БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Биологический факультет

Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

СОГЛАСОВАНО
Председатель учебно-методической
комиссии биологического факультета
Поликсенова В.Д.

«26» ноября 2014 г.

СОГЛАСОВАНО
Декан
биологического факультета
Лысак В.В.

«26» ноября 2014 г.

Регистрационный номер № УД-275

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИЙ КОМПЛЕКС ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

Иммобилизованные клетки и ферменты

для специальностей
1-31 01 01 Биология (по направлениям)
направлений
1-31 01 01-01 Биология (научно-производственная деятельность) и
1-31 01 01-03 Биология (биотехнология);
1-31 01 02 Биохимия

Составители: докт. биол. наук, профессор Юрин В.М.
канд. биол. наук, доцент Дитченко Т.И.

Рассмотрено и утверждено
на заседании
Научно-методического совета БГУ

«27» ноября 2014 г.

протокол № 2

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Кафедра биотехнологии и биоэкологии Учреждения образования «Белорусский государственный технологический университет»;

Т.И. Фоменко, заведующая лабораторией клеточной биотехнологии ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», кандидат биологических наук

СОДЕРЖАНИЕ

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА 4

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ 6

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ 125

3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ 130

Задания для самоконтроля 130

Вопросы для подготовки к зачету 133

Темы рефератов 135

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ 137

Учебно-программные материалы 137

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов 137

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА

Учебно-методический комплекс (УМК) по учебной дисциплине «Иммобилизованные клетки и ферменты» создан в соответствии с требованиями Положения об учебно-методическом комплексе на уровне высшего образования и предназначен для студентов направлений специальности 1-31 01 01-01 Биология (научно-производственная деятельность), 1-31 01 01-03 Биология (биотехнология) и специальности 1-31 01 02 Биохимия. Содержание разделов УМК соответствует образовательным стандартам высшего образования данных специальностей. Главная цель УМК – оказание методической помощи студентам в систематизации учебного материала в процессе подготовки к итоговой аттестации по учебной дисциплине «Иммобилизованные клетки и ферменты».

Структура УМК включает:

1. Учебно-методическое обеспечение дисциплины

1.1. Теоретический раздел (учебное издание для теоретического изучения учебной дисциплины).

1.2. Практический раздел (материалы для проведения лабораторных занятий по учебной дисциплине в соответствии с учебным планом).

2. Контроль самостоятельной работы студентов (материалы текущей и итоговой аттестации, позволяющие определить соответствие учебной деятельности обучающихся требованиям образовательных стандартов высшего образования и учебно-программной документации, в т.ч. вопросы для подготовки к зачету, задания, тесты, вопросы для самоконтроля, тематика рефератов и др.).

3. Вспомогательный раздел.

3.1. Учебно-программные материалы (типовая учебная программа, учебные программы учреждения высшего образования для студентов дневной и заочной форм получения образования).

3.2. Информационно-аналитические материалы (список рекомендуемой литературы, перечень электронных образовательных ресурсов и их адреса и др.).

Работа с УМК должна включать ознакомление с тематическим планом дисциплины, представленным в типовой учебной программе. С помощью учебной программы учреждения высшего образования по учебной дисциплине можно получить информацию о тематике лекций и лабораторных занятий, перечнях рассматриваемых вопросов и рекомендуемой для их изучения литературы. Для подготовки к лабораторным занятиям и промежуточным зачетам необходимо использовать материалы, представленные в разделе учебно-методическое обеспечение дисципли-

ны, а также материалы для текущего контроля самостоятельной работы. Для написания рефератов могут быть использованы информационно-аналитические материалы, указанные в соответствующем разделе УМК.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

1. *Юрин, В. М.* Иммобилизованные клетки и ферменты: курс лекций / В.М. Юрин. Минск: БГУ, 2006.

2. Краткие презентации лекций по учебной дисциплине для студентов дневной и заочной форм получения образования доступны по адресу http://bio.bsu.by/fbr/kursy_immobilization.html

ВВЕДЕНИЕ

Много тысяч лет человек умеет выпекать хлеб, делать вино, дубить кожу и т. д. Он научился этим необходимым операциям, не вникая в суть происходящих биологических процессов. Однако понимание клеточного метаболизма и каталитических свойств ферментов позволяют человеку более полно использовать возможности клеток и ферментов для бытовых промышленных, медицинских и др. целей.

Почему иммобилизация? Во многих случаях разработка практических методов, включающих в качестве компонента биологический элемент, зависит от способности стабилизировать или сохранить этот биологический элемент, будь то большая молекула или частица. В последние годы набор способов сохранения активности биологических объектов значительно расширился, в разработке этих способов иммобилизация играет все большую роль. Иммобилизация – это процесс фиксации биообъекта с помощью физико-химических сил на носителе.

Иммобилизация входит в дисциплину, носящую название «биотехнология». Этот раздел науки, основываясь на последних достижениях в области микробиологии, биохимии, физиологии и молекулярной генетики, одной из своих целей ставит использование процессов, протекающих под действием ферментов, для получения необходимых человеку продуктов. Высокая специфичность ферментативного катализа обеспечивает большой выход продукта и позволяет создать практически безотходные производства. Эффективность ферментативных процессов, используемых в самых разных областях человеческой деятельности (медицина, энергетика, пищевая промышленность, микроэлектроника), удалось увеличить с помощью иммобилизованных препаратов. Иммобилизованные ферменты и др. биопрепараты оказываются более стабильными и могут использоваться неоднократно.

Однако нужно отметить, что применение иммобилизованных препаратов индивидуальных ферментов оказалось менее успешным, чем надеялись. В качестве недостатков следует назвать нестабильность фер-

мента в процессе работы и способность катализировать одну единственную реакцию. Кроме того, для практических целей могут использоваться те ферменты, которые не требуют регенерации кофакторов. Один из недостатков попытались решить методом микрокапсулирования (инкапсулирование). Микрокапсулирование это удержание (иммобилизация) исходного раствора, содержащего фермент или другие биопрепараты, а не создание физико-химических сил, необходимых для иммобилизации. В этом случае иммобилизуется целиком исходный раствор, а не отдельные молекулы, скажем фермента. При микрокапсулировании используют мембраны, подобные мембранам природных клеток. С помощью мембран осуществляется контроль размеров молекул, проникающих внутрь капсулы или выходящих из нее. Большие молекулы, также как ферменты или белки, удерживаются внутри микрокапсулы, тогда как малые молекулы субстрата и продукта могут свободно диффундировать через окружающую оболочку. Одним из преимуществ микрокапсулирования перед равномерным включением фермента является большая площадь поверхности, приходящая на единицу активности иммобилизованного фермента, что позволяет использовать высокие концентрации фермента в исходном растворе и достигать высокой эффективности действия иммобилизованного фермента. Микрокапсулированию можно подвергать и отдельные биомолекулы и клетки.

Микрокапсулирование сейчас успешно используется при создании коммерческих препаратов, внутреннее содержимое которых составляют масло, духи, лекарственные средства и т. д.

Вообще же недостатки, характерные для процесса иммобилизации ферментов, способствовали развитию интереса к использованию потенциальных возможностей клеточного метаболизма, т. е. использованию целых клеток. Действительно, многие примеры иммобилизованных клеток можно найти в природе и впервые их применили в технологическом процессе более 150 лет назад (быстрый способ получения уксуса).

Использование иммобилизованных клеток позволяет избежать необходимость выделения и очистки требуемых ферментов.

Поскольку клетки микроорганизмов являются поистине бесконечным источником самых разнообразных ферментов, естественно, что в первую очередь именно они были использованы для иммобилизации. Живая клетка, в отличие от фермента представляет собой готовый биотехнологический реактор, в котором реализуются не только процессы, приводящие к образованию конечного продукта, но и ряд других, способствующих поддержанию каталитической эффективности системы на высоком уровне (например, регенерация кофакторов).

Существует, по меньшей мере, четыре области, в которых находят применение иммобилизованные ферменты и клетки, а именно: промышленность, охрана окружающей среды, различного рода анализы и производство лекарственных препаратов.

Примерами первой области являются синтез аминокислот, производство сахарных сиропов, молочных продуктов и т. д. В системе охраны окружающей среды иммобилизованные препараты применяются для очистки сточных вод и гидролиза городских, промышленных и с/х стоков, содержащих целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. При этих процессах утилизируется энергия в форме метана или этанола, т. е. очевидны социальные и экономические выгоды. Примеры производства лекарств – синтез антибиотиков, алкалоидов и т. д. Препараты микрокапсулированных ферментов испытаны при лечении больных с генетическими нарушениями, у которых отсутствуют соответствующие ферменты. Такие препараты могут применяться для улучшения пищеварения, удаления токсических метаболитов, предотвращение роста опухолей.

Иммобилизованные ферменты могут быть использованы для анализа, в частности применяются ферментные электроды, например для регистрации концентрации глюкозы или мочевины в биологических или других жидкостях. Кроме того, можно надеяться, что помимо практического применения изучение включенных в носитель или инкапсулированных ферментов и клеток будет способствовать лучшему пониманию их функционирования in vivo.

Исследования в области иммобилизации ферментов и клеток чрезвычайно важны и, по-видимому, сохранят свое значение в обозримом будущем. Развитие инженерной энзимологии и способов модификации клеток будет зависеть от результатов этих исследований все в большей степени.

Глава 1. ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ИММОБИЛЛИЗАЦИИ И ХАРАКТЕРИСТИКА НОСИТЕЛЕЙ

Иммобилизацию можно рассматривать как физическое разделение биокатализатора (клеток, клеточных фракций или ферментов) и растворителя, при котором молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между фазами. Разделение катализатора и растворителя может быть достигнуто либо адсорбционным, либо ковалентным связыванием с нерастворимым органическим или неорганическим носителем, либо связыванием отдельных молекул катализатора друг с другом с образованием агрегатов или сополимеров. Недостатком этих методов иммобилизации является необходимость использования большого количества катализаторов. Кроме того, химическая модификация, которой подвергаются препараты (ферменты, клетки) в процессе иммобилизации, может нежелательным образом изменить их каталитические и другие свойства. По этой причине многие исследователи предпочитают отделение клеток или ферментов от остального объема и включение в носитель или инкапсулирование.

Таким образом, катализатор можно включить в полимерную сетку, например полиакриламидного геля или геля альгината кальция, путем проведения полимеризации или реакции полярного сшивания геля в присутствии ферментов или клеток.

Родственными методами являются либо инкапсулирование в липосомы, нейлоновые или коллодиевые мембраны, либо их физическое отграничение от других компонентов в аппаратах для ультрафильтрации. Для облегчения работы с частицами, содержащими биокатализатор, им придают по возможности сферическую форму.

При одностадийной катализируемой реакции иммобилизуют или подходящий фермент, или жизнеспособные клетки, обладающие необходимой активностью. В первом случае, чтобы увеличить степень включения и свести к минимуму утечку фермента, требуется высокая степень сшивки носителя. Однако при высокой степени сшивки может ограничиться диффузия молекул субстрата и продукта внутрь частиц носителя и из них наружу. Эта проблема исчезает в случае иммобилизации клеток. Поскольку размеры клеток относительно велики, то можно использовать носители с низкой степенью сшивки и, следовательно, с хорошими диффузионными свойствами.

Для катализа многостадийных реакций, например превращение глюкозы в этанол, где регенерация и удержание кофакторов является обязательным условием, необходимо особое внимание уделять влиянию

сшивающих агентов на жизнеспособность клеток. Нужно также иметь ввиду и подачу и отвод необходимого для данных клеток количества газов (кислорода, CO_2). Таким образом, включение живых клеток требует мягких условий иммобилизации; носитель при этом должен представлять систему открытых пор, обеспечивающих хорошие условия для газообмена. К сожалению, частицы носителя, полученные с учетом этих требований, обладают низкой прочностью. Этот фактор особенно важен при увеличении масштабов процесса.

Для получения иммобилизованных ферментов и клеток используется огромное число носителей.

Основные требования, предъявляемые к материалам, которые могут быть применены в качестве носителя для иммобилизации: высокая механическая, химическая и биологическая устойчивость (стойкость), обеспечивающая стабильность получаемых иммобилизованных препаратов; возможность получения технологически удобных форм (гранул, мембран, листов и т. д.); носитель не должен затрагивать активность фермента или ферментативные системы клетки при реализации конкретной технологии, необходимо исключить нежелательные воздействия носителя (токсичность, температура, стресс и т. д.); надежное удержание фермента и клетки носителем; материал носителя не должен препятствовать обеспечению иммобилизованного препарата субстратами, газообмену и отводу продуктов жизнедеятельности; высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность реакций в водной среде; дешевизна носителя и простота иммобилизации, т. е. экономическая оправданность.

Выполнить все требования невозможно, поэтому необходимо находить компромисс между «идеальным» и «реально возможным». Для приближения к оптимальному варианту необходима разработка научно-обоснованных подходов для выбора путей иммобилизации. Выбор путей иммобилизации и материала носителя на эмпирической основе – это надежда на случайную удачу, требующую больших затрат труда, времени и веществ.

Поэтому необходимо в этом направлении проведение фундаментальных исследований.

Отсутствие носителей, удовлетворяющих одновременно всем требованиям, и разнообразие задач, стоящих перед экспериментаторами, обуславливают широкий набор применяемых для иммобилизации материалов. Для иммобилизации используются как органические, так и неорганические материалы.

Существующие в настоящее время органические полимерные носители можно разделить на два класса: природные полимеры и синтетиче-

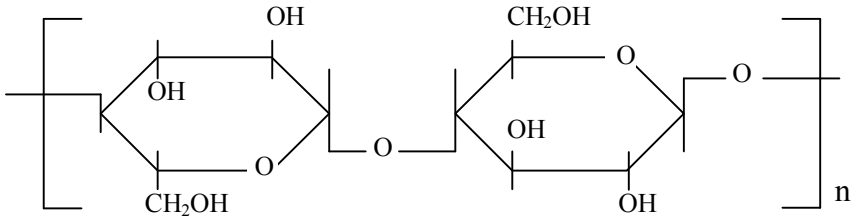
ские полимерные носители. В свою очередь класс природных полимеров можно подразделить на группы в соответствии с их биохимической классификацией: полисахаридные, белковые и липидные. Синтетические полимеры также могут быть подразделены на группы, например, в соответствии с химическим строением основной цепи макромолекул: полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные носители.

Рассмотрим основные классы полимерных носителей.

Природные носители. Большое значение природных полимеров в качестве носителей для иммобилизации объясняется их доступностью и наличием реакционноспособных функциональных групп (в исходном или модифицированном препарате), легко вступающих в различные химические реакции, а также высокой гидрофильностью. К недостаткам можно отнести неустойчивость к воздействию микроорганизмов, относительно высокую стоимость многих из них.

Полисахариды. Наиболее часто для иммобилизации используют целлюлозу, декстран, агарозу и их производные.

Целлюлоза, представляет собой, поли-1,4-β-D-глюкопиранозил-D-глюкопиранозу:



Целлюлоза отличается высокой степенью гидрофильности, а наличие большого количества гидроксильных групп дает возможность ее легко модифицировать путем введения различных заместителей.

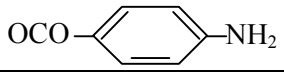
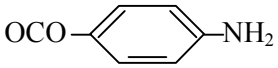
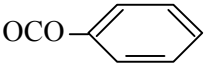
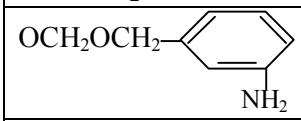
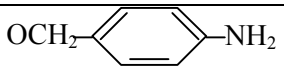
Препараты целлюлозы для придания им химической устойчивости «сшивают» эпихлоргидрином. Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются ее аморфные участки. На их место для сохранения прочности между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированная целлюлоза благодаря простоте получения, сравнительно низкой стоимости относится к удобным носителям для иммобилизации ферментов.

К недостаткам целлюлозы как носителя можно отнести ее неустойчивость к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей.

