

Иммобилизованные клетки и ферменты

- Существуют два принципиально различных метода иммобилизации : без возникновения ковалентных связей между веществом и носителем (физические методы иммобилизации) и с образованием ковалентной связи между ними (химические методы иммобилизации). Каждый из этих методов осуществляется разными способами.
- **Физические методы** иммобилизации ферментов реализуются посредством адсорбции фермента на нерастворимом носителе, путем включения энзимов в поры поперечносшитого геля, в полупроницаемые структуры или двухфазные системы.

• **Адсорбция**

- на нерастворимых носителях. При адсорбционной иммобилизации молекула удерживается на поверхности носителя за счет электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей. Адсорбция была первым методом иммобилизации ферментов, но и сейчас не потеряла своего значения и стала наиболее широко распространенным способом получения иммобилизованных ферментов в промышленности. Описано получение адсорбционным способом более 70 иммобилизованных ферментов с использованием главным образом таких носителей, как кремнезем, активированный уголь, графитовая сажа, различные глины, пористое стекло, полисахариды, синтетические полимеры, оксиды алюминия, титана и других металлов. Последние применяются наиболее часто. Эффективность адсорбции молекулы белка на носителе определяется удельной поверхностью (плотностью центров сорбции) и пористостью носителя. Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается крайней простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем (статистическим способом, при перемешивании, динамическим способом с использованием колонок). С этой целью раствор фермента смешивают со свежим осадком, например, гидроксида титана, и высушивают в мягких условиях. Активность фермента при таком варианте иммобилизации сохраняется практически на 100 %, а удельная концентрация белка достигает 64 мг на 1 г носителя.

- К недостаткам адсорбционного метода следует отнести невысокую прочность связывания веществ с носителем. При изменении условий иммобилизации могут происходить десорбция вещества, его потеря и загрязнение продуктов реакции. Существенно повысить прочность связывания вещества с носителем может предварительная его модификация (обработка ионами металлов, полифункциональными агентами - полимерами, белками, гидрофобными соединениями, монослоем липида и пр.). Иногда, наоборот, модификации подвергается молекула исходного вещества, однако зачастую это ведет к снижению его активности.

Иммобилизация путем включения в гель

. Способ иммобилизации вещества путем включения в трехмерную структуру полимерного геля широко распространен благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных веществ, но и даже интактных клеток. Иммобилизацию веществ в геле осуществляют двумя способами. В первом случае вещества вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами. Во втором случае вещество вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние. Для первого варианта используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, силикагеля, для второго - гели крахмала, агар-агара, каррагинана, агарозы, фосфата кальция. Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя. Большинство гелевых матриц обладает высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивает возможность многократного использования вещества, включенного в его структуру. Однако метод непригоден для иммобилизации ферментов, действующих на водонерастворимые субстраты.

• **Иммобилизация веществ в полупроницаемые структуры.**

- Сущность этого способа иммобилизации заключается в отделении водного раствора вещества от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомолекулярные молекулы субстратов и кофакторов, но задерживающей большие молекулы фермента. Разработано несколько модификаций этого метода, из которых интерес представляет микрокапсулирование и включение веществ в липосомы.
- Первый способ состоит в том, что водный раствор вещества включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером. Один из механизмов возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул вещества заключается в реакции межфазной поликонденсации двух соединений, одно из которых растворено в водной, а другое — в органической фазе. Примером может служить образование на поверхности раздела фаз микрокапсулы, получаемой путем поликонденсации гексаметилендиамина-1,6 (водная фаза) и галогенангидрида себациновой кислоты (органическая фаза):
- Размер получаемых капсул составляет десятки или сотни микрометров, а толщина мембраны - сотые доли микрометра.

- Достоинства метода микрокапсулирования - простота, универсальность, возможность многократного использования нативного вещества (фермент может быть отделен от непрореагировавшего субстрата и продуктов реакции процедурой простого фильтрования). Особенно существенно, что методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но и мультиэнзимные комплексы, целые клетки и отдельные фрагменты клеток. К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.
- Близким к инкапсулированию методом иммобилизации можно считать включение водных растворов ферментов в липосомы, представляющие собой сферические или ламеллярные системы двойных липидных бислоев. Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель. Оставшуюся тонкую пленку липидов диспергируют в водном растворе, содержащем фермент. В процессе диспергирования происходит самосборка бислоевых липидных структур липосомы, содержащий включенный раствор фермента.

- Ферменты, иммобилизованные путем включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и научных целях, ибо значительная часть ферментов в клетке локализована в составе липидного матрикса биологических мембран, поэтому изучение липосом имеет большое значение для понимания закономерностей процессов жизнедеятельности в клетке.
- Другие приемы иммобилизации ферментов, основанные на физических методах, менее распространены по сравнению с рассмотренными выше.

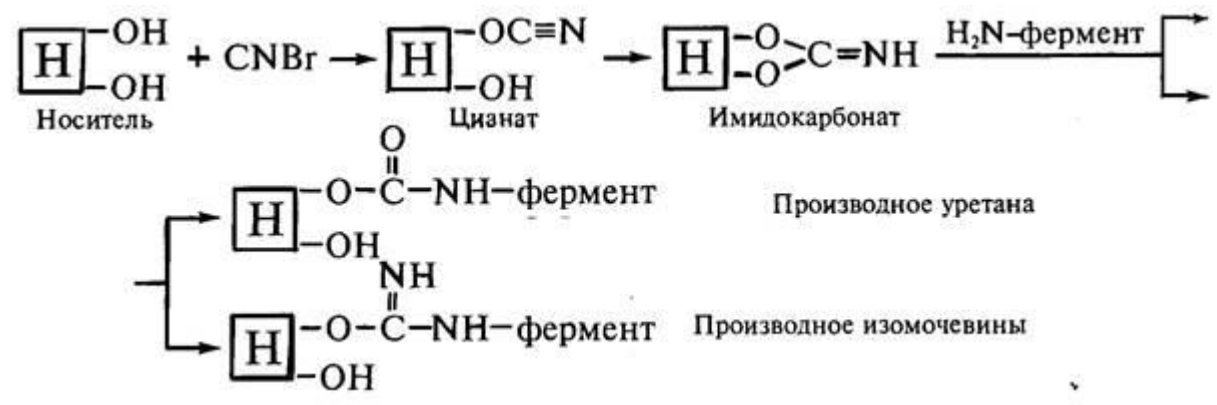
Химические методы

- Иммобилизация веществ путем образования новых ковалентных связей между веществом и носителем - наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.
- В отличие от физических методов этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь вещества с носителем и часто сопровождается стабилизацией молекулы энзима. Однако расположение вещества относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает стерические трудности в осуществлении каталитического процесса. Вещество отделяют от носителя с помощью вставки (сшивки, спейсера), в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, гидразин, сульфурилхлорид, глутаровый диальдегид и др.). Например, для выведения галактозилтрансферазы из микроокружения носителя между ним и ферментом вставляют последовательность — $\text{CH}_2\text{—NH—(CH}_2\text{)}_5\text{—CO—}$. В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединенные между собой ковалентными связями.

- Принципиально важно, чтобы в иммобилизации вещества участвовали функциональные группы, не существенные для его каталитической функции. Так, гликопротеины обычно присоединяют к носителю через углеводную, а не через белковую часть молекулы фермента.
- Число методических приемов, разработанных для осуществления ковалентной иммобилизации вещества, исключительно велико. Все методы химической иммобилизации классифицируют в зависимости от природы реакционной группы носителя, вступающей во взаимодействие с молекулой вещества. Ниже представлен ряд примеров, иллюстрирующих некоторые способы химической иммобилизации ферментов.

носителем или синтезируются диалкильным эфиром цианатным методом.

При обработке носителя бромцианом возникают реакционноспособные цианаты и имидокарбонаты, которые при взаимодействии с нуклеофильными аминогруппами фермента образуют производные изомочевины и уретанов:



Иммобилизация ферментов в носителях, обладающих аминогруппами.

Первичные аминогруппы носителя, связанные с ароматическим кольцом, предварительно превращают в соли диазония, которые затем подвергают разнообразным реакциям сочетания.

В реакции сочетания вступают фенольные, имидазольные, аминные, гуанидиновые, тиольные группы белков.

Так, в щелочной среде фенольные радикалы тирозина образуют прочные азоосоединения, в составе которых белок связан с носителями:



ангидриды, галогенангидриды, активированные эфиры и другие производные карбоновых кислот.

Реакционная способность производных карбоновых кислот в реакциях ацилирования аминогрупп фермента уменьшается от галогенангидридов до эфиров.

- **Иммобилизация на носителях, обладающих сульфгидрильными группами.** Сульфгидрильные группы носителя и фермента легко окисляются с образованием дисульфидных связей под действием кислорода воздуха:
- Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю отличается высокой эффективностью и прочностью связи. Несмотря на это, методы ковалентной иммобилизации ферментов все еще малодоступны для промышленного использования в связи со сложностью и дороговизной их применения. Однако они остаются незаменимыми инструментами в практике проведения научных и лабораторных исследований по созданию энзимов с контролируемыми свойствами.
- Методы иммобилизации универсальны для всех видов иммобилизованных биокатализаторов - индивидуальных ферментов, клеток, субклеточных структур, комбинированных препаратов.

Промышленные микробиологические процессы условно можно разбить на несколько основных групп:

- **1) получение живой или инактивированной микробной биомассы** (производство пекарских, винных, кормовых дрожжей; вакцин, белково-витаминных концентратов, средств защиты растений, заквасок для получения кисломолочных продуктов и силосования кормов, почвоудобрительных препаратов и т.д.);
- **2) получение продуктов метаболизма микроорганизмов** (антибиотики, гормоны, аминокислоты, витамины, органические кислоты и т.д.);
- **3) получение ферментов микробного происхождения;**
- **4) получение рекомбинантных продуктов;**
- **5) биотрансформация веществ;**
- **6) утилизация неприродных соединений.**

ОСНОВНЫЕ СТАДИИ (ЭТАПЫ ИЛИ ОПЕРАЦИИ) ПРОМЫШЛЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

- Подготовка необходимой культуры микроорганизма-продуцента.
- Подготовка сырья.
- Стадия ферментации.
- Выделение и очистка целевого продукта.
- Приготовление товарной формы целевого продукта.

Выбор и требования к штаммам-продуцентам

- 1) способность расти в чистой культуре и генетическая стабильность;
- 2) отсутствие патогенности и токсичности;
- 3) высокая скорость роста при массовом культивировании и способность синтезировать продукт в большом количестве и за короткий промежуток времени;
- 4) устойчивость к контаминации;
- 5) способность расти на простых и дешевых питательных средах.

Объекты промышленного использования

- а) бактерии и цианобактерии;
- б) грибы;
- в) водоросли;
- г) простейшие.

Продукты микробиологического производства	Микроорганизмы-продуценты
<p>Пищевые продукты <i>Кисломолочные продукты</i></p> <p><i>Соления и маринады</i></p> <p><i>Уксус</i></p> <p>Пищевые и кормовые добавки <i>Аминокислоты</i></p> <p><i>Белок</i></p> <p><i>Витамины</i></p>	<p>Lactobacillus spp., Leuconostoc spp., Streptococcus spp., Lactococcus spp.</p> <p>Lactobacillus spp., Leuconostoc spp., Pediococcus spp.</p> <p>Acetobacter aceti, Gluconobacter suboxidans</p> <p>Corynebacterium glutamicum, Brevibacterium flavum, Micrococcus spp.</p> <p>Methylomonas spp., Methylophilus methylo-trophus, Anabaena spp., Spirulina spp.</p> <p>Saccharomyces cerevisiae.</p> <p>Clostridium spp., Propionibacterium freudenreichii, Pseudomonas denitrificans, Bacillus megaterium, Gluconobacter spp.</p>

Продукты микробиологического производства	Микроорганизмы-продуценты
<p>Промышленные соединения <i>Спирты</i> <i>Ацетон</i> <i>Органические кислоты</i></p> <p><i>Полисахариды</i></p> <p>Ферменты</p> <p>Лекарственные препараты <i>Антибиотики</i></p> <p>Биологически активные вещества <i>Инсектициды</i></p>	<p>Zimomonas mobilis, Clostridium spp. Clostridium spp. Lactobacillus spp., Acetobacter spp., Clostridium aceticum, Gluconobacter spp., Propionibacterium spp., Pseudomonas spp. Leucomonstoc mesenteroides, Azotobacter vinelandii Bacillus spp., Streptomyces spp., Actinomyces spp., Escherichia coli, Clostridium spp. Streptomyces spp., Bacillus spp. Bacillus thuringiensis</p>

Ферменты, получаемые путем промышленного культивирования продуцентов

Группы ферментов	Ферменты	Бактерии-продуценты
Гликозидазы	α -амилаза Пуллуланаза β -галактозидаза Инвертаза Полигалактуроназа, пектин-эстераза Пектиназы	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis, B. diastaticus</i> <i>Clostridium felsineum</i> <i>Erwinia spp., Bacillus polymyxa</i>
Протеазы	Коллагеназа Аспартаза Комплекс «римопротелин» Комплекс «протелин»	<i>Clostridium histolyticum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Actinomyces rimosus</i> <i>Streptomyces griseus</i>
Липазы	Фосфокиназы	<i>Clostridium spp., Bacillus spp.</i>
Негидролитические ферменты	Фумараза Глюкозоизомеразы	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptomyces spp., Bacillus spp.</i>

Грибы

- антибиотики (*Penicillium* spp.);
- гиббереллины и цитокинины (*Fusarium* spp., *Botrytis* spp.);
- каротиноиды (астаксантин, *Rhaffia rhodozima*);
- белок (*Candida*, *Saccharomycopsis lipolytica*);
- спирты (*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*);
- сыры типа рокфор и камамбер (*Penicillium* spp.);
- соевый соус (*Aspergillus oryzae*).

