінеральних носіїв. Носії використовуються як у вигляді порошоків, гранул, мембран, трубок, кульок, так і моноліту. Вони можуть бути як пористими, так і непористими.

Неорганічні носії можуть використовуватись як для адсорбційної, так і ковалентної іммобілізації після хімічної модифікації поверхні носія шляхом уведення реакційноздатних груп, які можуть вступати у взаємодію з функціональними групами ферменту.

*Макропористі кремнезemi.* До носіїв цього типу належать силікагелі, силохроми і макропористе скло. До позитивних якостей кремнеземних носіїв слід віднести механічну міцність, хімічну інертність до багатьох розчинників, наявність жорсткого каркасу із заданими розмірами пор, стійкість до дії мікроорганізмів.

*Силікагель* – аморфна речовина із загальною хімічною формулою  $x\text{SiO}_2 \cdot y\text{H}_2\text{O}$ . Одержують його в процесі «старіння» (поліконденсації) ортокремніевої кислоти ( $\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ):



Поверхня частинок силікагелю й інших кремнеземів покрита гідрофільними гідроксильними групами, які мають слабо виражені кислотні властивості.

Недоліком кремнеземних носіїв є їх використання в обмеженому діапазоні рН, підвищена розчинність і деяка неспецифічна сорбція на їх поверхні. Подолати ці недоліки, окрім першого, можна шляхом модифікації поверхні кремнеземів.

Таким чином, використання різних модифікуючих агентів дає можливість змінювати властивості поверхні кремнеземних носіїв. Однак вартість цих носіїв надто висока, а модифікація ще більше підвищує їх вартість, що є суттєвим обмеженням для впровадження кремнеземів у промисловість.

Окрім крупнодисперсних кремнеземів, як носії використовуються і пірогенні кремнезemi. Вони повністю нерозчинні, мають високу хімічну, біологічну і термічну стійкість, жорсткість каркасу при різних значеннях рН розчину, їх поверхня покрита гідроксильними групами, завдяки яким відбувається адсорбція з утворенням водневих зв'язків.

Більш придатними для промислового використання можуть бути *природні алюмосилікати* – глини, цеоліти, а також пориста кераміка, до складу якої, окрім алюмосилікатів, входять оксиди титану, цирконію або інші домішки. Поверхня цих носіїв аналогічно кремнеземним може бути модифікована різними органічними речовинами, наприклад силанами.

Важливою характеристикою силікатних і алюмосилікатних носіїв є висока щільність поверхневих груп, на яких зв'язування білкових молекул ферменту може здійснюватись як за рахунок електростатичних взаємодій, так і водневих зв'язків. Це дуже суттєво для ефективної іммобілізації ферментів.

Широкого розповсюдження як носії набули також *активоване вугілля і графітована сажка*. Активоване вугілля може бути використане як носій для адсорбційної і ковалентної іммобілізації (після попередньої активації оксидних груп).

До переваг сажі можна віднести високу однорідність і електричну провідність її поверхні. Остання властивість важлива при створенні біоелектрокаталітичних систем на основі іммобілізованих ферментів. Суттєвим недоліком цього носія є низька механічна міцність, що обмежує його використання. Відкладанням вуглецю на гранульованій сажі був створений новий носій – карбохром, у якого висока механічна міцність поєднується з перевагами графітованої сажі.

Перспективними є *носії на основі металів і їх оксидів*. Ці носії мають високу механічну міцність, відносно дешеві, стабільні, мають хороші гідродинамічні властивості. На практиці частіше використовуються носії на основі оксиду алюмінію і титану. У промисловому масштабі їх одержують зазвичай у вигляді макропористих порошків, однорідних за формою і розміром. Використання матриць цього типу дозволяє проводити іммобілізацію як адсорбційну, так і ковалентну після попередньої модифікації.

Металеві поверхні, які використовуються як носії (Al, Ni, Ti), зазвичай модифікують шляхом створення оксидної плівки на поверхні матриці, або покривають їх шаром полімеру (похідні полістиролу, целюлози та ін.). Це дозволяє значно підвищити місткість носія.

В останні роки розвиваються методи іммобілізації, які ґрунтуються на використанні носіїв на основі феромагнітних матеріалів. Одержані біокаталізатори й іммобілізовані біологічно активні речовини мають магнітні властивості, що дає змогу маніпулювати ними за допомогою магнітного поля. Іммобілізовані на магнітних носіях лікарські речовини використовуються у системах «направленого транспорту» ліків у органи-мішені, тобто хворі органи. Магнітні носії, з'єднані з біореагентами, є новими засобами виділення і очищення білків і клітин.

За своєю природою магнітні носії можуть складатись із феромагнітного матеріалу або ж бути гелевою субстанцією з включеними в пори частинками магнетика.

Використання магнітного компонента у складі сорбенту, який використовується як носій у твердофазовому імуноаналізі мікроорганізмів, значно спрощує маніпуляції з дрібнодисперсним матеріалом та підвищує швидкість методу діагностики.

## Завдання



1. Скласти таблицю щодо переваг та недоліків різних видів носіїв для іммобілізації ферментів

Таблиця 5

**Переваги та недоліки різних видів носіїв для іммобілізації ферментів**

Носій	Переваги	Недоліки
<u>Полісахариди:</u>		
целюлоза		
хітин		
агароза		
декстрин		
альгінові кислоти		
гепарін		
<u>Білки:</u>		
колаген		
желатин		
кератин		
<u>Ліпіди:</u>		
ліпосоми		
<u>Синтетичні полімери:</u>		
на основі стиролу		
поліамідні		
похідні акрилових кислот		
на основі полівінілового спирту		
поліуретани		
<u>Неорганічні носії:</u>		
силікагель		
силохром		
макропористе скло		
метали і їх оксиди: титан, залізо, алюміній		
природні алюмосилікати		
цеоліти		
пориста кераміка		
активоване вугілля		
сажа		
носії на основі феромагнітних матеріалів		

**Лабораторна робота 7**  
**Вплив іммобілізації ферментів на їх властивості**

Ферменти є досить лабільними структурами, тому метод іммобілізації і природа твердого носія не можуть не впливати на такі властивості біокаталізаторів, як біологічна активність і стабільність. Причому іммобілізація може призводити в різних випадках, як до збереження, так і до різкого падіння активності і стабільності біокаталізатора.

Різниця в кінетичних властивостях вільного та іммобілізованого ферменту може бути зумовлена низкою факторів, серед яких:

*Вплив дифузійних обмежень.* Дифузійні обмеження часто виявляються в тому, що полімерна матриця, до якої прикріплений фермент, може перешкоджати проникненню субстрату до ферменту або виходу в середовище продуктів реакції.

*Вплив ефекту розподілу.* Певну роль у створенні ефекту розподілу відіграють різні взаємодії розчинених речовин з полімерною матрицею. Внаслідок цього полімерний матеріал матриці може або притягувати, або відштовхувати від своєї поверхні субстрат, продукт реакції, інгібітор/активатор і різні іони, тим самим, підвищуючи або знижуючи їх концентрацію в розчині, внаслідок чого їх склад навколо ферменту й в усій системі буде відрізнятися.

*Вплив просторових ефектів.* Через те що, іммобілізація білків носить статичний характер активний центр може бути спрямований до поверхні матриці і, як наслідок, недоступний для молекул субстрату.

*Вплив модифікації ферментів.* Інактивація ферменту в результаті іммобілізації може виникати внаслідок зачіпання залишків амінокислот, що входять до активного центру, а також при проведенні процесу іммобілізації в жорстких умовах (високе значення рН або температури, присутність вільних радикалів або окислюючих агентів та ін.). Також іммобілізація ферменту може супроводжуватися будь-якими внутрішньомолекулярними взаємодіями в структурі білка, що приводять до зниження його активності. З іншого боку, локалізація молекул ферменту може сприяти збільшенню його активності в результаті закріплення активної конформації іммобілізованою молекулою.

*Вплив мікрооточення.* На активність іммобілізованих ферментів, як і в разі вільних, можуть впливати низько- і високомолекулярні речовини, субстрати і продукти реакції, що знаходяться в розчині. Будь-яка полімерна матриця, яка ускладнює вільну дифузію субстрату, обмежує і вільну дифузію продукту, в результаті чого концентрація продукту в мікрооточенні ферменту буде вищою, ніж при проведенні реакції в розчині, що може призводити до пригнічення каталітичної реакції.

*Вплив кількості іммобілізованого ферменту.* Як правило, для перетворення субстрату в продукт часто потрібна невелика кількість ферменту. При занадто великому вмісті ферменту на поверхні твердої фази можуть мати місце стеричні труднощі, що знижують ефективність біокаталізу. З іншого боку, занадто малі кількості ферменту можуть не справлятися з кількістю субстрату, що подається, особливо при використанні високих його концентрацій. Таким чином, для реалізації ефективного біокаталітичного процесу необхідно визначити оптимальний вміст ферменту на поверхні твердого носія.

*Вплив ефекту видалення продуктів.* Іммобілізовані ферменти можуть бути більш активними, ніж нативні при зниженні інгібуючого ефекту продуктів реакції при їхньому постійному відводі з реактора.

*Вплив способу зв'язування.* Вплив цього фактора на активність ферменту зумовлений кількістю зв'язків, утворених між носієм і молекулами ферменту, а також їх положенням щодо активного центру ферменту. Чим більша кількість зв'язків, утворених між ферментом і носієм, тим нижча активність одержуваного гетерогенного біокатализатора. Аналогічний ефект спостерігається при використанні для формування ковалентного зв'язку функціональних груп ферменту, що знаходяться в безпосередній близькості до його активного центру або входять до його складу. Як і активність гетерогенних біокатализаторів, їх стабільність також значною мірою залежить не тільки від властивостей самого ферменту, а й від природи носія і типу зв'язку між ферментом і матрицею.

В основі технологічності іммобілізованих ферментів лежить, перш за все, їх висока стабільність, виражена в підвищенні термостабільності, стійкості при кислотних і лужних рН середовища, а також стійкості до денатуруючих агентів. Якщо активність і стабільність нативного ферменту головним чином визначаються його внутрішньою структурою, то для іммобілізованого ферменту дані параметри значною мірою залежать від ряду додаткових чинників. Наприклад, сприятливе мікрооточення іммобілізованого ферменту досягається за рахунок вибору відповідних носіїв або інженерії мікросередовища; стабілізація конформації в результаті багатоточкового кріплення і т.і. Таким чином, правильний вибір оптимального матеріалу твердого носія і методу іммобілізації дозволяє управляти властивостями одержуваного гетерогенного біокатализатора.

Властивості іммобілізованих ферментів вивчають, вимірюючи вплив рН, температури, іонної сили, концентрацій субстрату й продукту на кінетичні параметри ферментативної реакції й порівнюють їх з аналогічними результатами, отриманими для нативного ферменту.

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

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

де:  $[E]_0$  й  $[S]_0$  – концентрація ферменту й субстрату в системі відповідно;  
 $k_{кат}$  – каталітична константа ферментативної реакції;

$K_{м.уяв.}$  – ефективне (уявне) значення константи Міхаеліса, яке потрібно встановити.

Параметр  $K_{м.уяв.}$  служить характеристикою спорідненості ферменту до субстрату й, отже, є мірою тієї концентрації субстрату, що необхідна для насичення ферменту. Чисельно  $K_{м.уяв.}$  дорівнює концентрації субстрату в молях за умов, коли швидкість каталітичної реакції досягає половини максимальної швидкості (при  $V_0 = 1/2V_{max}$ ), тобто, чим нижча  $K_{м.уяв.}$  ензиму, тим менша концентрація субстрату необхідна ферменту для досягнення

максимальної швидкості і навпаки, чим вища  $K_m$ , тим більше треба субстрату для досягнення  $V_{max}$ .

При каталізі іммобілізованими ферментами концентрація субстрату поблизу самого ферменту (локальна концентрація) може відрізнятися від концентрації субстрату в повному об'ємі системи. У цьому випадку дослідний показник  $K_m$  повинен залежати від розподілу субстрату між вільним розчином і носієм, де зосереджений фермент.

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

Каталітичні параметри ферментативної реакції ( $k_{cat}$  і  $K_m$ ) можуть залежати від наявності в реакційній системі різних ефекторів (інгібітори, активатори, іони водню, температура тощо). У таких випадках необхідно враховувати розподіл цих ефекторів між розчином і фермент-утримуючою матрицею.

*Розподіл субстрату.* В умовах рівноважного розподілу субстрату між розчином і ферментвмісною матрицею показник  $K_m$  визначається наступним виразом:

$$K_{M,um} = K_M * P \quad (2)$$

де,  $K_M$  – значення константи Міхаеліса реакції, що каталізується вільним (неіммобілізованим) ферментом;

$P$  – коефіцієнт розподілу субстрату, що розраховується за формулою:

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

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

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

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

### Завдання

1. Яка характеристика  $K_m$  є вірною:

а) концентрація субстрату, за якої досягається насичення;

б) концентрація субстрату, за якої утворюється фермент-субстратний комплекс;

в) концентрація субстрату, за якої досягається половина максимальної швидкості реакції;

г) концентрація субстрату яка дорівнює половині максимальної швидкості.

2. Фермент сахараза може каталізувати гідроліз двох субстратів: сахарозу та рафінозу. Якщо субстратом є сахароза, то  $K_m$  уяв. = 0,05 моль/л; якщо рафіноза –  $K_m$  уяв. = 2,0 моль/л. В якому випадку за однакової концентрації субстрату швидкість реакції буде більшою?

3. Константа Міхаеліса для ферменту визначає:

A. Ступінь спорідненості ферменту до продукту реакції

B. Ступінь спорідненості ферменту до субстрату

C. Ступінь спорідненості ферменту до інгібітору

D. Середню швидкість ферментативної реакції

E. Максимальну швидкість ферментативної реакції

### Контрольні запитання

1. Вкажіть причини, за яких стримувалося технологічне застосування ферментів.
2. Яким чином за допомогою іммобілізації вдається подолати труднощі промислового використання ферментів?
3. Які переваги мають іммобілізовані ферменти при використанні їх у прикладних цілях?
4. Чим обумовлені відмінності у конформації нативного й іммобілізованого ферментів?
5. На які дві групи можна розподілити кінетичні ефекти, що спостерігаються при каталізі іммобілізованими ферментами?
6. За якими кінетичними параметрами ферментативної реакції вивчають властивості іммобілізованих ферментів?
7. Яким параметром характеризують спорідненість ферменту до субстрату?
8. Які дифузійні фактори визначають при каталізі іммобілізованими ферментами?
9. За якими експериментальними критеріями характеризують каталіз за участю іммобілізованих ферментів?
10. В якому випадку швидкість ферментативної реакції контролюється зовнішньою дифузією?
11. В якому випадку швидкість ферментативної реакції контролюється внутрішньою дифузією?
12. В якому випадку говорять про кінетично контрольований процес?