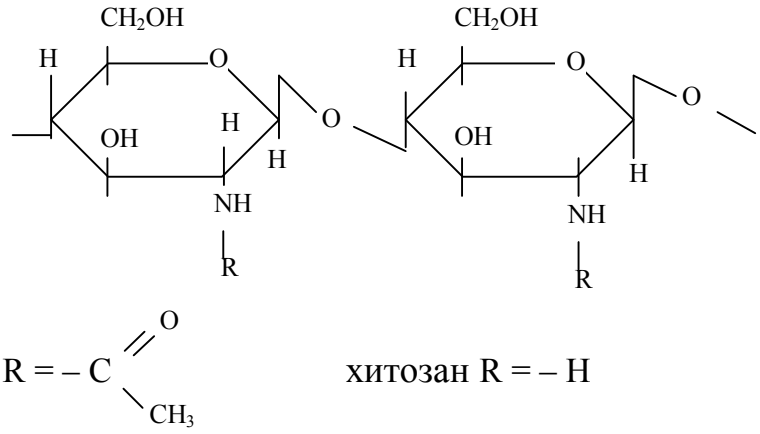
Гранулированную целлюлозу довольно легко превращают в различные ионообменные производные, которые имеют промышленное значение (табл. 1.1).

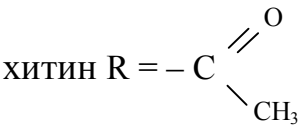
Таблица 1.1

Целлюлоза и некоторые ее производные

Заместитель по ОН–группе	Название препарата	Фирма
–	Целлюлоза	«Whatman» (Англия)
$O(CH_2)_2NH_2$	Аминоэтилцеллюлоза	То же
OPO_3H	Фосфорилцеллюлоза (Р-10)	То же
–	Целлюлоза	«Sigma» (США)
–	Целлюлоза	«Bio-Rad-Labs» (США)
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Диэтиламиноэтилцеллюлоза	То же
OCH_2COOH	Карбоксиметилцеллюлоза	То же
$O(CH_2)_2NH_2$	Аминоэтилцеллюлоза	То же
	n-Аминобензоилцеллюлоза	То же
	*n*-Аминобензоилцеллюлоза	«Serva» (Германия) «Reanal» (Веррия)
$OCOCH_2Br$	Бромацетилцеллюлоза	То же
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$ 	Бензоилдиэтиламиноэтил-целлюлоза	То же
$OCH_2CONHNH_2$	Гидразидкарбоксиметил-целлюлоза	«Miles Labs» (Англия)
$OCOCH_2Br$	Бромацетилцеллюлоза	То же
	*м*-Аминобензилоксиметил-целлюлоза	То же
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	ДЭАЭ-целлюлоза	НПО «Биохимреактив»
OCH_2COOH	КМ-целлюлоза	То же
	*n*-Аминобензилцеллюлоза	То же
$O(CH_2)_2SO_3H$	Триэтиламмонийэтилцел-люлоза	То же
$O(CH_2)_2\overset{+}{N}(C_2H_5)_3$	Сульфоэтилцеллюлоза	То же

К природным аминополисахаридам относится *хитин.* Его можно рассматривать как целлюлозу, в которой CH_2OH-группа заменена ацетамидным остатком:





хитозан R = – H

Хитин – основной компонент наружного скелета ракообразных, насекомых, а также клеточных оболочек некоторых грибов. Это соединение является отходом промышленной переработки креветок и крабов, поэтому доступно в больших количествах при относительно низкой стоимости.

Хитин обладает пористой структурой, не растворяется в воде, разбавленных кислотах и щелочах, а также в органических растворителях. Для переведения в реакционноспособную форму он может быть модифицирован глутаровым альдегидом, а также солями тяжелых металлов.

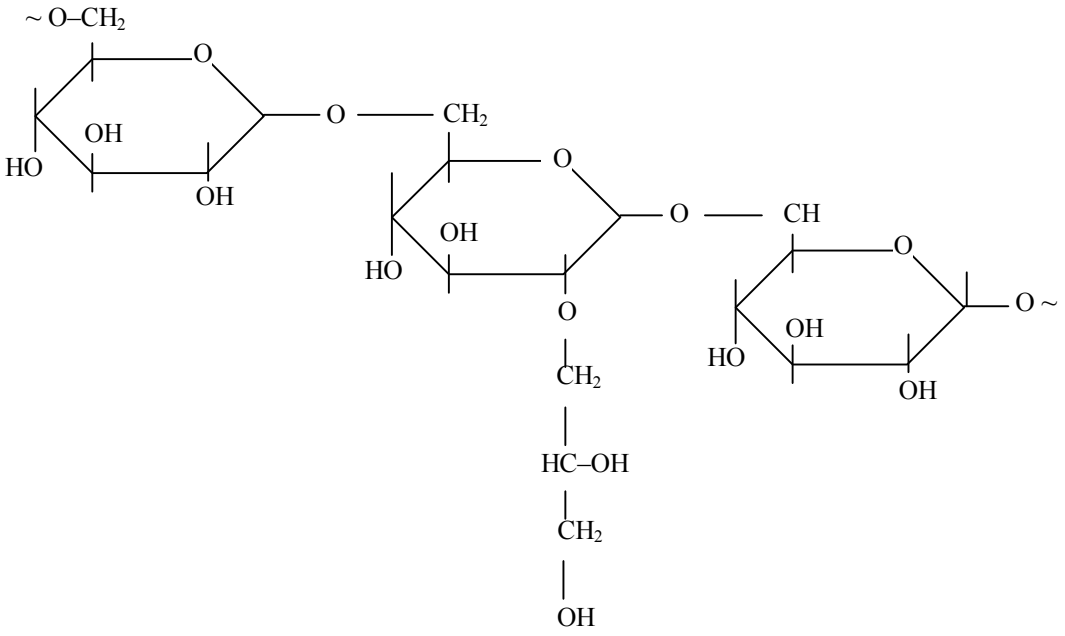
Обработка хитина концентрированными растворами щелочей (деацилирование) приводит к образованию *хитозана.*

Хитозан имеет свободные аминогруппы, поэтому может использоваться для ковалентной иммобилизации с помощью бифункциональных реагентов: диальдегиды, диизоцианаты.

В отличие от хитина хитозан растворяется в минеральных и органических кислотах, поэтому для иммобилизации он часто применяется в виде растворов (pH 3–7).

Полученные препараты иммобилизованных ферментов и других биобъектов на основе хитозана обладают высокой каталитической активностью и устойчивостью к микробному воздействию; наблюдается и повышение термостабильности белков, иммобилизованных на хитозане.

Декстран-поли-1,6-α-D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза – разветвленный полисахарид из бактериальных источников, содержащий остатки глюкозы, связанные, в основном, 1,6-глюкозидными связями (а также 1,2-, 1,3- и 1,4- связями):



Фирмы «Pharmacia» и «Renal» выпускают ряд производных декстрана, содержащих различные функциональные группы (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Коммерческие препараты производных декстрана

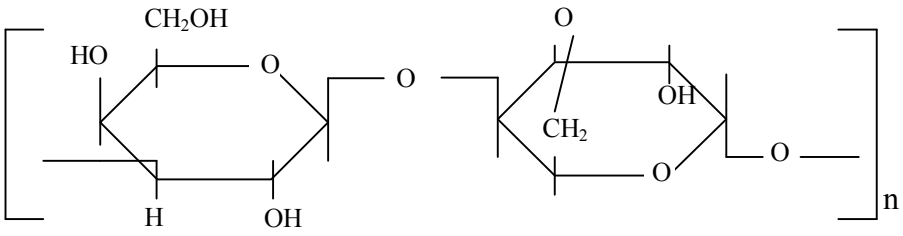
Функциональная группа	Название и марка	Фирма
OCH_2COOH	Карбоксиметилсефадекс (CM)	«Pharmacia» (Швеция)
$O(CH_2)_3SO_3H$	Сульфопропилсефадекс (SP)	То же
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Диэтиламиноэтилсефадекс (DEAE)	То же
$OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2CH_2$– –$CH(OH)CH_3$	Диэтил–(2–оксипропил) аминоэтилсефадекс (QAE)	То же
OCH_2COOH	Молселект (CM)	«Reanal» (Венгрия)
$O(CH_2)_2SO_3H$	Молселект (SE)	То же
$O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	Молселект (DEAE)	То же

Гели на основе декстрана обладают высокой стойкостью и гидрофильностью (из-за наличия большого количества гидроксильных групп).

К группе декстранов можно отнести и *крахмал*, представляющий смесь полисахаридов, основными компонентами которой являются амилоза-поли-1,4-α-D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза и амилопектин – разветвленный полисахарид, состоящий из остатков D-глюкозы, связанной 1,4-α-глюкозидными связями, а в местах разветвлений – 1,6-α- глюкозидными связями.

При химической модификации крахмала сшивающими агентами (формальдегид, глиоксаль, глутаровый альдегид) получен новый носитель – *губчатый крахмал*. Этот носитель обладает повышенной устойчивостью по отношению к ферментам, гидролизующим полисахариды. Введение диэтанол– и триэтаноламинных групп дает возможность применять губчатый крахмал для иммобилизации.

Агароза-поли-β-галактопиранозил-3,6-ангидро-α-L-галактопираноза:



Она широко используется как носитель для иммобилизации. Однако стоимость ее очень высока, поэтому разрабатываются различные методы ее модификации с целью получения легко регенерируемых форм. При охлаждении горячего 2–6 % водного раствора агарозы до температуры ниже 45 ^{0}C образуются прочные крупнопористые гели, представляющие собой сложную смесь из заряженных и нейтральных полисахаридов.

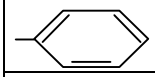
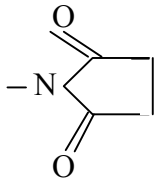
Гели на основе агарозы выпускаются под названиями «сефароза» и «биогель А» (табл. 1.3).

Агар выделяют из некоторых красных водорослей. Точный состав неизвестен. Установлено, что он содержит, по крайней мере, два полисахарида: агарозу и агаропектин. Гели агара образуются аналогично агарозным при охлаждении до температуры ниже 38 ^{0}C. После высушивания гель агара превращается в прозрачную пленку, что позволяет использовать для изучения иммобилизованных в геле препаратов оптические методы. К преимуществам агара следует отнести его низкую стоимость, нетоксичность и способность формировать механически прочные гели даже при малых концентрациях в растворе.

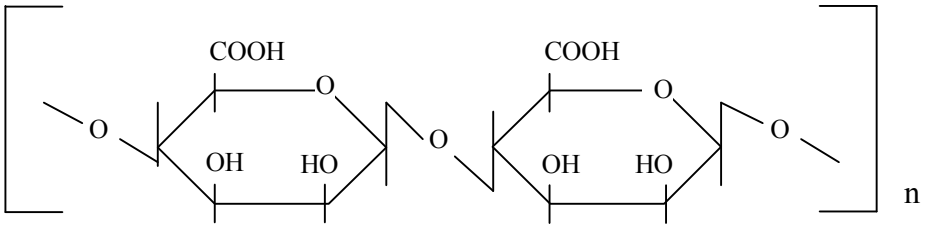
Улучшить свойства агара можно сшиванием эпихлоргидрином, диэпоксидными агентами и т. д. Сшитый агар с регулируемой проницаемостью устойчив к нагреванию даже в щелочной среде, обладает высокой механической прочностью, а наличие большого количества оксигрупп позволяет легко модифицировать носитель. Это дало основание отдельным исследователям считать агар почти идеальным носителем.

Таблица 1.3

Агароза и некоторые ее производные

Функциональная группа (заместитель по OH–группе)	Название и марка	Концентрация агарозы, %	Фирма
–	Сефароза 6В	6	«Pharmacia» (Швеция)
–	Сефароза 4В	4	То же
–	Сефароза 2В	2	То же
$-O(CH_2)_2\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2Cl^-$	ДЭАЭ-сефароза CL-6B	6	То же
$-OCH_2COOH$	КМ-сефароза CL-6B	6	То же
$-OCN$	Бромциансефароза 4В	4	То же
$-OCH_2-\underset{\displaystyle OH}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2-O-$ $-(CH_2)_7-CH_3$	Октилсефароза CL-4B	4	То же
$-OCH_2-CHOH-CH_2-O-$ 	Фенилсефароза CL-4B	4	То же
	Биогель А-0,5	10	«Bio-Rad Labs» США
	Биолгель А-1,5	8	То же
	Биолгель А-5	6	То же
	Биолгель А-15	4	То же
	Биолгель А-50	2	То же
	Биолгель А-150	1	То же
$-O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	ДЭАЭ-биогель	–	То же
$-NH-(CH_2)_5-COO-$ 	Активированная CH-сефароза 4В	4	«Pharmacia» (Швеция)
$-OCH_2\underset{\displaystyle OH}{\underset{\vert}{CH}}-CH_2-$ $-O(CH_2)_4-O-CH_2-$ $-\underset{\displaystyle O}{\underset{\diagdown\!\diagup}{CH-CH_2}}$	Эпоксиактивированная сефароза 6В	6	То же

Альгиновые кислоты и их соли – это полисахариды бурых морских водорослей, состоящие из связанных β-1,4-связями остатков D-маннуроновой кислоты.



Они служат основой при получении альгинатных гелей.

В присутствии моновалентных катионов эти полисахариды даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор, а в присутствии двухвалентных катионов, особенно Ca^{2+}, наблюдается образование геля.

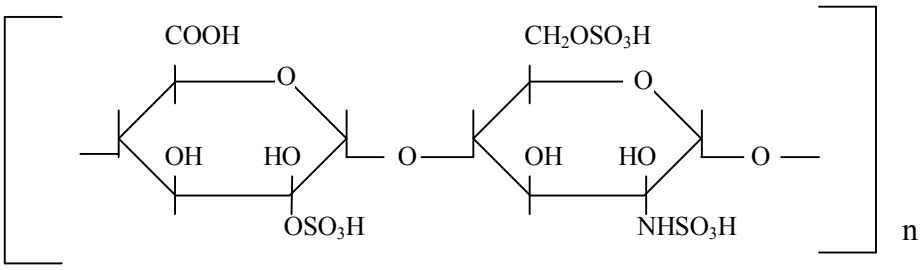
В зависимости от присутствующего катиона эти гели и носят различные названия: натрий альгинатный гель, кальций альгинатный гель и т. д.

Характерной особенностью этих носителей является зависимость их растворимости от температуры и pH-раствора.

Для иммобилизации биопрепаратов широкое распространение получила система с альгинатом кальция. Выбор этого геля для иммобилизации произошел не случайно: условия включения в гель альгината кальция очень мягкие, полимер можно стерилизовать автоклавированием, и кроме того, процесс иммобилизации обратим, что достигается добавлением агента, связывающего Ca^{2+} (например ЭДТА или лимонной кислоты). Последнее особенно важно было на начальных этапах исследования, поскольку необходимо было изучать свойства клеток по мере их нахождения в иммобилизованном состоянии.

От соотношения концентрации альгината и Ca^{2+} зависит плотность сшивки геля. Стабильность геля возрастает с увеличением концентрации полимера, но при высоких концентрациях альгината масса становится вязкой, что может затруднять процесс образования гранул. Поэтому необходимо подобрать такие условия, которые бы позволили получать стабильный гель.

Гепарин представляет собой кислый полисахарид, содержащий чередующие звенья сульфатированной D-глюкуроновой кислоты (или L-идуроновой) и сульфатированного глюкозамина (или N-ацетилглюкозамина):



Гепарин успешно применяется для получения водорастворимых препаратов иммобилизованных ферментов, используемых в медицине для введения in vivo.

к-Каррагинан. Каррагинаны представляют собой гетерогенные полисахариды, содержащие главным образом эфиры α-D-галактопиранозилсерной кислоты.

к-Каррагинан – это нерастворимая фракция, которую получают при добавлении ионов Ca^{2+} к водному экстракту каррагинана. При нагревании он растворятся, а при последующем охлаждении образует гель. Температура образования и качество геля зависят как от концентрации полимера, так и от количества присутствующих в растворе катионов (например, K^+, NH_4^+, Ca^{2+} или Ba^{2+}).