Простейшие

- Противоопухолевые препараты круцин и трепаноза (*Trypanosoma* (*Schizotrypanum* *cruzi*)), астазилид (*Astasia longa*), парамилон (*Astasia* spp., *Euglena* spp.).
- Потенциальные продуценты белка и гетерополисахаридов.

Водоросли

- кормовой и пищевой белок (*Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp);
- пищевые и витаминные добавки (*Ulva* spp., *Porfira* spp., *Undaria* spp., *Rhodimentia* spp., *Alaria* spp.);
- глицерол (*Dunaliella bardawil*)

Классификация процессов культивирования

- 1) по состоянию питательной среды (поверхностные и глубинные);
- 2) по наличию или отсутствию перемешивания (динамические или статические);
- 3) по содержанию кислорода (на аэробные или анаэробные);
- 4) по способу действия (закрытые, чаще периодические, и открытые, чаще непрерывные);
- 5) по количеству ферментеров (одно-, дву- и многостадийные);
- 6) по способу управления (хеостатные, турбидостатные, оксистатные, рН-статные и другие).



Рис.1. Основные методы культивирования микроорганизмов.

Системы твердофазного или твердожидкостного типа

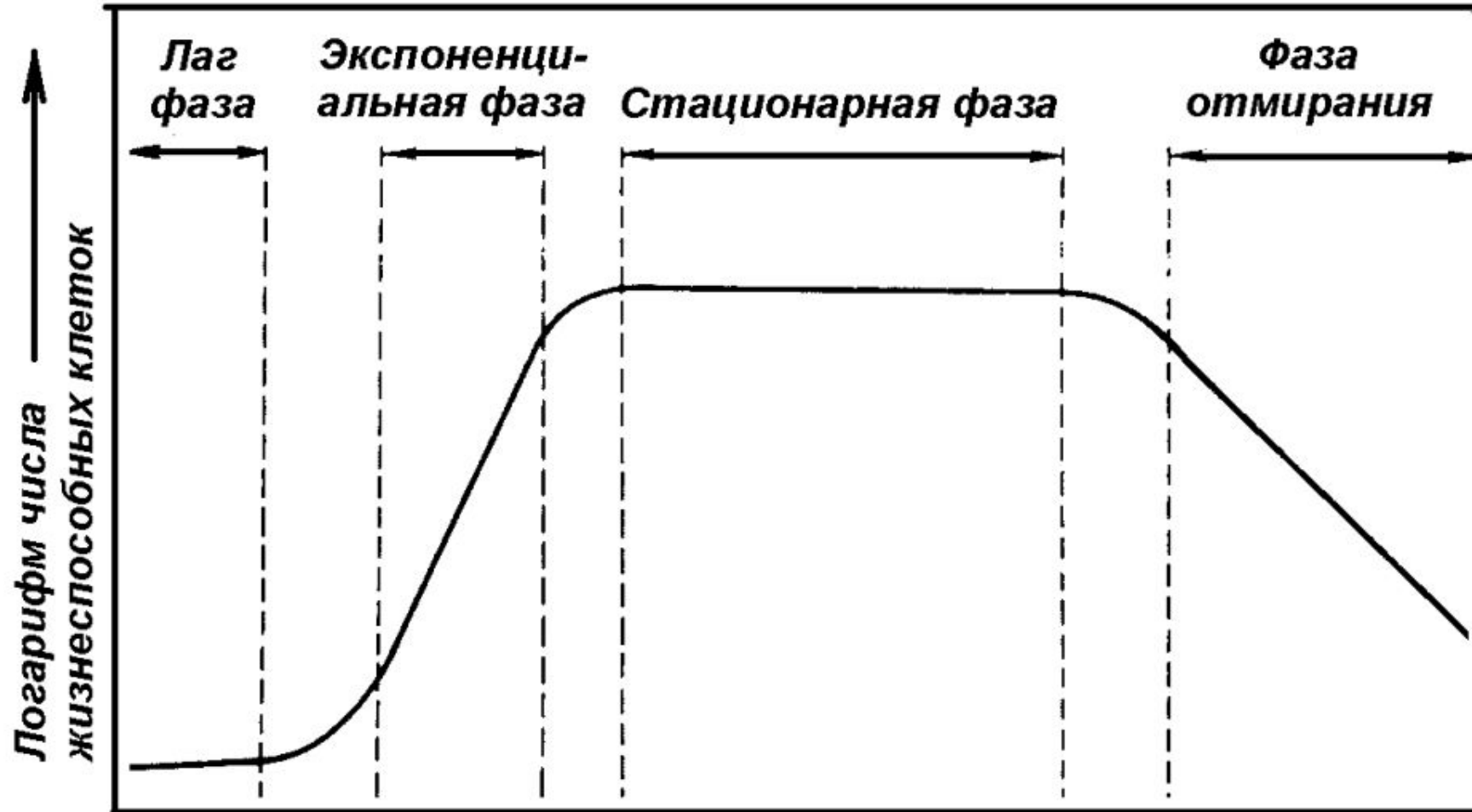


Рис. 2. Основные фазы кривой роста периодической культуры микроорганизмов.

Получение товарных форм целевого продукта

Все товарные формы биопрепаратов с точки зрения технологии их получения можно разделить на три основные группы.

- 1. Биопрепараты, имеющие в товарном продукте в качестве основного компонента жизнеспособные микроорганизмы. К этой группе относятся средства защиты растений, бактериальные удобрения, закваски для силосования кормов, биодеграданты, другие активные средства биотрансформации.
- 2. Биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса клеток и продукты ее переработки. Это кормовые дрожжи, грибной мицелий и т.д.
- 3. Биопрепараты на основе очищенных продуктов метаболизма микроорганизмов. К ним относятся витамины, аминокислоты, ферменты, антибиотики, липиды, полисахариды, продукты комплексной переработки микробных масс и метаболитов.

В зависимости от конкретных целей производства товарные формы представляют собой либо сложную смесь, содержащую некоторое количество основного вещества, либо высокоочищенный препарат, отвечающий ряду специальных требований.

Общие принципы разделения веществ

На первом этапе переработки культуральной жидкости производят отделение массы продуцента от жидкой фазы – сепарацию.

Технологические приемы, используемые для отделения клеток от среды, зависят от природы продуцента. Часто используют флотацию и фильтрование.

Сгущенная биомасса высушивается или прессуется (пекарские дрожжи).

Если биомасса не содержит значимых количеств целевого продукта, то она осаждается добавлением твердых компонентов, увлекающих клетки или мицелий на дно - физическое осаждение либо подвергается фильтрации или центрифугированию.

Для выделения и очистки продуктов, находящихся внутри клеток продуцента (например интерферонов, гормонов) вводится стадия разрушения клеточных оболочек (*дезинтеграция биомассы*).

Жидкость далее также подвергается переработке, если содержит метаболиты, представляющие практическую ценность.

Культуральная жидкость перерабатывается путем *экстракции, адсорбции, осаждения, ионообмена, высаливания, кристаллизации* или *с помощью микро- и ультрафильтрации* через полимерные мембраны со специально подобранным размером пор.

Методы тонкой очистки и разделения препаратов

- **Хроматография**

- хроматография на бумаге

- хроматография в тонком слое или тонкослойная хроматография

- колоночная хроматография (в зависимости от типа матрикса подразделяется на : ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, хроматографию гель-фильтрацией, аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию.)

- **Высокоскоростное центрифугирование**

- **Ультрацентрифугирование**

- **Электрофорез**

К микробным продуктам,

- синтезируемым в больших количествах, относятся **полисахариды** - декстраны, леваны, маннаны, ксантаны. Декстраны продуцируются при использовании сахарозы в качестве субстрата бактериями **Leuconostoc mesenteroidis**, обладающими декстрансахарозной (или транс-глюкозидазной) активностью. Молекулы декстранов построены из остатков глюкозы с α -1,6-связью, имеют небольшое количество ветвлений, частично гидрализованые декстраны с молекулярной массой 40-80 тыс. служат заменителями плазмы крови, модифицированные декстраны также используются в медицине, поперечно-сшитые декстраны (сефадексы) применяются в качестве молекулярных сит для гельфильтрации.
- Ксантаны - это смолы, синтезируемые **Xanthomonas campestris** при анаэробном росте на глюкозной среде. Ксантаны представляют собой разветвленные полимеры, состоящие из остатков глюкозы, маннозы и глюкуроновой кислоты, некоторые из которых имеют ацетильную (CH_3CO) или пируватную (CH_3COCO) группы. Ксантаны добавляют ко многим пищевым продуктам в качестве загустителей и стабилизаторов, используют как красители в текстильной промышленности и полиграфии, в производстве косметических и фармацевтических препаратов, а также при бурении нефтяных скважин в качестве добавки к буровому шламу, поскольку они обладают свойствами ПАВ.

- Для получения микробных полисахаридов используют, как правило, свободные клетки, однако имеется опыт применения и иммобилизованных клеток. Иммобилизацию проводят адсорбцией на полиуретане, песке, активированном угле, силихромах. Установлено, в частности, что целесообразно осуществлять синтез полисахаридов в условиях периодической смены среды (азотсодержащей и безазотистой). Введение безазотистой среды приводит к дополнительному закреплению клеток на носителе, так что они длительное время сохраняются в адсорбированном состоянии, однако, биосинтетическая активность клеток при этом снижается. При введении в реактор азотсодержащей среды сохраняется жизнеспособность клеток и восстанавливается уровень биосинтеза. В случае биосинтеза полисахаридов иммобилизация путем адсорбции более целесообразна, чем включением в гели, однако при адсорбционной иммобилизации велика вероятность десорбции клеток и смешивания их с целевым продуктом, причем в случае полисахаридов отделение целевого продукта от клеток затруднено. Поэтому метод, основанный на периодической смене сред играет в случае биосинтеза полисахаридов важную роль.

Производство белка микроорганизмами

Области применения микробного белка

- 1) техническая (компоненты питательных сред, различного рода наполнители, загустители-эмульгаторы, стабилизаторы и т.д.),
- 2) кормовая (для хозяйственно ценных животных),
- 3) пищевая.

Основные продуценты белка –

с технологической точки зрения наилучшими из продуцентов являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp., *Trichosporon* spp., *Hansenula* spp., *Zygoascus* spp., *Pichia* spp.

Помимо дрожжей также используют мицелиальные грибы родов *Aspergillus* и *Fusarium*, виды рода *Mucor* и бактерии *Methylomonas* spp., *Methylophilus methylotrophus*, *Hyphomicrobium* spp., *Pseudomonas* spp.

Сырье для микробиологического производства

Поиск сырья для микробиологического производства белковых веществ осуществляется по двум направлениям – ориентация на чистые виды сырья, желательны, индивидуальных соединений и ориентация на использование различных отходов.

Основные виды сырья для производства микробного белка :

Нормальные (неразветвленные) парафины и дистилляты нефти, природный газ, спирты, растительные гидролизаты, метан, водород, метанол, этанол, уксусная кислота, углекислый газ, молочная сыворотка, меласса, крахмал и целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства.

• Получение органических кислот.

- Органические кислоты и их соли широко используются в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной, химической, металлургической и других отраслях промышленности, поэтому их получение является важным направлением крупнотоннажного микробиологического синтеза. Многие кислоты можно производить как химическим, так и микробиологическим путем, причем первый путь более предпочтителен, когда кислоты предполагается использовать для технических нужд, второй путь - для целей пищевой промышленности и медицины.