### Лабораторна робота 8

#### Ефекти інгібування й активації в каталізі іммобілізованими ферментами

Активність ферментів виражають в міжнародних одиницях активності. Кількість ферменту, яка каталізує перетворення 1 мікромоль субстрату на продукт реакції за 1хв у стандартних (оптимальних) умовах з розрахунку на 1 г тканини називається міжнародною одиницею (МО). Для оцінки кількості молекул ферменту серед інших білків досліджуваної тканини визначають питому активність – це кількість одиниць ферменту в зразку тканини, розділену на масу білка (мг) у цій тканині. За цією величиною аналізують ступінь очистки ферменту: чим менше сторонніх білків, тим вища питома активність.

У 1973 році Міжнародна біохімічна спілка запропонувала використати як одиницю активності катал (кат). Активність в 1 кат – це така кількість каталізатора, яка перетворює 1 моль субстрату на продукт за 1 секунду. Отже, 1 кат =  $60 \times 10^6$  міжнародних одиниць. Рекомендовано використати також одиницю значно меншого масштабу – нанокатал (нкат), яка дорівнює  $10^9$  кат.

Кількість молекул субстрату, які перетворюються однією молекулою ферменту на продукт у процесі реакції за одиницю часу при повному насиченні ферменту субстратом, прийнято називати числом обертів ферменту, або молярною активністю. Ця активність виражається в каталах на 1 моль ферменту.

Дія багатьох ферментів може бути загальмована, а в низці випадків і повністю припинена під впливом певних хімічних речовин – інгібіторів. Останні за тією або іншою причиною частково або повністю перешкоджають утворенню активного фермент-субстратного комплексу.

Зокрема, токсичність багатьох отрут для живих організмів, лікувальні ефекти деяких лікарських речовин зумовлені їх інгібуючою дією на ферменти. Серед інгібіторів є як синтетичні речовини, так і природні метаболіти.

Процес інгібування ферментів може бути зворотнім і незворотнім. Якщо молекула інгібітору викликає стійкі зміни, модифікацію функціональних груп ферменту або їх руйнування, то такий тип інгібування називається незворотнім.

*Незворотне гальмування* виникає, коли утворений комплекс фермент-інгібітор практично не дисоціює. Такі інгібітори хімічно модифікують важливі функціональні групи ферменту, тому після усунення інгібітора шляхом діалізу активність модифікованого ферменту не відновлюється. Незворотні інгібітори мають властивості клітинних отрут.

До незворотних неконкурентних інгібіторів належать фосфорорганічні препарати, наприклад хлорофос. Фосфорорганічні сполуки (ФОС) блокують каталітичну ділянку ферменту ацетилхолінестерази; у результаті цього фермент стає неактивним, що призводить до накопичення ацетилхоліну та, як наслідок, отруєння організму, тому ФОС застосовують для боротьби зі шкідниками сільськогосподарства, побутовими комахами, гризунами тощо.

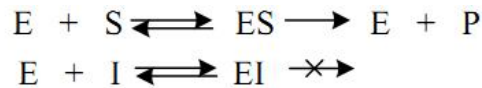
У медичній практиці відомі випадки отруєння синильною кислотою, коли смерть настає внаслідок повного гальмування та виключення дії ферментів тканинного дихання (система цитохромів), особливо клітин мозку.

*Зворотні інгібітори* взаємодіють з ферментом без утворення ковалентних зв'язків. Після інкубації з утворенням комплексу фермент-інгібітор активність ферменту відновлюється при видаленні інгібітору шляхом діалізу.

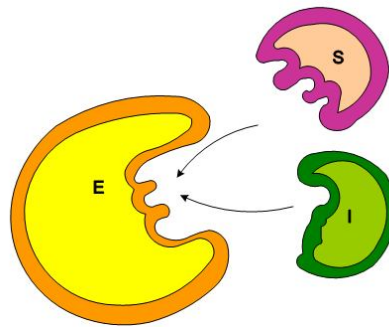
За механізмом дії зворотні інгібітори ферментів поділяють на конкурентні, неконкурентні, безконкурентні, субстратні (або метаболічні) та алостеричні.

*Конкурентне інгібування.* Конкурентні інгібітори за будовою подібні до субстрату, вони конкурують із ним за зв'язування з активним центром ферменту (рис. 16).

Характерною особливістю конкурентного гальмування є те, що ефективність інгібітору залежить від співвідношення концентрацій субстрату й інгібітору. При наявності субстрату [S] та інгібітору [I] одночасно відбуваються дві реакції:

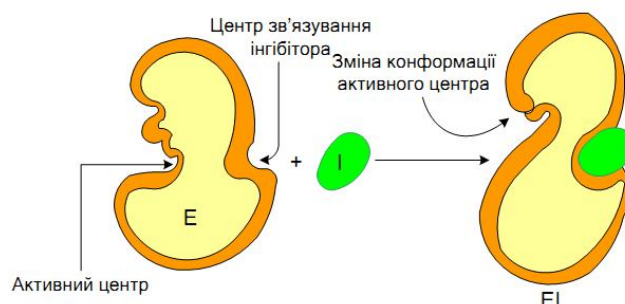


Гальмування відбудеться тоді, коли концентрація інгібітору перевищить концентрацію субстрату. У цьому випадку інгібітор утворює ферментом комплекс фермент-інгібітор і виключає фермент із реакції. Але якщо концентрація субстрату буде вищою за концентрацію інгібітору, утворюється фермент-субстратний комплекс і дія інгібітору припиняється.



*Рис. 16. Конкурентне інгібування:*  
S – субстрат, I – інгібітор, E – фермент

*Неконкурентним інгібуванням* називають таке гальмування, при якому інгібітор не є структурним аналогом субстрату, він взаємодіє з ферментом або в ділянці, відмінній від активного центра, або з уже сформованим фермент-субстратним комплексом. Приєднання неконкурентного інгібітору викликає зміну конформації молекули ферменту в такий спосіб, що порушується взаємодія субстрату з активним центром ферменту, що призводить до зниження швидкості реакції (рис. 17).



*Рис. 17. Неконкурентне інгібування ферменту*

Неконкурентними інгібіторами є ціаніди, які міцно сполучаються з тривалентним залізом, яке входить в каталітичну ділянку гемінового ферменту цитохромоксидази. Блокування останнього призводить до припинення тканинного дихання та загибелі клітини.

Велика токсичність іонів ртуті, свинцю, миш'яку зумовлена їх властивістю блокувати SH-групи каталітичних ділянок низки ферментів. Проте, важкі метали лише в невеликих концентраціях виконують роль неконкурентних інгібіторів; у великих кількостях вони є інактиваторами і діють як денатуруючі агенти. Для подолання інтоксикації, викликані цими препаратами, застосовують різні реактиватори (або протиотрути), які витісняють інгібітор з комплексу. До них відносять, наприклад, SH-вмісні комплекси (цистеїн, унітіол тощо), лимонну кислоту, етилендіамінтетраацетатну кислоту тощо.

*Безконкурентне інгібування.* Цей тип інгібування спостерігають у тому випадку, коли інгібітор зворотно взаємодіє з ферментом тільки після утворення фермент-субстратного комплексу, тобто безконкурентний інгібітор не сполучається з ферментом за відсутності субстрату. Інгібітор полегшує приєднання субстрату, а потім, зв'язуючись, інгібує фермент. Це рідкісний вид інгібування.

*Субстратне інгібування.* Наявність надмірно високої концентрації субстрату викликає гальмування ферментативної реакції. Пояснюється цей факт тим, що молекули субстрату в надлишку займають неправильне положення в активному центрі ферменту (рис. 18).

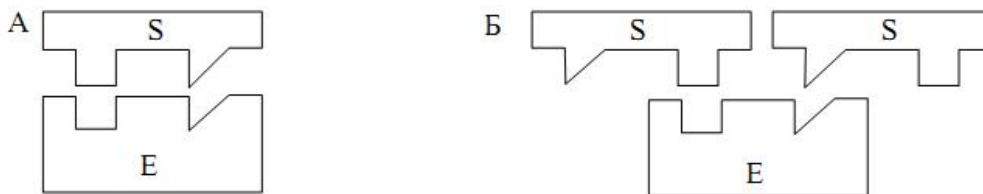
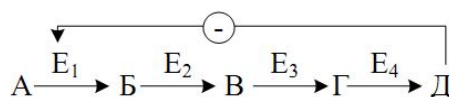


Рис. 18. Схема субстратного інгібування: А – молекула субстрату (S) оптимально розташована в активному центрі ферменту (E); Б – дві молекули субстрату зв'язалися неправильно з активним центром ферменту

У багатьох біосинтетичних реакціях основним типом регуляції швидкості багатоступінчастого ферментативного процесу є *алостеричне інгібування за типом зворотного зв'язку*, коли кінцевий продукт, який за структурою подібний до субстрату, гальмує дію ферменту. Такий тип інгібування доведений для всіх живих організмів і розглядається як один з основних типів регуляції активності ферментів і клітинного метаболізму взагалі, оскільки нагромадження надлишку продукту гальмує в подальшому його утворення.

Іноколи алостерична регуляція виявляється у вигляді інгібування першого ферменту біохімічних перетворень кінцевим продуктом:





Фермент, який каталізує перетворення субстрату А на продукт Б має алостеричний центр для негативного ефектора (інгібітору), яким виступає кінцевий продукт метаболічного шляху (Д). Якщо концентрація останнього збільшується, то інгібується активність одного з початкових ферментів (Е1). Така регуляція за принципом зворотного зв'язку (ретроінгібування) дозволяє контролювати вихід кінцевого продукту.

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

Інгібування продуктом реакції може призвести до таких кінетичних наслідків:

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

2. Всередині дифузійних обмежень продукту концентрація субстрату буде зменшуватися в напрямку до центру частки, а концентрація продукту, навпаки, збільшуватися в тому ж напрямку. Тобто, ступінь інгібування іммобілізованого ферменту, що перебуває в глибині частки носія, буде істотно вищим, ніж на межі розподілу із зовнішнім розчином.

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

Якщо інгібітор і полімерний носій однойменно заряджені, то ступінь інгібування знижується (порівняно з гомогенним розчином), а якщо протилежно заряджені – зростає. Якщо в останньому випадку субстрат має однаковий заряд з носієм, то ступінь інгібування ще більше збільшується.

*Високомолекулярні інгібітори.* Їх дія на іммобілізовані ферменти може ускладнюватися як дифузійними обмеженнями, так і стеричними ускладненнями. Обидва цих ефекти будуть перешкоджати контакту молекули інгібітору з ферментом і, тим самим, зменшувати ефективність інгібування.

### Завдання

1. Укажіть тип інгібування, при якому інгібітором ферменту є продукт реакції:

- A. Конкурентне
- B. Неконкурентне
- C. Безконкурентне
- D. Стереохімічне
- E. Ретроінгібування

2. *Оберіть правильні характеристики типів інгібування:*

а) конкурентне, б) неконкурентне.

- 1) інгібітор і субстрат мають подібну будову,
- 2) інгібітор може приєднуватися до фермент-субстратного комплексу,
- 3) інгібітор приєднується до активного центра ферменту,
- 4) інгібітор приєднується до регуляторного центра ферменту.

3. *Конкурентні інгібітори ферментів змінюють:*

а)  $V_{max}$  реакції, б)  $K_m$  реакції, в) як  $V_{max}$ , так і  $K_m$  реакції, г) не змінюють кінетичні характеристики.

4. *При зміні концентрації субстрату активність ферменту:*

1. не змінюється;
2. активність ферменту постійно підвищується зі збільшенням концентрації субстрату;
3. зі збільшенням концентрації субстрату активність ферменту підвищується до певної межі.

5. *Зворотне інгібування активності ферменту можливо:*

1. при вродженому порушенні первинної структури ферменту;
2. при дії солей важких металів;
3. при дії високої температури;
4. при надлишку субстрату.

6. *Субстратне інгібування активності ферментів виникає внаслідок:*

1. недостатньої концентрації субстрату;
2. оптимальної концентрації субстрату;
3. високої концентрації субстрату.

7. *При дії інгібітора, що володіє структурною подібністю з субстратом, спостерігається такий вид інгібування:*

1. неконкурентне;
2. конкурентне;
3. алостеричне;
4. неспецифічне.

8. *Незворотні інгібітори ферментів:*

1. гормони;
2. солі важких металів у високих концентраціях;
3. солі лужноземельних металів;
4. надлишок субстрату.

9. *Механізм дії конкурентних інгібіторів, полягає в тому, що інгібітор:*

1. викликає денатурацію ферменту;

2. змінює просторову конформацію активного центру;
3. блокує активний центр;
4. окислює сульфгідрильні групи ферменту.

10. *Інгібування ферменту за типом зворотного зв'язку називається:*

1. конкурентним пригніченням;
2. безконкурентним пригніченням;
3. ретроінгібуванням;
4. змішаним пригніченням.

### **Контрольні запитання**

1. Як впливає швидкість дифузії субстрату на процес інгібування іммобілізованого ферменту?
2. В чому полягає особливість впливу високомолекулярних інгібіторів на іммобілізовані ферменти?
3. Які кінетичні наслідки викликає в іммобілізованих ферментах інгібування продуктом реакції?
4. Як змінюється максимальна швидкість ферментативної реакції за застосування іммобілізованих ферментів, коли продукт є конкурентним або неконкурентним інгібітором?
5. На основі аналізу яких показників визначають активність ферменту?
6. Які молекулярні механізми лежать в основі інактивації ферментів?
7. В яких одиницях виражають активність ферментів?
8. Які методи іммобілізації ферменту дозволяють уникнути десорбції кофактора, окиснення киснем функціональних груп активного центру ферменту, денатураційного розгортання ферментної молекули та ін.?