Белки используют в качестве носителей для иммобилизации ферментов. Известно, что многие ферменты в клетке функционируют в тесном контакте с липидами и белками. Поэтому полагают, что изучение поведения ферментов, иммобилизованных на белковых матрицах, позволит также лучше понять закономерности функционирования ферментов in vivo. С точки зрения практической значимости важными свойствами этих носителей являются высокая вместимость по отношению к ферментам и способность к биодеградации, а также возможность применения большинства из них (благодаря фибриллярной природе) в виде тонкой пленки (толщина 80 мкм). Иммобилизацию на белковых носителях можно проводить как в присутствии, так и отсутствии сшивающих агентов.

К недостаткам белков как носителей, в частности для медицинских препаратов, используемых in vivo, следует отнести высокую иммуногенность (исключение составляют коллаген и фибрин).

Наиболее часто в качестве носителей применяют структурные белки, такие как кератин, фиброин, коллаген; двигательные белки, в частности миозин, а также транспортные белки, например сывороточный альбумин.

Коллаген – фибриллярный белок группы склеропротеидов, основной компонент хрящей и сухожилий, обладает высокой прочностью на разрыв. Особенностью этого белка является высокая гидрофильность. Легкость выделения коллагена и наличие большого числа групп для связывания ферментов делают возможным его использование в качестве носителя. Коллаген используют и в виде модифицированных производных. Например, блокированием амино- или карбоксильных групп изменяют поверхностный заряд носителя и, соответственно, гидрофильность, с помощью сшивающих аминов получают сжатую микроструктуру. Наиболее часто коллаген употребляется в азидной форме. В результате длительной обработки коллагена кипящей водой, в ходе чего гидролизуются некоторые его ковалентные связи, получают желатин. Ценностью этого носителя, обладающего гелевой структурой, является нетоксичность, легкость биодеградации, что позволяет применять его в фармацевтической и пищевой промышленностях.

Другим представителем фибриллярных белков группы склеропротеидов является *кератин*. Из кератина почти полностью состоят шерсть, волосы, роговые покровы, шелк и т. д. Чаще всего кератин получают при переработке перьев. Таким образом, кератин дешев и доступен в больших количествах.

Существуют две формы кератина – α и β. α-Кератин характеризуется высоким содержанием цистеина, что способствует иммобилизации препаратов, содержащих SH-группы. β-Кератины характеризуются высоким содержанием глицина и аланина, что способствует образованию вытянутой зигзагообразной полипептидной цепи. Нити β-Кератина обладают мягкостью, гибкостью и нерастворимостью, однако по прочности уступают α-Кератину.

При иммобилизации препаратов на носителях белковой природы необходимо учитывать диффузионные ограничения, определяемые гелевой структурой матрицы.

Липиды. Иммобилизация ферментов на природных липидных носителях (конструирование ансамблей белок – липид) может рассматриваться как приближение к живой клетке.

Для такой иммобилизации, как правило, используются природные липиды – компоненты биомембран. Обычно липидные носители применяются в виде монослоев на различных поверхностях или бислоев (как правило, сферической формы).

Липиды, имеющие хотя бы небольшую полярную «головку», способны образовывать мономолекулярную пленку на границе раздела фаз (вода –воздух, вода – неполярный растворитель). Липидные молекулы в

монослое расположены таким образом, что полярные «головки» погружены в водную среду, а углеводные группы направлены в воздух или неполярную среду. Такая пленка способна сорбировать белковые молекулы. Изучение монослоев липидов, содержащих белок, помогает также установить природу взаимодействия липидов и белков в биологической мембране.

Липидный монослой можно нанести на твердую подложку (силикагель, сажа и т. д.). В качестве липидной матрицы используют обычно лецитин, фосфатидилэтаноламин и холестерин. Возможность варьировать структуру и ориентацию молекул в липидных слоях достигается подбором полярности носителя и природы используемого растворителя липида.

Если липид с молекулами бифильной природы, растворенный в неполярном органическом растворителе (бензол, гептан), адсорбировать на полярном силикагеле, то в монослое липида углеводородные цепи будут ориентированы наружу. При адсорбции липида из полярного растворителя на неполярной графитовой саже можно получить гидрофильный монослой, в котором полярные головки ориентированы в сторону растворителя.

В качестве природных носителей используются *липосомы*. Для приготовления липосом наиболее часто используются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и др. Размер и форма липосом зависит от способа их приготовления, а также от таких факторов, как кислотность среды, присутствие неорганических солей и природы используемого липида.

Существует три различных типа липосом: мультиламеллярные, моноламеллярные и макровезикулярные. Мультиламеллярные липосомы представляют собой замкнутые упорядочные структуры, состоящие из нескольких концентрических липидных бислоев, отделенных один от другого водной средой. Расстояние между соседними бислоями составляет 7,5 нм, диаметр центрального водного ядра равен ~ 0,15 мкм, а общий диаметр мультиламеллярных липосом колеблется от 1–2 до 50 мкм.

Ультрозвуковая обработка мультиламеллярных липосом приводит к трансформации их в моноламеллярные. Диаметр таких липосом составляет 20–50 нм.

Макровезикулярные липосомы образуются, например, путем слияния малых липосом, индуцируемого ионами Ca^{2+}, а также присутствием фосфолипидов с отрицательно заряженными головными группами. Такие липосомы состоят из одного бислоя и имеют диаметр от 60 нм до 100 мкм.

Широкое применение липосом как носителей для ферментов и лекарственных препаратов обусловлено простотой получения, легкостью регенерации иммобилизованного материала, а также возможностью использования in vivo благодаря близости свойств этих липидов – носителей и природных биомембран.

Синтетические полимерные носители. Огромное разнообразие доступных синтетических полимеров обеспечило их широкое использование в качестве носителей для иммобилизации.

Вводя в полимерные молекулы различные функциональные группы, можно в широких пределах варьировать физические свойства носителей и создаваемое ими микроокружение для иммобилизованных препаратов. Синтетические полимеры применяются как для ковалентной иммобилизации, так и сорбционной, а также для получения гелей и микрокапсул.

Полимеры на основе *стирола* являются основой многих промышленных марок ионообменных материалов. Для сорбционной иммобилизации применяются как микропористые, так и макропористые (размер пор 10–1000 нм) материалы. Сополимеры стирола в виде сферических частиц с различными сшивающими агентами можно получить гранульной полимеризацией. Геометрическая структура таких макропористых носителей (размер пор, удельная поверхность) варьирует в широких пределах при изменении количества агента и концентрации растворителя мономеров в реакционной среде.

Наиболее часто в качестве сшивающего агента используется дивинилбензол.

Пористость сополимеров стирола регулируют полимеризацией в присутствии порообразователей, например добавок, разлагающихся при нагревании с выделением газообразных веществ (NH_4Cl).

В последние годы стали применяться носители, имеющие макросетчатую, изопористую и гетеропористую структуры. Макросетчатые полистиролы подобны стеклам. Они имеют стабильную структуру пор, не набухают в воде, отличаются повышенной механической прочностью. Получают их эмульсионной сополимеризацией стирола с дивинилбензолом в присутствии осаждающего вещества. Изопористый полистирол образуется при сшивании стирола в дихлорэтане, содержащем n-ксилилендихлорид.

Под действием монохлордиметилового эфира и парообразователя получают гетеропористый полистирол с диаметром пор ~ 1 мкм. Применение гетеропористых носителей обеспечивает высокую остаточную активность биопрепаратов.

Немодифицированные полистирольные носители гидрофобны. Присоединением ионогенных групп в пароположении бензольных радикалов можно придать некоторую гидрофильность, хотя в целом, сохраняется склонность полимера к гидрофобным взаимодействиям.

Широкие возможности для разработки новых видов носителей открывает введение реакционноспособных ангидридных групп в состав синтетических полимеров. В этом случае получают носитель при сополимеризации эквимолярных количеств стирола и малеинового ангидрида. В присутствии избыточного количества диметилендиамина получают носитель, содержащий аминогруппы. Последние обладают высокой вместимостью по отношению к белкам, могут применяться как для ковалентной, так и нековалентной иммобилизации.

Полиакриламидный гель получается при сополимеризации производных акриловой кислоты со сшивающими агентами.

Полиакриламид – носитель, часто используемый для включения ферментов и клеток, не обладает ионообменными свойствами, поэтому при иммобилизации pH-профиль активности препаратов практически не меняется. По этой же причине не происходит ни обогащения, ни обеднения носителя заряженными субстратами и продуктами. Однако отсутствие взаимодействия включенных белков с носителем не способствует их удержанию. Для устранения утечки требуется высокая степень сшивки носителя, т. е. желательна как можно более полная полимеризация. К сожалению, мы это уже отмечали, при высокой степени сшивки возникает проблема диффузионных ограничений.

Таким образом, хотя включение препаратов в полиакриламидный гель используется довольно широко, методы иммобилизации, также как ковалентное сшивание с инертным носителем, имеют в этом случае определенные преимущества.

Кроме того, полиакриламидный гель вследствие токсичности используемых для его получения мономеров (акриламида, бисакриламида) и выделении тепла при полимеризации снижает жизнеспособность клеток и ферментов. Но поскольку клетки значительно больше ферментов, то высокая степень сшивки необязательна. По этой причине для иммобилизации клеток в последнее время используют поперечносшитый и предварительно полимеризованный линейный полиакриламид.

Полиамидные носители – это группа различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой –C(O)–NH–.

Один из способов получения основан на гомополиконденсации аминокарбоновых кислот, например ε-аминокапроновой кислоты.

Носители на основе поливинилового спирта обладают высокой реакционной способностью. Соответствующая обработка позволяет вводить в них различные функциональные группы: альдегидные, хлортриазиновые, дисульфидные и др. Для получения гидрофильных гелей носители могут быть сшиты глутаровым альдегидом в кислой среде, а в щелочной – эпихлоргидрином. К достоинствам этих носителей следует отнести, помимо высокого содержания реакционно-способных групп, большую вместимость по отношению к белкам.

Гидрофильные полиуретановые полимеры, содержащие группировку –NH–C–O являются достаточно удобными материалами для включения препаратов в гель; процедура иммобилизации в этом случае состоит в простом смешивании компонентов.

Полиуретанты обладают большой стойкостью по отношению к воде и окислителем по сравнению с полиамидами. Серьезное значение в связи с использованием иммобилизованных препаратов, в частности в медицине, приобретает проблема биодеградации. Полимеры, имеющие высокую молекулярную массу, могут накапливаться в организме; возникает необходимость создания таких синтетических полимеров (или выбора природных), которые будут расщепляться с образованием нетоксичных продуктов обмена. В этом отношении предпочтение отдается природным полимерам, которые гидролизуются в организме ферментами. Так, например, в качестве носителя лекарственных препаратов наиболее широко применяют декстраннетоксичный, с малой иммуногенностью, способный к биодеструкции полисахарид.

Среди синтетических полимерных материалов наибольшее применение в качестве носителей лекарственных препаратов имеют полимеры на основе N-винилпирролидона.

Проводятся такие попытки целенаправленного синтеза биодеградабельных полимеров, в частности полиуретанов, содержащих в основной цепи дипептидные фрагменты и др.

Неорганические материалы. Для иммобилизации используются различные типы неорганических носителей. Основными качествами, обуславливающими широкое внедрение неорганических материалов в промышленные процессы, являются легкость их регенерации и возможность придания им любой конфигурации. Носители применяются как в виде порошков, шариков, так и монолита. Неорганические носители могут быть как пористыми, так и непористыми.

К ***макропористым кремнеземам*** относятся *силикагели, силохромы и макропористые стекла*. Достоинства: механическая прочность, химическая инертность ко многим растворителям, наличие жесткого

скелета с заданным размером пор, устойчивость к воздействию микроорганизмов.

Поверхность частиц кремнеземов покрыта гидрофильными и гидроксильными группами, обладающими слабовыраженными кислотными свойствами.

К недостаткам этих носителей следует отнести использование их в ограниченном диапазоне pH и некоторую неспецифическую сорбцию на их поверхности.

Можно химически модифицировать кремнеземы путем введения различных реакционно-способных групп (–CN, $–NO_2$, $–NH_2$ и др.) или гидрофобизировать поверхность соответствующими реагентами.

Применение различных модифицирующих агентов дает возможность целенаправленного изменения свойства поверхности кремнеземных носителей. Однако стоимость кремнеземных носителей относительно высока, а модификация еще более повышает их стоимость, что является существенным ограничением во внедрении их в промышленности.

Природные алюмосиликаты (*глины, цеолиты*), а также ***пористая керамика.*** Поверхность также может быть модифицирована различными органическими веществами. Они характеризуются высокой плотностью поверхностных групп, связыванием белковых групп, что имеет немаловажное значение для эффективной иммобилизации.

Уголь и графитированная сажа. Уголь может быть использован в качестве носителя, как для адсорбционной, так и для ковалентной иммобилизации.

Достоинства графитированной сажи: однородность и электрическая проводимость ее поверхности. Последнее свойство важно при создании биоэлектрокаталитических систем на основе иммобилизованных препаратов.

К недостаткам можно отнести низкую механическую прочность.

Весьма перспективны носители на основе ***металлов и их оксидов***. Эти носители характеризуются высокой механической прочностью, относительной дешевизной, стабильностью, хорошими гидродинамическими свойствами. Металлические поверхности, используемые в качестве носителей, как правило модифицируют, либо создавая оксидную пленку на поверхности матрицы, либо покрывая их слоем полимера (производные полистирола, целлюлозы и т. д.). Это позволяет значительно повысить сорбционную вместимость носителя.

Глава 2. МЕТОДЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ

Методы иммобилизации часто рассматриваются с точки зрения природных сил, удерживающих препарат в зоне носителя. В этом случае методы иммобилизации подразделяют на химические и физические.

В первом случае препарат химически «пришивается» к носителю, что, в свою очередь, может осуществляться как на поверхности соответствующего нерастворимого материала, так и в объеме носителя.

Во втором случае удержание препарата носителем осуществляется за счет физических факторов: адсорбционно, полупроницаемой мембраной, электрическим полем и т. д., в этом случае имеют ввиду иммобилизацию, при которой препарат не соединяется с носителем ковалентными связями.

Другой принцип классификации методов основывается на следующих положениях: производится ли иммобилизация одновременно с обездвиживанием препарата и образованием матрицы носителя или же процесс иммобилизации происходит на заранее приготовленной нерастворимой основе, на которой тем или иным способом закрепляют биологическое действующее начало.

В ряде случаев конкретный препарат (клетка) прикрепляется в реальных условиях к нерастворимым материалам (например, древесина, почва, минералы и др.). В этом случае жизнедеятельность клетки в иммобилизованном состоянии является для нее естественной, отличающейся от природной только искусственно поддерживаемыми в биотехнологическом процессе внешними параметрами (температура, давление, влажность и др.) и набором подаваемых клетке веществ.

Иммобилизация препаратов (т. е. удерживание на носителе) может быть как необратимой, так и временной. Когда иммобилизуют растущую, интенсивно делящуюся культуру, часто наблюдается постепенный переход из фазы носителя в окружающую среду, даже если исходная биомасса была фиксирована носителем необратимо. Но иногда оказывается удобной обратимая фиксация. В этом случае, возможно, удалить отработавшие свой срок клетки и вновь иммобилизовать свежие. Такой подход к регенерации биокатализаторов удается применять, например, в случае адсорбционных вариантов иммобилизации.

2.1. Методы физической иммобилизации

Все методы физической иммобилизации (т. е. иммобилизации, при которой фермент не соединен с носителем ковалентными связями) разделяют на четыре группы:

1. Адсорбция на нерастворимых носителях (т. е. на поверхности носителя).

2. Включение в поры геля.

3. Иммобилизация в полимерных пленках (мембранах).