Источником углерода для микроорганизмов-продуцентов органических кислот являются углеводы, органические кислоты, спирты, алканы. Кислоты часто секретируются клетками, когда рост культуры в силу определенных причин тормозится и переходит в стационарную фазу.

Фактором, вызывающим прекращение роста микробных культур, может быть недостаток минеральных компонентов или витаминов. В случае получения органических кислот рост культур лимитируют источником азота, используя при этом избыточное количество источника углерода (и энергии). Интенсивный синтез кислот в стационарной фазе роста после исчерпывания дефицитного компонента продолжается до тех пор, пока в среде присутствует источник углерода и пока клетки продуцента жизнеспособны. Это в принципе позволяет надеяться на широкое применение иммобилизованных клеточных препаратов для получения органических

- Хотя свойство продуцировать ту или иную органическую кислоту широко распространено среди микроорганизмов, на практике для получения кислот используют специально отобранные или мутантные высокопродуктивные штаммы, не синтезирующие побочных продуктов. В этих случаях выходы органических кислот - по существу, монопродуктов процесса - являются высокими: для молочной кислоты 90, глюконовой - 90-95, уксусной - 90-98, лимонной - 85%.

В настоящее время семь органических кислот производятся в промышленных масштабах, причем лимонную, глюконовую, кетоглюконовую, итаконную и яблочную кислоты получают только микробиологическим путем, а молочную и уксусную - химическим и микробиологическим методами.

Важнейшей для промышленности органической кислотой является уксусная. Она используется при производстве волокон, фармацевтических препаратов, инсектицидов, в пищевой промышленности, как субстрат для получения аминокислот. Микробиологический способ экономически оправдан в случае получения пищевого уксуса (окисление этанола ацетобактериями). Производство столового уксуса (10%-ная кислота) составляет в мире 8-10 млн. м³ в год. Техническую уксусную кислоту получают химическим синтезом (карбонилирование метанола).

- В зависимости от способа иммобилизации (адсорбция на буковых стружках, TiO_2 , ZrO_2 , керамике, хлопке, ионообменных смолах, включение в гели каррагинана, коллагена) продуктивность процесса варьирует в пределах 60 раз, концентрация уксусной кислоты изменяется от 20 до 110 г/л, операционная стабильность иммобилизованного биокатализатора достигает 270 сут. Иммобилизованные на древесной стружке ацетобактерии применяются в промышленности; ряд биокатализаторов, полученных на основе использования других способов иммобилизации, успешно испытан в установках и реакторах пилотного масштаба.

Молочная кислота - первая из органических кислот, которую начали производить путем брожения, в конце XIX века было налажено промышленное производство молочной кислоты при участии молочнокислых бактерий (***Lactobacillus delbrueckii***, ***L. Leichmanii*** и ***L. bulgaricus***). Молочную кислоту используют в качестве добавки к пищевым продуктам, сокам, эссенциям и напиткам, как окислитель в пищевой промышленности, в гальваностегии, а также при производстве пластмасс, когда L(+)форму кислоты полимеризуют в полилактам. За 1980г. в США и Европе было произведено 40 000 т молочной кислоты. Следует отметить, что практически вся производимая в США молочная кислота синтезируется химическим путем, в Европе половину ее получают при сбраживании глюкозы ***L. delbrueckii***. Для интенсификации процессов получения молочной кислоты проводят исследования по применению иммобилизованных молочнокислых бактерий, а также по оптимизации конструкции биореакторов.

- Молочнокислые бактерии были иммобилизованы путем включения в различные гели. Для получения молочной кислоты предложено использовать мембранный реактор, колонный реактор с полыми волокнами, колонный реактор с иммобилизованным включением в Са-альгинатный гель бактериями, соединенный с электродиализной ячейкой. Имеющиеся данные позволяют рассчитывать на 50-100-кратное увеличение производительности процесса. Время полужизни иммобилизованного Са-альгинат биокатализатора на основе *L.delbrueckii* составляет 100 сут.

Лимонную кислоту получают из мелассы с помощью микроскопических грибов *Aspergillus niger*. В 1980 г. ее мировое производство составило 175 000 т. Лимонная кислота применяется как ароматизирующее средство и консервант пищевых продуктов, для очистки и шлифовки металлов (хелатирующий агент), в качестве пластификатора лакокрасочных материалов. Эфиры лимонной кислоты применяются при производстве пласт масс. В лабораторных условиях иммобилизация *A.niger* проводилась в гелях Са-альгината, каррагинана, агара, полиакриламида, путем адсорбции на полипропиленовых пленках и пластинках, включением в поперечно-сшитую глутаровым альдегидом коллагеновую мембрану. Применение иммобилизованных клеток приводит к увеличению скорости образования лимонной кислоты в несколько раз, операционная стабильность иммобилизованного биокатализатора достигает 30 сут.

- Лимонную и изолимонную кислоты получают с помощью дрожжей **Candida sp.** Изолимонная кислота синтезируется и при использовании **Penicillium janthinellum** (некоторые виды **Penicillium** синтезируют диастереомер лимонной кислоты - аллозо-L_s-изолимонную кислоту). В лабораторных условиях осуществлена иммобилизация указанных микроорганизмов в Са-альгинат и ПААГ.

Хорошие результаты по технологическому применению иммобилизованных клеток продемонстрированы при получении яблочной кислоты путем микробиологической трансформации фумаровой кислоты. С 1974 г. японская фирма “Танабо Сеяку” приступила к промышленному выпуску яблочной кислоты с использованием включенных в ПААГ мертвых клеток **Brevibacterium ammoniagenes**. В 1978 г. ПААГ был заменен на каррагинан, что позволило в 2,3 раза увеличить эффективность биокатализатора, а замена **B. ammoniagenes** на **B. flavum** еще в 2 раза увеличила его эффективность. В итоге появилась возможность с помощью однократно приготовленной партии иммобилизованного биокатализатора получить до 100 т яблочной кислоты (в настоящий момент производится 180 т). Продолжительность функционирования иммобилизованных в полиакриламидный гель клеток составляет около 60 суток, в геле на основе каррагинана – до 160 суток против 6 суток для свободных клеток. Конверсия фумарата (1М) - до 70%, время одного трансформационного цикла - около 5 ч

- Глюконовая кислота и ее лактон являются продуктами окисления глюкозы. Промышленное производство глюконовой кислоты с помощью **A.niger** было налажено еще в начале 20-х годов. Выход процессов ферментации (свободные клетки) с получением глюконовой кислоты равен 95%, концентрация глюкозы - 150-200 г/л.

Глюконовая кислота находит применение как моющее средство, ее соли используются в медицине, а лактон - как подкислитель в пищевой промышленности. Производные глюконовой кислоты - 2-кетоглюконовую и 5-кетоглюконовую кислоты - получают с помощью микроорганизмов **Pseudomonas sp., Gluconobacter sp., Acetobacter sp.**, причем процесс получения 2-кетоглюконовой кислоты на основе свободных клеток нашел промышленное применение. Из 5-кетоглюконовой кислоты в результате химической гидрогенизации образуется L-идоновая кислота, а из нее осуществляется ферментативный синтез 2-кетоглуконовой кислоты, являющейся полупродуктом для производства аскорбиновой кислоты.

Иммобилизацию микроорганизмов-продуцентов глюконовой и 2-кетоглюконовой кислот проводят с помощью адсорбционных методов (при использовании в качестве адсорбентов нейлонового волокна, керамики, анионообменника амберлита), а также включением в гели каррагинана, Са-альгината, коллагена, ПААГ.

- Наиболее эффективны биокатализаторы, полученные методами включения в упругие гели ПААГ или Са-альгината, при их использовании были реализованы процессы превращения глюкозы, концентрацией до 200 г/л с продуктивностью до 10 г/л×ч (по глюконовой кислоте), продолжительность функционирования иммобилизованных клеток достигала 200 сут.

Итаконовую кислоту, применяющуюся при производстве пластмасс и красителей, получают с высоким выходом из глюкозы с помощью грибов **A.terreus** (процесс на основе свободных клеток внедрен в промышленную практику в СССР). На лабораторном уровне проводилась иммобилизация **A.terreus** в ПААГ, а также путем адсорбции на сетчатых дисках из пористой нержавеющей стали. В последнем случае использовался дисковый реактор: концентрация итаконовой кислоты достигала 20 г/л, реактор функционировал без изменения продуктивности, которая составляла до 1 г/л.ч, до 30 сут.

• Получение антибиотиков.

- Применение биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток позволило достичь больших успехов в области получения антибиотиков. Как важна область биотехнологии, связанная с синтезом антибиотиков, наглядно видно из стоимости мирового сбыта их четырех наиболее распространенных групп (пенициллинов, цефалоспоринов, тетрациклинов и эритромицинов (имеется в виду продажа для медицины и ветеринарии): в 1978 г она составляла свыше 4 млрд. дол., в 1980 г. - около 7 млрд. дол., в 1985 г. - около 8 млрд. дол. (объем производства превысил 60 тыс. т в год), в 2000 г. более 20 млрд. дол.

Важность и масштабы производства антибиотиков обусловлены их применением в медицине и ветеринарии как противомикробных и противоопухолевых препаратов. С их помощью контролируется рост растений и ведется борьба с болезнями.

Новые поколения синтетических антибиотиков представляют собой сложные по химическому строению вещества, поэтому методы получения на основе полного химического синтеза не могут конкурировать с методами, в которых используются микроорганизмы. Шесть родов филаментозных грибов синтезируют около тысячи различных антибиотиков, в том числе цефалоспорины и пенициллины. Два рода нефиламентозных бактерий синтезируют 500 видов антибиотиков, а три рода актиномицетов - около 3 000 видов. Число известных антибиотиков увеличивается на несколько сотен каждый год.

- Начиная с середины 60-х годов исследователи перешли от поиска новых антибиотиков к модификации структуры уже имеющихся. Особенно это было характерно для пенициллинов и цефалоспоринов, структура которых включает β -лактамное кольцо. Химическая модификация β -лактамного кольца ("добавление" к нему какой-либо химической группы) позволяет получить новые виды антибиотиков; их называют полусинтетическими.

Ключевым полупродуктом для получения полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда является 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК)

Получение 6-АПК в промышленности путем химического гидролиза бензилпенициллина сопряжено с большими трудностями в связи с крайней неустойчивостью лактамного цикла его молекулы. Так, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1 %. Продуктивность этого процесса удалось значительно повысить благодаря применению для гидролиза иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинацилазу.

- Со второй половины 70-х годов XX в. вся 6-АПК, выпускаемая в России, и значительная часть 6-АПК, получаемая в Италии производится с помощью иммобилизованных ферментов. На итальянских фирмах применяют фермент, иммобилизованный путем включения клеток *E. coli* в волокна триацетата целлюлозы, на российских предприятиях используют бактериальные клетки, иммобилизованные в полиакриламидном геле. Переход к технологии, применяющей иммобилизованные бактериальные клетки обеспечивает высокий выход 6-АПК, составляющий 80-85%. По данным японских исследователей, время полуинактивации пенициллинацилазы, содержащейся в иммобилизованных в полиакриламидном геле бактериальных клетках, равно 42 суткам при 30°C или 17 суткам при 40°C.

Внедрение в промышленность биокаталитической технологии производства 6-АПК привело к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

Для получения промышленных биокатализаторов с целью трансформации антибиотиков используют иммобилизацию клеток микроорганизмов путем включения в ПААГ, сшитый глутаровым альдегидом желатиновый гель, связывание с глицидилметакрилатом с помощью глутарового альдегида. По существу при трансформации антибиотиков из всего многообразия ферментов клетки используется лишь один из них. Сохранять жизнеспособность клеткам при этом не обязательно, активность катализатора можно увеличивать за счет разрушения клеточных оболочек, служащих диффузионными барьерами на пути субстрата к ферменту.

- Тем не менее, простота требований, предъявляемых к системе, когда при иммобилизации нет необходимости сохранять жизнеспособность клеток, является кажущейся. В частности, простое включение в гель клеток *E.coli* приводит к быстрой инактивации биокатализатора вследствие вымывания фермента в процессе получения геля. В связи с этим был разработан способ включения в ПААГ клеток, предварительно модифицированных в растворе мономеров путем сшивки бифункциональным реагентом.

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

Резкого повышения стабильности удастся достичь после "фиксирующей" модификации поверхности клеток до их контакта с раствором, содержащим ионы кальция. Эта фиксация резко меняет картину ультраструктуры иммобилизованных клеток, их удастся сохранить структурно неизменными.