### **Лабораторна робота 9**

#### **Характеристика, фізіологія та промислове використання іммобілізованих клітин мікроорганізмів**

Розвиток технологій на основі іммобілізованих клітин зумовив безліч нових, цікавих, але надзвичайно важких проблем, які стосуються фізіології клітин в іммобілізованому стані.

У даний час накопичено значний експериментальний матеріал, який свідчить про збільшення стабільності іммобілізованих клітин порівняно з вільно культивованими мікроорганізмами. Стабільність виражається в більш тривалому

активному функціонуванні клітин, при цьому відзначається розширення рН і температурних оптимумів, значна стійкість до негативних впливів навколишнього середовища. Показано, що іммобілізовані клітини інгібуються більш високими концентраціями утворених ними продуктів, ніж вільні.

Детально проаналізовано та систематизовано фактори, що впливають на морфологію, фізіологію і метаболічну активність іммобілізованих клітин, саме ці чинники в кінцевому підсумку визначають стабільність і інші характеристики іммобілізованих клітин (мікробних, рослинних і тваринних):

1. Метаболізм використовуваних клітин, щільність і рівномірність розподілу в носії;
2. Властивості носія (матриці або підкладки);
3. Природа мікрооточення навколо клітини;
4. Властивості середовища, що оточує біокатализатор.

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

Для аналізу різних функціональних показників клітини, таких як життєздатність, метаболічна і синтетична активності, пропонуються методи, які умовно можна розділити на мікробіологічні, морфо-цитохімічні і біохімічні.

*Мікробіологічні методи* засновані на визначенні життєздатності клітин за їх здатністю до відтворення. Вони передбачають посів клітин і подальше їх вирощування з метою підрахунку колоній, що утворилися. Ці способи надзвичайно трудомісткі, тривалі, вимагають значного числа повторювань і викликають труднощі при роботі з анаеробними, спороутворюючими бактеріями, грибними культурами і термофілами, що не ростуть на щільних середовищах.

*Морфо-цитологічні методи*, прикладом яких може слугувати фарбування вітальними барвниками або детекція ферменту за пофарбованими або електрон-щільними продуктами ферментативних реакцій. Дозволяють отримувати лише якісну інформацію.

*Біохімічні методи*, які, як правило, передбачають визначення будь-якої ферментативної активності на цілих клітинах, засновані на загальних підходах ензимології. Однак такі тести, як споживання субстрату і утворення продукту, можуть застосовуватися в якості показника функціональних параметрів клітини тільки в тому випадку, якщо утворення продукту з субстрату здійснюється складними поліферментними системами, здатними функціонувати тільки в непошкодженій клітині. Крім того, можливість застосування цих тестів обмежена в тому випадку, коли кількісне визначення сполук, що є субстратами і продуктами, з яких-небудь причин ускладнене.

Активність основного метаболізму клітин можна визначити за споживанням енергетичного субстрату, поглинанням кисню, виділенням тепла.

Кожен із перерахованих методів, безумовно, дає інформацію про ті чи інші функції клітини, проте не може розглядатися як критерій загальної метаболічної активності клітин. Під загальною метаболічною активністю клітини, іноді

званою життєдіяльністю, слід розуміти поєднання основного метаболізму в клітині з процесами синтезу первинних і вторинних метаболітів.

Очевидно, що висока загальна метаболічна активність може виявлятися тільки структурно-цілісними клітинами.

Якщо при роботі з вільними клітинами перераховані методи незручні (оскільки трудомісткі і не завжди однозначні), то стосовно іммобілізованих клітин вони або зовсім не придатні, або є важкоздійсненними, оскільки вимагають відокремлення клітин від носія. Для гелів на основі природних полісахаридів розроблено методи руйнування, що дозволяють вивільнити клітини з матриці гелю з метою подальшого висіву та підрахунку колоній, що утворилися. Однак умови, необхідні для руйнування гелів, можуть впливати на життєздатність клітин і спотворювати реальну картину.

У випадках іммобілізації методом адсорбції, хімічного зв'язування з носієм або включення в синтетичні полімери вивільнення клітин взагалі неможливе або для цього необхідні дії, летальні для клітин (термообробка, обробка кислотами, різними органічними розчинниками і т.і.).

Очевидно, що для визначення загальної метаболічної активності іммобілізованих клітин необхідний високочутливий метод, який може бути застосований до будь-яких вільних і іммобілізованих різними способами клітин і не вимагає попереднього відокремлення клітин від носія.

Останню вимогу значною мірою задовольняють методи, що дозволяють стежити за споживанням субстрату або утворенням цільового продукту безпосередньо в системі з іммобілізованими клітинами. Можна також контролювати основний метаболізм іммобілізованих клітин за споживанням кисню або енергетичного субстрату. До недоліків таких методів можна віднести наступне:

- Активність основного метаболізму клітини – безумовно важливий показник, оскільки синтетична здатність клітини залежить безпосередньо від нього. Однак не у всіх випадках швидкість споживання кисню або енергетичного субстрату можуть служити показниками активності основного метаболізму.

Наприклад, ряд бактерій містять високоактивну глюкозооксидазу. Споживання глюкози і кисню такими клітинами не буде характеризувати їх основний метаболізм, а лише свідчити про активність глюкозооксидази, що міститься в них.

- Найкращим критерієм впливу способу іммобілізації на клітини, зрозуміло, є питома синтетична або трансформаційна продуктивність отриманого каталізатора, яка визначається як кількість цільового продукту, утвореного одиницею обсягу (або маси) каталізатора в одиницю часу.

Однак, якщо в результаті іммобілізації виходить каталізатор з низькою продуктивністю, неможливо з'ясувати, яка зі стадій використаної методики здійснила на клітини негативний вплив.

Як критерій при оцінці рівня життєздатності клітини можна використовувати концентрацію внутрішньоклітинного АТФ, оскільки відомо, що енергія, яку отримують живі клітини, зберігається в корисній формі головним чином у вигляді молекул аденозинтрифосфату (АТФ). Незалежно від того, звідки

в кінцевому рахунку надходить енергія: від світла або від окислення органічних сполук, велика її частина запасається в молекулах АТФ, яка потім є «енергетичною валютою», що забезпечує функціонування всіх систем клітини. І, що найбільш істотно, рівень АТФ миттєво знижується при зменшенні метаболічної активності клітини.

#### *Способи визначення АТФ*

Існують кілька різних способів визначення АТФ. Методично вони здійснюються або спектрофотометрично, або хроматографічно. Такі методи мають досить низьку чутливість і при роботі з мікроорганізмами вимагають значної кількості біомаси, оскільки вміст АТФ у різних класах мікроорганізмів невеликий і становить 500-5000 мкг/г сухої маси. Крім того, для спектрофотометричного визначення АТФ необхідно використання складних кофактор-залежних систем, що дорого і не завжди є в наявності, а хроматографічне визначення (причому кількісне потребує коштовного обладнання) також не дозволяє вимірювати низькі концентрації АТФ.

Одним з найбільш перспективних є біолюмінесцентний метод визначення АТФ, в основі якого лежить реакція, що каталізується люціферазою світляків.

Для вимірювання вмісту внутрішньоклітинного АТФ клітини необхідно якимось чином або зруйнувати, або екстрагувати з них АТФ. Очевидно, що відомі способи руйнування клітин такі, як ультразвукова або механічна дезінтеграція, заморожування-відтавання, призводять часто до загибелі клітин і, таким чином, до гідролізу АТФ. З іншого боку, ці процедури зазвичай досить тривалі, що в свою чергу сприяє зниженню реальної концентрації АТФ.

Найбільш зручними визнані в даний час різні методи екстракції АТФ з живих біологічних об'єктів.

Для того щоб використовувати концентрацію внутрішньоклітинної АТФ як критерій метаболічної активності іммобілізованих клітин, необхідно досліджувати вміст АТФ у вільних клітинах цього мікроорганізму.

Якщо концентрація АТФ у клітинах не залежить істотно від фази росту культури, її можна використовувати як критерій метаболічної активності клітин у процесі приготування біокатализатора і в умовах його подальшої експлуатації.

Одним із способів збільшення продуктивності безперервних мікробіологічних процесів і отримання високої щільності клітинної культури є використання іммобілізованих клітин. Іммобілізовані клітини зберігають проліферативну функцію як безпосередньо після іммобілізації, так і після тривалого використання в біотехнологічних процесах. При цьому кінетичні характеристики росту (питома швидкість росту і час подвоєння) іммобілізованих клітин істотно не відрізняються від аналогічних характеристик вільних клітин.

Іншою важливою характеристикою іммобілізованих клітин, що відрізняє їх від вільних клітин, є тривала функціональна активність. Існує припущення, що носій грає роль захисного бар'єру для іммобілізованих клітин, «екрануючи» їх від негативного впливу метаболітів і перешкоджаючи їх проникненню в матрицю.

У наш час іммобілізованими вважають клітини, для яких створені штучні обмеження рухливості в зовнішньому середовищі, а матеріальний посередник,

що забезпечує обмеження рухливості, вважається носієм. В цілому система клітина-носій називається іммобілізованим біокатализатором.

*Перевага іммобілізованих клітин*, порівняно з іммобілізованими ферментами полягає головним чином в тому, що при використанні іммобілізованих клітин:

- відпадають стадії виділення, очищення та іммобілізації самих ферментів, які, як правило, є найбільш дорогими при здійсненні повного технологічного процесу;

- знижуються витрати на виділення і очищення продуктів реакції;

- покращується можливість створення безперервних і напівбезперервних автоматизованих процесів;

- ферменти в клітинах знаходяться в найбільш природному оточенні, що позитивно позначається на їх термостабільності, а також на їх операційній стабільності (тривалості роботи). Відомо багато прикладів, коли після виділення з організму ферменти швидко втрачали активність, а іноді їх взагалі не вдавалося виділити в активній формі, тоді як у клітинах вони зберігають каталітичні властивості досить довго. У цих випадках застосування цілих клітин, а не ферментів є цілком виправдане і єдино прийнятне.

- іммобілізація цілих клітин підвищує безпеку і термін роботи в якості каталізатора порівняно зі звичайними клітинами.

За допомогою іммобілізованих мікроорганізмів реалізуються процеси, в яких, використовуючи природні (або придбані) властивості клітин, можна довго підтримувати на постійному рівні їх синтетичну активність, спрямовану на утворення необхідного продукту.

Стерильність мікробіологічного виробництва – проблема, реалізація якої вимагає значних капіталовкладень. При експлуатації іммобілізованих клітин вимоги до стерильності виробництва дещо знижуються і в цьому випадку з'являється ряд переваг.

По-перше, процеси, в яких можна використовувати іммобілізовані клітини, як правило, реалізуються в тривалому проточному режимі (зменшується число маніпуляцій з вільними клітинами, а також проточність системи реактора не дає можливості спорам і одиничним мікроорганізмам, які розмножуються, в нього потрапляти).

По-друге, висока концентрація мікроорганізмів, що активно здійснюють метаболічні процеси, створює несприятливі умови для розмноження поодиноких клітин сторонньої мікрофлори.

По-третє, якщо іммобілізація проведена шляхом включення в будь-який гелевий носій, то сторонні мікроорганізми в матрицю носія, як правило, не потрапляють.

Використання іммобілізованих мікроорганізмів має і екологічний аспект. Періодичне і безперервне культивування мікроорганізмів для виробництва різних речовин призводить до того, що корисний продукт утворюється при регулярному нарощуванні біомаси, що не утилізується і є відходом. Будь-які, навіть непатогенні мікроорганізми, при досить високій концентрації погіршують екологію повітря, води, ґрунту, можуть викликати алергічні

захворювання у людей і т. д. Заміна вільно культивованих клітин на іммобілізовані позбавляє від необхідності регулярного нарощування біомаси.

Слід зазначити, що пріоритет в області іммобілізації клітин належить не вченим, а природі. У природі більшість мікроорганізмів знаходиться (на тій чи іншій стадії розвитку) в закріпленому стані на поверхні тіла тварин, рослин, у воді, в гірських породах і особливо в ґрунті. Без адгезії мікроорганізми не могли б існувати у природі. Вона є важливою екологічною рисою існування мікроорганізмів. Так, у ґрунті адгезія дозволяє мікроорганізмам утримуватись у ґрунтовому профілі і не вимиватись у нижні горизонти. Крім того, адгезовані клітини знаходяться на межі розділу твердого тіла і рідини, де зосереджені основні поживні речовини. Розкладання рослинних решток, деяких мінералів теж відбувається лише при адгезії мікроорганізмів.

Явище *адгезії* (іммобілізація цілих мікробних клітин) на різних носіях почали використовувати дуже давно. Ще більше 150 років тому в Німеччині використовували закріплені на буковій стружці бактерії для виробництва оцту. В 1857 р. Луї Пастер наголошував, що додавання адсорбентів стимулює спиртове бродіння.

Однією з перших робіт, яка започаткувала використання в області інженерної ензимології поряд з ферментами безпосередньо клітин, є робота шведських дослідників К. Мосбаха і П. Ларссона, опублікована в 1970 р.

Перший промисловий процес з використанням іммобілізованих клітин здійснено в 1973 році. Відома японська фірма «Танабе Сейяко» за допомогою іммобілізованих у поліакриламідному гелі клітин *Escherichia coli* здійснила процес одержання аспарагінової кислоти з фумарової кислоти. Тепер існує більше десятка біотехнологічних процесів, у яких використовуються іммобілізовані клітини (синтез амінокислот, органічних кислот, антибіотиків).

Ферментативна активність іммобілізованих клітин використовується також при очищенні стічних вод, особливо від токсичних сполук, наприклад фенолу, бензолу, гексаметилендіаміну.

Можлива також деградація і неприродних речовин, таких як циклічний димер амінокапронової кислоти, який міститься у стічних водах з нейлонового виробництва. Створені пілотні установки, в яких використовується суміш адсорбованих мікроорганізмів, що здійснюють денітрифікацію стічних вод, а також вилучення з них важких металів. Показана можливість використання цілих клітин *Algaligenes eutrophus*, іммобілізованих в альгінатний або карагінановий гель, для очищення стічних вод від тритію. 10 г клітин (сиря біомаса) еквівалентні 1 г платинового каталізатора.

Іммобілізовані клітини використовуються для обробки не тільки стічних вод, але й органічних відходів. Реактор з адсорбованими клітинами в анаеробних умовах діяв два роки. Одержаний біогаз містив 90% метану і менше 5% CO<sub>2</sub>.