4. Включение в двухфазную реакционную среду, где препарат может находиться только в одной из фаз.

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из всех существующих способов. Еще в 1916 году Нельсон и Гриффин провели успешную иммобилизацию инвертазы путем адсорбции на активированном угле и геле гидроксида алюминия.

Адсорбционная иммобилизация клеток, в частности микроорганизмов основывается часто на способности многих из них прикрепляться к разнообразным твердым или гелеобразным носителям и продолжать жизнедеятельность в таком состоянии (микробные популяции почвы, кишечника, рубца, некоторые азотфиксирующие микроорганизмы растений и т. д.).

Поверхность клеток неоднородна, характеризуется мозаичной структурой – наличием гидрофильных и гидрофобных участков. Разнообразие свойств поверхности клеток и адсорбентов определяют различные механизмы адсорбционного взаимодействия (ион – ионные взаимодействия, ван-дер-ваальсовы силы и т. д.)

Однако указанные подходы к классификации способов иммобилизации оставляют в стороне проблему микроокружение препарата.

Поэтому предлагается использовать следующую классификацию:

1. Иммобилизация на носителе или на поверхности носителя. В этом случае удерживающая поверхность или часть поверхности носителя «омывается» внешней средой (жидкой или газообразной).

2. Иммобилизация в носителе или в массе (объеме) носителя. Между внешней средой и препаратом в результате иммобилизации появляется слой материала носителя. В данном случае свойства носителя (например, пористость, заряд, гидрофильность) в значительной степени могут сказываться на функционировании иммобилизованного препарата и на уровне реализации потенциальных возможностей.

3. Следующий вариант называют иммобилизацией с использованием мембранной технологии. Препарат и небольшая часть внешней среды помещены в замкнутый объем, отделенный от остальной среды избирательно проницаемой мембраной, размер пор, в которой таковы, что субстраты и продукты через них проникают, а иммобилизованный препарат удерживается внутри замкнутого объема.

Иммобилизация на поверхности носителя. Для осуществления данного подхода к созданию иммобилизованных систем используются разные носители: непористые, ячеистые и др.

При иммобилизации на носителе препарат может быть связан различными силами:

– адсорбционно неспецифически – взаимодействие базируется на не ковалентных контактах (ионные, гидрофобные, водородные и др.);

– адсорбционно биоспецифически – носитель, содержащий аффинные лиганды, способен образовать достаточно прочные комплексы с поверхностью препарата (в основе также лежат нековалентные взаимодействия).

– химически удерживающая матрица должна иметь особые группировки, способные реагировать с компонентами препарата (этот случай можно рассматривать как хемосорбцию); либо для ковалентного связывания препарата с носителем необходим специальный сшивающий агент.

К достоинствам адсорбционной иммобилизации относятся исключительная простота методов ее проведения. По существу, иммобилизация происходит при контакте водной суспензии биопрепаратов с адсорбентом (исключение составляет иммобилизация с помощью электроадсорбции).

Способы разделяются на статические, с перемешиванием и путем нанесения на колонке рис. 2.1.

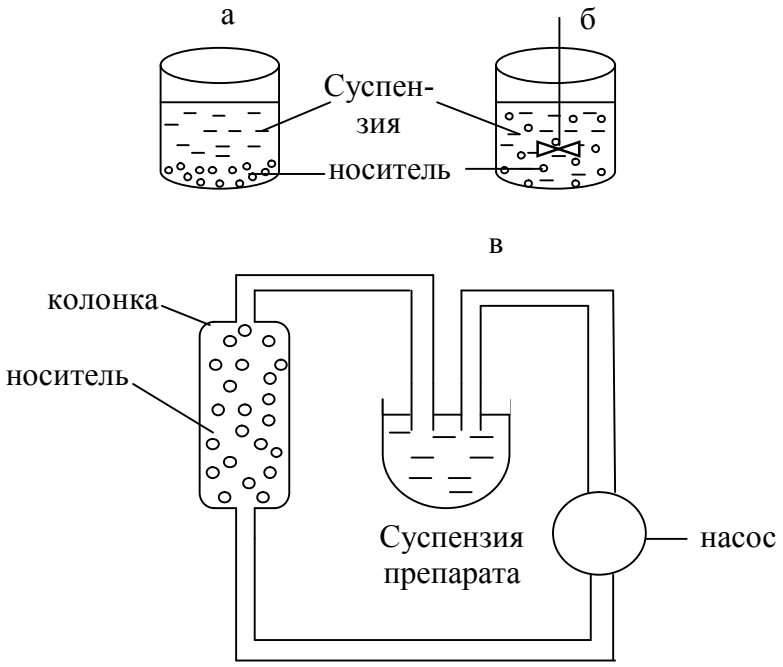


Рис.1. Способы адсорбционной иммобилизации:
а – статический; б – с перемешиванием; в – нанесения в колонке

Статический способ наиболее прост и заключается в том, что носитель (адсорбент) вносят в суспензию биопрепарата и смесь некоторое время инкубируют. Иммобилизация достигается за счет осаждения клеток и последующей их адсорбции на частицах носителя. Недостатком способа является необходимость длительного контакта адсорбента с суспензией биопрепарата.

Способ с перемешиванием обеспечивает более быстрое завершение процесса адсорбции и более равномерное заполнение носителя.

Способ нанесения в колонке заключается в прокачивании суспензии с препаратом через колонку, заполненную носителем.

Иногда для проведения адсорбционной иммобилизации применяют метод электроосаждения (электроадсорбция) (рис. 2.2).

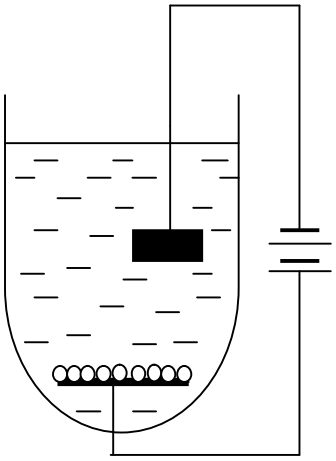


Рис.2.2. Иммобилизация методом электроосаждения

В этом случае в раствор препарата погружают два электрода, на поверхность одного из которых помещают слой носителя. При пропускании электрического тока молекулы фермента или клетки благодаря имеющимся на поверхности заряженным группам начинают перемещаться в растворе в направлении электрода с носителем и осаждаются на поверхности последнего.

Иммобилизация в массе носителя. Этот вариант один из самых распространенных, хотя его нельзя отнести к самым простым подходам.

В данном варианте иммобилизации в качестве носителей применяются либо полимерный гель, либо полимерное волокно.

Нерастворимые материалы, которые служат основой матриц подобных носителей, могут быть как органическими веществами, так и неорганическими соединениями, как синтетическими производными, так и природными продуктами.

Если говорить о природе сил, удерживающих препарат в объеме носителя, то и здесь может быть как обездвиживание за счет физических факторов (просто массой носителя, т. е. механически), так и фиксация с образованием ковалентных связей между компонентами препарата и веществом матрицы (препарат «вшивается» в носитель) рис. 2.3.

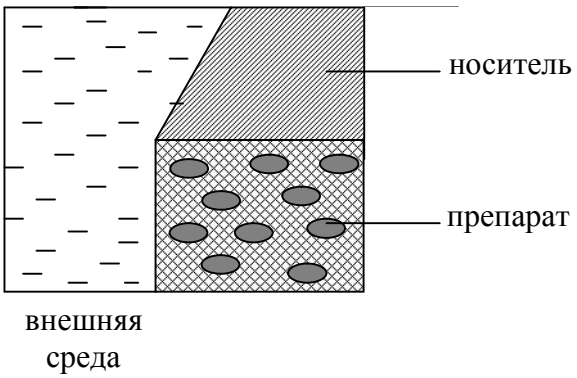


Рис.2.3. Иммобилизация в массе носителя

Широкое распространение метода обусловлено тем, что в этом варианте достигается более высокая удельная концентрация иммобилизованных препаратов в носителе. Это в свою очередь теоретически дает возможность поднять продуктивность биотехнологического процесса в целом.

Еще одно важное преимущество иммобилизации в носителе по сравнению с иммобилизацией на носителе состоит в хороших эксплутационных свойствах получаемых препаратов. Препараты также лучше защищены от многих неблагоприятных факторов среды.

Иммобилизация с использованием мембранной технологии. Суть метода – водный раствор препарата отделяется от водного раствора субстрата избирательно проницаемой мембраной. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения избирательно проницаемой мембраны и ее природой. Важным фактором является толщина мембраны – с ее уменьшением происходит повышение проявляемой иммобилизованными биокатализаторами активности, что определяется возможностью увеличения диффузии субстрата к биокатализатору.

Наиболее широкое распространение мембранные биокатализаторы получили не в системах превращения веществ, а при создании чувствительных элементов биосенсоров.

В мембранной технологии применяются следующие системы: плоские мембраны, пористые волокна и микрокапсулы.

Плоские мембраны – легко пропускают молекулы субстрата, но представляют собой непреодолимый барьер для крупных молекул фермента или клеток (рис. 2.4).

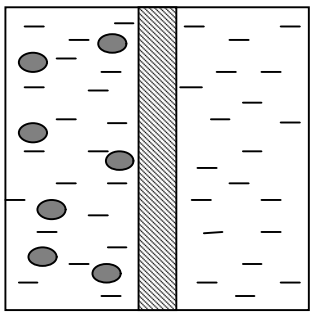


Рис. 2.4. Иммобилизация с использованием мембранной технологии

Пористые волокна – аналогично случаю плоских мембранных носителей, только здесь используются мембранные полые волокна. Фактически эти волокна представляют собой длинные тонкие трубки, стенки которых выполнены из полимерной мембраны (рис. 2.5).

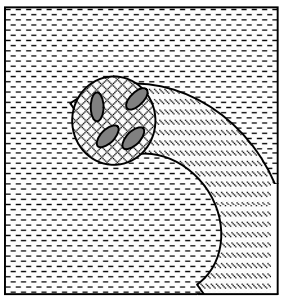


Рис. 2.5. Иммобилизация в пористые волокна

По сравнению с плоскими мембранами отношение занимаемого препаратами объема к общему объему системы выше, поэтому и выше получаются удельные продуктивности. Среди волокнообразующих полимеров используются триацетат целлюлозы – дешевый и доступный носитель, а также волокна коагулята целлюлозы. Носитель из коагулята целлюлозы гидрофилен, обладает высокой механической прочностью,

его химическая и биологическая устойчивость определяется стабильностью самой целлюлозы.

2.2. Микрокапсулирование

Суть метода в том, что водный раствор с биопрепаратом (фермент, клетка) включают внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (мембраной). В зависимости от условий получения размер микрокапсул изменяется от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров.

Для формирования микрокапсул с иммобилизованными препаратами существуют два основных подхода: диспергирование и (микро) гранулирование.

В первом случае водная суспензия клеток диспергируется в несмешивающуюся с ней органическую жидкость, а присутствующие в системе специальные добавки образуют на поверхности капелек водной фазы мембранную пленку. Получаемые микрокапсулы имеют неодинаковые размеры – существует некоторое распределение величин их диаметров, зависящее от гидродинамических свойств применяемых жидкостей, интенсивности перемешивания, соотношения объемов фаз, геометрии рабочего сосуда и конструкции мешалки.

Во втором случае водная суспензия препарата через особое дозирующее устройство (гранулятор) инъектируется порциями строго заданного объема в несмешивающуюся с водой органическую жидкость, где на границе раздела фаз поверхности водной капли происходит формирование оболочки микрокапсулы. В этом случае получаются частицы практически одинаковой величины.

В принципе, микрокапсулирование отличается от включения в волокна, главным образом, формой получаемых препаратов: при микрокапсулировании образуются сферические микрокапсулы, а при втором способе – нити.

Технология микрокапсулирования в настоящее время находит очень широкое применение в самых разнообразных отраслях – от производства лекарств и пищевых добавок до изготовления красящего слоя печатающих устройств или специальных антипиреновых присадок к полимерным композициям. Большие надежды связываются с практической реализацией лазерного термоядерного синтеза, где используют шарики дейтерево-тритиевого топлива, включенные как раз в микрокапсулы. Определенное развитие получили методы иммобилизации ферментов в полимерные микрокапсулы, а также довольно популярны эти приемы при

иммобилизации животных и растительных клеток; что касается микроорганизмов, то таких работ еще мало.

Наполнение микрокапсул (внутреннее содержимое) может быть газовым, жидким, студнеобразным и твердым.

Весьма интересен прием совместного капсулирования клеток и экзогенных ферментов. Например, бактерии *Gluconobacter oxydans*, способные окислять глюкозу в глюконовую кислоту, требуют для этого хорошего снабжения кислородом. Однако при капсулировании даже при обильной аэрации они проявляли низкую глюкозооксидазную активность. При включении в полимер одновременно с клетками каталазы и добавлении в среду H_2O_2 (донор кислорода) количество образующейся глюконовой кислоты резко увеличилась.

2.3. Иммобилизация металлохелатным способом

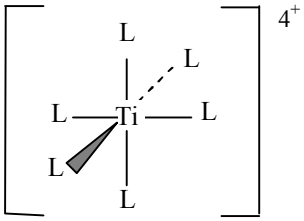
Для целей иммобилизации, как оказалось, можно использовать свойства ряда металлов образовывать хелатные комплексы. В этом случае не требуется дополнительной модификации носителя, и иммобилизация протекает быстро и в достаточно обычных условиях. Наиболее подходящими свойствами для иммобилизации обладают из переходных металлов титан и цирконий, оксиды которых не проявляют токсического действия.

Этот метод иммобилизации разработан для ферментов на основе химии гидроксидов переходных металлов. В качестве носителя используют собственно гидроксид металла, который можно получить осаждением при гидролизе соответствующего хлорида. Молекула фермента иммобилизуется при образовании хелатов.

При некоторых приемах используется совместное осаждение гидроксидов металлов с ферментами. Такое осаждение может привести к получению более активного продукта, чем при последующем добавлении фермента, так как поверхность частицы выпадающего в осадок гидроксида очень велика. Однако при этом необходимо учитывать возможную инактивацию фермента в результате инкубации при низких значениях pH.

Чтобы получить более высокую ферментативную активность, нужно оптимизировать процесс иммобилизации относительно некоторых важных условий: продолжительность иммобилизации, pH, соотношение количества фермента и носителя. Металлохелатный метод иммобилизации ферментов впервые разработал Новеис в университете г. Бирменген (Великобритания) в опытах иммобилизации на целлюлозе с применением диазотирования.

Рассмотрим возможность переходных металлов образовывать хелатные комплексы с биополимерами на примере титана и целлюлозы. В растворе хлорида титана определенная часть ионов титана образует октаэдрические координационные комплексы с другими молекулами и ионами, которые в данном случае выступают в роли лигандов комплексного иона (пример комплексного иона приведен на рис. 2.6.



$[Ti(H_2O)_6]^{4+}$

$[Ti(H_2O)_5Cl]^{3+}$ $[Ti(H_2O)Cl_5]^{-}$ $[TiCl_6]^{2-}$

Рис. 2.6. Пример комплексного иона

Гидроксильные группы являются эффективными лигандами для ионов переходных металлов, и, следовательно, можно ожидать, что ионы переходных металлов будут образовывать комплексы с полисахаридами, гидроксильные группы которых будут замещать другие лиганды. Более того, хорошо известно, что гликоли – очень эффективные лиганды ионов переходных металлов. Некоторые полисахариды, такие как целлюлоза, содержат гидроксильные группы, не участвующие в образовании гликозидных связей между углеводными остатками, и, следовательно, способные образовывать хелаты с ионами переходных металлов, замещая своими гидроксильными группами два лиганда иона титана. Таким образом, поскольку целлюлоза представляет собой полимер молекул D-глюкопиранозы, связанных β-1,4-связью, в образовании хелатов могут участвовать гидроксильные группы в положении 2 и 3. О возможности участия во взаимодействии целлюлозной цепи с титаном гидроксильной группы в положении 6 D-глюкопиранозного остатка можно лишь строить предположения. Стерически этой группе трудно приблизиться к другим гидроксильным группам целлюлозы и участвовать в образовании хелата. Таким образом, обработанную хлоридом титана целлюлозу можно рассматривать как полимерный хелат с аква-, хлораква- и хлор-комплексами титана, преобладающими в водном растворе хлорида титана (рис. 2.7).