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

Для иммобилизации микроорганизмов, осуществляющих биосинтез антибиотиков, применяют разные методы - включение в ПААГ, гели Са-альгината, каррагинана, агара, коллагена, включение в полые волокна, адсорбция на цеолите, пенополиуретане, поликарбонате, нейлоне, полисульфоне, стали. Биосинтез антибиотиков с помощью иммобилизованных клеток не имеет пока промышленного значения, но исследования в этом направлении интенсивно развиваются.

Производство полусинтетических β -лактамных антибиотиков.

- Очень большое влияние оказало на развитие медицины открытие пенициллина. Природный пенициллин вырабатывается некоторыми видами зеленой плесени (*Penicillium*). Все эти соединения – производные 6 – АПК (6-аминопенициллановая кислота), а именно амиды, образованные различными кислотами RCOOH и аминогруппой 6-АПК. Сама 6-АПК обладает лишь незначительной антибиотической активностью.
- Важный элемент строения 6-АПК – наличие β -лактамного цикла, характерного и для других антибиотиков, например цефалоспоринов.
- Из-за этого структурного элемента рассматриваемые соединения относят к классу β -лактамных антибиотиков. Изменение группы R приводит к заметным изменениям свойств пенициллинов, в частности их биологической активности.
- Оказалось, что при введении в среду, на которой растет *Penicillium chrysogenum*, карбоновых кислот или их производных преимущественно образуется тот пенициллин, который содержит боковую цепь введенной кислоты. Полученные таким способом пенициллины называют биосинтетическими. Метод достаточно эффективен. В присутствии фенилуксусной кислоты и пара-оксифенилуксусной кислоты (кислот с высокими выходами) получают бензил- и п-оксибензилпенициллины соответственно, а в присутствии феноксиуксусной кислоты – феноксипенициллин, который обладает ценным свойством: он устойчивее к расщеплению под действием кислот, и поэтому его можно принимать внутрь в виде таблеток.

- Однако многие перспективные пенициллины получить биосинтетическим путем не удастся из-за того, что вводимые предшественники вовлекаются в неконтролируемые побочные процессы. Выход был найден, когда биохимики предложили получать полусинтетические пенициллины. 6-АПК вступает в реакцию ацетилирования хлорангидами карбоновых кислот, и дает при этом любые требуемые аналоги пенициллина.
- Химический синтез 6-АПК слишком трудоемок для промышленного использования. Достаточно дешевый источник 6-АПК - биосинтетический бензилпенициллин, гидролиз которого давал бы 6-АПК. Однако химический гидролиз бензилпенициллина идет не по амидной связи с 6-аминогруппой, а по более лабильной амидной связи напряженного β -лактамного кольца. Здесь на помощь приходит уникальная специфичность ферментного катализа: под действием фермента пенициллинамидазы идет расщепление только требуемой связи и не затрагивается β -лактамное кольцо.
- Были изучены кинетика и механизм действия пенициллинамидазы, способы ее иммобилизации и стабилизации. Этот фермент легко включается в полиакриламидный гель, модифицированный глутаровым альдегидом, и обладает в нем достаточно высокой стабильностью.

- Процесс с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы внедрен в производство в последние годы. Это открыло доступ к широкомасштабному производству многих полусинтетических пенициллинов, обладающих высокой устойчивостью в кислых средах, высокой активностью по отношению к большому количеству микробов, низкой токсичностью для организма человека, устойчивостью к ферменту β -лактамазе, гидролизующему в отличие от пенициллинамидазы расщепление лактамного кольца, что приводит к полной потере антибиотической активности. Первое крупнотоннажное производство в СССР, основанное на применении иммобилизованных ферментов, вступило в строй в 1976 г. на Саранском заводе медицинских препаратов: здесь с помощью пенициллинамидазы был налажен выпуск 6 – аминопенициллановой кислоты, необходимой для синтеза ряда антибиотиков пенициллинового ряда. В создании этой технологии принимали участие сотрудники ВНИИ Антибиотиков, Таллиннского политехнического института, МГУ, а также специалисты Рижского и Саранского заводов медпрепаратов.
- Пенициллинамидазе присуща уникальная специфичность и по отношению к гидролизу цефалоспоринов: отщепляется только боковая группа, а β -лактамный цикл остается нетронутым. Это использовано для создания второго технологического процесса – получения 7-АДЦК (7-аминодезацетоксицефалоспорановой кислоты) гидролизом соответствующего фенилацетатного производного. Таким образом, открывается путь к получению очень перспективных лекарственных средств на основе «полусинтетических» цефалоспоринов.
- Пенициллинамидаза, как и любой химический катализатор, не смещает равновесия, а только увеличивает скорость его достижения. Фермент катализирует как прямую реакцию – гидролиз, так и обратную – синтез антибиотика. Это обстоятельство и используется ферментативного синтеза.

- Водный раствор, содержащий 6-АПК или 7-АДЦК, а также соответствующую кислоту, приводят в контакт с иммобилизованной пенициллинамидазой. Через некоторое время в растворе образуется равновесное количество антибиотика. Преимущество метода в его простоте; например, можно использовать непосредственно кислоту, а не ее хлорангидрид. Основной недостаток – низкая скорость реакции для большинства R. Причина этого кроется в его высокой специфичности.

• Трансформация стероидов.

- Одна из первых работ, посвященных иммобилизованным клеткам, касалась трансформации стероидов (в ней шла речь о гидроксигировании стероида кортексолона). В настоящее время все основные ферментативные процессы, используемые в стероидной химии, осуществлены с помощью иммобилизованных клеток: 1.2-дегидрирование, 11-а- и 11-б-гидроксилирование, стереоспецифическое 17-б-восстановление, 20-а- и 20-б-восстановление, деацетилирование, трансформация стероидов и некоторые другие. Острая необходимость применения для трансформации иммобилизованных клеток обусловлена тем, что стереотрансформирующие ферменты, особенно гидролазы и гидрогеназы, являются весьма лабильными, их выделение и очистка затруднены. Иммобилизованные клетки могут служить в этих случаях "носителем" активных и стабильных полиферментных систем, регенерируемых необходимыми им кофакторы.

Промышленный синтез многих лекарственных препаратов на основе стероидов стал возможен с развитием методов микробиологической трансформации. В качестве сырья для промышленных процессов используют природные стероиды, выделяемые из растений или различных органов животных.

Трансформацию стероидов осуществляют с помощью различных микроорганизмов, для иммобилизации которых предложен широкий круг методов.

- Максимальная стабильность и активность в непрерывном (проточном) реакторе наблюдается у клеток, адсорбированном на керамическом носителе, в условиях периодического реактора - у клеток, включенных в ПААГ. В случае иммобилизации в ПААГ период полуинактивации составил 5 мес. (160 циклов трансформации) при сохранении 95%-ного превращения гидрокортизона в преднизолон. Практически во всех носителях (кроме каррагинана) дегидрогеназная активность сохраняется на уровне активности свободных клеток, причем клетки в иммобилизованном состоянии остаются жизнеспособны.

Трансформация стероидов является одним из примеров реализованных в промышленности процессов, основанных на использовании иммобилизованных клеток.

В настоящее время интенсивно разрабатываются методы использования нерастворимых микрокристаллических стероидных субстратов для иммобилизованных клеток. В этих случаях применяют диспергирование и измельчение субстрата, а также превращение его в водорастворимое состояние (с помощью циклодекстринов). Предложен также новый метод проведения реакций, как для свободных, так и для иммобилизованных клеток и в двухфазных водно-органических системах. Клетки при этом локализованы в водной фазе (внутри гранул носителя) и мало подвержены воздействию органического растворителя, не смешивающегося с водой.

- В качестве катализатора реакции дегидрирования стероидов в среде бензола и гептана используются различные виды бактерий *Nocardia* sp., иммобилизованные в гидрофобном носителе. Бактерии, включенные в гидрофобные гели (уретановые полимеры), обладают большей активностью и стабильностью, чем находящиеся в гидрофильном окружении, что определяется характером распределения субстрата между гелем и окружающим растворителем.

Наконец, следует отметить еще одну возможность утилизации нерастворимого стероидного субстрата, когда клетки и частицы субстрата одновременно включают в гранулы геля (альгината, агара, агарозы). После осуществления цикла трансформаций гранулы геля разрушают, клетки удаляют центрифугированием и рециклизуют, а продукт (преднизолон) экстрагируют из супернатанта органическими растворителями.

Препараты для сельского хозяйства

Препараты, производимые для сельского хозяйства подразделяются на:

- энтомопатогенные препараты;
- бактериальные удобрения.

Бактериальные энтомопатогенные препараты

- Бактериальные препараты на основе *Bacillus thuringiensis* - энтобактерин, дипел, инсектин, алестин, токсобактерин, дендробациллин, битоксибациллин, гомелин, бактокулицид, текнар, бактимос, вектобак, москитур, бактоспеин. Активны против 130 видов насекомых.

Грибные энтомопатогенные препараты

- *Beaveria bassiana* (боверин), *Entomophthora thaxteriana* (энтомофторин), *Aschersonia aleuroides* (верталек, майкотал), *Verticillium lecanii* (вертициллин).

Бактериальные удобрения

- *Rhizobium* spp. (нитрагин и ризоторфин), *Azotobacter chroococcum* (азотобактерин), *Bacillus megaterium* var. *Phosphaticum* (фосфобактерин).

- **Получение ферментов.** С точки зрения применения иммобилизованных клеток речь может идти в первую очередь о получении внеклеточных ферментов (производство в мире составляет сотни тысяч тонн в год), среди которых промышленно важными являются амилазы, целлюлозы, гемицеллюлазы, пуллулазазы, декстраназа, пектиназы, лактаза, липазы, протеазы. Внутри-клеточные ферменты - глюкозооксидазу, каталазу, аспарагиназу, пеницилин-ацилазу, инвертазу, б-галактозидазу, глюкозоизомераза, выделение которых требует разрушения клеточной стенки микроорганизма-продуцента, получать с помощью иммобилизованных микроорганизмов нецелесообразно.

По существу, из трех классических методов культивирования микроорганизмов - на жидких питательных средах (глубинный), на твердых питательных средах (поверхностный) и непрерывное культивирование - два последних можно с определенными оговорками отнести к методам, связанным с применением иммобилизованных клеток, которые закреплены на нерастворимом субстрате (источнике углерода) или отделяются от целевого продукта для последующего

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

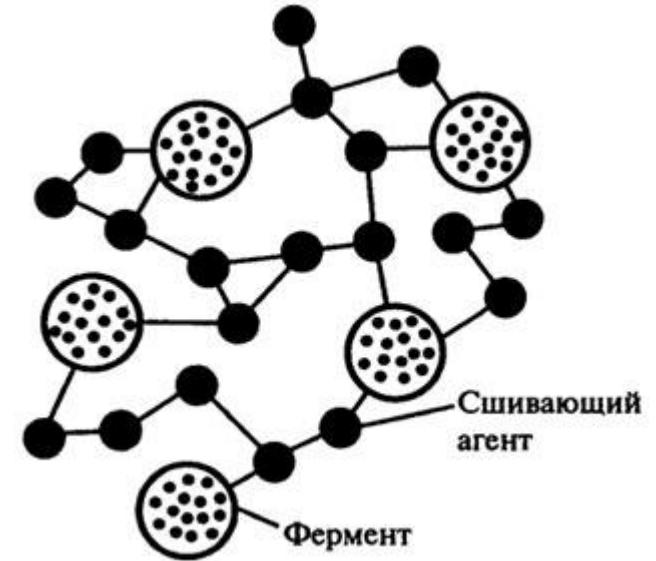
- В различных пищевых технологиях долгое время применялись лишь препараты свободных ферментов, срок использования которых — один производственный цикл. Однако достижения молекулярной биологии, биохимии и энзимологии привели к тому, что в настоящее время строение и функции многих ферментов изучены очень детально и это позволило создать теоретическую базу для производства ферментов пролонгированного действия или иммобилизованных ферментов, т. е. фиксированных или связанных ферментных препаратов.
- Сущность иммобилизации ферментов заключается в присоединении их в активной форме тем или иным способом к инертной матрице (обычно это нерастворимый полимерный носитель).
- Иммобилизацию фермента можно определить и как включение молекулы фермента в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора или кофактора.
- Фаза фермента обычно нерастворима в воде и часто представляет собой высокомолекулярный гидрофильный полимер, например, целлюлозу, полиакриламид, сефарозу и т. п.