Для іммобілізації можуть використовуватись клітини у різному стані: живі і пошкоджені різною мірою. Одностадійні реакції можуть здійснювати і живі, і пошкоджені клітини. Поліферментні реакції проводять з використанням



живих клітин, які тривалий час можуть регенерувати АТФ та інші коферменти (НАД, НАДФ).

Ще більш придатні іммобілізовані мікроорганізми для багатоступневих процесів. Наприклад, широкі можливості відкриваються при виробництві спирту за допомогою іммобілізованих дріжджів. Етанол утворюється з глюкози в анаеробних умовах в результаті багатоступінчастої реакції, в якій використовуються системи регенерації АТФ і НАДФ. Японська компанія "Киова Хакко" тривалий час на дослідних заводських установках (колонки загальним обсягом 4000 л) з іммобілізованими клітинами дріжджів отримує 2400 л спирту в день з цукрово-очеретяної меляси. Продуктивність такого повністю автоматизованого процесу в 20 разів вище порівняно з традиційними реакторами періодичної дії, причому витрати на електроенергію і робочу силу істотно нижче. З 20% розчину глюкози за 2,5 години утворюється приблизно 13% розчин спирту. Рис. 19 слугує ілюстрацією оптимістичних уявлень (звичайно, з певною часткою фантазії) проф. Сибата щодо повсякденного життя японців у недалекому майбутньому, якщо врахувати всі можливості, які вони отримують після освоєння методів іммобілізації клітин.



*Рис. 19.* «Можливості» використання іммобілізованих клітин дріжджів для виробництва спирту

Можливості іммобілізованих клітин великі. Їх можна використовувати практично в усіх відомих сьогодні біотехнологічних процесах. Порівняно зі вільноживучими клітинами, іммобілізовані клітини мають у більшості випадків явні переваги. Наприклад, при виробництві аспарагінової кислоти з фумарової за допомогою іммобілізованих клітин витрати виробництва знизилися на 40% тільки завдяки підвищенню продуктивності праці, економії фондів заробітної плати, автоматизації та підвищенню виходу продукту.

Чи означає це, що іммобілізовані клітини витіснять ферменти з промисловості? Треба ретельно зважити, в яких випадках слід віддати перевагу іммобілізованим ферментам, а в яких – іммобілізованим клітинам. Переваг

іммобілізованих клітин неможна не бачити. Вони полягають насамперед у тому, що відпадає необхідність в очищенні ферментів, причому активність і стабільність іммобілізованих клітин дуже високі, з їх участю легко здійснюються багатоступінчасті процеси, при яких потрібна регенерація коферментів. Однак, за участю іммобілізованих клітин не вдається розщепити високомолекулярні субстрати (наприклад, крохмаль, целюлозу), оскільки вони не можуть подолати такого бар'єру, як клітинна мембрана. В цьому випадку можна було б одночасно використовувати клітини і позаклітинні ферменти. Для аналітичних цілей можна підключити іммобілізовані клітини до сенсорів. Однак час вимірювання за допомогою бактеріальних сенсорів значно більше, ніж у разі ферментних, внаслідок тривалої дифузії субстрату через мембрани клітин. Крім того, бактеріальні сенсори менш чутливі і часто не настільки специфічні, як ферментні сенсори. Це робить бактеріальні сенсори особливо зручними при визначенні таких складних параметрів, як, наприклад, загальна кількість сполук, що піддаються біологічній деградації. Для контролю стану навколишнього середовища при визначеннях вмісту кисню в стічних водах в Японії – використовують мікробіологічний сенсор. Такий аналіз займає всього кілька хвилин замість 5 днів, необхідних при традиційному визначенні. Недоліком мікроорганізмів є те, що на відміну від ізолюваних ферментів це складні системи, причому в результаті того, що в них відбувається обмін речовин можуть утворитися побічні продукти, які повинні бути згодом видалені. Крім того, при застосуванні ферментів на 1 г носія можна іммобілізувати приблизно в 10 разів більшу активність, ніж при іммобілізації клітин, тобто при тій же кількості носія перетворити більше субстрату.

Таким чином, іммобілізовані клітини в найближчому майбутньому не зможуть замінити іммобілізовані ферменти. Швидше, обидві форми іммобілізованих на носіях біокатализаторів, доповнюючи один одного, будуть відігравати важливу роль у промисловості майбутнього.

### Завдання

1. Вкажіть біотехнологічні процеси, в яких доцільніше застосовувати іммобілізовані клітини, а в яких – іммобілізовані ферменти.
2. Заповніть таблицю 6.

*Таблиця 6*

#### Переваги та недоліки іммобілізованих мікроорганізмів

№ пп	Переваги	Недоліки

### **Контрольні запитання**

1. Які чинники визначають морфологію, фізіологію і метаболічну активність іммобілізованих клітин?
2. Які методи пропонуються для аналізу функціональних показників клітини, таких, як життєздатність, метаболічна і синтетична активності?
3. За якими показниками можливе визначення загальної метаболічної активності іммобілізованих клітин?
4. Чому при оцінці рівня життєздатності клітини можна використовувати концентрацію внутрішньоклітинного АТФ?
5. Які існують способи визначення АТФ?
6. Чому при експлуатації іммобілізованих клітин вимоги до стерильності виробництва знижуються?
7. Які екологічні аспекти дозволяє вирішувати використання іммобілізованих мікроорганізмів?
8. В чому полягає значення адгезії для клітин мікроорганізмів?
9. Чи зможуть іммобілізовані клітини замінити іммобілізовані ферменти?

### **Лабораторна робота 10**

#### **Методи іммобілізації клітин мікроорганізмів**

В наш час іммобілізованими вважають такі клітини, для яких створені штучні обмеження рухливості в зовнішньому середовищі, а матеріальний посередник, що забезпечує ці обмеження рухливості, вважається носієм.

Розрізняють хімічні, фізичні і механічні методи іммобілізації клітин (рис. 20).



Рис. 20. Види іммобілізації клітин мікроорганізмів

*Хімічні методи (ковалентне і поперечне зв'язування).* Ці методи засновані на утворенні ковалентних зв'язків між реакційноздатними групами носія. Зазвичай використовуються біфункціональні реагенти токсичні для живих клітин, тому безпосередній контакт клітин з ними небажаний. Уникнути цього можна, проводячи обробку носія такими речовинами, як гексаметилендіамін, карбодіїмід та ін., до прикріплення клітин. Пошкоджені або мертві клітини, що каталізують одностадійні процеси, наприклад, ізомеризацію глюкози, прив'язують одну до одної за допомогою поліфункціональних агентів типу альдегідів або амінів. Таку процедуру називають хімічним поперечним зв'язуванням. Показано, що в біореакторі глюкоізомеразна активність поперечнозшитих клітин *Streptomyces olivaceus* зберігається незмінною до 40 діб.

В цілому, для живих клітин хімічні методи мало придатні і тому використовуються рідко.

*Механічні методи іммобілізації* засновані на включенні мікробних клітин у різні гелі і мембрани. При включенні в гелі клітини виявляються зв'язаними всередині полімерної сітки, проникною для субстрату, але не для самих клітин. Як і у випадку ферментів, процедуру включення проводять або в процесі реакції полімеризації, або при гелеутворенні розчину полімеру (альгінат, карагенан і ін.), або просочуючи готовий блок гелю клітинної суспензією.

Найбільш універсальним і широко використовуваним методом іммобілізації клітин є включення їх у поліакриламідний гель (ПААГ), яке при будь-якому способі гарантує рівномірний розподіл клітин по зовнішньому об'єму носія. Зазвичай застосовують гель у вигляді гранул, одержаних механічним дробленням через сито з отворами необхідного розміру. Його переваги – це простота приготування, відносна дешевизна, можливість включати клітини будь-якого розміру в будь-якій кількості, достатня фіксація клітин, міцність гранул на стирання, інертність по відношенню до дії мікроорганізмів.

Відомі приклади включення в гель, утворений похідними цирконію. Але, оскільки процес гелеутворення протікає при рН 2-5, такі носії можуть застосовуватися лише для кислотостійких бактерій.

Японськими вченими запропоновано спосіб іммобілізації клітин в каррагінановий гель. Каррагінан – полісахарид, в процесі гелеутворення беруть участь одновалентні іони металів.

Прикладом «м'якої» іммобілізації є включення клітин в альгінатні гелі. Такий погляд заснований на тому, що альгінат – природний полісахарид, виділений з морських водоростей, складається із залишків Д-маннуранової кислоти, індиферентний до мікроорганізмів, оскільки заснований на утворенні іонних зв'язків між лінійним поліелектролітом (альгінат натрію) і полівалентним протиіоном (зазвичай іони кальцію), протікає при досить низьких температурах.

Клітини, включені в полісахаридні гелі, зберігають життєздатність протягом тривалого часу і в живильному середовищі можуть розмножуватися в поверхневих шарах полімеру. Здатність цих гелів до розчинення дає можливість вести кількісний облік клітин, що знаходяться в камерках. Недоліком є те, що більшість полісахаридних гелів демонструють низьку механічну міцність.

Клітини мікроорганізмів, включені в різні гелі знайшли застосування в біотехнології.

З 1974 року фірма "Танабе Сейяко" (Японія) приступила до промислового виготовлення яблучної кислоти з використанням включених в ПААГ клітин *Brevibacterium ammoniagenes*.

У 1978 році ПААГ був замінений каррагінаном, що дозволило збільшити ефективність біокатализатора в 2,3 рази, а заміна штаму на більш активний збільшила цей показник ще в 5 разів. Це призвело до того, що стало можливим за допомогою одноразового приготування гранул отримувати в безперервних умовах до 100 т яблучної кислоти.

Ферментативна активність іммобілізованих клітин використовується для очищення стічних вод і для вилучення з них важких металів. Показано, що 10 г клітин *Alcaligenes eutrophus* (сира біомаса), іммобілізованих в каррагінановому або альгінатному гелі, при очищенні стічних вод від тритію еквівалентні 1 г платинового катализатора.

*Фізичні методи.* До фізичних методів відносяться адсорбція і агрегація. Іммобілізація мікробних клітин методом сорбції вже більше 100 років застосовується в процесах зброджування вуглеводів до етанолу, окислення етанолу до ацетату та ін. В 40-х роках ХХ століття почалося використання адсорбованих клітин мікроорганізмів для очищення стічних вод, а потім для біологічного очищення повітря, синтезу цінних хімічних речовин, виробництва пластмаси, вилучення кольорових металів з бідних руд та ін.

Як адсорбенти можуть бути використані різні органічні і неорганічні носії – різні полімери, кераміка, глини. Розвиток полімерної хімії на сучасному етапі дозволяє обґрунтовано модифікувати або цілеспрямовано синтезувати пористі сорбенти із заданою проникністю, гідрофільністю і набором певних функціональних груп на поверхні, що відрізняються високою хімічною стійкістю і достатньою для проведення термічної стерилізації термостійкістю.

Фізичні методи іммобілізації засновані на здатності клітин злипатися одна з одною або адсорбуватися на відповідних поверхнях. Ступінь закріплення

клітин на носії залежить від хімічної природи адсорбенту, його форми, характеру клітинної поверхні і умов проведення процедур іммобілізації.

В даний час у більшості великомасштабних мікробіологічних процесів використовуються клітини, сорбовані на різних носіях, що пов'язано з такими перевагами адгезійної іммобілізації як дешевизна, універсальність, відсутність стресових впливів на клітини і простота здійснення.

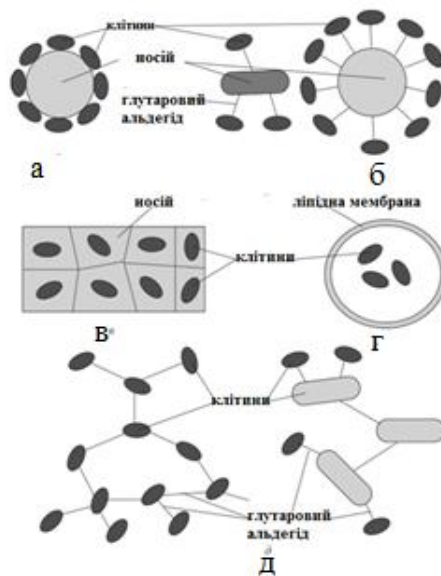
### Завдання

1. *Вкажіть до якого методу іммобілізації належать наступні способи:*

А – хімічні; Б – механічні; В – фізичні

1. Іммобілізація мікроорганізмів за допомогою біоспецифічної адсорбції
2. Методи ковалентної іммобілізації клітин на нерозчинних носіях
3. Методи штучної агломерації клітин мікроорганізмів
4. Іммобілізація клітин мікроорганізмів у масі носія

2. *Вкажіть до якого методу іммобілізації належать наведені способи*



а)                      б)                      в)                      г)                      д)

3. *Вкажіть які з наведених механізмів адсорбційної взаємодії та видів сил адгезії клітин на адсорбенті застосовують при здійсненні різних способів іммобілізації:*

А – хімічні

Б – механічні

В – фізичні

1. Утворенням хімічних зв'язків між поверхнею клітин і адсорбенту (хемосорбція);

2. Іон-іонними взаємодіями, утворенням іонних пар і триплетів;

3. Електростатичними взаємодіями заряджених поверхонь клітин і адсорбенту;
4. Силами Ван-дер-Ваальса;
5. Впливом електролітів, гідратаційними ефектами, капілярними силами;
6. Флокуляцією та коагуляцією;
7. Гідрофобними взаємодіями;
8. Біоспецифічною адсорбцією.

### **Контрольні запитання**

1. Чому хімічні методи використовуються рідше, порівняно з іншими?
2. Які реакційно здатні групи застосовують для того, щоб прикріпити клітину до носія ковалентними зв'язками?
3. Які носії використовують для ковалентної іммобілізації клітин?
4. Які прийоми використовуються для ковалентного закріплення клітин на носії?
5. В чому полягають переваги самофлокуляції перед іншими методами іммобілізації клітин?
6. Які існують підходи для вибору способів іммобілізації за програмними цілями використання в конкретних виробничих умовах?
7. Які існують переваги іммобілізованих клітин порівняно з іммобілізованими ферментами і вільними клітинами у технологічному плані?