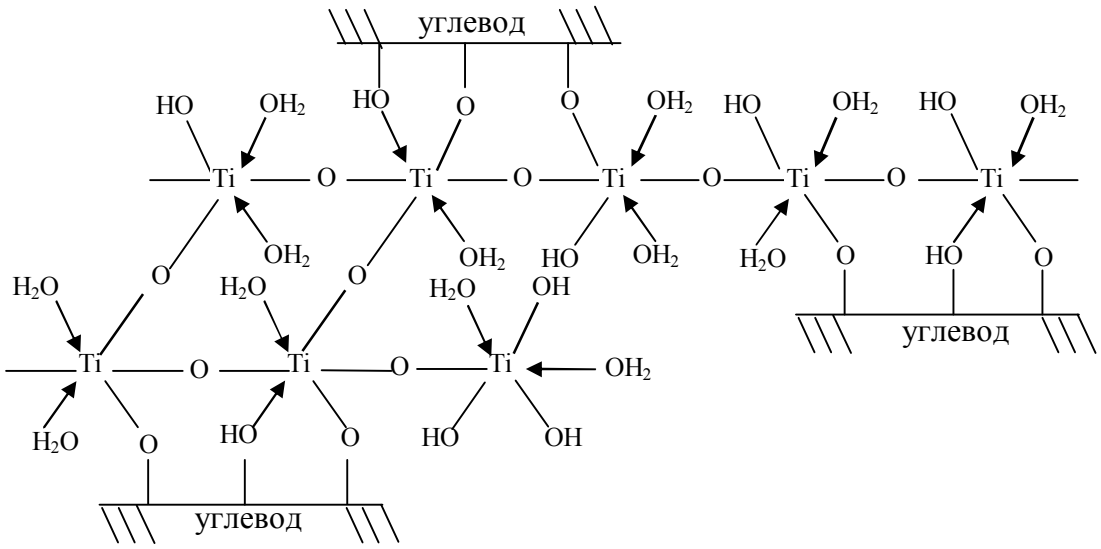


Рис. 2.7. Обработанная титаном целлюлоза, координационно связавшая вдоль своих цепей различные аква-, хлораква- и хлор-комплексы ионов титана, преобладающие в растворе

Следует отметить, что по стерическим соображениям все лиганды иона титана заместить гидроксильными группами полисахаридной цепи невозможно. Более того, оставшиеся лиганды не будут замещаться гидроксильными группами соседней целлюлозной цепи из-за нерастворимости и недостаточной подвижности макромолекулы целлюлозы. Любая же другая молекула, содержащая группы, способные замещать лиганды, может образовать хелат с титаном, связанным с целлюлозой. Такая молекула должна находиться в водном растворе и pH раствора может быть близок к нейтральному.

Образование связи между полимером (целлюлоза), обработанным металлом, и ферментом (с появлением ферментативно активного производного) будет успешным лишь при выполнении следующих условий:

– в молекуле фермента должны присутствовать группы, способные выступать в роли лигандов;

– контакт этих групп с атомами металла стерически возможен;

– эти группы не должны находиться в области активного центра фермента;

– молекулы фермента, уже связанные с носителем, не должны располагаться слишком близко друг к другу.

Удельная активность получаемых препаратов на основе различных ферментов (глюкоамилаза, инвертаза, нуклеаза и др.) обычно довольно

высокая (50–80 %). В результате иммобилизации металлохелатным методом константа Михаэлиса фермента, как правило не меняется.

Использование хлорида титана приводило к получению препарата иммобилизованного фермента с большей активностью, чем в его отсутствии. Метод весьма прост и состоит из следующих стадий:

1. Взвесить в чашке 10 г. микрокристаллической целлюлозы.
2. Добавить 50 мл 15 %-ного (вес/объем) хлорида титана (IV) к 15 %-ной (вес/объем) HCl и хорошо перемешать.
3. Поместить смесь в вакуумный эксикатор с гидроксидом натрия и откачать воздух.
4. Выдержать смесь в сушильном шкафу при 45 ^{0}C до полного высыхания (примерно 24 ч).
5. Промыть сухой остаток три раза буферным раствором (pH буфера обычно выбирают соответствующим оптимальной активности фермента), пока носитель не станет практически белым.
6. К промытому носителю добавить раствор фермента, содержащий 1 г белка, и перемешивать при 4 ^{0}C в течение 18 ч.
7. Отцентрифугировать суспензию и промыть иммобилизованный фермент буфером, затем буфером, содержащим 1 M NaCl, еще раз этими же растворами, затем еще два раза буфером.
8. Ресуспендировать иммобилизованный фермент в буфере и хранить при 4 ^{0}C.

Потенциальная возможность использования ферментного препарата в промышленных целях связана с его стабильностью в процессе функционирования (операционная стабильность). В этом плане металлохелатная иммобилизация дает неоднозначные результаты, которые зависят от вида фермента, материала носителя, условий окружающей среды и т. д. Особенно низкая операционная стабильность наблюдается при использовании высокополимерных субстратов.

Логическим развитием рассматриваемого метода явилось его использование для иммобилизации целых клеток, в частности микроорганизмов.

Процесс иммобилизации на гидроксидах металлов представляет собой замещение гидроксильных групп на поверхности гидроксида подходящими лигандами, входящими в состав фермента или клетки. В результате образуются связи, аналогичные ковалентным. Структурная сложность клеточных оболочек обеспечивает достаточное разнообразие подходящих лигандов, входящих в состав белковых и углеводных компонентов клеточной стенки. В качестве примера применение иммобилизо-

ванных металлохелатным методом живых клеток, может служить сообщение об использовании таких клеток для производства уксуса.

Таким образом, мы рассмотрели довольно общие принципы получения иммобилизованных биокатализаторов. Отметим, что соответствующие способы для разных вариантов разработаны с различной степенью детализации. Выбор средств и путей реализации зависит от конкретных биотехнологических задач.

Глава 3. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Под иммобилизацией фермента понимается его включение в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в последней молекулами субстрата или эффектора. Иными словами, иммобилизация представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. Иммобилизация ферментов – это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Вообще, в идеальном случае иммобилизация фермента не должна приводить к потере каталитической активности. Адсорбция – мягкий метод иммобилизации, который, как правило, слабо изменяет каталитическую активность фермента.

Наоборот, ковалентное связывание приводит часто к снижению ферментативной активности. Однако инактивацию фермента можно предотвратить, если проводить иммобилизацию в присутствии субстрата, который защищает активный центр. Приведем примеры типичных водонерастворимых носителей, используемых для адсорбции и ковалентной иммобилизации ферментов (табл. 3.1).

Таблица 3.1

Материалы, используемые для иммобилизации

Адсорбционная иммобилизация	Ковалентная иммобилизация
Окись алюминия	Агароза (сефароза)
Бентонит	Целлюлоза
Карбонат кальция	Декстран (сефадекс)
Гель фосфата кальция	Стекло
Уголь	Сополимеры полиакриламида
Целлюлоза	
Глина	Полиаминостерол
Каллоген	
Конковалин А-сефарозы	

Широкое технологическое применение ферментов долгое время сдерживалось рядом причин, из которых важнейшим являются:

– трудоемкость отделения ферментов от исходных реагентов и продуктов реакции после завершения процесса, в результате чего ферменты используются, как правило, однократно;

– неустойчивость (лабильность) ферментов при хранении, а также при различных воздействиях (главным образом тепловых);

– трудоемкость очистки ферментов и получения их в достаточно активном виде и, как следствие, высокая стоимость активных ферментов.

В последнее десятилетие определились пути преодоления этих трудностей. Они связаны как раз с получением иммобилизованных ферментов, а также иммобилизованных клеток (микроорганизмов). Открылись принципиально новые перспективы перед прикладной наукой в результате создания иммобилизованных ферментов. Дж. Нельсон и Е. Гриффин в 1916 г. показали, что инвертаза, адсорбированная на угле (т. е. иммобилизованная), сохраняет каталитическую активность. В 20–30-х годах прошлого века работы по получению адсорбции белков и ферментов были продолжены главным образом в практических целях.

Каким образом, с помощью иммобилизации удается преодолеть перечисленные выше трудности промышленного использования ферментов?

1. В результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества гетерогенных катализаторов – их можно удалять из реакционной смеси (и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией. Этим устраняется первый из перечисленных недостатков растворимых ферментов как технологических катализаторов. Более того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим, используя колонны или проточные аппараты с иммобилизованными ферментами.

2. Иммобилизованные ферменты более устойчивы к внешним воздействиям, чем растворимые ферменты. Таким образом, возникли перспективы преодоления и второго недостатка – их лабильности.

3. Наконец, принцип иммобилизации был применен не только к ферментам, но и к их субстратам, ингибиторам и кофакторам, т. е. веществам, имеющим избирательное сродство к ферментам. Это позволило создать метод выделения и очистки ферментов, основанный на хроматографии по сродству, или аффинной хроматографии. Тем самым существенно облегчается выделение чистых ферментов, и в настоящее время можно рассчитывать на то, что и третья из отмеченных причин, ограничивающих промышленное применение ферментов, успешно преодолевается.

Иммобилизованные ферменты обладают рядом преимуществ при использовании их в прикладных целях:

1. Гетерогенный катализатор легко отделить о реакционной среды, что дает возможность:

– остановить в нужный момент реакцию;

– использовать катализатор повторно;

– получать продукт, не загрязненный ферментом (важное обстоятельство для пищевых и фармацевтических производств).

2. Использование гетерогенных катализаторов позволяет проводить ферментативный процесс непрерывно, например, в проточных колоннах, и регулировать скорость катализируемой реакции, а также выход продукта путем изменения скорости потока.

3. Иммобилизация или модификация фермента способствует целенаправленному изменению свойств катализатора, в том числе специфичности, зависимости каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды и, что важно, его стабильности по отношению к различного рода денатурирующим воздействиям.

4. Иммобилизация ферментов дает возможность регулировать их каталитическую активность путем изменения свойств носителя под действием некоторых физических факторов (свет, звук); создаются механо- и звукочувствительные датчики, усилители слабых сигналов и бессеребряные фотографические процессы.

С практической точки зрения иммобилизация ферментов на водонерастворимых носителях очень выгодна, поскольку после завершения ферментативной реакции иммобилизованный фермент может быть выделен и использован повторно. Однако необходимо знать, остается ли иммобилизованный фермент связанным с носителем при различных условиях (pH, температура, присутствие субстрата и продуктов). Убедившись в прочности связывания фермента с носителем, можно сравнивать свойства свободного и иммобилизованного фермента. Одним из свойств носителя является максимальная «нагрузка». Под максимальной «нагрузкой» (емкостью) носителя ферментом подразумевается максимальное количество фермента, которое может быть иммобилизовано на определенном количестве носителя. Это очень важный параметр, так как высокая степень нагрузки носителя позволяет уменьшить размеры реактора. Перенасыщение носителя может привести к тесному сближению молекул и к уменьшению активности фермента за счет стерических затруднений при взаимодействии субстрата с активным центром. Однако, ограниченная «на-

грузка» носителя может приводить к блокированию свободными молекулами пространства между связанными молекулами фермента.

3.1. Кинетические параметры катализа иммобилизованных ферментов

Свойства иммобилизованных ферментов изучают, измеряя влияние pH, температуры, ионной силы, концентрации субстрата и продукта на кинетические параметры ферментативной реакции и сравнивания с аналогичными результатами, полученными для нативного фермента. Измерения должны проводиться одинаковым образом для свободного и иммобилизованного ферментов.

Изменение отдельных свойств фермента при иммобилизации в ряде случаев можно предсказать, например, при адсорбции фермента на заряженном носителе. Если носитель заряжен отрицательно или положительно, то зависимости активности и стабильности адсорбированного фермента от pH могут смещаться в более щелочную или кислую область соответственно. Это смещение объясняется изменением свойств микроокружения фермента в непосредственной близости от загрязненного носителя.

В простейшем случае скорость (V) катализируемой ферментативной реакции подчиняется уравнению Михаэлиса – Ментен, предложенному еще в начале XX века:

$$V = \frac{k_{кат}\,[E]\,[S]}{K_м + [S]} \qquad 3.1$$

[E], [S] – концентрация фермента и субстрата в системе соответственно; $k_{кат}$ – каталитическая константа ферментативной реакции; $K_м$ – определяемое эффективное (кажущееся) значение константы Михаэлиса. Результаты измерений начальных скоростей при различных концентрациях субстрата, соответствующие выражению 3.1, можно представить графически (рис. 3.1).

Параметр $K_м$ служит характеристикой сродства фермента к субстрату и, следовательно, является той мерой концентрации субстрата, которая необходима для насыщения фермента. При катализе иммобилизованными ферментами концентрация субстрата вблизи фермента может отличаться от концентрации субстрата во всем объеме системы. В этом случае наблюдаемая $K_м$ должна зависеть от распределения субстрата между свободным раствором и носителем, где сосредоточен фермент.

Параметр $k_{кат}$ характеризует реакционную способность образовавшегося фермент-субстратного комплекса, поэтому не зависит от распределения субстрата в системе, а определяется состоянием, в первую очередь, конформацией самого фермента.

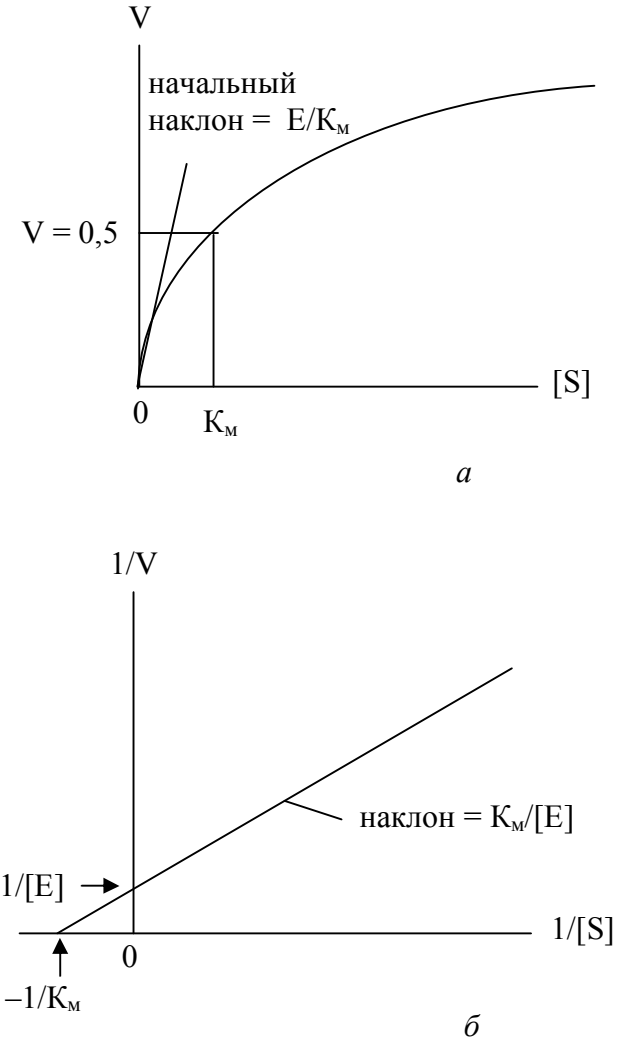


Рис. 3.1. Зависимость начальной скорости (0) от концентрации субстрата (S):
а, *б* – в обычных и обратных координатах соответственно

Каталитические параметры ферментативной реакции ($k_{кат}$ и $K_м$) могут зависеть от наличия в реакционной системе различных эффектов (ингибиторы, активаторы), pH и т. д. В таких случаях необходимо учитывать распределение также этих эффекторов между раствором и фермент содержащей матрицей.

