

**Технология ферментационных
процессов.
Иммобилизованные ферменты.
Иммобилизованные клетки в
биотехнологии.**

Лекция № 9



Под **иммобилизацией** понимают такую процедуру, в результате которой молекула фермента тем или иным способом прикрепляется к определенным объектам (носителей), нерастворимых в воде. Эти объекты вместе с ферментом легко отделяются от раствора после завершения реакции. Химическое «пришивание» фермента к носителю закрепляет конформацию фермента, и является причиной повышения устойчивости и снижения лабильности.





Первым иммобилизованным ферментом, примененным в промышленном масштабе, была **аминоацилаза**. Она была использована в Японии в 1969 г. для производства аминокислот, добавляемых в корм животных. На мировом рынке эта продукция пользуется большим спросом.

Преимущества использования иммобилизованных ферментов:

1. Чистые препараты ферментов неустойчивы при длительном хранении.
2. Многократное использование ферментов затруднено в промышленных условиях, т.к. их сложно отделить от реагентов.



Иммобилизованный (гетерогенный)

катализатор легко отделить от реакционной среды. Это обуславливает:

1) возможность остановки реакции в любой нужный момент:

2) повторное использование катализатора;

3) получение конечного продукта, не загрязнённого ферментом.





Иммобилизация фермента даёт возможность регулировать их каталитическую активность за счёт **изменения свойств носителя.**

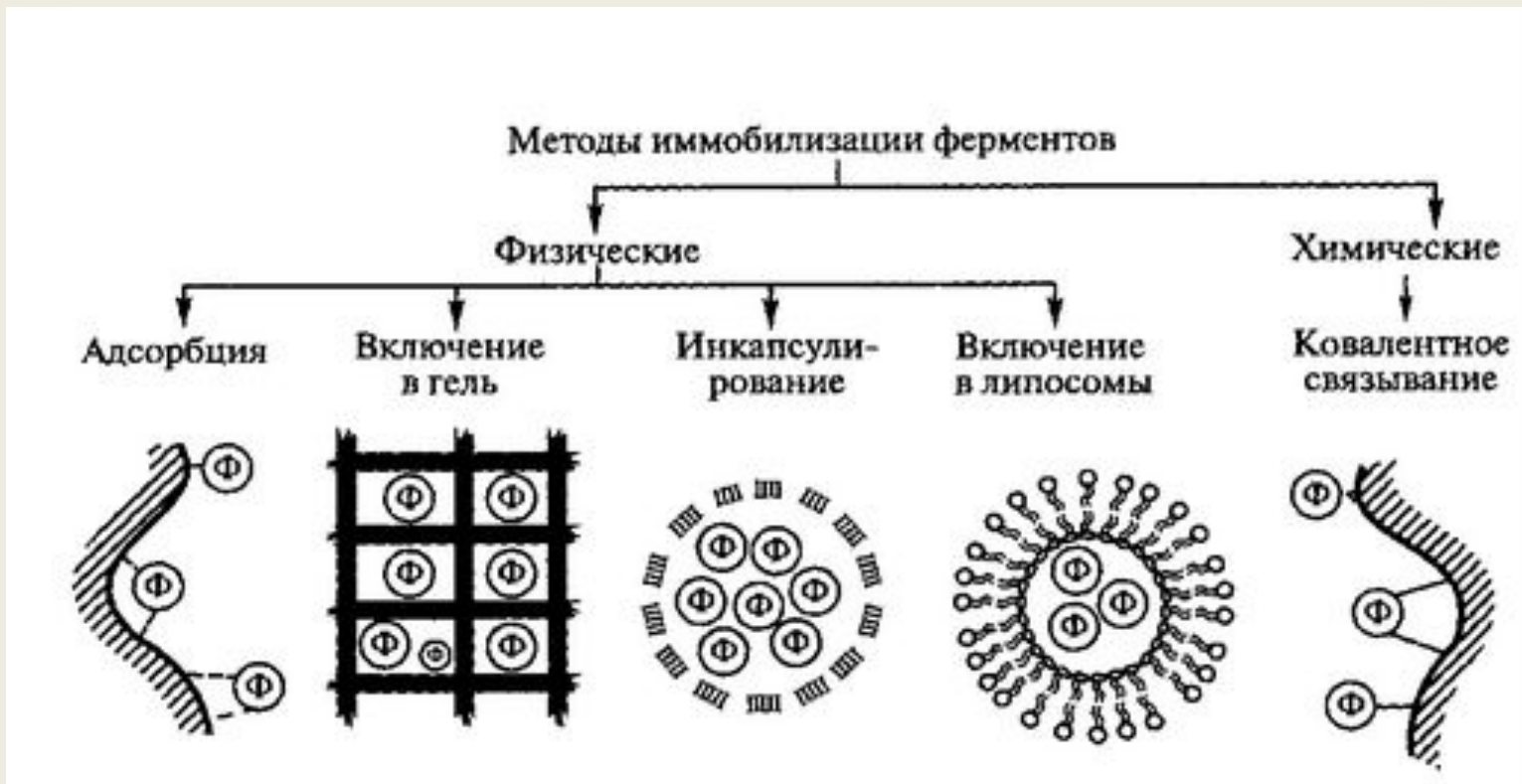
Иммобилизация представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной оказывается лишь ограниченная часть общего объёма.