### **Лабораторна робота 11**

#### **Особливості культивування клітин рослин.**

#### **Способи іммобілізації рослинних клітин**

Особливістю вищих рослин є їх здатність синтезувати різноманітні низькомолекулярні сполуки, які мають біологічну активність: сапоніни, кумарини, стерини, каротиноїди, поліфеноли, алкалоїди, вітаміни, хінони та ін. Оскільки їх присутність в рослинній клітині не строго обов'язкова для підтримки життя, вони отримали назву «вторинні метаболіти» (ВМ). Ці речовини мають складну хімічну будову, і тому їх важко отримати іншими способами.

Для отримання таких сполук використовують культуру клітин рослин; за останнє десятиліття в цій галузі досягнуто значних успіхів.

Характерна особливість культивованих клітин полягає в тому, що їх подвоєння, що призводить до збільшення клітинної біомаси, і синтез ВМ роз'єднані в часі. Накопичення ВМ зростає в фазі уповільненого росту клітинної популяції (в кінці клітинного циклу) і досягає максимуму в стаціонарній фазі.

У рослин біосинтез багатьох ВМ вимагає участі як коренів, так і поверхневих органів. Наприклад, попередник якого-небудь ВМ синтезується в коренях, а потім транспортується в стебло або листи, де зазнає конверсію в кінцевий продукт. В такому випадку культура окремих органів *in vitro* буде неефективною. Рішення проблеми передбачає сокультивування як коренів, так і стебел одного і того ж або різних видів. При цьому попередник може екстрагуватися в живильне середовище і потрапляти через нього в той орган, де він перетворюється в кінцевий продукт. Щоб підсилити цей процес, застосовують механічне пошкодження культивованих органів, в яких синтезується попередник.

Існує позитивна кореляція між накопиченням вторинних метаболітів і ступенем диференціювання в культурі клітин. Отримані дані свідчать про те, що диференціація і накопичення вторинних продуктів обміну речовин відбуваються в кінці клітинного циклу. При уповільненні росту процеси диференціації прискорюються, тобто компактні, повільно ростучі культури клітин містять ВМ у більших кількостях, ніж пухкі, швидко ростучі культури. Організація клітин необхідна для їх нормального метаболізму. Наявність організованості в тканини і її подальша дія на різні фізичні і хімічні градієнти – чіткі показники, за якими розрізняються високо- і низькопродуктивні культури. Очевидно, що іммобілізація клітин забезпечує умови, що призводять до диференціації, впорядковує організацію клітин і сприяє тим самим високому виходу вторинних метаболітів.

Підходи щодо збільшення виходу ВМ в культурі *in vitro* шляхом фізіологічної регуляції метаболізму клітин рослин, що застосовують в наш час, включають в себе підбір поживних середовищ (складу і концентрацій регуляторів росту, мінеральних речовин, вітамінів, цукрів, рН), режимів освітлення, аерації (співвідношення  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ), температури, підбір типу і розмірів біореактора. Для кожного окремого випадку (виду рослин, ВМ) оптимальні умови культивування можуть істотно відрізнятися, тому повинні підбиратися індивідуально.

Ефективний напрям стимулювання синтезу культивованими клітинами рослин ВМ – *еліцація* (від англ. Elicitation). В контексті виробництва ВМ за допомогою культури клітин рослин елісатори – речовини або інші чинники, що здатні індукувати біосинтез ВМ в культурі клітин рослин.

Новим підходом, спрямованим на збільшення виходу вторинних метаболітів, є іммобілізація клітин і тканин рослин. Перша вдала спроба зафіксувати цілі клітини була здійснена у 1966 р. Мосбахом. Він зафіксував клітини лишайника *Umbilicaria pustulata* в поліакриламідному гелі. Після цього



клітини були іммобілізовані на різних субстратах. В основному це були клітини мікроорганізмів.

Іммобілізація клітин рослин істотно змінює їх метаболізм. У іммобілізованих клітин спостерігається подовження стаціонарної фази росту. В результаті уповільнення ростових процесів продукти первинного метаболізму стають доступнішими для процесів вторинного метаболізму. Завдяки цьому системи іммобілізованих культур характеризуються стабільністю біосинтезу ВМ протягом тривалих проміжків часу. Вважається, що процес іммобілізації ініціює стресову реакцію рослинної клітини, яка призводить до посилення синтезу ВМ. Як стресовий фактор може розглядатися саме мікросередовище всередині матриксу. Крім того, полісахариди (пектин, хітозан, альгінат та ін.), які використовуються в якості матриксу, можуть діяти як елісатори. Вони ж, захищаючи клітини, що дозрівають, від зовнішніх стресових факторів, перешкоджають їх апоптозу та виділенню клітинами, що гинуть, протеаз в середовище для культивування. Накопичення протеаз призводить до розщеплення і втрати частини ВМ, що виділяються клітинами в середовище. Іммобілізація клітинної культури всередині матриксу сприяє збереженню життєздатності клітин і кінцевого виходу ВМ (рис. 21).

Методи іммобілізації рослинних клітин поділяють на 4 категорії:

- іммобілізація в інертному субстраті: обволікання клітин альгінатом, агаром, колагеном, поліакриламідом;
- адсорбція клітин на інертному субстраті. Клітини прилипають до заряджених кульок з альгінату, полістиролу, поліакриламіду. Прикладом цього способу іммобілізації також може служити вирощування клітин всередині нейлонового сита, пенополіуретанового матриксу, порожнистих волокон;
- адсорбція клітин на інертному субстраті за допомогою біологічних макромолекул (таких, як лектин). Застосовується рідко, в основному при роботі з різними лініями клітин людини;
- ковалентне зв'язування клітин з інертним носієм типу карбоксиметилцелюлози (КМЦ).

Найбільшого поширення набули способи іммобілізації рослинних клітин шляхом їх вбудовування в гранули полісахаридних гелів природного походження на основі желатину, пектину, хітозану, агарози, альгінату кальцію та інших речовин.

### Завдання

#### 1. Заповніть таблицю 7.

Таблиця 7

#### Усування проблем, що перешкоджають великомасштабному використанню рослинних клітин, за рахунок іммобілізації

№ пп	Проблеми	Вирішення
1.	Повільний ріст характерний для рослинних клітин	
2.	Здатність клітин до агрегації	

3.	Низький вихід кінцевого продукту (ВМ)	
4.	Генетична нестабільність	
5.	Низька механічна стійкість рослинних клітин	
6.	Складність екскреції речовин, накопичених всередині клітини	

2. На підставі рис. 21 поясніть переваги використання іммобілізованих клітин рослин

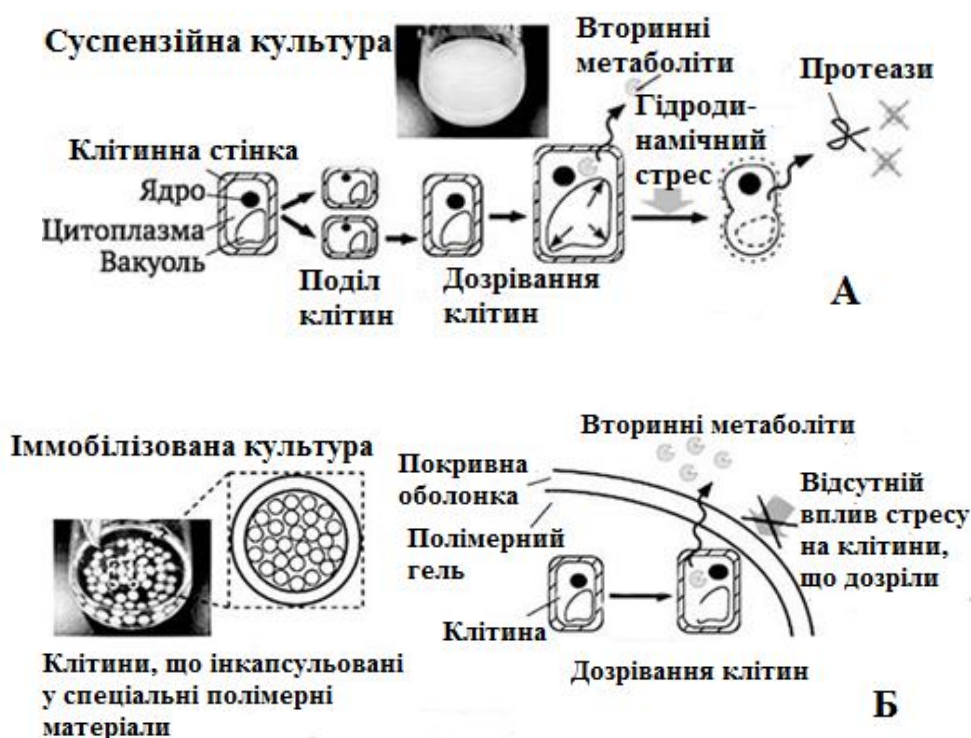


Рис. 21. Особливості накопичення клітинами і вивільнення в живильне середовище ВМ при використанні звичайної суспензійної культури (А) і іммобілізованої культури (Б)

### Контрольні запитання

1. Чим продукти вторинного метаболізму рослин відрізняються від продуктів первинного метаболізму?
2. У яких випадках ВМ вигідніше виробляти за допомогою культури клітин, ніж використовувати природну рослинну сировину?
3. В чому полягають відмінності в біосинтезі ВМ в культурі клітин і в інтактній рослині?
4. Чому культура органів більш ефективно акумулює ВМ, порівняно з суспензійною або калусною культурою?

5. Що таке елісітація культур клітин рослин? Які елісітори застосовують для підвищення виходу ВМ в культурі клітин?
6. Яким чином отримують культуру іммобілізованих клітин рослин?
7. Які методи іммобілізації рослинних клітин існують?
8. У чому полягають відмінності в промисловому культивуванні мікроорганізмів і рослинних клітин?

### **Лабораторна робота 12**

#### **Методи визначення життєздатності іммобілізованих рослинних клітин. Особливості фізіології іммобілізованих рослинних клітин**

У наш час багато промислово важливих сполук, що використовуються у фармацевтичній, харчовій, парфумерній і т. і. галузях, виділяють з тканин рослин. Ці речовини – вторинні метаболіти (ідеоліти), мають складну хімічну будову, і тому їх важко отримати іншими способами.

Вторинні метаболіти є сполуками, що отримані біосинтетичним шляхом з первинних метаболітів, та більш обмежені за розподілом у рослинному організмі. Вторинні сполуки не мають очевидної функції початкового метаболізму рослин, але часто грають екологічну роль, вони можуть бути запилювачами, атрактантами, являти собою хімічні речовини, що викликають екологічні стреси, або служити для хімічного захисту від мікроорганізмів, комах, вищих хижаків, і навіть інших рослин. Вторинні метаболіти часто накопичуються рослинами в менших кількостях, порівняно з первинними. Крім того, вторинні метаболіти, на відміну від первинних, мають тенденцію синтезуватися у спеціалізованих типах клітин і на різних етапах розвитку, що ускладнює їх виділення і очищення. В результаті, вторинні метаболіти, які використовуються з комерційними цілями в якості біологічно активних сполук (фармацевтичні препарати, смакові добавки, запашні речовини, пестициди), як правило, мають велику вартість при меншому обсязі продукції, ніж первинні метаболіти.

Для збереження біосинтетичної активності велике значення має життєздатність клітинних препаратів. Для її визначення використовують ряд методичних прийомів.

*Фарбування.* Фарбування, зокрема флуоресцеїндіацетатом (ФДА), часто використовують для визначення життєздатності клітин. Після адсорбції ФДА клітинами за наявності естеразної активності він деацетилюється і стає флуоресціюючим. Пофарбовані клітини розглядають за допомогою мікроскопа, забезпеченого УФ-джерелом світла.

Співвідношення клітин, що знаходяться в даний момент часу на будь-якій стадії мітозу, до їх загальної кількості в популяції, виражене у відсотках, називають мітотичним індексом (МІ). За його зміною протягом інкубації можна робити висновок про життєздатність клітин. Зручним барвником для забарвлення хромосом після фіксації є карбол-фіксин.

*Дихання* – критерій життєздатності клітин. Вимірювання проводять протягом інкубації через різні проміжки часу, наприклад, за допомогою кисневого електрода Кларка.

Клітини, суспендовані в середовищі (сира вага 100-200 мг), або відповідну кількість іммобілізованих клітин (загальний обсяг 5 мл) інкубують при 25<sup>0</sup>С. Реєструють споживання кисню, визначають суху вагу клітин і розраховують питому швидкість дихання.

Дуже часто дихання іммобілізованих клітин менш інтенсивне, ніж дихання такої ж кількості суспендованих клітин, що пояснюється дифузійними ускладненнями всередині полімерної сітки.

*Ріст і подвоєння клітин.* Збільшення числа і ваги клітин є хорошим показником їх життєздатності. Однак у культурі число рослинних клітин визначити дуже важко, оскільки клітини ростуть у вигляді агрегатів різних розмірів. Набагато простіше визначити вагу клітин (сиру або суху).

Суха вага іммобілізованих клітин розраховується, виходячи з припущення, що вага полімерної матриці під час інкубації не змінюється.

*Метод вимірювання швидкості ділення*, незважаючи на його тривалість, вигідно відрізняється від попереднього, оскільки дозволяє оцінити здатність іммобілізованих клітин до відтворення. Критерієм життєздатності слугує коефіцієнт ділення – відношення числа пророслих клітин до числа посіяних.

*Визначення рН.* Про життєздатність рослинних клітин можна судити за швидкістю залуження середовища у відповідь на освітлення. У цьому випадку про інтактність клітин судять за величиною зсуву рН незабуференого середовища при переході від темряви до освітлення. Ступінь залуження середовища внаслідок активізації процесу фотосинтезу і поглинання вуглекислоти при включенні світла вказує на рівень життєздатності клітин. Зміни рН середовища легко реєструється рН-електродом.

Іммобілізовані рослинні клітини помітно відрізняються за своїми фізіологічними властивостями від інтактних. Клітини, що іммобілізовані на інертному субстраті, утворюють біомасу набагато повільніше, ніж ростучі в рідких суспензійних культурах. Існує певний зв'язок між ростом клітин і метаболізмом, між клітинною організацією і диференціюванням. Припускають, що цей взаємозв'язок обумовлений двома типами механізмів.

Перший механізм базується на тому, що зростання визначає ступінь агрегації клітин, здійснюючи непрямий вплив на синтез вторинних метаболітів. Організація в даному випадку є результатом агрегації клітин, а достатня ступінь агрегації може бути отримана тільки в повільно ростучих культурах.