Иммобилизация фермента может приводить к увеличению или уменьшению $K_м$. Уменьшение $K_м$ фермента при иммобилизации может

давать дополнительные практические преимущества, поскольку при низких концентрациях субстрата скорость реакции будет выше, чем в случае свободного фермента. Увеличение $К_м$, иммобилизованного фермента, напротив, означает, что для достижения данной скорости реакции требуется большая концентрация субстрата, чем для свободного фермента. Изменения $К_м$ могут объясняться также изменением свойств микроокружения частиц иммобилизованного фермента. Так, например, известно, что частицы окружает не перемешиваемый слой растворителя (слой Нернста), в котором концентрация субстрата ниже, чем в основной массе раствора. Для насыщения иммобилизованного фермента требуется более высокая концентрация субстрата. Этот эффект проявляется в уменьшении величины $К_м$ при уменьшении размера частиц, на которых иммобилизован фермент, или при увеличении скорости перемешивания.

Ионная природа носителя также может оказывать влияние на $К_м$, в частности если субстрат несет заряд. Если заряды носителя и субстрата противоположны, то величина $К_м$ будет уменьшаться, а если они одноименны, то эта величина будет увеличиваться. Могут быть и другие случаи изменения величины $К_м$, объяснить которые более сложно.

Предполагают, что после иммобилизации фермента на носителе его термостабильность увеличивается и, следовательно, его действие будет пролонгировано. Однако, заранее трудно представить дает ли такой эффект соответствующий метод иммобилизации. Для более стабильного прогноза необходимо изучить влияние различных температур на активность фермента, измеряя начальную скорость ферментативной реакции в каждой точке, т. е. при конкретной температуре. Увеличение оптимума, иммобилизованного фермента в сторону положительных температур не обязательно означает увеличение термостабильности. Хотя после иммобилизации температурный оптимум фермента может увеличиться на 10–20 ^{0}C, при высокой температуре он может быть очень лабилен и может быстро терять свою активность даже при возрастании начальной скорости реакции.

Термостабильность измеряют двумя способами:

1) предварительная инкубация фермента при повышенной температуре в течение различных промежутков времени с последующим охлаждением и измерением активности.

2) инкубация фермента с субстратом при определенной температуре и регистрацией превращения субстрата в продукт.

Оба способа проиллюстрированы на рис. 3.2, *а, б.*

Как видно из представленных данных, инвертаза, адсорбированная на Кон А-сефарозе, имеет повышенную стабильность по сравнению с нативным ферментом (*а*). В режиме функционирования иммобилизованный фермент еще более стабилен, чем нативный. С практической точки зрения данные, приведенные на рис. 3.2, *б*, более информативны по сравнению с таковыми на рис. 3.2, а.

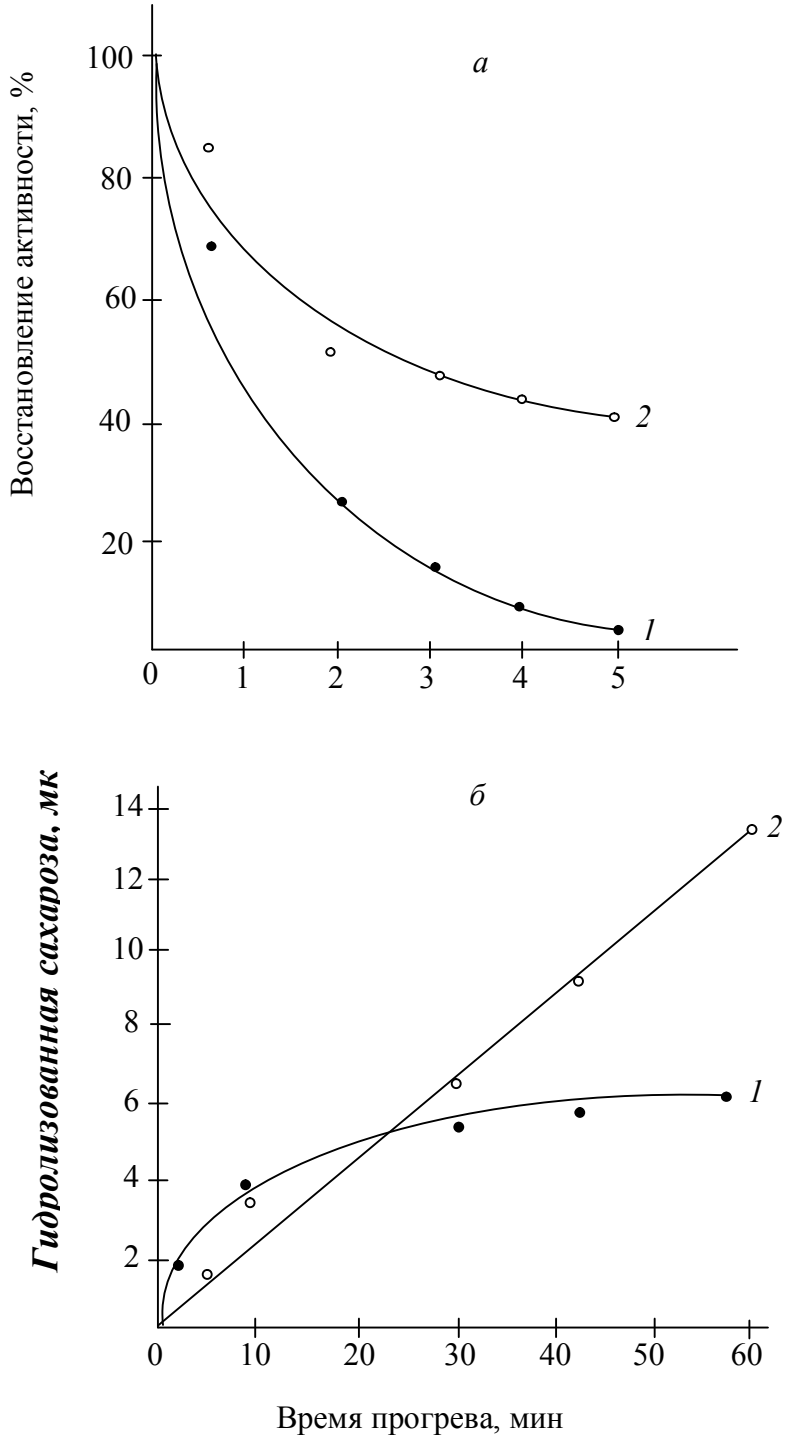


Рис. 3.2. Термостабильность при 65^0 С растворимой инвертазы (*1*) и иммобилизованной (*2*) на Кон А-сефарозе в отсутствие (*а*) и в присутствии (*б*) 0,12 моль сахарозы

Таким образом, все кинетические эффекты, наблюдаемые при катализе иммобилизованными ферментами можно разделить на две группы. К первой из них относятся эффекты, связанные с влиянием иммобилизации на состояние (конформацию) фермента, а ко второй – эффекты, обусловленные распределением реагентов в системе.

3.2. Влияние иммобилизации на состояние фермента

При иммобилизации существует опасность, что белок присоединится к носителю в конформации, отличной от нативной. В этом случае каталитическая активность фермента может существенно измениться или вообще исчезнуть.

В реальных условиях в результате иммобилизации пространственная структура фермента может, во-первых, либо существенно изменяться, либо изменяться незначительно; во-вторых, остаться неизменной (что наблюдается чаще всего).

Изменение конформации нативного и иммобилизованного ферментов обусловлено одной из трех причин:

1. Модификацией каких-либо важных для структуры функциональных групп белка, например, связанных с самим процессом иммобилизации фермента (т. е. присоединением к носителю). Чтобы устранить действие этого фактора, необходимо, например, выбрать соответствующий метод иммобилизации, не затрагивающий этих функциональных групп в белке.

2. Взаимодействием (электростатические, гидрофобные, водородные связи) между ферментом и носителем, приводящие к денатурации. В этом случае чаще всего достаточно просто заменить носитель.

3. Наличие большого числа связей между ферментом и носителем.

Вторая ситуация, когда в результате иммобилизации конформация фермента не меняется, но нарушается динамика конформационных изменений в белке, а именно замедляются необходимые для катализа конформационные переходы, уменьшается число конформационных стадий и глубина их протекания. В этом случае, как показано, следует проводить иммобилизацию на инертных носителях.

Иногда исследователи целенаправленно стремятся «закрепить» или как говорят «заморозить» с помощью иммобилизации конформацию фермента, отличающуюся от нативной. Это, в частности, оказыва-

ется важным для детекции конформационных изменений в ферментах, индуцированных субстратами, кофакторами и специфическими лигандами.

Как показали многочисленные исследования «замороженные» конформации фермента могут отличаться от обычных, ненапряженных состояний, по целому ряду свойств: стабильности, доступности к действию модифицирующих агентов, сродству к субстрату и специфическим лигандам, а также каталитическим свойствам. Этот фактор необходимо учитывать, поскольку иммобилизацию фермента иногда рекомендуют проводить в присутствии ферментативной активности.

3.3. Эффекты распределения реагентов в катализе иммобилизованными ферментами

Большое значение дляэффективной работы иммобилизованных ферментов приобретает распределение субстрата между раствором и ферментсодержащей матрицей, т. е. концентрация субстрата.

При высоких концентрациях субстрата эффекты распределения не существенны, поскольку в этом случае скорость ферментативной реакции не зависит от концентрации субстрата.

Если же концентрация субстрата невелика, то последующее концентрирование субстрата в матрице приводит к уменьшению значения $К_м$, т. е. к возрастанию ферментативной реакции.

Неравномерность распределения субстрата в системе обусловлена его взаимодействием с матрицей за счет, например, электростатических сил, водородных связей и т. п.

В случае тех ферментов, которые характеризуются низким сродством к субстрату или действуют на плохо растворимые субстраты выбор носителя для иммобилизации приобретает первостепенное значение.

При рассмотрении распределения субстрата также большое значение приобретают диффузионные ограничения. Если молекула фермента находится на поверхности (или внутри) частицы носителя, то для протекания ферментативной реакции необходимо, во-первых, чтобы молекула субстрата подошла к поверхности частицы, и, во-вторых, продифундировала внутри нее. В зависимости от того, как соотносятся скорости диффузионных стадий и непосредственно ферментативной реакции, может наблюдаться одна из трех ситуаций:

1. Если ферментативная реакция в поверхностных слоях частицы протекает быстрее, чем субстрат из раствора подходит к поверхности,

то через непродолжительное время вокруг частицы образуется зона, обедненная субстратом. В результате наблюдаемая скорость ферментативной реакции будет определяться скоростью массопереноса субстрата к частице. В этом случае говорят, что процесс контролируется внешней диффузией.

К поверхности частицы носителя примыкает неперемешиваемый слой жидкости, в пределах которого перенос молекул происходит исключительно за счет молекулярной диффузии. Поскольку молекулярная диффузия в жидкости проходит очень медленно (коэффициент диффузии ~ 10^{-5}–10^{-6} $см^2/с$), массоперенос может стать лимитирующей стадией процесса, катализируемого иммобилизованным ферментом (внешне диффузионное торможение).

2. Если массоперенос субстрата проходит быстрее, чем идет ферментативная реакция на поверхности частицы, то может возникнуть другой тип диффузионных затруднений. Если размер частицы носителя велик, а фермент очень активен (или велика его плотность внутри частицы), то практически весь субстрат израсходуется уже в приповерхностных слоях носителя, а глубинные области будут обеднены субстратом. В таком случае говорят, что процесс контролируется внутренней диффузией.

Иными словами скорость ферментативной реакции может лимитироваться скоростью проникновения субстрата внутрь частицы. Внутридиффузионное торможение ферментативных реакций зависит от формы частицы с иммобилизованным ферментом.

Теоретический анализ показывает, что роль внутридиффузионных ограничений в кинетике реакций, катализируемых иммобилизованными ферментами, сводится к увеличению константы Михаэлиса.

Существует два основных экспериментальных критерия, по которым можно определить, протекает ли реакция, катализируемая иммобилизованным ферментом, во внутридиффузионном или внешнедиффузионном режиме. Они основаны на различной чувствительности кинетических параметров ферментативных процессов к действию специфических лигандов и температуры.

Например, для реакций контролируемых внутридиффузионно, когда ферментативная реакция существенно замедлена диффузией, имеем $К_м >> [S]$. Далее, ферментативные реакции, контролируемые внутренней диффузией, «чувствуют» эффекты ингибирования, pH-зависимы и т. д.

Энергия активации коэффициента диффузии D, получаемая из температурных зависимостей, при внешнедиффузионных ограничениях равна 15–20 кДж/моль, а при внутридиффузионных – возрастает и становится выше 40 кДж/моль.

3. Когда диффузия субстрата как к поверхностному слою, так и во внутренние области проходит достаточно быстро, общая скорость превращений субстрата определяется непосредственной ферментативной реакцией. В этом случае говорят о кинетически контролируемом процессе.

Учет перечисленных выше диффузионных факторов является одним из наиболее сложных вопросов в катализе иммобилизованными ферментами.

В условиях насыщения фермента субстратом ($К_м$ << [S]) ферментативный процесс не может лимитироваться диффузией, т. е. протекает в кинетическом режиме. Если же ферментативная реакция идет намного быстрее массопереноса, то ферментативный процесс протекает в диффузионном режиме.

Для оценки режима протекания ферментативного процесса чаще всего используют экспериментальные критерии. Рассмотрим основные из них.

1. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата. Как уже отмечалось, в условиях насыщения иммобилизованного фермента субстратом, т. е. при достаточно высоких концентрациях последнего, ферментативный процесс, в принципе, не может контролироваться диффузией субстрата, и, таким образом, реакция протекает по кинетическому типу. Однако по мере уменьшения концентрации субстрата повышается вероятность перехода реакционной системы в диффузионную область. В этом случае (рис. 3.3) в координатах Лайнуивера – Берка в зависимости V от S наблюдается выраженный излом: при концентрациях субстрата выше значения в точке излома (т. е. при низких значениях 1/[S]) реакция проходит в кинетическом режиме (прямая 1), а при низких концентрациях субстрата (высоких значениях 1/[S]) в диффузионном режиме (прямая 2).

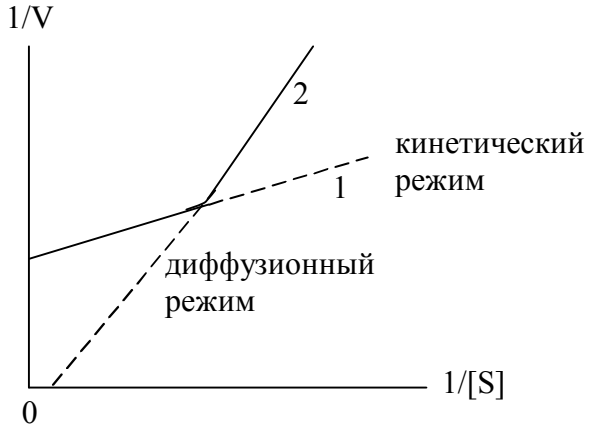


Рис 3.3. Зависимость скорости реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом, в координатах Лайнуивера – Берка, осложненная внешнедиффузионными ограничениями

Следовательно, если для иммобилизованного фермента в координатах Лайнуивера – Берка получена аналогичная зависимость, то это указывает на то, что диффузия играет важную роль в процессе.

Температурные зависимости. Ферментативные реакции характеризуются обычно энергией активации порядка 40–120 кДж/моль. В то же время скорость процессов, протекающих в диффузионной области, должна слабо зависеть от температуры. Это связано с тем, что единственный к температуре параметр D характеризуется энергией активации порядка 15–20 кДж/моль. Поэтому слабая зависимость скорости реакции, катализируемой иммобилизованным ферментом, от температуры может служить указанием на диффузионный режим процесса.