Все существующие методы физической иммобилизации (т.е. иммобилизации, при которой фермент не соединяется с носителем ковалентными связями, могут быть подразделены на четыре группы:



- 1) адсорбция на поверхности нерастворимого носителя;
- 2) включение в поры геля;
- 3) пространственное разделение фермента от остальной части с помощью полупроницаемой мембраны;
- 4) введение фермента в двухфазную реакцию среду, в которой он растворим, но может находиться только в одной из фаз.





Основные требования, которым должны соответствовать носители:

- Высокая химическая и биологическая стойкость;
- Высокая механическая прочность;
- Достаточная проницаемость для фермента и субстратов;
- Высокая пористость;
- Возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран, труб, листов и т.д.);





- Легкое перевода в реакционно-способную форму (активация):
- Высокая гидрофильность, которая обеспечивает возможность проведения реакции связывания фермента с носителем в водной среде;
- Невысокая стоимость.

В зависимости от природы **носители** делятся на:

1. **Органические материалы;**
2. **Неорганические материалы.**

Органические полимерные носители можно разделить на **2 класса**:

- а) **природные;**
- б) **синтетические.**

В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется **на группы** в зависимости от их строения. Среди **природных** полимеров выделяют: **белковые;** **полисахаридные;** **липидные** носители, а среди **синтетических**: **полиметиленовые;** **полиамидные;** **полиэфирные** носители.



К преимуществам природных носителей следует отнести:

1. Доступность;
2. Полифункциональность;
3. Гидрофильность,

а к недостаткам – высокую стоимость.

Из *полисахаридов* для иммобилизации наиболее часто используют: **целлюлозу, декстран, агарозу** и их производные. Для придания химической устойчивости их линейные цепи поперечно сшивают **эпихлоргидрином**. В полученные сетчатые структуры легко вводят различные ионогенные группировки.



Из **природных** аминосахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют **хитин**, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки **крабов и креветок**. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру. Среди **белков** практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие как: **кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена – желатин**.



Синтетические полимерные носители
включают **полимеры** на основе **стирола**,
акриловой кислоты, **поливинилового спирта**,
полиамидные и **полиуретановые** поли меры.

Их преимущество:

1. Механическая прочность;
2. Возможность варьирования в широких пределах величины пор и введения различных функциональных групп.

Синтетические полимеры воспроизведены в таких изделиях, как трубы, волокна, гранулы. Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.



Носители неорганической природы

представляют собой материалы изготовленные из **стекла, глины, керамики, графитовой сажи**, а также оксиды металлов. Их можно подвергать химической модификации, для чего носители покрывают плёнкой оксидов алюминия, титана, циркония. Или обрабатывают органическими полимерами.

Преимущество неорганических носителей:
лёгкость регенерации.

Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.



При адсорбционной иммобилизации белковая молекула удерживается на поверхности носителя за счёт **электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей.**



Эффективность адсорбции молекулы белка на носителе определяется пористостью носителя. Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается крайней простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем при перемешивании. С этой целью раствор фермента смешивают со свежим осадком, например, гидроксида титана, и высушивают в мягких условиях.



Иммобилизация ферментов путём включения в гель.

Способ иммобилизации ферментов путём включения в трёхмерную структуру полимерного геля широко распространён благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но даже отдельных клеток.

иммобилизацию ферментов в геле осуществляют **двумя способами:**



1. Фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включёнными в его ячейки молекулами фермента.

2. Фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние.

Для первого варианта используют гели: полиакриламида, поливинилового спирта, силикагеля. Для второго: гели крахмала, агар-агара, агарозы, фосфата кальция.



Метод инкапсулирования разработан в 1974 г. и состоит в том, что водный раствор фермента включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером. Один из механизмов возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул фермента заключается в реакции межфазной поликонсистенции двух соединений, одно из которых растворено с водой, а другое – в органической фазе.

Размер получаемых капсул составляет сотни микрометров, а толщина мембраны - сотые доли микрометра.



Метод включения водных растворов ферментов в липосомы

Впервые данный метод был применён для иммобилизации ферментов **Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 году.**

Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 году.

Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель.



Оставшуюся тонкую плёнку липидов выдерживают в водном растворе, содержащем фермент. В процессе выдержки происходит самосборка липидных структур липосомы, содержащих данный раствор фермента. Ферменты, иммобилизованные путём включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и биотехнологических целях.



Химические методы иммобилизации ферментов.

Представляют иммобилизацию ферментов путём образования **новых ковалентных связей между ферментом и носителем** – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов. В *отличие* от физических вариантов, эти методы иммобилизации обеспечивают прочную и необратимую связь фермента с носителем и сопровождаются *стабилизацией* молекулы энзима.





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!