Другий механізм пов'язаний з кінетикою швидкості росту і передбачає, що «первинний» і «вторинний» шляхи метаболізму різним чином конкурують за попередників у швидко і повільно ростучих клітинах. Якщо умови середовища сприятливі для швидкого зростання, то в першу чергу синтезуються первинні метаболіти. Якщо швидке зростання блокуване, то починається синтез вторинних метаболітів. Таким чином, низька швидкість росту іммобілізованих клітин сприяє високому виходу вторинних метаболітів.

Крім повільного зростання іммобілізація клітин дозволяє їм рости в тісному фізичному контакті, що сприятливо відбивається і на хімічних контактах.

У рослині будь-яка клітина оточена іншими клітинами, але її положення змінюється в ході онтогенезу внаслідок поділу її і оточуючих клітин. Від положення клітини в рослині залежить ступінь і тип диференціації цієї клітини. Отже, фізичне оточення клітини впливає на її метаболізм. Регуляція синтезу вторинних метаболітів знаходиться як під генетичним, так і під епігенетичним (позаядерним) контролем, тобто будь-які зміни в цитоплазмі можуть привести до кількісних і якісних змін в утворенні вторинних метаболітів. У свою чергу, цитоплазма являє собою динамічну систему, яка знаходиться під впливом навколишнього середовища.

Із зовнішніх умов на метаболізм істотний вплив здійснюють два важливі чинники: концентрація кисню і вуглекислого газу в живильному середовищі, а також рівень освітлення при культивуванні. Світло грає роль і в процесі фотосинтезу, і в таких фізіологічних процесах, як поділ клітин, орієнтація мікрофібрил, активація ферментів. Інтенсивність і довжина світлової хвилі

визначається положенням клітини в масі інших клітин, тобто залежать від ступеня організованості тканини. В організованій структурі існують відцентрові градієнти концентрації  $O_2$  і  $CO_2$ , які грають виключно важливу роль в процесі диференціації.

Таким чином, вторинний метаболізм у великих агрегатах клітин з невеликим відношенням площі до об'єму ( $S/V$ ) відрізняється від такого ізольованих клітин і дрібних груп клітин в результаті дії градієнтів концентрації газів. Аналогічно діють градієнти регуляторів росту, поживних речовин, механічного тиску. Умови оточення у диспергованих клітин і клітин в вигляді агрегатів різні, тому шляхи метаболізму у них також різняться.

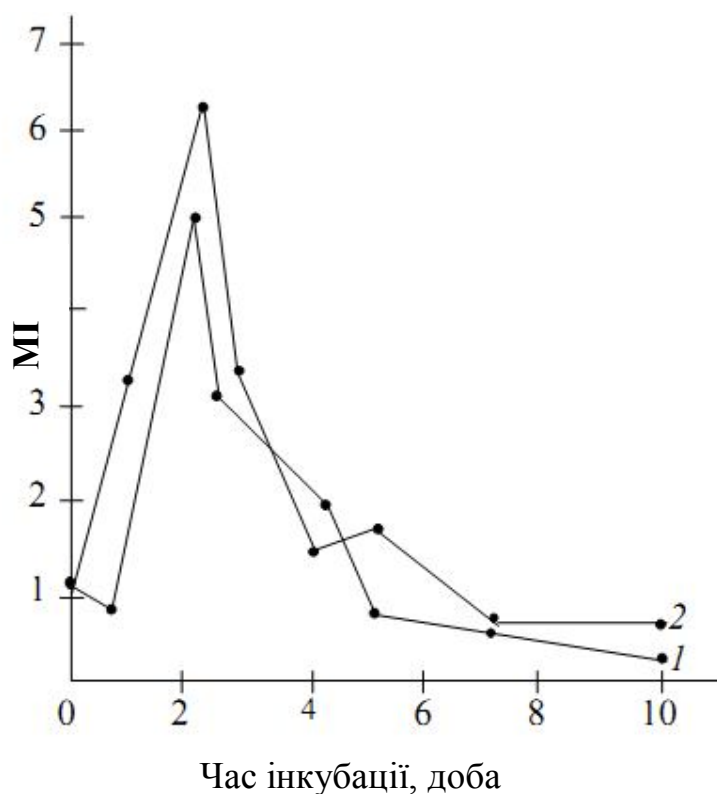
Зміна складу середовища для калюсних і суспензійних культур супроводжується певними фізичними маніпуляціями з клітинами, що може привести до пошкодження або забруднення культур. Ці труднощі можна подолати, використовуючи циркуляцію великих обсягів поживного середовища навколо фізично нерухомих клітин, що дозволяє здійснювати послідовні хімічні впливи. Можна також регулювати вихід вторинних метаболітів, змінюючи хімічний склад навколишнього середовища.

При використанні іммобілізованих клітин відносно легко здійснюється обробка їх хімічними речовинами, що індукують вивільнення необхідних продуктів. Це також знижує інгібування за типом зворотного зв'язку, яке обмежує синтез речовин внаслідок накопичення їх усередині клітини. Культивовані клітини деяких рослин виділяють вторинні метаболіти в навколишнє середовище, а система іммобілізованих клітин дозволяє відбирати продукти без пошкодження культур. Таким чином, іммобілізація клітин сприяє легкій ізоляції ідіолітів.

Спонтанна екскреція все ж зустрічається досить рідко. Тому в даний час розробляються методи, за допомогою яких можна індукувати екскрецію бажаного продукту з іммобілізованих клітин. Індукція продукту, що вивільняється, збільшується при обробці клітин речовинами, що підвищують проникність клітинних мембран (пермеабілізація), причому така обробка не впливає ні на життєздатність, ні на біосинтетичну активність іммобілізованих клітин. У зв'язку з цим один і той самий препарат іммобілізованих клітин можна використовувати для багаторазового напрацювання продукту в циклічному режимі.

### **Завдання**

1. На підставі даних, що наведено на рис. 22, підрахувати кількість клітин, що знаходяться у стадії мітозу, на 1, 2, 3, 4, 5 і 7 добу, якщо відомо, що початкова кількість клітин складає 1500 шт.



**Рис. 22. Мітотичний індекс (МІ) для суспендованих (1) і включених в агарозний гель (2) клітин *Catharanthus roseus***

### Контрольні запитання

1. Які способи визначення життєздатності іммобілізованих клітин існують?
2. Яким чином визначають життєздатність клітин рослин на підставі дихання?
3. На чому заснований метод визначення життєздатності клітин рослин на підставі вимірювання швидкості ділення?
4. Які два типи механізмів пояснюють зв'язок між ростом клітин і метаболізмом, між клітинною організацією і диференціюванням?
5. Які фактори здійснюють істотний вплив на метаболізм іммобілізованих клітин рослин?
6. Яким чином іммобілізація клітин рослин може покращити процеси екскреції вторинних метаболітів?

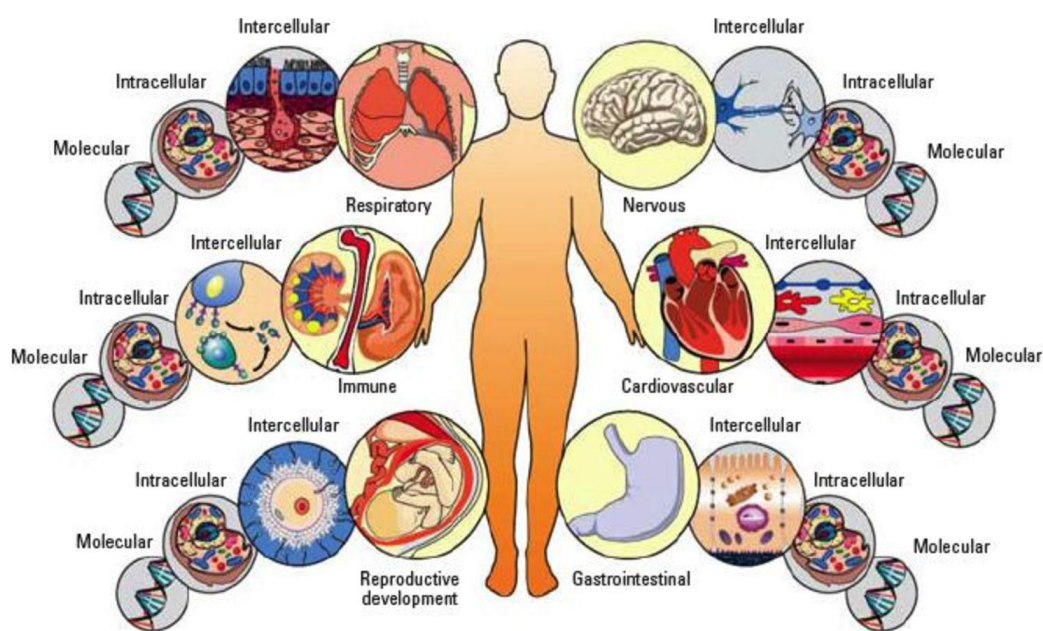
### Лабораторна робота 13

#### Методи виділення та іммобілізації клітин тваринного походження

В даний час культури клітин тварин використовуються для виробництва ряду цінних продуктів, в тому числі вакцин, протеолітичного ферменту

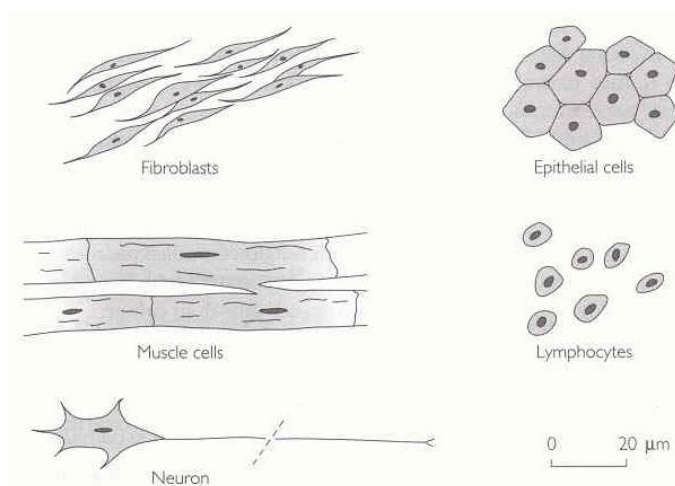
урокинази, моноклональних антитіл і інтерферонів. За допомогою культур тваринних клітин можна також отримувати лімфокіни (білки, які надають регуляторний ефект на імунну систему), багато ферментів, фактори росту, фактори згортання крові та гормони. Технологія рекомбінантних ДНК дозволяє отримувати деякі з цих речовин і іншими шляхами, і в той же час відкриває нові перспективи для синтезу різних речовин за допомогою культур тваринних клітин. З одного боку, можливість експресії чужорідних білків у мікроорганізмах означає, що для виробництва цих білків у значних кількостях можна користуватися мікробіологічними процесами. У той же час білок, що синтезується в тваринних клітинах, часто схильний до різних посттрансляційних модифікацій; прокаріоти не здатні здійснювати такі перетворення. Звідси випливає, що для отримання речовин, що виявляють необхідну активність або стійкість тільки після посттрансляційних модифікацій, потрібні еукаріотичні клітини-господарі. Експресія деяких еукаріотичних білків в прокаріотах-господарях ускладнена також в силу протеолізу цих білків або неможливості їх складання в певну просторову структуру. Поряд з удосконаленням методів експресії чужорідних генів у тваринних клітинах розширюються перспективи промислового застосування рекомбінантних систем за участю клітин тварин.

Багато типів клітин тварин у природній сфері їх проживання існують у вигляді тканин – щільних структур, побудованих зі значної кількості однакових клітин (рис. 23, 24).



*Рис. 23. Типи культур тваринних клітин залежно від походження*





**Рис. 24. Культури клітин тварин, що поширено використовуються:**

а - фібробласти; б- епітеліальні клітини; с - м'язові клітини; д - лімфоцити;

е - нейрони

У нативному оточенні тканини постійно контактують з рідинами організму, які мають певний склад і містять безліч регуляторних сполук, що чинять істотний вплив на функціонування клітин. Швидкості росту багатьох тваринних клітин у природних умовах дуже низькі. Під час росту занурених культур таких клітин виникають труднощі в забезпеченні оточення, що сприяє росту клітин; багато типів клітин тваринного походження взагалі не ростуть у культуральному середовищі. Тваринні клітини не мають типових для мікроорганізмів клітинних стінок, що забезпечують механічну міцність; крім того, клітини тварин зазвичай значно більші клітин мікроорганізмів. Тому на будь-який механічний вплив на культуру тваринних клітин (перемішування суспензії клітин або часточок носіїв, які містять клітини на поверхні, з метою підтримки однорідності реакційної маси або прискорення перенесення кисню до клітин) повинні бути накладені певні обмеження.

Всі тваринні клітини за здатністю до росту в суспензії можна розділити на дві групи. Так, клітини крові, лімфи, пухлинної тканини і багато трансформованих клітин можуть рости в суспендованій культурі. Клітини інших типів ростуть тільки в тому випадку, якщо вони пов'язані з сумісною твердою поверхнею; в цьому випадку регуляторний механізм контактного інгібування зазвичай зупиняє клітинний ріст, як тільки на поверхні твердого носія утворюється моношар клітин.

В будь-якому випадку ізольовані клітини отримують, піддаючи зразки тканин ферментативному диспергуванню. При цьому щоб уникнути некрозу і отримати максимальний вихід життєздатних клітин, тканину слід подрібнювати якомога швидше. Всі операції слід проводити в стерильних умовах. Подрібнення тканин починають з приготування зрізів товщиною 0,5-1,0 мм за допомогою мікротома, успішно можна застосовувати ножиці і пінцет. Ферментативне диспергування здійснюють за допомогою трипсину в колбі, отримуючи в кінцевому підсумку суспензію життєздатних клітин.

Залежно від підходів, що використовуються для прикріплення ізольованих клітин до твердої основи, або матриці, використовують різні методики культивування клітин тканин тварин і людини.