Зависимость скорости реакции от удельной концентрации иммобилизванного фермента (количество активного фермента на 1 г носителя). Скорость реакции в диффузионной области не должна изменяться при возрастании удельной концентрации иммобилизованного фермента. Скорость реакций в этом режиме не должна также зависеть от сдвигов pH среды, ионной силы и т. д.

Зависимость скорости реакции от степени измельчения частиц с иммобилизованными ферментами. В кинетической области скорость реакции не должна зависеть от степени измельчения частиц содержащих катализатор (если нет внутридиффузионных ограничений для субстрата). С другой стороны, скорость диффузионноконтролируемых реакций будет возрастать, поскольку уменьшение размера частиц с иммобилизованным ферментом способствует диффузии субстрата к ферменту.

Зависимость от скорости перемешивания. Влияние диффузионных факторов ослабляется по мере ускорения массопереноса при более интенсивном перемешивании. Известно, что на любой поверхности существует неперемешиваемый слой жидкости. Толщина неперемешиваемого слоя уменьшается при увеличении скорости потока жидкости вокруг частицы. Зависимость наблюдаемой скорости ферментативной реакции от скорости перемешивания или скорости протока субстрата указывает на существенную роль диффузии в процессе.

Существенное ускорение перемешивания может, в принципе, перевести реакцию из диффузионной области в кинетическую.

Стерические ограничения. Пространственная сетка матрицы, в которой иммобилизован фермент, может препятствовать передвижению молекул субстрата, например, в силу чисто механических причин. В ре-

зультате активные центры части ферментативных молекул становятся недоступными для субстрата. Фактически это означает снижение концентрации активного фермента и приводит к уменьшению наблюдаемой скорости ферментативной реакции. Следовательно, хотя истинные каталитические параметры не изменились, фермент не может полностью проявить свою потенциальную активность.

Уменьшение каталитической активности фермента за счет стерических факторов проявляется особенно часто в случае высокомолекулярных субстратов. Стерические ограничения иногда удается уменьшить или даже полностью устранить путем изменения свойств носителей под действием химических реагентов (мягкой обработкой окислителями, кислотами и т. д.) или специальными ферментами (декстраназой, целлюлазой и др.) При этом важно не затронуть первичную структуру и не нарушить пространственную организацию ферментов, пришитых к носителю.

Среди других факторов, влияющих на распределение реагентов в катализе иммобилизованными ферментами, можно отметить pH-эффекты, эффекты ингибирования и активации, гистерезисные и колебательные свойства иммобилизованных олигомерных ферментов и др.

3.4. Стабильность иммобилизованных ферментов

Одним из требований технологичности ферментов является их высокая стабильность. Даже небольшие отклонения внешних условий, которые характерны для микроокружения ферментов в клетке, может оказаться достаточным, чтобы нарушить структуру и функцию ферментов, т. е. инактивировать их.

Для практических целей, однако, часто требуется, чтобы ферменты работали при повышенных температурах, экстремальных значениях pH, в присутствии высоких концентраций органических растворителей или поверхностно-активных веществ и т. п.

В связи с этим возникает проблема существенного увеличения стабильности ферментов.

Какие факторы вызывают инактивацию свободных ферментов? Иногда эти факторы условно разделяют на физические и химические. К первым относят нагревание или охлаждение, облучение (γ-рентгеновские лучи), ультразвук, сорбцию и т. д. К химическим относят действие щелочи, кислоты, ПАВ, окислителей и т. д.

Однако это разделение практически ничего не дает для понимания сути и механизма инактивационных процессов.

Более информативной, с точки зрения решения стабилизационной задачи, является классификация инактивационных процессов по молекулярным механизмам.

В наиболее общем случае инактивационный процесс представляют в виде двухстадийной схемы:

$$N \rightleftarrows D \longrightarrow I$$

N, D и I – соответственно нативная, обратимо денатурированная и необратимо инактивированная форма белка. Первая стадия ($N \rightleftarrows D$) чаще всего представляет собой обратимое конформационное изменение, в случае олигомерных ферментов эта стадия состоит в обратимой диссоциации на субъединицы. Вслед за обратимыми процессами протекают необратимые стадии ($D \longrightarrow I$). Механизмы инактивации ферментов, как правило, классифицируют, исходя из процессов, происходящих именно во второй, необратимой стадии.

Коротко рассмотрим основные инактивационные механизмы.

Агрегация. При длительной инкубации в растворе с повышенной температурой, экстремальных значениях pH, в присутствии денатурирующих агентов белки агрегируют.

Изменение первичной структуры. Все химические процессы, приводящие к инактивации белков, можно подразделить на две группы. К первой относятся реакции разрыва полипептидной цепочки, ко второй – химическая модификация отдельных функциональных групп белка, среди которых наиболее существенны следующие: гидролиз пептидных связей, протеолиз, автолиз, окисление функциональных групп фермента, химическая модификация участвующих в катализе SH-групп, фосфорилирование белков in vivo, радиационное воздействие и др.

Десорбция кофактора из активного центра фермента. У многих ферментов в состав активных центров входят атомы металлов, металлосерные группы (кофакторы). При нагревании может сдвигаться равновесие между кофактором и белком и кофакторы диссоциируют из активных центров ферментов в раствор. Последнее приводит в ряде случаев к необратимой инактивации фермента.

Диссоциация олигомерных белков на субъединицы может происходить при действии многих денатурантов (мочевины, детергентов, кислот, нагревании и т. п.).

Процесс этот, в принципе, обратимый. Однако, как правило, вслед за стадией диссоциации происходят другие процессы: конформацион-

ные изменения в отдельных субъединицах, диссоциация кофакторов из активных центров, агрегация субъединиц и др., т. е. происходят необратимые процессы.

Сорбция белка на стенках реакционного сосуда. На поверхности реакционного сосуда (например, стекла) могут присутствовать нескомпенсированные заряженные группы и потенциальные доноры и акцепторы водородных связей, т. е. на поверхности происходит сорбция ферментов за счет образования слабых нековалентных взаимодействий. Это приводит к уменьшению концентрации фермента в растворе, т. е. кажущейся инактивации.

«Сорбционная инактивация» становится весьма заметной в разбавленных растворах белка (концентрация 10^{-8}–10^{-10} моль/л).

Инактивация в потоке. Этот тип инактивации особенно важен при проведении ферментативных процессов в проточных реакторах. По-видимому, это связано с тем, что в потоке происходит механическая деформация белковых молекул.

Необратимые конформационные изменения (необратимая денатурация). Механизм необратимой денатурации состоит в следующем. При денатурационном воздействии (температура) в белке разрушаются «правильные» нековалентные взаимодействия, которые поддерживают нативную структуру, и образуются «ненативные» нековалентные взаимодействия, термодинамически выгодные при повышенной температуре. При охлаждении эти «неправильные» нековалентные взаимодействия сохраняются по чисто кинетическим причинам, поскольку молекулярная подвижность существенно уменьшается при понижении температуры. Иными словами, в результате охлаждения белок оказывается «замороженным» в метастабильном «необратимо денатурированном» состоянии и не может самопроизвольно перейти в нативную форму.

Для иммобилизованных ферментов число возможных инактивационных механизмов существенно меньше, чем в случае растворимых ферментов. **Каким образом иммобилизация помогает устранить инактивационные ферментативные процессы?**

Иммобилизация подавляет такие процессы, как агрегация и автолиз. Дело в том, что в иммобилизованном состоянии подвижность белков, как правило, резко ограничена, поэтому молекулы в значительно меньшей степени подвержены этим процессам. По этой же причине исключен и механизм инактивации путем сорбции на поверхности и часто удается затормозить необратимую диссоциацию олигомерных белков на субъединицы.

Иммобилизация на (или в) носителе, как правило, создает вокруг молекул фермента стерические ограничения, т. е. как бы экранирует их от внешнего раствора. Это приводит к существенному ограничению диффузии молекул других, не связанных с носителем ферментов, в частности протеаз, фосфорилаз, фосфатаз. Поэтому для иммобилизованных ферментов практически не наблюдаются такие процессы, как протеолиз, микробное заражение и фосфорилирование.

Иммобилизованные белки стабильнее нативных по отношению к инактивации в потоке. Причина заключается в том, что носитель механически защищает молекулы ферментов от деформаций в потоке, выполняя роль своеобразного демпфера.

В последние годы при иммобилизации начали активно пришивать молекулу кофактора в районе активного центра фермента или совместно иммобилизовать молекулы кофактора и фермента на одном носителе в непосредственной близости друг от друга. С помощью таких приемов становится возможным подавить такой инактивационный механизм, как десорбция кофактора из активного центра фермента.

Наиболее сложная задача – затормозить химические изменения в белке, приводящие к инактивации. Однако, и в этом случае иммобилизация, в ряде случаев, оказывает положительное влияние. Например, когда инактивация происходит под действием пероксида водорода или супероксидных радикалов, хорошо зарекомендовал себя следующий прием. Подвергающийся инактивации белок иммобилизуют совместно с каталазой или супероксиддисмутазой – ферментами, катализирующими разложение H_2O_2 и O_2 соответственно.

Некоторые ферменты инактивируются вследствие окисления кислородом воздуха высокореакционных функциональных групп их активного центра и в первую очередь SH-групп. Такую инактивацию также удается подавить методами иммобилизации. Для этого фермент иммобилизуют в полиэлектролитной матрице, обладающей способностью «высаливать кислород». В результате фермент экранирован от контакта с инактиватором и стабильность его по отношению к окислению становится существенно выше, чем у неиммобилизованного.

Кроме того, можно создать условия для конкуренции за вещество – инактиватор. Например, многие ферменты, имеющие SH-группы, необходимые для катализа, инактивируются в результате их «отравления» катионами тяжелых металлов по механизму образования меркаптидов. Иммобилизуя такой фермент с другим белком с высоким содержанием реакционно-способных SH-групп или пришивая к мат-

рице носителя низкомолекулярные тиолы, добиваются того, что основная часть катионов металлов расходуется не на «отравление» фермента, а на модификацию SH-групп «несущественного» белка или тиола.

Далее, можно, в какой-то мере, предотвратить с помощью иммобилизации первичные обратимые стадии денатурации и диссоциации нативных белков.

Любой инактивационный процесс начинается с обратимой реакции ($N \rightleftarrows D$). Ее молекулярный механизм сводится либо к обратимому конформационному изменению (обратимая денатурация), либо, в случае олигомерных белков, к обратимой диссоциации на субъединицы. В этом случае стабилизация ферментов состоит в том, чтобы подавить первую стадию.

На основе познания указанных процессов стало возможным проводить целенаправленный поиск конкретных путей стабилизации, как мономерных белков, так и ферментов с четвертичной структурой.

В общем случае можно указать три причины изменения стабильности в результате иммобилизации:

1. Изменение конформации иммобилизованного фермента по сравнению с нативной структурой.

2. Изменение микроокружения ферментной молекулы.

3. Ужесточение нативной конформации белковой глобулы.

Первые два фактора еще мало изучены. Более перспективным представляется третий путь – ужесточение (закрепление) нативной конформации фермента с целью воспрепятствовать ее разворачиванию.

Ужесточение структуры фермента можно проводить несколькими путями.

Нековалентные связи (электростатические, водородные и т. д.) практически не образуются в разбавленных растворах полимерных носителей.

Ситуация существенно изменяется при включении ферментов в концентрированные полимерные гели, поскольку здесь становится возможным многоточечное взаимодействие за счет слабых нековалентных сил фермента с носителем. Это происходит благодаря тому, что в таких гелях полимерные цепи со всех сторон окружают ферментную глобулу. Такое многоточечное взаимодействие в гелевых системах действительно имеет место и приводит к существенной стабилизации ферментов.

С практической точки зрения применение гелевых систем имеет один существенный недостаток. Частички геля склонны к набуханию в воде, что приводит к снижению концентрации полимерных цепей в геле.

В результате эффект стабилизации включенного в гель фермента может ослабевать или вовсе исчезать.

Другой путь ужесточения структуры фермента заключается в его иммобилизации на носителе с образованием большого числа ковалентных связей (многоточечное ковалентное присоединение фермента к поверхности носителя) (рис. 3.4).

Рис. 3.4. Схематическое изображение иммобилизованных подходов к стабилизации ферментов:
а – многоточечное ковалентное связывание;
б – сшивание биофункциональными реагентами;
в – включение в поры носителя.

В этом случае используют сополимеризационный метод иммобилизации, позволяющий создать полимерный носитель, комплементарный молекуле фермента. Фермент химически модифицируют (например, по аминогруппам) аналогом мономера, т. е. соединением, содержащим ненасыщенные связи (например, хлорангидридом акриловой кислоты). При последующей сополимеризации с мономером белковая глобула формирует вокруг себя поверхность носителя, комплементарную собственной, и ковалентно к ней присоединяется. Сополимеризационный метод дает уникальную возможность получать препараты ферментов, пришитых различным числом ковалентных связей к поверхности носителя, за счет варьирования модификации на стадии обработки фермента аналогом мономера.

Эффект стабилизации возрастает с увеличением числа связей между ферментом и носителем. Эффект зависит только от числа ковалентных связей с носителем, и не зависит ни от плотности гелевого носителя (т. е. концентрации полимера в геле), ни от степени его набухания.

Еще один подход – внутримолекулярное сшивание фермента бифункциональными реагентами – увеличивает конформационную жесткость белка, и, следовательно, его стабильность. Этот подход (внутримолекулярное сшивание белка) активно используется в природе для увеличения стабильности белковых структур. К числу «природных сшивок» относятся как ковалентные S–S связи, так и нековалентные «солевые мостики», Ca^{2+} и др. металлов, связанные с молекулой белка и т. п.

Метод сшивок весьма эффективен, поскольку позволяет получать водорастворимые стабилизированные производные ферментов с относительно низкой молекулярной массой (сравнимой с молекулярной массой самого фермента).

Разворачиванию белковой глобулы можно также воспрепятствовать, если поместить молекулу фермента в ячейку носителя, не взаимодействующую с ней ни химически, ни сорбционно, но столь «тесную», которая не давала бы возможности образовываться развернутой конформации по стерическим причинам. Этот прием называют как механическое включение фермента в «тесные» поры носителя.

Стабилизацию фермента подобным образом методически проще всего осуществить включением белков в полимерные гели. Включая фермент в гели различной концентрации, можно реализовать ситуацию, когда белковая глобула окажется «зажатой» полимерными цепями носителя и благодаря этому не сможет развернуться. В таких случаях достигаются существенные стабилизационные эффекты: включенные в гель ферменты в тысячи раз стабильнее своих нативных предшественников, причем стабилизация проявляется тем сильнее, чем выше концентрация полимера.

Существуют и другие методы стабилизации ферментов, не основанные на методе иммобилизации. Например, стабильные препараты ферментов можно создавать методами химической модификации и белковой инженерии.

3.5. Ферментные электроды

Ферментный электрод – это комбинация датчика, основанного на использовании ионселективного электрода, с иммобилизованным ферментом, обеспечивающая высокоселективный и высокочувствительный метод определения данного субстрата. Первые сообщения об измерении концентрации глюкозы в биологических растворах и тканях с помощью электрода, в котором использовали глюкозооксидазу, иммобилизованную в геле на поверхности полярографического кислородного электрода,

появились в 1962 году. Эти электроды были датчиками вольтамперометрического или амперометрического типа, т. е. они позволяли измерить ток при наложении постоянного напряжения. Первый потенциометрический ферментный электрод (который позволяет измерять разность потенциалов в системе без внешнего приложения напряжения) был предложен в 1969 г. для определения концентрации мочевины с помощью уреазы, иммобилизованный на pH электроде. К настоящему времени описано более 100 различных электродов включающие различные ферменты. Например, для определения L-Тирозина (тирозиндекарбоксилаза), L-Глутамина (глутаминаза), молочной кислоты (локтатдегидрогеназа), янтарной кислоты (сукцинатдегидрогеназа), пенициллина (пенициллиназа), холестерола (холестеролоксидаза) и т. д.