- **Принципы и способы иммобилизации.** Включение фермента в изолированную фазу осуществляют различными способами: фермент может быть ковалентно связан с этой фазой, адсорбирован на ней или физически включен в нее.
- Возможны следующие способы иммобилизации фермента.
- 1. Ковалентное связывание. Молекула фермента ковалентно связывается с нерастворимым полимером. Полимер может быть в виде порошка или в форме пленки. Иногда молекулы фермента соединяются ковалентными связями друг с другом или с каким-либо инертным белком; при этом образуется нерастворимый, но активный полимерный фермент (рис. 8.11).
- 2. Электростатическое связывание. Этот способ иммобилизации основан на использовании электростатических или других нековалентных механизмов связывания (рис. 8.12).
- 3. Сополимеризация с помощью многофункциональных реагентов. Связывание молекул фермента с белками (например, с альбумином) или друг с другом осуществляется за счет использования определенных реагентов. В качестве такого многофункционального реагента часто используют глутаровый альдегид, гелеобразующее действие которого известно давно. В этом способе необходимо избегать взаимодействия реагента с активным центром фермента и ингибирования последнего

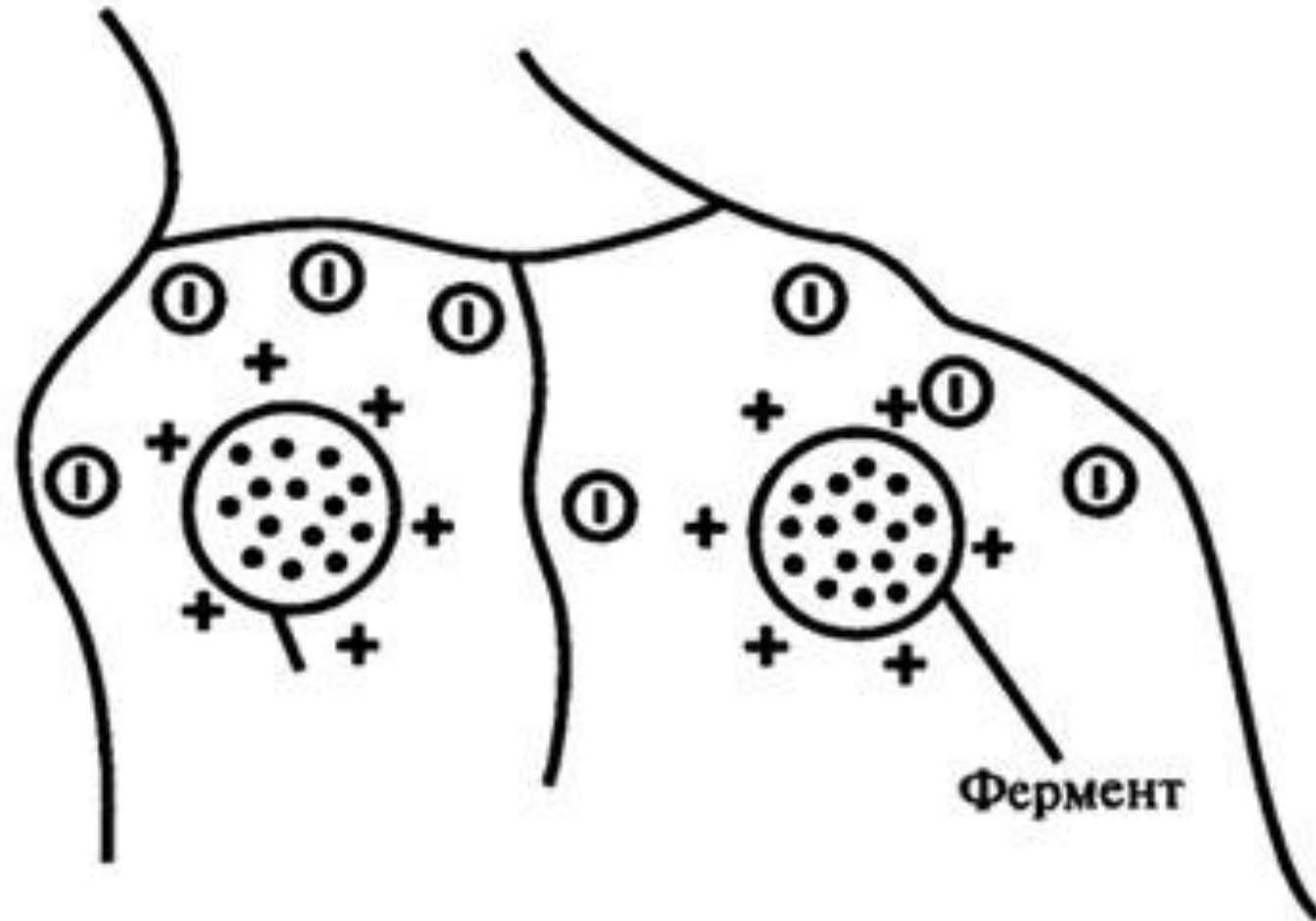
Ковалентное связывание фермента



Поперечное сшивание молекул

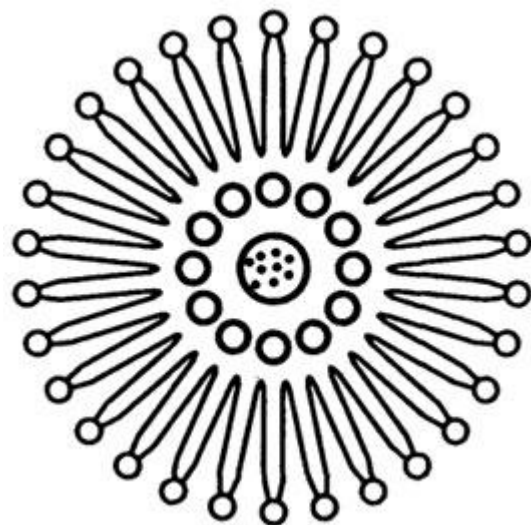
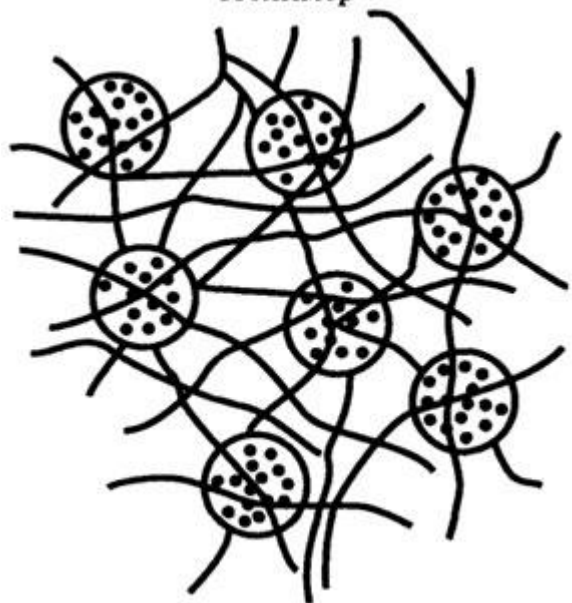


Электростатическое связывание (адсорбция)



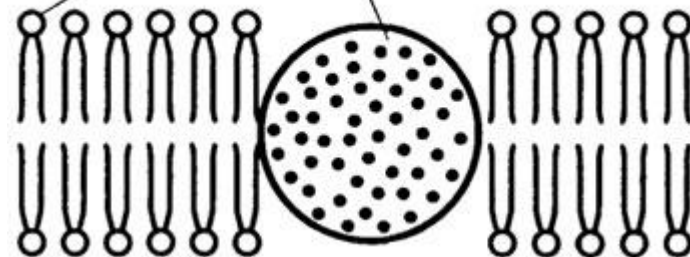
- 4. Включение в полимер. В этом способе фермент не прикреплен к полимеру, но удерживается внутри него, поскольку последний образует вокруг фермента сетевидную матрицу (рис. 8.14). Ячейки этой матрицы настолько малы, что молекула фермента не может освободиться из сети, но в то же время достаточно велики для проникновения низкомолекулярных субстратов. Примером такого способа иммобилизации могут служить:
 - а) включение в липосомы, когда фермент находится в водном растворе, окруженном фосфолипидным барьером (рис. 8.15);
 - б) гидрофобное взаимодействие, когда фермент "погружен" в гидрофобную часть двойного липидного слоя
- Инкапсулирование. Включение фермента в органическую или неорганическую капсулу, которая представляет собой полупроницаемую мембрану

Полимер



Липиды

Фермент



- **Выбор способа иммобилизации.** Искусство иммобилизации ферментов заключается в правильном выборе подходящего метода. Этот выбор определяется целым рядом факторов, многие из которых невозможно выявить до тех пор, пока метод не будет опробован.
- Первичный отбор осуществляется обычно эмпирическим путем. Сначала нужно решить, необходим ли для прикрепления фермента какой-либо специфический носитель, не будет ли процедура иммобилизации инактивировать фермент и сможет ли иммобилизованный фермент действительно функционировать в тех условиях, при которых его предстоит использовать.
- Поэтому для успешной иммобилизации следует по возможности принять во внимание следующие факторы:
 - — фермент должен быть стабильным в условиях протекания реакции;
 - — реагенты, образующие поперечные сшивки, не должны взаимодействовать с химическими группировками активного центра. В связи с этим поперечно-сшивающий реагент должен быть как можно больших размеров, что будет препятствовать его проникновению в активный центр;
 - — всегда, когда это осуществимо, необходимо тем или иным способом защищать активный центр фермента (например, обработка тиоловых ферментов глутатионом или цистеином);
 - — процедура промывания для удаления "непришитого" фермента не должна оказывать вредного влияния на иммобилизованный фермент;
 - — полимерная матрица не должна являться субстратом для иммобилизованного фермента;
 - — необходимо наконец учитывать механические свойства носителя, особенно его

- Процесс иммобилизации фермента можно продемонстрировать на примере связывания глюкоамилазы с носителем — ацетил этил целлюлозой.
- Носитель выдерживают сутки в дистиллированной воде для набухания. Далее к набухшей ацетилэтилцеллюлозе добавляют сначала натрий-ацетатный буфер с pH 5,5, а затем раствор очищенного фермента; после перемешивания к смеси добавляют поперечно-сшивающий агент — глутаровый альдегид. Через несколько часов полученный препарат промывают последовательно натрий-ацетатным буфером и раствором хлористого натрия для удаления несорбированного на носителе фермента. Иммобилизованный таким образом фермент хранится под слоем воды или буфера при 3 — 5°C.
- В настоящее время разработаны методы иммобилизации множества ферментов. Один и тот же фермент можно иммобилизовать несколькими методами. Например, глюкоизомеразу из *S. phaeochromogenes* можно иммобилизовать на различных носителях: пористом алюминии, ДЭАЭ-целлюлозе, ДЭАЭ-крахмале и др. Лактатдегидрогеназу можно включить в гель, прикрепить к носителю поперечной сшивкой; аспарагиназу — прикрепить к носителю сорбционным путем или химической (ковалентной) связью. В табл. 8.4 представлены некоторые методы иммобилизации для различных

- **Влияние иммобилизации на ферментативную активность.** Иммобилизация часто приводит к резким изменениям основных параметров ферментативной реакции: максимальной скорости (V_{\max}); константы Михаэлиса (K_T); оптимума pH и температуры, а также отношения к ингибиторам.
- Степень и природа этих изменений зависят не только от используемого метода иммобилизации, но и от типа ферментативной реакции. Большое влияние на ферментативную активность может оказывать полимерная матрица, причем это влияние может проявляться как в виде воздействия на микроокружение фермента, так и непосредственно на саму молекулу фермента. Кроме того, сами условия иммобилизации (значение pH, присутствие свободных радикалов, окисляющих агентов и т. п.) могут приводить к частичной или полной инактивации фермента.
- При рассмотрении влияния иммобилизации на ферментативную активность одним из важных является вопрос об эффективных кинетических параметрах.
- Параметры K_T и V_{\max} , используемые для характеристики каталитических свойств ферментов в разбавленных растворах (см. разд. 8.2), не могут быть применены в их строгом математическом значении для характеристики иммобилизованных ферментов, т. к. наблюдаются существенные отклонения от гиперболической субстратной кривой, описываемой уравнением Михаэлиса — Ментен, и искривления прямолинейных графиков в двойных обратных координатах (уравнение Лайнуивера — Берка).