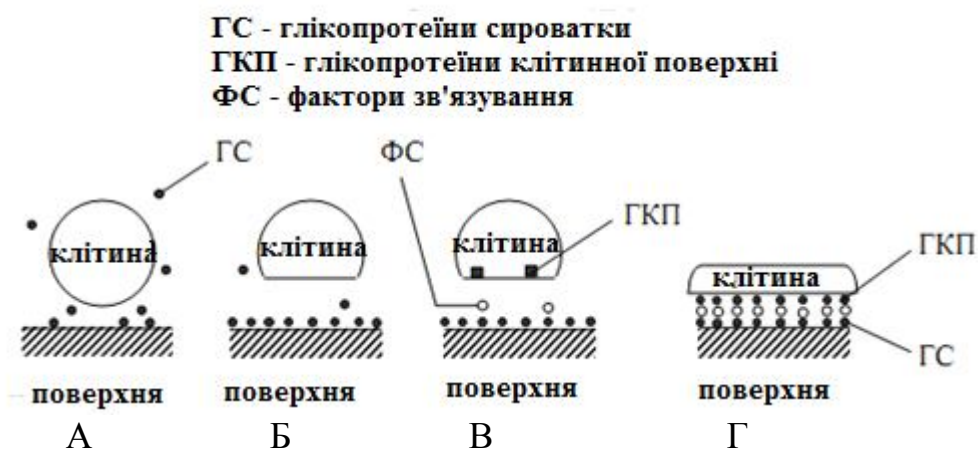
Розрізняють два основних способи культивування тваринних клітин:

- в прикріпленому стані на поверхні посуду для культивування або на поверхні носія (моношарові культури);
- глибинне культивування (суспензійні культури).

При культивуванні поверхнево-активних клітин потрібна велика площа поверхні носія, а також адекватне і строго контрольоване надходження поживних речовин і кисню, що до останнього часу стримувало їх великомасштабне застосування. Завдяки розробці методів культивування на мікроносіях, коли клітини вирощують у вигляді моношарів, іммобілізованих на гранулах полістиролу, скла або декстрану, стало можливим культивування поверхнево-активних клітин у суспензії.

Іммобілізація поверхнево-активних клітин на твердій основі – процес багатоступінчастий, який зазвичай починається з адсорбції на негативно зарядженій поверхні підкладки спеціальних речовин, що сприяють закріпленню клітин. До таких речовин відносяться глікопротеїни, що одержують з сироватки, або з клітин певних типів (диплоїдні фібробласти, часто зустрічаються у вигляді домішок у первинних культурах епітеліальних клітин).

Крім того, з епітеліальних клітин виділяють особливі фактори зв'язування, які здійснюють прикріплення клітин до підкладки, пов'язуючи глікопротеїни клітинної поверхні з попередньо адсорбованими сироватковими або фібробластними глікопротеїнами (рис. 25).



**Рис. 25. Прикріплення і організація у моношар свіжоотриманих клітин:**

А – молекули глікопротеїну, отримані з культурального середовища, збагаченого сироваткою, адсорбуються на поверхні (електростатична взаємодія) лунки;

Б – клітини, отримані з цілої тканини осідають на поверхні лунки через 1-2 години після нанесення;

В – фактори зв'язування, отримані з клітин, прикріплюють клітини до поверхні, пов'язуючи сироваткові глікопротеїни з глікопротеїнами клітинної поверхні;

Г – через приблизно 24 години іммобілізовані клітини розпластуються по поверхні, утворюючи моношар

Таким чином, іммобілізація клітин досягається завдяки початковому контакту і подальшому розпластуванню клітин на поверхні, в результаті чого формується моношар. Утворення тісного зв'язку між поверхнею клітини і підкладкою і, по суті, структурна і функціональна стабільність моношару в більшій мірі залежать від присутності в середовищі глікопротеїнів, що сприяють закріпленню клітин.

Дуже висока локальна щільність клітин може бути досягнута двома різними методами іммобілізації – за допомогою ультрафільтраційних мембран або шляхом мікрокапсулювання. В одному з перспективних способів мікрокапсулювання клітини спочатку включають у гранули альгінату (рис. 26). Потім на гранули наносять шар полілізину і останній зшивають поперечними зв'язками, після чого альгінатний гель можна видалити розчиненням. У цьому випадку клітини, що знаходяться всередині полілізинової капсули, після стадії росту можуть заповнити весь об'єм всередині капсули, і їх щільність наблизиться до щільності в тканинах. Подібні каталізатори перспективні з точки зору можливості досягнення більш високої продуктивності реакторів (в розрахунку на одиницю об'єму).

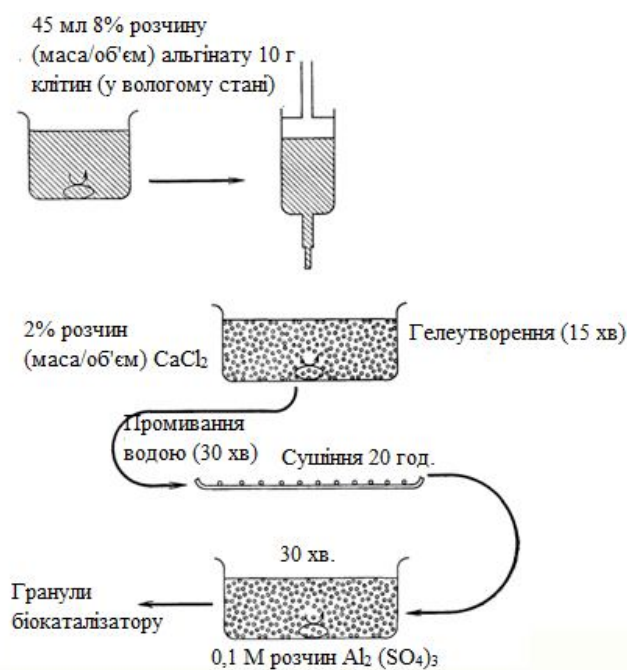


Рис. 26. Схема методики включення клітин у гранули альгінату

В останні роки найбільша увага приділяється мікроносіям – невеликим бусинам, на поверхні яких можуть рости клітини і які можна суспендувати в культуральній рідині. Основна перевага мікроносіїв пов'язана з можливістю їх використання в тих самих реакторах і з тими ж пристроями, які застосовуються для процесів за участю клітин тварин без носіїв. Потенційні можливості мікроносіїв вперше були продемонстровані на заряджених декстранових бусинах. Інгибування клітинного росту, що спостерігалось в перших експериментах вдалося пізніше зменшити шляхом зміни складу бусин і зниження їх поверхневого заряду.

*Вимоги до мікроносіїв:* мікроносії повинні:

- не бути токсичними;
- не сорбувати компоненти поживних середовищ і продукти метаболізму клітин;
- мати поверхневий заряд або обмінну ємність, достатню для прикріплення клітин;
- мати можливість багаторазового використання.

Комерційні класичні мікроносії мають діаметр 100-250 мкм і підрозділяються на 6 основних груп:

1. Декстранові мікроносії поперечно зшиті (Цітодекс 1), які завдяки пористій структурі придатні для вирощування різних клітинних ліній, але мають заряд, рівномірно розподілений по всьому об'єму часточок і добре сорбують білки і низькомолекулярні компоненти живильного середовища;

2. Декстранові мікроносії, з дещо зниженою здатністю до сорбції субстрату (Цітодекс 2);

3. Мікроносії, вкриті колагеном або желатином (Цітодекс 3). Також декстранові частки, вкриті денатурованим колагеном або перехресно зшиті желатином;

4. Полістиренові мікроносії (Біосілон, цитосферес). Не мають пористу структуру, що запобігає сорбції живильного середовища;

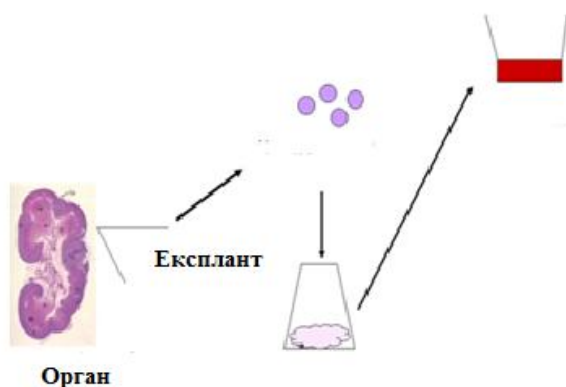
5. Скляні мікроносії (Біогласс). Подібно до пластикових не мають пористої структури ростової поверхні;

6. Целюлозні мікроносії (ДЕ-53), що мають циліндричну форму з мікрокристалічною целюлозною матрицею і найчастіше використовуються для вирощування первинних і диплоїдних культур, які мають тенденцію рости у вигляді гігантських агрегатів.

Мікроносії на основі мікропористого желатину або пористого боросилікатного скла, що використовуються в наш час, мають ємність близько 3000 кл/мкм

### Завдання

1. На підставі наведеної на рис. 27 схеми вкажіть порядок отримання ізолюваних клітин тваринного походження.



**Рис. 27. Схема отримання первинної культури ізолюваних тваринних клітин**

### Контрольні запитання

1. Чому для синтезу деяких речовин, що створюються в клітинах еукаріот, не можна застосовувати рекомбінантні клітини мікроорганізмів?
2. Які клітини тваринного походження найчастіше застосовують для культивування?
3. Які існують перешкоди культивування клітин тваринного походження?
4. В чому полягає різниця між суспендованими та моношаровими культурами клітин?
5. У чому полягає особливість іммобілізації клітин тваринного походження?
6. Які матеріали застосовують для отримання носіїв для іммобілізації клітин тварин?
7. У чому полягають переваги методики включення клітин тварин у гранули альгінату?
8. Які вимоги висуваються до мікроносіїв для іммобілізації клітин тварин?
9. Які основні групи комерційних мікроносіїв використовують у наш час?
10. У чому полягає різниця у фізико-хімічних властивостях різних груп носіїв?

### Лабораторна робота 14

#### Промислові реактори для процесів за участю клітин тварин

Клітини тварин багато в чому відрізняються від мікробних і рослинних клітин, що мають клітинні стінки: вони повільніше ростуть, у них велика чутливість до поранення і бульбашок повітря. Ці властивості клітин визначають вибір системи перемішування і аерації в біореакторі, які не повинні створювати стресових умов для культури. Перемішування має бути гомогенним, щоб уникнути градієнтів температури і рН, підвищених концентрацій субстрату і продуктів. При цьому необхідно враховувати високий рівень травматизму клітин. Зазвичай перемішування здійснюється великими лопатевими мішалками при низьких швидкостях.

Ерліфтний ферментер. У цих ферментерах перемішування здійснюється потоком повітря, а не лопатою мішалки, забезпечуючи ефективний масоперенос і низькі сили розсічення. Для контролю за циркуляцією рідини можна встановити витяжну трубу, котра спрямовує потік бульбашок по центру. Розподіл газу може здійснюватися за допомогою перфорованих, пористих або гідрофобних трубок. Якщо клітини можуть пошкодитися бульбашками газу, можна встановити систему безбульбашкової аерації через силіконові трубочки, або використовують пневматичне (повітряне) перемішування в ерліфтних реакторах (рис. 28).

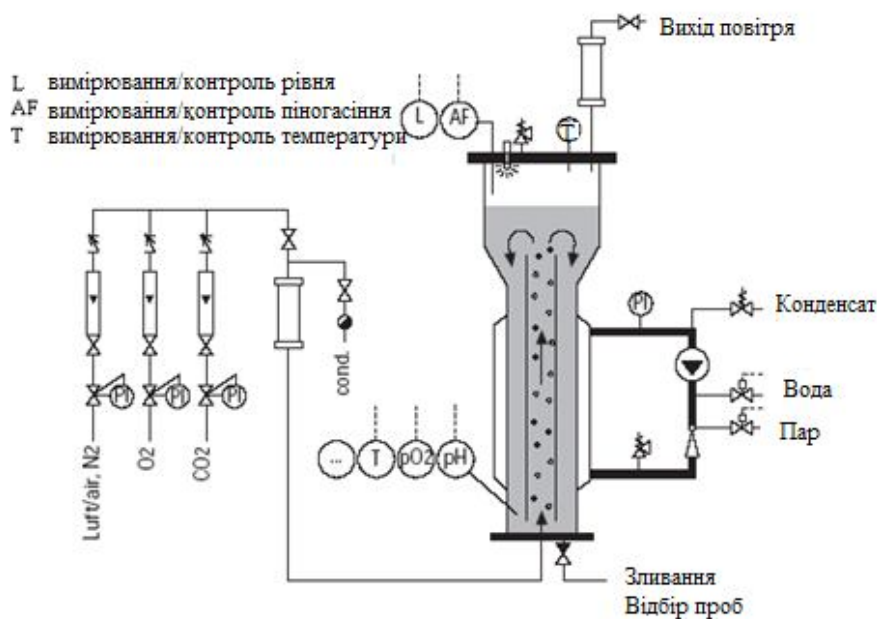


Рис. 28. Ерліфтний ферментер

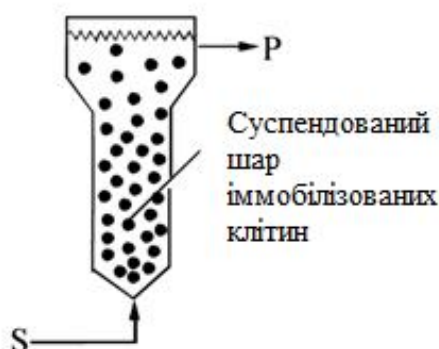
Для запобігання пошкодження клітин бульбашками повітря зменшують обсяг газової суміші, що подається, використовують поверхневу аерацію через мембрани. При скороченні обсягу газу, що подається необхідно збільшити в ньому концентрацію кисню. Оптимальне забезпечення киснем, азотом і вуглекислим газом створюється за допомогою систем перемішування газів. Вирощування клітин тварин можна здійснювати в періодичній (*batch*), періодичній з підживленням (*fed-batch*) або безперервній (*continuous*) культурі. Через низьку продуктивність, пов'язану з повільним ростом, для клітин тварин



кращим є безперервний процес культивування з утриманням клітин (перфузійна система). Це призводить до підвищення щільності культури клітин і кращого контакту з ними середовища, що збільшує продуктивність. Для утримання біомаси та запобігання її винесення з культуральною рідиною використовують різні системи фільтрації, наприклад, роторні або обертові фільтри.