- По этой причине в случае иммобилизованных ферментов лучше заново определить физический смысл данных кинетических параметров. Ранее с этой целью использовался параметр "кажущаяся" K_m , но позднее было предложено пользоваться двумя константами: K_w и V_s .
- V — самая высокая скорость, которую можно достичь (теоретически) в данной системе, т. е. когда фермент полностью насыщен субстратом. Следовательно, этот параметр отражает исходные свойства иммобилизованного фермента, но на него могут влиять диффузионные ограничения.
- K_w — такая концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна $V/2$. Этот параметр отражает реальные свойства субстрата и зависит от эффекта распределения и диффузионных ограничений.
- Величина K_m (кажущаяся) не может отражать истинного положения, т. к. варьирует в зависимости от выбранного диапазона концентраций субстрата. Например, ограничение диффузии субстрата сильнее проявляется при низких концентрациях субстрата, а эффект распределения более выражен при низких ионных силах. От этих двух факторов зависит видимая легкость связывания фермента с субстратом, и поэтому они оказывают существенное влияние на параметр K_m (кажущаяся).
- Необходимо также учитывать и возникновение кооперативных эффектов в поведении иммобилизованных ферментов в ответ на изменение концентрации субстрата. Иммобилизованные ферменты (в отличие от аллостерических, которые проявляют или только положительную, или только отрицательную кооперативность) способны обнаруживать оба вида кооперативности в зависимости от pH и микроокружения. Кооперативные эффекты имеют важное значение, т. к. позволяют выявить как значительные изменения скорости реакций в небольшом диапазоне концентраций субстрата, так и малые изменения скорости реакции в других, очень широких диапазонах концентраций субстрата.

- Имобилизованные ферменты как катализаторы многофазового действия можно использовать, в основном, для трех практических целей: аналитических, лечебных и препаративных.
- При решении вопроса о целесообразности использования системы с иммобилизованным ферментом следует руководствоваться следующими критериями: эффективностью, стоимостью и возможностью осуществить процесс с помощью другой системы.
- В случае препаративного (промышленного) применения основную роль играет стоимость, а также возможность автоматизации процесса. Несмотря на большие потенциальные возможности использования иммобилизованных ферментов в производстве, в настоящее время реализованы лишь немногие, например:
 - — разделение D- и L-аминокислот, основанное на использовании плесневой аминоацилазы (Н. Ф. 3.5.1.14), иммобилизованной на ДЭАЭ-сефадексе;
 - — получение сиропов с высоким содержанием фруктозы с использованием глюкозоизомеразы (Н.Ф.5.3.1.18), иммобилизованной на целлюлозном ионообменнике;
 - — возможно использование иммобилизованных ферментов при производстве сыров, стабилизации молока и удалении лактозы из

ПРОМЫШЛЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ.

- Сочетание уникальных каталитических свойств энзимов с преимуществами иммобилизованных ферментов как гетерогенных катализаторов позволило создать новые промышленные технологические процессы. Следует отметить, что все они относятся к производству пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

В настоящее время в мире разработаны следующие крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов и клеток:

1. Получение глюкозофруктозных сиропов.
2. Получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей.
3. Синтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония.
4. Синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты.
5. Синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты.
6. Получение безлактозного молока.
7. Получение сахаров из молочной сыворотки.
8. Получение 6-аминопенициллановой кислоты.

В качестве примера рассмотрим некоторые из них.

1 Применение иммобилизованных ферментов в медицине.

- Иммобилизованные ферменты – основа одного из главных направлений современной биотехнологии. Сегодня с их помощью уже производятся в больших количествах многие важные продукты. В первую очередь это разнообразные биологически активные вещества. Например, в медицине широко используются индивидуальные *аминокислоты*; но при их химическом синтезе получается смесь природной и неприродной – левой и правой форм аминокислоты, а организм может усваивать только природную, левую форму. Разделить такие смеси проще всего с помощью ферментов.
- Широко используется в медицине способность ферментов реагировать на строго определенные вещества – на этом основаны новые, *высокочувствительные методы анализа*, применяемые, в частности, в диагностике. Например, если человек болен, то его иммунная система вырабатывает определенные антитела – с помощью ферментов можно их определить; обнаруживать и самих возбудителей заболевания.
- Ферменты значительно *упрощают анализ крови*: если сегодня для биохимического анализа нужно взять целую пробирку крови, то созданный в самые последние годы иммуноферментный метод позволяет ограничиваться всего одной каплей, чтобы определить содержание около 50 веществ одновременно.
- Иммобилизованные ферменты находят применение и непосредственно как *лекарственные препараты*. Группа ученых под руководством академика Чазова Е.И. создали иммобилизованный ферментный препарат стрептодеказу для растворения тромбов при лечении инфаркта миокарда. После введения данного препарата тромб, если его захватить вовремя, почти бесследно исчезает. Это очень важное и серьезное достижение ферментной технологии.

Иммобилизованные ферменты и лечебное питание.

- Иммобилизованные ферменты успешно используются также и в химических процессах пищевой промышленности, в частности для получения глюкозы из крахмала, для получения глюкозо-фруктозного сиропа, для улучшения качества молока путем удаления из него лактозы и т.п.
- Благодаря ферментным методам начинает стираться грань между привычными пищевыми технологиями и промышленностью тонкого органического синтеза. Так, фирма «Cetus Corporation» в США разработала процесс, в результате которого образуется *фруктоза* (пищевой продукт) и *окиси алкенов* (полупродукт органического синтеза). Для этого глюкозу, полученную из крахмала, окисляют в присутствии иммобилизованного фермента, пиранозо-2-оксидазы до глюкозона, который затем с помощью водорода на палладиевом катализаторе превращают во фруктозу. На первой стадии в качестве побочного продукта образуется перекись водорода, используемая далее для микробиологического окисления этилена или пропилена в соответствующие эпоксиды. Таким образом, в данном технологическом цикле тесно переплетены между собой 3 синтетических метода: ферментативный (первая стадия), химический (вторая стадия) и микробиологический (третья стадия). Именно сочетание разных методов обеспечивает высокую экономичность производства.

- *3.1 Удаление лактозы из молока с помощью иммобилизованных ферментов.*
- Малосладкий дисахарид – лактоза, присутствующий в молоке, легко усваивается детьми, особенно в младенческом возрасте, а вот у взрослых людей иногда наблюдается интолерантность к молоку, что обусловлено отсутствием лактазы в тонком кишечнике. Молочный сахар (лактоза) не расщепляется до глюкозы и галактозы. После потребления молока такие люди страдают расстройствами желудка, вздутием и болями в нижней части живота. До сих пор нет ясности, является ли отсутствие лактазы наследственным. Такое заболевание особенно широко распространено в развивающихся странах, а ведь именно население этих стран особенно нуждается в таком дешевом и одновременно полноценном продукте питания, как молоко. Чтобы у людей с подобными отклонениями молоко усваивалось, оно было ферментативно обработано с помощью иммобилизованной лактазы.
- Итак, проблема была решена, когда молоко стали предварительно обрабатывать иммобилизованной лактазой. Такое лактозное молоко уже получают по соответствующему биотехнологическому процессу.
- В Италии с 1975 г. работает завод по переработке молока с помощью иммобилизованной лактазы в диетическое безлактозное молоко. Ежедневно предприятие выпускает 800 л данного диетического продукта.
- Более того, разрабатывают ферментативный гидролиз лактозы как дополнительный путь получения глюкозы. Дело в том, что при свертывании молока до 75% лактозы остается в сыворотке, которую пропускают через колонну с иммобилизованной лактазой и получают после дополнительной очистки водный раствор смеси глюкозы и галактозы, которую непосредственно можно использовать в пищевой промышленности.

- *3.2 Превращение глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы.*
- Фруктоза слаще глюкозы почти в 2 раза. Фруктоза – это изомер глюкозы. Она имеет ту же самую химическую формулу. Использование фруктозы вместо сахара сулит массу преимуществ. Из-за большей сладости ее можно применять в меньших количествах, что ведет к снижению калорийности продуктов, а это важно для диетологии. Фруктозу в отличие от глюкозы и сахарозы могут потреблять больные диабетом. Дело в том, что пути превращения фруктозы в человеческом организме совершенно иные, нежели глюкоза, и не связаны с наличием инсулина. К тому же фруктоза менее вредна для зубов.
- Не смотря на все эти положительные факторы, фруктозу до последнего времени применяли крайне ограниченно из-за отсутствия разработок ее промышленного производства. Для того чтобы увеличить сладость глюкозы в 2 раза, достаточно было бы ее просто химически превратить во фруктозу, но все попытки осуществить изомеризацию глюкозы во фруктозу химическим путем с помощью промышленных катализаторов окончились неудачей, поскольку при этом неспецифически образовывались темно окрашенные побочные продукты с плохим вкусом. Очистка фруктозы от них была бы слишком дорогой.
- Положение изменилось в 70-х гг., когда в производстве стали применять фермент глюкоизомеразу, который катализирует взаимопревращения глюкозы во фруктозу.

- В 1957 г. была открыта глюкоизомераза – внутриклеточный фермент, выделяемый из различных микроорганизмов.
- В 1960 г. в США запатентован ферментативный процесс превращения глюкозы во фруктозу.
- В 1966 г. японская исследовательская лаборатория фирмы «Шива сити» описала промышленный процесс с использованием растворимой глюкоизомеразы. При промышленной изомеризации глюкозы в качестве конечного продукта получают не одну фруктозу, а смесь глюкозы и фруктозы (сироп), обладающей высокой сахаристостью.
- В 1967 г. американская фирма «Клинтон крон процессинг компани» приступила к производству глюкозо-фруктозного сиропа из глюкозы с помощью растворимой глюкоизомеразы. Но сироп содержал всего 15 % фруктозы. Кроме того, выяснилось, что процесс с участием глюкоизомеразы может быть рентабельным только при многократном использовании дорогостоящего фермента. Глюкоизомераза оказалась идеальным ферментом для иммобилизации: стабильная при высоких температурах, а т.к. субстрат (глюкоза) и продукт реакции (фруктоза) – очень небольшие молекулы, то не возникает проблем с их движением по колонке с иммобилизованным ферментом. Ни глюкоза, ни фруктоза не несут электростатического заряда, поэтому глюкоизомеразу можно было адсорбировать на заряженных группировках целлюлозы.
- В 1968 г. концерн «Клинтон» предложил периодический метод превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованного фермента, при котором выход фруктозы составлял 42 %.
- В 1978 г. начался новый этап в развитии этого производства. Благодаря применению новых способов разделения удалось получить 55 % фруктозного сиропа.
- *Технология превращения глюкозы во фруктозу:*
- В колонку высотой до 5 м загружают иммобилизованный фермент, например, в виде гранул и затем непрерывным потоком пускают водный раствор глюкозы. На выходе получают так называемый глюкозо-фруктозный сироп – довольно концентрированный водный раствор примерно равных количеств глюкозы и фруктозы. Этот сироп можно использовать непосредственно или, отделив фруктозу, а оставшуюся глюкозу вновь подвергнуть изомеризации до смеси фруктозы и глюкозы, и т. д.

Ферментные электроды на основе иммобилизованных

ферментов.

- Иммобилизованные ферменты нашли применение и для аналитических целей в виде ферментных электродов (датчиков или биосенсоров). В любом ферментном электроде обязательно есть собственно электрод, слой иммобилизованного тем или иным способом фермента и, зачастую, диализная полупроницаемая мембрана, предотвращающая диффузию фермента в раствор, но пропускающая низкомолекулярные соединения к поверхности электрода. Достаточно внести электрод в раствор, содержащий специфическое по отношению к ферментному электроду вещество (субстрат), и в приэлектродном слое происходит ферментативная реакция, ее продукты определяют с помощью того или иного электрохимического устройства. Присутствие на электроде фермента-биокатализатора с высокой специфичностью действия – позволяет определять наличие и концентрацию в сложной по составу смеси подчас одного – единственного вещества. В настоящее время с помощью биосенсора можно определить 10 соединений: глюкозу, лактат, этанол, лактозу, галактозу, сахарозу, α -амилазу, α -лизин, мочевую кислоту, холин.
- Иммобилизованные ферменты применяются в автоматическом анализе биологических субстратов и лекарственных веществ. Они являются рабочей частью автоматических проточных анализаторов. Ферментные электроды позволяют проводить непрерывный анализ веществ. На основе проточных анализаторов с иммобилизованными ферментами и ферментных электродов созданы биохимические автоматы, позволяющие в короткие отрезки времени проводить обследование больших контингентов людей. Иммобилизованные ферменты (ферментные электроды) применяют для непрерывного контроля загрязненности окружающей среды токсическими веществами.

- В будущем иммобилизованные ферменты найдут значительно более широкое применение, в составе ферментсодержащих электродов, используемых для мониторинга *in vitro* и *in vivo*. Много подобных систем уже сконструировано, но в клинике пока не применяется.
- Был разработан *электрод с глюкозооксидазой*. В устройстве Апдайка и Хикса глюкозооксидаза нанесена на поверхность обычного платинового электрода. Чем больше кислорода потребляется в реакции:
 - *Глюкоза + Кислород = Глюконовая кислота + Перекись водорода*,
 - тем меньше количество его регистрируется внутренней частью электрода. Недостаток устройства – ненадежность, что не позволяет использовать его как имплантируемый аппарат для постоянной регистрации содержания глюкозы. Эти проблемы связаны с наличием конкурентных отношений между глюкозой и кислородом в жидкостях тела, инактивацией фермента *in vivo*, сложностью калибровки и дрейфом характеристик электрода.
- Ведущиеся исследования позволяют надеяться, что, усовершенствовав такие электроды с ферментами, удастся со временем создать датчик глюкозы для автономно работающего, полностью автоматического и небольшого по размеру протеза поджелудочной железы, нужного для лечения больных диабетом. В этой связи особенно важны последние достижения в области разработки ферментсодержащих электродов. Исследователи, работающие в Крэнфилдском технологическом институте Оксфордского университета и в госпитале Гая в Лондоне, разрабатывают *глюкозный электрод*, в котором для переноса электронов от простетической группы глюкозооксидазы на графитовый электрод используется органический медиатор (например, ферроцен), т.е. процесс идет без участия кислорода, который обычно выступает в роли конечного акцептора электронов.

- Работа этого электрода, таким образом, не связана с кислородом и поэтому он может оказаться полезным при создании имплантируемого, способного работать *in vivo* устройства для больных диабетом.
- По-видимому, основные усилия в ближайшие несколько лет будут направлены на развитие технологии биодатчиков. Ферменты могут оказаться весьма полезными для контроля за концентрацией разнообразных веществ, интересующих клиницистов промежуточных метаболитов, лекарственных препаратов и гормонов.
- Применение перевязочных средств с иммобилизованными ферментами и антибиотиками.
- Для лечения гнойных ран предложено множество различных способов и схем, но до сих пор эта задача остается сложной и не до конца решенной. Большое количество больных с острыми воспалительными заболеваниями, гнойными послеоперационными осложнениями, а также преобладание в ране микрофлоры, малочувствительной или нечувствительной к антибиотикам, заставляют искать новые способы терапии.
- Активное хирургическое лечение гнойных ран не исключает традиционного лечения под повязкой, весьма распространенного в клинической практике. Однако ватно-марлевые перевязочные средства нередко оказываются индифферентными к раневому процессу, а порой и ухудшает его лечение. Ворсистость, высокая степень адгезии к ране, отсутствие дренирующих свойств при сорбции гнойного отделяемого и ряд других параметров не создают благоприятных условий для заживления ран.
- Среди множества методов местного лечения гнойных ран одним из наиболее признанных является *сорбционно-аппликационная терапия*, основанная на очищении инфицированных ран за счет физической сорбции

- С накоплением опыта стали очевидными преимущества *сорбционно-аппликационного метода*: эффективность, доступность, простота, относительная экономичность, возможность влиять на течение раневого процесса дифференциацией сорбентов, отсутствие аллергических и других побочных явлений, что стимулировало развитие исследований в области создания новых видов сорбционных материалов.
- перевязочные средства на основе биологически активных полимерных материалов ознаменовало новую эру в лечении ран. Они позволяют вводить лекарственные средства непосредственно в гнойную рану, а главное - создавать терапевтически эффективную и постоянную их концентрацию в очаге гнойной инфекции.
- Перспективным направлением является *иммобилизация лекарств на матрице*, обеспечивающей пролонгированную подачу препарата при однократном местном применении. Рассмотрим некоторые примеры.
- По мнению И.М. Самодумовой и соавт. (1988 г.), *полиметилсилоксан (ПМС)* по структурно-сорбционным свойствам имеет преимущества перед другими сорбентами и пригоден в качестве матрицы, т.к. обладает высоким сродством к веществам органической природы, и при иммобилизации на нем некоторые вещества проявляют гидрофильные свойства, что активизирует местную детоксикацию пораженных тканей. Недостаток ПМС состоит в том, что при аппликации на рану происходит его высушивание, исчезает влажная микросреда, необходимая для регенераторных процессов. Местное применение иммобилизованных на ПМС антибиотиков, ферментов, анестетиков позволило сократить продолжительность лечения и пребывание в стационаре, как минимум, на 40 – 50 %. Поверхность ожога или трофической язвы становилась пригодной к пластике в 2 раза быстрее, чем при лечении обычными методами, приживаемость лоскутов кожи составила 90 – 98 %. На 2 – 3-и сутки от начала лечения отмечены также резкое уменьшение отечности окружающих тканей, количества раневого отделяемого, длительное и стойкое снижение интенсивности болевого синдрома.

- С целью подавления имеющейся в ране микрофлоры, предупреждения вторичного инфицирования, борьбы с ожоговым шоком и общей интоксикации на всех этапах медицинской эвакуации предложен *углеродминеральный сорбент СУМС – 1*, поглощающий грамположительную и грамотрицательную микрофлору, высоко- и среднемолекулярные токсины, продукты распада микробов и тканей. Адсорбированные на нем фурагин, иодпирин и диоксидин воздействуют на большинство известных микроорганизмов в течение 2 – 3 суток, что важно при транспортировке пострадавших. Аппликационно-сорбционные способы лечения с гнойными ранами мягких тканей и ожогами позволяют в 2 – 4 раза быстрее снизить количество микробов в 1 г тканей и в 3 – 4 раза сократить процент присоединения вторичной инфекции.
- Исследованиями А.Г. Саркисяна и соавт. установлено, что шарики *полиметилметакрилата «Септопал»*, применяемые при лечении гнойных осложнений у травматических и ортопедических больных, высвобождают входящий в его состав гентамицин в таком количестве, которое требуется для подавления местного антибактериального действия.
- В числе биологически активных гидрофильных сорбентов следует отметить *лизосорб*, созданный на основе сшитого поливинилового спирта с иммобилизованным на нем террилитином и антибиотиками неомицином и полимиксином. Ряд публикаций свидетельствуют о высоком лечебном эффекте этого сорбента при лечении гнойно-некротических ран (послеоперационных нагноений, трофических язв и ожогов).

Применение иммобилизованных ферментов в органическом синтезе.

- В настоящее время большое количество зарубежных фирм занимается созданием нового направления биотехнологии, основанной на катализе с применением иммобилизованных ферментов. Среди реализованных процессов можно указать на получение *L-яблочной кислоты* гидратацией фумаровой кислоты с помощью фермента фумаразы и получение *L-аспарагиновой кислоты* из фумарата аммония под действием фермента аспарагиназы. В последнем случае в реакторе объемом 1 м³ ежедневно получают 1700 кг продукта.
- Близок к промышленному воплощению синтез еще одной ценной кислоты, *L-триптофана*, из индола и пирувата аммония.
- Таким образом, ферменты могут использоваться для реализации промышленных процессов получения различных химических продуктов, которые сейчас синтезируют сложными и дорогими химическими способами. Например, синтез окиси пропилена, представляющей собой маленькую молекулу, состоящую из углерода и водорода, в которую определенным образом введен атом кислорода. Данное химически активное соединение широко используется для синтеза эпоксидных смол. Окись пропилена получают сложным химическим путем, который обходится очень дорого, следовательно, это обстоятельство обуславливает и высокую стоимость эпоксидных смол. Но недавно обозначился новый путь получения окиси пропилена – ферментативный, отличающийся высокой эффективностью и дешевизной.

Применение иммобилизованных ферментов в химии полимеров

- .
- Очень важным является налаживание сотрудничества представителей разных специальностей: биотехнологов, биохимиков, а также представителей полимерной химии, т.к. многие применяемые сейчас носители для иммобилизации ферментов были найдены случайно, и не всегда это самые лучшие носители. Необходимо научиться подбирать оптимальные носители для определенной цели, для определенного фермента, создавать такие носители, которые будут служить не просто опорой для фермента, но и могли бы выполнять за него часть его работы, например, концентрировать субстрат в непосредственной близости от его активного центра.

Особенности переработки целлюлозы с помощью иммобилизованных ферментов.

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

Ферментные комбинаты.

- Очень перспективная область ферментной технологии – создание ферментных систем, когда на одном и том же носителе, в непосредственной близости друг от друга, иммобилизуется два или большее количество ферментов, работающих последовательно. При этом можно добиться того, чтобы активные центры ферментов были определенным образом ориентированы относительно друг друга. Таким путем удастся значительно повысить эффективность их работы: образующиеся под действием одного фермента промежуточные продукты в такой системе сразу же поступают на другой фермент, что особенно важно, когда промежуточные продукты неустойчивы и легко разрушаются в окружающей среде: в такой системе они не выходят наружу, а сразу же перерабатываются.
- Усовершенствование методов иммобилизации ферментов позволяет намного увеличить их стабильность. Например, если прикрепить фермент к носителю не в одной точке, а во многих, у него заметно повышается термоустойчивость: так, если обычно фермент не выдерживает увеличение температуры более чем до 65 – 66 °С, то теперь он может работать при 80 °С и более. Таким путем можно сделать ферменты более устойчивыми и к высокому содержанию в среде солей или органических растворителей – последнее особенно важно для увеличения эффективности синтеза пептидов.
- Для работы некоторых ферментов нужны коферменты – небелковые соединения, присутствие которых является обязательным условием активности фермента. Эти вещества имеют сложное строение и получение их дорогостоящий процесс, а добавлять их в реакционную среду приходится в большом избытке. В последнее время разрабатываются методы, позволяющие прикреплять молекулу кофермента непосредственно к молекуле фермента. Больше того, кофермент можно «посадить» на гибкой «ножке» - небольшой линейной молекуле – рядом с активным центром фермента: «ножка» изгибается, кофермент приближается к активному центру, срабатывает там, а потом «ножка» разгибается, кофермент окисляется в среде или на электроде и снова готов к работе. В данном случае кофермента требуется гораздо меньшее количество, т.к. он используется намного эффективнее; к тому же такая система гораздо устойчивее к ингибиторам реакции, поскольку кофактор «сидит» в непосредственной близости от активного центра фермента.

Соиммобилизация.

- Под соиммобилизацией понимают совместную иммобилизацию различных биокатализаторов: двух или более ферментов, видов клеток, ... комбинаций ферментов и другие варианты.
- Иммобилизация нескольких ферментов позволяет осуществить многостадийные процессы *in vitro*. Многостадийные процессы могут осуществлены также с использованием нескольких видов соиммобилизованных клеток, в частности смешанных культур микроорганизмов. Так, трансформация сорбозы в 2-кето-L гулоновую кислоту, легко переводимую в результате химического окисления в аскорбиновую кислоту, происходит при участии соиммобилизованных клеток *Gluconobacter melanogenes* и *Pseudomonas syringia*.
- Большое внимание уделяют соиммобилизации ферментов и клеток. При этом возможны два варианта:
- Клетки имеют ту же каталитическую активность, что и совместно с ней иммобилизованный фермент. Использование такой системы позволяет значительно ускорить реакцию и стабилизировать каталитическую активность.
- Клетки и фермент катализируют разные реакции. В этом случае возможно поэтапное преобразование субстрата в целевой продукт. Примеры соиммобилизованных систем, включающие клетки в изолированные системы представлены в Приложении 2.
- При соиммобилизации биокаталитических систем, в частности клеток с ферментами, встает проблема их функциональной совместимости. Например, попытка превратить крахмал во фруктозу с применением соиммобилизованных глюкоамилазы и бактериальных клеток с глюкоизомеразной активностью по схеме:

Разделение рацематов аминокислот.

- Аминокислоты используют в медицине, сельском хозяйстве, прикладной микробиологии и во многих отраслях науки. Они необходимы как компонент питания при недостаточности какой-либо из природных аминокислот, как составная часть внутреннего питания больных людей, для создания лекарственных и биохимических соединений и т.д. Все аминокислоты усваиваются только в L-форме, а попадание в организм D-формы крайне нежелательно.
- L- и D-формы – это *энантиомеры*, разновидность изомеров, являющихся зеркальными отражениями друг друга. Смесь L- и D-форм в равных количествах называют *рацемической*. Ей присущи все свойства чистого вещества, ибо L- и D-изомеры во всех отношениях идентичны, кроме тех случаев, когда они вступают во взаимодействие с другим асимметрическим объектом.
- Химический синтез всех аминокислот – давно решенная задача. Однако химические методы дают всегда рацемическую смесь аминокислот, и, следовательно, необходима дополнительная стадия разделения энантиомеров. Чисто химически это сделать очень трудно. В то же время ферменты способны «узнавать», а значит и по-разному реагировать на L- и D-формы аминокислот или их производные. Преимущественное расщепление одного из энантиомеров под действием ферментов настолько предпочтительно, что, как правило, они быстро реагируют с L-изомером, совершенно не затрагивая D-изомер. Это обстоятельство, т.е. энантиоселективность, и было положено в основу ферментативного разделения рацемических смесей аминокислот.