Багато клітин ссавців ростуть тільки будучи прикріпленими до поверхні. Такі опорнозалежні клітини іммобілізують на мікроносіях. Якщо носій пористий, клітини можуть рости всередині нього, при цьому вони захищені від стресу від поранення, що дозволяє використовувати більш високі швидкості перемішування і продувки в процесі культивування. Біореактори, які підтримують носії з іммобілізованими клітинами в стані суспензії, називаються реакторами з суспензійною твердою фазою (*fluidized bed reactors*). Зазвичай в цих реакторах є три фази – тверда, рідка і газоподібна. Для безперервного культивування з утриманням біомаси використовується спеціально розроблена система сепарації. Вона складається з різних камер і забезпечує повне затримання частинок при перфузійних процесах. Перемішування досягається за допомогою продувки. Це забезпечує низький стрес від поранення і рівномірний масоперенос.

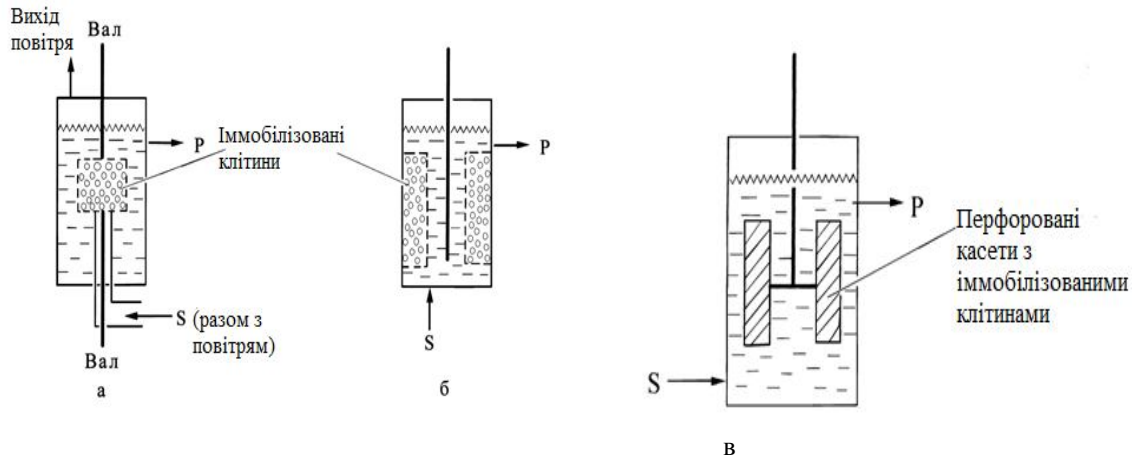
Біореактори з суспендованою твердою фазою рекомендуються для клітин на мікроносіях, для клітин, чутливих до стресу від поранення, для включених у капсулу клітин і для продукування цільових метаболітів у довготривалій культурі клітин (рис. 29).



**Рис. 29. Проточний біореактор з суспендованим «киплячим» шаром клітин**

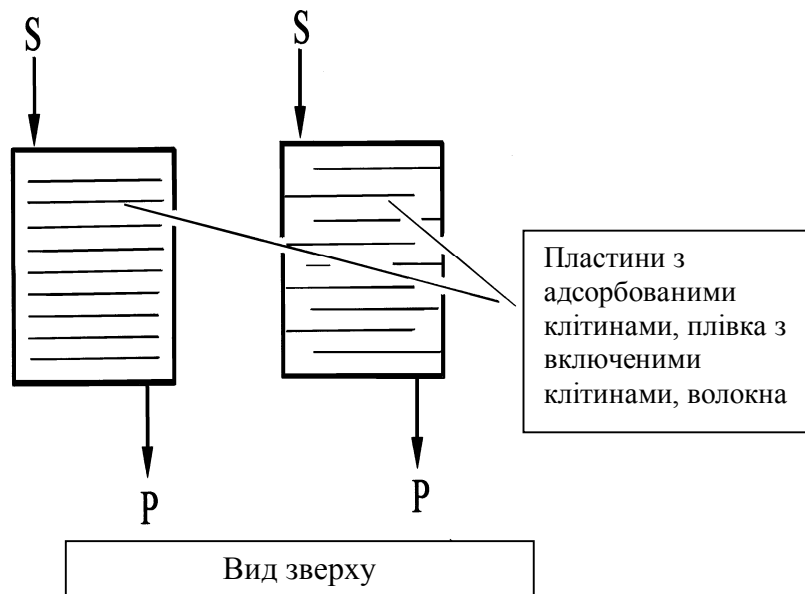
Відносна швидкість руху рідини і гранул у реакторах із суспендованим шаром невелика, що не вигідно з точки зору забезпечення біокатализатора субстратом. Більш зручними вважаються реактори з рухомим фіксованим шаром біокатализатора, коли розташування його гранул фіксоване (це виключає також механічне пошкодження гранул).

Запропоновано ряд варіантів реакторів з обертовим перфорованим контейнером (рис. 30 а), з касетами дифузорами і мішалкою (рис. 30 б), а також реактори типу "активний ротор" з перфорованими касетами, які виконують роль мішалки (рис. 30 в).



**Рис. 30. Реактори з рухомих фіксованим шаром біокаталізатора**  
 а - з обертовим перфорованим ротором; б - з касетами - дифузорами; в - типу «активний ротор»

Для опорнозалежних клітин можна також використовувати біореактор з фіксованою твердою фазою (*fixed bed reactor*), в якому клітини і їх носії захоплюються в закріплену підкладку (рис. 31).



**Рис. 31. Реактори з упорядкованим розташуванням біокаталізатора, варіанти пластинчастого реактора**

Ця система не потребує сепараційних прийомів для видалення рідкої фази. Стрес від поранення і пошкодження клітин бульбашками газу мінімальний. У процесі культивування через фіксовану підкладку циркулює насичене киснем середовище. Тому довжина підкладки є критичним параметром, оскільки забезпечення культури киснем і живильними речовинами може бути недостатнім. У великих реакторах цю проблему можна вирішити за допомогою потоку, що радіально поширюється. Середовище, збагачене продуктами метаболізму, видаляється безперервно або періодично. У таких реакторах



вирощують клітини, що потребують іммобілізації і чутливі до поранення. Система підходить і для довготривалого вирощування культур клітин з продуктами метаболізму.

### Завдання

1. Порівняти ефективність застосування різних типів біореакторів з іммобілізованими клітинами тварин.

Тип біореактора	Переваги	Недоліки
Ерліфтний		
Проточний з суспендованим «киплячим» шаром клітин		
З рухомим фіксованим шаром біокатализатора		
З упорядкованим розташуванням біокатализатора		

Промислове впровадження іммобілізованих препаратів відбувається в тих процесах, де продукт реакції не може бути отриманий без їх участі або де вартість продукту настільки перевищує вартість вихідної сировини, що отримана різниця може окупити витрати на використовувані препарати і їх іммобілізацію. Саме цим пояснюється останнім часом підвищений інтерес до процесів іммобілізації і використання іммобілізованих ферментів і клітин.

Розробка технологічних процесів із застосуванням іммобілізованих ферментів і клітин проводиться в різних країнах, в першу чергу, в Японії, Італії, США, Данії, Голландії.

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

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

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

Іммобілізовані ферменти дали поштовх до створення принципово нових методів «безреагентного» неперервного аналізу багатокомпонентних систем органічних та неорганічних сполук. Головною ланкою у цих методах є «ферментні електроди» та «ферментні термістори». Важливу роль у контролі за станом навколишнього середовища та в клінічній діагностиці грають такі методи, як біolumінісцентний та імуноферментний аналіз.

Нині проблеми *біоконверсії енергії* та маси намагаються вирішувати біотехнологічними методами з використанням іммобілізованих ферментів при фотолізі води та біоелектрокаталізі, у створенні паливних елементів.

Перспективним є й використання іммобілізованих ферментів у процесах переробки лігніноцелюлозної сировини.

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

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

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

Основними напрямками ензимотерапії є:

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

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

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

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

Однією з основних задач при одержанні медичних препаратів на основі іммобілізованих ферментів є створення системи лікарських засобів з регульованою *фармакокінетикою* (вивчає закономірності всмоктування, розподілу, метаболізму і виділення (екскреції) лікарських препаратів). З цією метою використовують включення ферментів у мікрокапсули, в тому числі і в ліпосоми.

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

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

Пігулки і гранули ферментних препаратів (трипсину, лізоциму, лужної фосфотази, каталази та ін.) отримують у суміші з біосумісними полімерами.

Імплантований у зону ураження або поблизу від неї фермент, що знаходиться в полімері, практично повністю захищений від дії агресивного

фізіологічного середовища. З полімеру фермент виходить у нативному стані, швидкість його подальшої інактивації і виведення аналогічна нативному ферменту, що використовується традиційним способом. Ліпосомні препарати ефективні при лікуванні інфаркту мозку та ішемічній хворобі серця.

Існують перспективні дослідження мультиферментних мікрокапсул, які імітують клітини живого організму. Створено препарати пролонгованої дії (тромболітичні, фібринолітичні, протеолітичні) для лікування серцево-судинних захворювань, тромбозів, тромбоемболій, інфарктів міокарда. Стерильний апірогенний розчин іммобілізованих на поліетиленоксиді протеаз може використовуватися в медицині і ветеринарії при отриманні ін'єкційних препаратів іммобілізованих ферментів; ліпази, іммобілізовані на твердих носіях, – при лікуванні різних захворювань шлунково-кишкового тракту та порушенні жирового обміну.

До 90-их років ХХ ст. дев'ять процесів з використанням іммобілізованих ферментів або клітин знайшли великомасштабне застосування в ряді країн світу:

1. Виробництво глюкозо-фруктозних сиропів з глюкози з використанням іммобілізованої глюкозоізомерази.

2. Поділ рацемічних сумішей амінокислот з використанням іммобілізованої аміноацілази.

3. Виробництво оптично активних D-амінокислот з амінокислот з використанням іммобілізованої гідантоїнази.

4. Синтез L-аспарагінової кислоти з фумарової кислоти з використанням іммобілізованих мікробних клітин, що містять аспартазу.

5. Синтез L-яблучної кислоти з фумарової кислоти з використанням іммобілізованих мікробних клітин, що містять фумарази.

6. Ферментативна модифікація антибіотиків з використанням іммобілізованої пеніцилінамідази.

7. Отримання глюкозо-галактозних сиропів з молочної сироватки з використанням іммобілізованої лактази.

8. Отримання дієтичного безлактозного молока з використанням іммобілізованої лактази.

9. Отримання глюкозо-фруктозних спиртів з сахарози з використанням іммобілізованої інвертази.

Ряд процесів знаходяться в стадії відпрацювання та обговорення доцільності їх великомасштабного застосування. До них в першу чергу відносяться:

1. Отримання глюкози з часткових гідролізатів крохмалю з використанням іммобілізованої глюкоамілази.

2. Отримання глюкози і (або) етанолу з целюлози з використанням іммобілізованої целюлази.

### **Завдання**

1. Підготувати презентацію на одну з наступних тем:

- Застосування біотехнологій з іммобілізованими ферментами у молочній промисловості
- Біотехнологія виробництва глюкози й етанолу з целюлози

- Біотехнологія одержання сиропів з високим умістом фруктози
- Біотехнологія перетворення крохмалю на глюкозу
- Біосенсори для кількісного визначення деяких з найпоширеніших вуглеводів
- Застосування іммобілізованих клітин для утилізації відходів
- Застосування іммобілізованих ферментів для проведення ІФА (імуноферментного аналізу)
- Використання іммобілізованих ферментних препаратів у медицині

### **Список використаної літератури**

1. Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К. Имобилизованные ферменты. Москва : Изд-во Моск. ун-та, Т.7. 1976. 242 с.
2. Біотехнологія : підруч. / В. Г. Герасименко та ін. ; за заг. ред. В. Г.

Герасименка. Київ : Фірма «ІНКОС», 2006. 647 с.

3. Волокитина М. В. Хроматографические биокаталитические реакторы нового поколения на основе макропористых сорбентов монолитного типа : дис... канд. хим. наук : 03.01.06 – биотехнология. ФГБУН ИВС РАН, СПб, 2015. 182 с.

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

5. Григор'єва М. А. Імобілізація ферментів як спосіб отримання ефективних біопрепаратів для практичного застосування. *Наукові вісті НТУУ «КПІ»*. 2008. № 1. С. 97-107.

6. Демьянцева Е. Ю., Парфенова А. В. Способы инкапсулирования ферментов: учебно-метод. пособие. ВШТЭ СПб ГУПТД-СПб., 2018. 20 с.

7. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / Под ред. Д. Вудворта. Москва : Мир, 1988. 215 с.

8. Инженерная энзимология : учебное пособие по курсу "Биотехнология" для студентов фармацевтического факультета. Нижний Новгород : Изд-во Нижегородской государственной медицинской академии, 2005. 74 с.

9. Колесов, А. А. Инженерная энзимология на промышленном уровне // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. Т. 18. М. : ВИНТИ, 1989. 184 с.

10. Крякунова Е. В., Канарский А. В. Применение иммобилизованных микроорганизмов и ферментов // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. № 19. С. 101-105.

11. Крякунова Е. В., Канарский А. В. Иммобилизация микроорганизмов и ферментов // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. № 17. С. 189-194.

12. Сеницин А. П., Райнина Е. И., Лозинський В. И. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Москва : Изд-во Моск. ун-та, 1994. 288 с.

13. Скопенко О. В., Кравченко О. О., Остапченко Л. І. Тестові завдання та методичні рекомендації до їх розв'язання з курсу «Хімія біоорганічна». Київ : Київський національний університет ім. Тараса Шевченка. 2012. 66 с.

14. Смирнов В. А., Климошкин Ю. Н. Витамины и коферменты : учеб. пособ. Ч. 2. Самара : Самар. гос. техн. ун-т, 2008. 91 с.

15. Ферменти : методичний посібник для викладачів / К. В. Александрова та ін. Запоріжжя : ЗДМУ, 2015. 115 с.

16. Шлейкин А. Г., Скворцова Н. Н., Бландов Н. Н. Прикладная энзимология. Санкт-Петербург : Университет ИТМО, 2019. 160 с.

17. Юрин В. М. Иммобилизованные клетки и ферменты: курс лекцій. Минск : БГУ, 2006. 138 с.



## **ІММОБІЛІЗОВАНІ ФЕРМЕНТИ І КЛІТИНИ**

Методичні рекомендації

Укладач: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84,1/16. Ум.друк.арк.6

Тираж 30 прим. Зам.№\_\_\_\_\_

Надруковано у видавничому відділі

Миколаївського національного аграрного університету

54020, м.Миколаїв, вул. Георгія Гонгадзе, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.