- Вероятно, первым реактором, где использовали иммобилизованный фермент в промышленном масштабе, был именно реактор для разделения рацемических смесей D,L-аминокислот, он был введен в эксплуатацию в Японии (1969 г.) на аминоацилазе, иммобилизованной на сефадексе.
- С 1969 г. таким путем осуществляется промышленное производство незаменимых аминокислот: L-метионина, L-фенилаланина, L-валина, L-аланина.
- Промышленный процесс выглядит следующим образом. Исходными веществами служат модифицированные по аминокгруппе D,L-аминокислоты, полученные в результате химического синтеза. На эту смесь воздействуют иммобилизованной **аминоацилазой**. Фермент гидролизует амидную связь только у L-изомера. В результате образуется свободная L-аминокислота, обладающая более высокой растворимостью, чем ацильное производное. Образовавшаяся смесь свободной L-аминокислоты и ацилированной D-аминокислоты разделяют простыми физическими методами, пользуясь их различной растворимостью. Оставшийся после разделения D-изомер обычно при повышенной температуре рацемизируют, т. е. превращают в исходную D,L-смесь и снова пускают в реакцию с ацилазой. В итоге добиваются высокой концентрации L-аминокислоты. Фермент аминоацилаза мало чувствителен к типу аминокислоты, и поэтому одна установка с иммобилизованным ферментом может использоваться для получения разнообразных L-аминокислот.
- Иммобилизацию аминоацилазы проводят адсорбцией на специально подобранном полимерном носителе. Когда ее активность падает, в реактор добавляют, свежую порцию фермента, которая тут же адсорбируется на носителе.

- **Аминоацилаза** строго специфична к структуре только ацильной части субстрата, поэтому одна и та же установка с иммобилизованным ферментом используется для получения различных аминокислот, в том числе L-валина, L-метионина, L-фенилаланина и L-триптофана. Время полуинактивации иммобилизованного энзима составляет 65 суток; на японских предприятиях он используется без замены более 8 лет и обеспечивает снижение стоимости производства аминокислот на 40 % по сравнению с технологией, где применяются свободные молекулы фермента.

- **Получение L-аспарагиновой кислоты.** Аспарагиновая кислота широко употребляется в качестве пищевой добавки (подсластитель и подкислитель). Первая в мире промышленная установка для синтеза L-аспарагиновой кислоты из получаемого химическим путем фумарата аммония была запущена в 1973 г. в Японии (фирма «Танабе Сейяку»); в ней использованы иммобилизованные в полиакриламидном геле клетки кишечной палочки *E. coli*, содержащие аспартат-аммиаклиазу.

Полиакриламидный гель с иммобилизованными микробными клетками формируют в виде кубиков размером 2 - 3 мм, которыми заполняют колонку объемом 1 м³. Через колонку пропускают раствор фумарата аммония. При подкислении выходящего из колонки элюата до рН 2,8 и охлаждении до 15⁰С из него выкристаллизовывается аспарагиновая кислота в виде препарата 100 %-ой чистоты. Процесс получения аспартата полностью автоматизирован и осуществляется в непрерывном режиме.

Производительность процесса - 1700 кг чистой аспарагиновой кислоты в сутки на 1 реактор. Иммобилизованные клетки кишечной палочки сохраняют активность фермента на 80 % в течение 120 дней и на 50 % в течение 600 дней работы реактора, в то время как свободные клетки — всего на протяжении 10 дней с уровнем активности 25 % от исходной. В Армении был налажен промышленный процесс получения аспартата особой степени чистоты с использованием иммобилизованной аспартат-аммиак-лиазы на базе научных разработок химфака МГУ им. М. В. Ломоносова (1974).

- **Получение L-аланина.** В настоящее время основной промышленный способ получения L-аланина - ферментативное декарбоксилирование L-аспарагиновой кислоты:
- Процесс превращения L-аспартата в L-аланин катализируется аспартат- β -декарбоксилазой ряда микроорганизмов (*Pseudomonas dacunhae*, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter pestifier*), иммобилизованных в полиакриламидном геле, каррагинане или полиуретане. Установка, разработанная японской фирмой «Танабе Сейяку», производит этим способом 10 тонн аланина в месяц. Усовершенствование процесса связано с использованием в качестве сырья фумарата аммония. В данном случае процесс получения L-аланина становится двустадийным и реализуется в двух последовательно расположенных реакционных колонках. На первом этапе фумарат аммония превращается в L-аспарагиновую кислоту, которая без выделения из реакционной среды на втором этапе претерпевает β -декарбоксилирование с образованием аланина.

С помощью иммобилизованных клеток *Serratia marcescens* из треонина и глюкозы синтезируют L-изолейцин, а с помощью иммобилизованных клеток *Corynebacterium glutamicum* - L-глутаминовую кислоту из L-глюкозы; L-триптофан - из индола; L-орнитин - из L-аргинина.

Таким образом расширение производства аминокислот стало возможным благодаря изменению технологии получения промышленных биокатализаторов и снижению затрат при их производстве.

Получение глюкозофруктозных

сиропов.

- Фруктоза (фрукто-вый, плодовый или медовый сахар) - важнейший в физиологическом и технологическом отношении природный моносахарид. Превращаясь в печени и кишечнике млекопитающих в глюкозу, фруктоза включается в пластический и энергетический обмен клетки. Она в 2,5 раза слаще глюкозы и в 1,7 раза слаще тростникового сахара (сахароза), благодаря чему фруктоза - менее калорийный пищевой продукт по сравнению с последними. В отличие от глюкозы обмен фруктозы не контролируется инсулином, поэтому фруктозный сахар может потребляться больными диабетом. Фруктоза практически не вызывает кариеса зубов. В смеси с глюкозой фруктоза не кристаллизуется, поэтому широко используется для производства кондитерских изделий.

Объем производства сахарозы за последние 100 лет возрос в 15 раз и составляет, по разным оценкам, 30 - 40 кг в год на человека. Однако, несмотря на явные преимущества использования фруктозы, первая промышленная установка для превращения глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованной глюкоизомеразы была запущена лишь в 1973 г. (компания «Клинтон Корн», США). Исходным сырьем для этого процесса служит глюкоза, которую получают при гидролизе кукурузного или картофельного крахмала в присутствии минеральных кислот. Для конструирования промышленного биокатализатора глюкоизомеразу сорбируют на пористых неорганических носителях или ионообменных смолах. Во многих случаях используют иммобилизованные клетки разного происхождения (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Streptomyces phaeochromogenes*, *S. olivaceus*, *S. venezuelae*).

- Коммерческие препараты иммобилизованной глюкоизомеразы имеют вид гранул, шариков, волокон или аморфной массы. Наиболее эффективными биореакторами для получения фруктозы признаны аппараты колонного типа высотой около 5 м, в которых по сравнению с реакторами перемешивания расход фермента минимален. Производительность такого реактора варьирует от 600 до 9000 кг глюкозофруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента в зависимости от чистоты исходного сырья, а время полуинактивации катализатора - 20 - 50 суток. Возникающий в результате каталитического процесса глюкозофруктозный сироп содержит 42 —45 % фруктозы, около 51 % глюкозы, небольшое количество олигосахаридов и по сладости соответствует инвертному сахару, получаемому при гидролизе сахарозы. Эти смеси постепенно вытесняют инвертированный сахар в промышленности и медицине. Глюкозофруктозную смесь широко применяют для производства тонизирующих напитков, консервированных фруктов, кондитерских изделий, хлеба, мороженого и пр. Экономические расчеты показали, что производство глюкозофруктозных сиропов с использованием иммобилизованной глюкоизомеразы в 1,5 раза выгоднее получения сахарозы из сахарной свеклы по традиционной технологии. Благодаря этому обстоятельству производство глюкозофруктозных сиропов в мире постоянно растет. Так, в 1980 г. 10 % потребляемого населением Японии сахара заменено на глюкозофруктозную смесь. В США эта доля к 2000 г. достигла уже 40%.

• Биотрансформация других углеводов.

Кроме изомеризации углеводов, важную роль также играют процессы микробиологической окислительной и восстановительной трансформации углеводов. Окислительная трансформация представляет собой окисление полиолов, например, маннита во фруктозу или сорбита в сорбозу. Окислению подвергаются все полиолы (полиспирты), обладающие двумя вторичными гидроксильными группами в цис-положении, прилежащими к терминальной первичной спиртовой группе, причем окисляется атом углерода, смежный с терминальным. Окисление полиолов получило название кетогенной ферментации.

В промышленном масштабе (при использовании свободных клеток) применяются два процесса окисления полиолов: превращение глицерина в диоксиацетон и превращение D-сорбита в L-сорбозу (одна из стадий синтеза аскорбиновой кислоты).

Диоксиацетон (1,3-дигидрокси-2-пропанон) используется для обработки изделий из целлюлозных волокон для придания им несминаемости, устойчивости к стирке и прочих важных эксплуатационных свойств; сложные эфиры диоксиацетона являются репеллентами; из диоксиацетона и аминокислот синтезируют пищевые и косметические красители; производные диоксиацетона применяют как консерванты, эмульгаторы, пластификаторы, фунгициды; наконец, диоксиацетон широко используют в медицине.

- Для промышленного производства диоксиацетона применяется культура [^] **Acetobacter suboxydans** (НПО "Биолар"). Известны лабораторные методы реализации процесса с помощью иммобилизованных клеток, когда иммобилизацию проводят в ПААГ или Са-альгинате.

Окисление D-сорбита в L-сорбозу в промышленных условиях также осуществляют с помощью клеток [^] **A. suboxydans** или **G. suboxydans**. L-сорбозу получают с 93%-ным выходом из 15-20 %-ных растворов D-сорбита в аэробных условиях.

В лабораторных условиях окисление D-сорбита в L-сорбозу проводят с помощью бактерий, иммобилизованных включением в каррагинановый гель, а также в ПААГ. Осуществлено также окисление иммобилизованными клетками рибита и маннита в соответствующие кетоны. Следует, однако, отметить существенное снижение скорости окислительных процессов при использовании иммобилизованных в гель клеток по сравнению со свободными.

Восстановительная трансформация углеводов заключается в превращении альдоз или кетоз в полиолы. Промышленно значимым является процесс получения ксилита из ксилозы, поскольку ксилит используется в пищевой промышленности и служит заменителем сахара. Для восстановления

- Еще один класс реакций, касающийся углеводов и приводящий к получению полезных продуктов, представляют гидролитические реакции. Важную роль играют следующие процессы: гидролиз лактозы, сахарозы, раффинозы и целлобиозы.

Гидролиз лактозы с получением глюкозы и галактозы и гидролиз сахарозы с получением глюкозы и фруктозы являются хорошими примерами биотехнологических процессов, основанных на использовании иммобилизованных биокатализаторов, внедренных в широком масштабе. Лактоза содержится в молоке и молочной сыворотке, причем определенная часть населения не может употреблять молоко именно из-за наличия в нем лактозы, но усваивает (без аллергических эффектов) безлактозное молоко. Гидролиз же лактозы в молочной сыворотке, содержащей около 5% лактозы в жидкой и около 75% в высушенной сыворотке, открывает новые возможности получения сахаристых веществ из нетрадиционного сырья.

- Инвертный сахар (почти эквивалентную смесь глюкозы и фруктозы) получают из сахарозы с помощью иммобилизованного фермента инвертазы на уровне пилотных установок в РФ и США (компания Snam Progesty). В настоящее время существуют лабораторные разработки по получению биокатализаторов в виде иммобилизованных в ПААГ, или желатине дрожжей (*S.cerevisiae*), не уступающие по эффективности иммобилизованным ферментам.
- Раффиноза, или галактозилсахароза, является наиболее распространенным после сахарозы олигосахаридом, встречающимся в свободном виде в сахарной свекле и других растениях (при ферментативном гидролизе раффинозы образуется галактоза и сахароза). Американская компания Great Western Sugar использовала в технологии иммобилизованный биокатализатор, представляющий собой клетки *Vortierella vinacea*, сшитые глутаровым альдегидом, обладающие α -галактозидазной активностью.

Гидролиз целлобиозы осуществлен иммобилизованными в Са-альгинате микроорганизмами с целлобиазной активностью. Этот биокатализатор может быть использован, например, при реализации процессов ферментативного осахаривания целлюлозы, когда гидролизат содержит целлобиозу.