Для изготовления ферментного электрода сначала подбирают подходящую ферментную систему: действие электрода должно основываться на первичной функции фермента, т. е. на основной реакции, которую он катализирует в природе. В некоторых случаях можно использовать фермент, для которого определяемое вещество служит вторичным субстратом – алкогольдегидрогеназу для определения уксусной кислоты.

При создании ферментных электродов следует обратить внимание на характеристики чистоты фермента. Это существенно для избежания побочных реакций с участием других субстратов. Также необходимо принимать во внимание и активность фермента.

Затем необходимо выбрать ионселективный датчик.

Таблица 3.2

Электродные датчики, используемые для конструирования ферментных электродов

Датчики	Определяемое вещество
Датчики для потенциометрических электродов	
NH_3	Мочевина, аминокислоты, глутамин, нитрат и др.
CO_2	Мочевина, аминокислоты, ферментные системы декарбоксилирования
pH	Пенициллин, РНК, ДНК, глюкоза и др.
Датчики для амперометрических электродов	
O_2	Глюкоза, аминокислоты, спирты, мочевая кислота, холестерол, фосфат, ферменты – катализирующие поглощение O_2
Pt или C	Окислительно-восстановительные ферменты, сульфат, холестерол, спирты, глюкоза, органические кислоты и др.

Тип датчика, на основе которого готовят электрод, следует выбирать в соответствии с природой ферментативной реакции. Датчик дол-

жен реагировать на один из продуктов или субстратов ферментативной реакции.

Следует помнить, чем прочнее иммобилизован фермент, тем он стабильнее, тем дольше им можно пользоваться и тем больше измерений можно провести.

Изготавливают ферментные электроды несколькими способами. Например, на основе фермента, физически включенного в гель, или ковалентно связанного и т. п. Процедура изготовления в общем виде сводится к следующему. Берут электродный датчик (ионселективный электрод) и поворачивают сенсорной частью вверх. На поверхность сенсорной части наносят фермент, накрывают диализной мембраной и закрепляют последнюю резиновым кольцом –электрод с диализной мембраной.

Сенсорную поверхность датчика покрывают нейлоновой сеточкой, которую закрепляют резиновым кольцом. Затем приготавливают раствор для получения геля, содержащего фермент, и наносят его на сеточку. Далее проводя полимеризацию геля при освещении раствора лампой с рефлектором, получают сухой и прочный слой геля, содержащего фермент. Для защиты ферментного слоя накрывают его диализной мембраной и закрепляют еще одним резиновым кольцом.

В случае ковалентного связывания фермент иммобилизуют на нерастворимом носителе, а затем помещают на основной датчик и накрывают диализной мембраной.

Следует отметить, что иммобилизация фермента заметно повышает его чувствительность к факторам окружающей среды. Например, при использовании в электроде алкогольоксидазы для определения уксусной кислоты помехой выступает природный субстрат – этанол. В этой же роли могут выступать ингибиторы ферментов.

После изготовления ферментный электрод используют как любой другой ионселективный электрод.

Конечный ответ ферментного электрода определяет несколько стадий:

– перенос субстрата к поверхности электрода;

– диффузия субстрата через мембрану к активному центру фермента;

– реакция в активном центре;

– перенос продукта ферментативной реакции через мембрану к поверхности ионселективного электрода;

– измерение концентрации продукта у поверхности электрода.

Скорость первой стадии (переноса субстрата) сильнее других зависит от скорости перемешивания раствора: при интенсивном перемеши-

вании субстрат быстро доставляется к поверхности электрода. В случае фермента с высокой активностью мембрана может быть очень тонкой. При этом влияние второй и четвертой стадий сводится к минимуму или вообще устраняется. Поскольку стадия третья очень быстрая, время отклика электрода теоретически должна приближаться по времени отклика основного датчика. Многие исследователи показали, что это достигается при использовании тонких мембран и интенсивном перемешивании.

Весьма важной характеристикой электрода является его стабильность, т. е. сохранение активности во времени, которая зависит от способа иммобилизации фермента. Параметры иммобилизации и стабильности фермента определяются раздельно в двух вариантах: при хранении в сухом состоянии и при использовании электрода. Большинство растворимых ферментов, за исключением некоторых препаратов глюкозооксидазы, которые весьма стабильны в неочищенном виде, в среднем сохраняют стабильность (активность) в течение недели или 25–30 анализов.

Ферменты, иммобилизованные физическим включением в гель, способны сохранять активность 3–4 недели, что эквивалентно проведению 50–200 анализов. Для ковалентно иммобилизованного фермента этот диапазон составляет 200–1000 анализов. В последние годы получены коммерческие препараты ферментов на нейлоновых трубках, позволяющие проводить до 10 000 измерений.

Стабильность электрода определяется содержанием фермента в носителе, правильным подбором оптимальных условий эксплуатации и стабильностью самого датчика, на основе которого сделан электрод.

Ковалентное связывание по сравнению с простым включением в гель является предпочтительным по двум причинам: Во-первых, оно позволяет изменять рабочий диапазон pH; а во-вторых, обеспечивает лучшее связывание любого фермента.

Рабочий диапазон определяемых концентраций для большинства ферментных электродов составляет 10^{-2}–10^{-4} М. Для некоторых электродов верхний предел может быть 10^{-1} М (в зависимости от растворимости субстрата в водных растворах), а нижний может доходить до 10^{-5} М или еще ниже в зависимости от порога чувствительности датчика.

Ухудшение работы ферментного электрода может проявляться в следующем:

– снижение со временем верхнего предела определяемых концентраций, например, с 10^{-1} М до 10^{-2} М;

– уменьшении наклона калибровочной кривой (т. е. кривой зависимости потенциала от логарифма концентрации) с 60 мВ до 50 мВ, 40 мВ и ниже;

– увеличение времени отклика электрода, исходное значение которого составляет 0,5–4 мин.

При изготовлении электрода очень важна высокая чистота препарата, позволяющая использовать фермент в небольших количествах, что обеспечивает малую величину времени отклика.

В последние годы появились ферментные электроды, в которых в качестве чувствительного элемента используются ферменты целых клеток микроорганизмов и тканей. В этом случае целые клетки или ткани наносятся на поверхность ионселективных электродов. Впервые датчик такого типа, описан Дивисом в 1975 г., который отмечал следующие их достоинства:

1. Нет необходимости получать очищенные ферменты.

2. Электрод можно регинирировать погружением в питательную среду. Микроорганизмы сохраняют жизнеспособность долгое время.

3. Целые клетки могут содержать несколько кофакторов и ферментов, катализирующих реакции, которые трудно, или вообще невозможно осуществить с помощью одного иммобилизованного фермента. Кроме того, кофакторы, необходимые для ферментативных реакций, находятся естественно в иммобилизованном состоянии.

Однако у таких электродов есть и недостатки:

1. Низкая селективность, обусловленная присутствием в клетках микроорганизма ряд ферментов, которые могут катализировать побочные реакции.

2. Часто наблюдается медленный отклик электрода (большая постоянная времени ответа), поскольку концентрации ферментов в клетках низкие, а мембрана электрода довольно толстая, что замедляет диффузионные процессы.

В качестве примеров можно привести использование клеток *Neurospora europea* для определения аммиака; *Trichosporon brassicae* – уксусной кислоты; *Sarcina flava* – глутамина; *Azotobacter vinelandii* – нитрат-ион; срезы почек свиньи – для определения глутамина.

Глава 4. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Микроорганизмы являются уникальными природными «биологическими комбинатами», используемыми человечеством для различных целей.

В настоящее время техническая микробиология стала одной из крупнотоннажных отраслей производства, поставляющая сельскому хозяйству средства защиты растений, для животноводства, – корма и лекарства, здравоохранению – антибиотики, витамины, аминокислоты, химической промышленности – спирты и органические кислоты и т. д.

Огромна роль микроорганизмов в системах биологической очистки сточных вод: входящие в состав активного ила клетки различных систематических групп разрушают или трансформируют вредные для окружающей среды соединения до простых веществ типа CO_2, N_2 и H_2O, решая тем самым экологическую проблему.

4.1. Характеристика микробных биокатализаторов

Микробные клетки – природные биокатализаторы, первыми стали применяться в иммобилизованном состоянии в производственных масштабах (первая половина XIX в. – получение уксуса из спирта с помощью уксуснокислых бактерий, адсорбированных на опилках).

Несмотря на ряд ограничений, процедуры с использованием иммобилизованных клеток представляют собой весомую альтернативу стандартной процедуре ферментации. Действительно, есть ряд сообщений об увеличении производительности на порядок и более иммобилизованными клетками по сравнению с суспендированными. Более того, иммобилизованные клетки сохраняют жизнеспособность в течение многих месяцев.

Термин «Иммобилизованные клетки» возник в научной литературе по аналогии с «иммобилизованными ферментами», но в последнее время по отношению к клеткам стал употребляться в более широком понятии, чем по отношению к ферментам.

В настоящее время иммобилизованными считают клетки, для которых созданы искусственные ограничения подвижности во внешней среде, а материальный посредник, обеспечивающий ограничение подвижности, считается носителем. В целом система клетка-носитель называется иммобилизованным биокатализатором.

Преимущества иммобилизованных клеток, по сравнению с иммобилизованными ферментами заключается главным образом в том, что при

использовании иммобилизованных клеток отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации самих ферментов, которые, как правило, являются наиболее дорогостоящими при осуществлении полного технологического процесса.

Далее, ферменты в клетках находятся в наиболее естественном окружении, что положительно сказывается на их термостабильности, а так- же на их операционной стабильности (продолжительности работы).

Известно много примеров, когда после выделения из организма ферменты быстро теряли активность, а иногда их вообще не удавалось выделить в активной форме, тогда как в клетках они сохраняют каталитические свойства достаточно долго. В этих случаях применение целых клеток, а не ферментов вполне оправдано и единственно приемлемо.

Иммобилизация целых клеток увеличивает сохранность и срок работы в качестве катализатора по сравнению с обычными клетками. Из миллионов известных человеку видов микроорганизмов в промышленности используют всего тысячи штаммов относительно небольшого числа видов. Это связано с тем, что производственный штамм должен отвечать ряду строгих требований:

– расти на дешевых субстратах;

– обладать высокой скоростью роста или давать высокий выход продукта за короткое время;

– проявлять синтетическую активность, связанную с образованием желаемого продукта при низком содержании побочных продуктов;

– образовывать максимально высокую концентрацию целевого продукта, чтобы затраты на его выделение были экономически оправданы;

– быть устойчивым к фаговой и другими видам инфекций;

– быть не токсичными (безвредными) для людей и окружающей среды;

– желательно использовать штаммы, для которых легко поддерживать стерильность в производстве.

В конечном итоге на первом месте оказывается себестоимость продукта. Себестоимость целевого продукта любого микробиологического производства в значительной степени определяется затратами на сырье, используемое клетками в процессе роста. Чтобы получить продукт микробного синтеза или трансформации в процессе роста культуры микроорганизма и при этом еще обеспечить высокую скорость роста клеток, необходимо сбалансировать среду культивирования по всем питательным компонентам. При иммобилизации, прежде всего имеет смысл проверить, способны ли эффективно утилизировать в процессе роста

имеющиеся в распоряжении клетки то сырье, которое будет использоваться в производстве.

Далее, при положительном результате, необходимо выяснить фазу роста, в которой способность культуры клеток в отношении синтеза и трансформации конкретного продукта максимальна. Это необходимо для своевременного отделения клеток от культуральной жидкости (сепарация, центрифугирование, фильтрация). Стадия отделения клеток от культуральной жидкости необходима, поскольку для иммобилизации удачнее всего иметь либо концентрированную суспензию клеток, либо клеточную пасту.

Затем следует проверить способность к функционированию клеток, перенесенных в свежую питательную среду, а также осуществлять контроль за накоплением целевого продукта в культуральной жидкости.

Целесообразность соблюдения выше перечисленных приемов объясняется следующими соображениями. Во-первых, следует проверить способность конкретного микроорганизма синтезировать и секретировать целевой продукт в отсутствии роста. Если культура синтезирует и секретирует продукт только в процессе активного роста, то необходимость иммобилизации вызывает сомнение. Это связано с тем, что непрерывно растущие клетки будут либо просто выходить из носителя, либо разрушать его структуру, т. е. такой процесс практически не будет отличаться от простой ферментации.

Однако есть примеры, когда клетки не растут на имеющемся субстрате. Но при иммобилизации, например клеток *Z. mobilis*, в криогели поливинилового спирта, с высокой скоростью эффективно сбраживали в этанол глюкозу, содержащуюся в ферментативных гидролизатах.

При помощи иммобилизованных микроорганизмов реализуются процессы, в которых, используя природные (или приобретенные) свойства клеток, можно длительно поддерживать на постоянном уровне их синтетическую активность, направленную в сторону образования нужного продукта.

Для снижения себестоимости конечного продукта необходимо, чтобы промышленные штаммы были экстремофильными, т. е. росли при повышенных температурах, очень высоких концентрациях солей, кислых или щелочных pH. Стерильность микробиологического производства – проблема, реализация которой требует значительных капвложений.

При эксплуатации иммобилизованных клеток требования к стерильности производства несколько снижаются и, в этом случае появляется ряд преимуществ. Во-первых, процессы, в которых можно использовать иммобилизованные клетки, как правило, реализуются в длительном про-

точном режиме (уменьшается число манипуляций со свободными клетками, а также проточность системы реактора не дает возможности попадающим спорам и единичным микроорганизмам размножаться).

Во-вторых, высокая концентрация активно метаболизирующих микроорганизмов создает неблагоприятные условия для размножения единичных клеток посторонней микрофлоры.

В-третьих, если иммобилизация проведена методом включения в какой-либо гелевой носитель, то посторонние микроорганизмы в матрицу носителя, как правило, не попадают.

Разумеется, что не так легко в природе подобрать штаммы, удовлетворяющие всем перечисленным требованиям. Для проведения подобной работы в настоящее время разработаны рациональные скрининговые методы, которые позволяют отобрать клетки, которые имеют (либо приобрели в результате мутагенеза) высокую продуктивность и/или другие полезные для производства свойства. Весьма перспективным представляются способы улучшения производственных характеристик штаммов путем использования рекомбинационных методов, позволяющих целенаправленно получать микроорганизмы с заданными свойствами.

Замена свободно культивируемых клеток микроорганизмов на биокатализаторы в виде иммобилизованных препаратов поднимает биотехнологический процесс на новый качественный уровень. Сама иммобилизация изменяет условия проведения биологических процессов в большей степени, чем свойства самих организмов.

Использование иммобилизованных микроорганизмов затрагивает и экологический аспект. Периодическое и непрерывное культивирование микроорганизмов для производства различных веществ приводит к тому, что полезный продукт образуется при регулярном наращивании биомассы, которая не утилизируется и является отходом. Любые, даже непатогенные микроорганизмы, при достаточно высокой концентрации ухудшают экологию воздуха, воды, почвы, могут вызывать аллергические заболевания у людей и т. д.

Замена свободно культивируемых клеток на иммобилизованные избавляет от необходимости регулярного наращивания биомассы.

При необходимости использования патогенных или условно-патогенных микроорганизмов в случае их иммобилизации в массе носителя, они оказываются изолированными от окружающей среды.

Применение иммобилизованных клеток связано с решением некоторых новых проблем, например, повторной утилизации или, напротив, уничтожения отработанного биокатализатора.

Существует и возможность повторной утилизации и носителя: например криогель поливинилового спирта, использованный в качествен носителя в течение трех месяцев, расплавляют при температуре 90–100 ^{0}C и затем вновь используют.

Следует отметить и трудности, которые возникают при замене свободно культивируемых клеток на иммобилизованные.

Первое, консистенция сырья, используемого в микробиологическом производстве. Так, например, процесс получения этилового спирта из гидролизатов некондиционного картофеля и зерна. Такое сырье представляет собой чрезвычайно густую негомогенную массу, содержащую большое количество твердых частиц. Применение в данном процессе иммобилизованных клеток является нецелесообразным, поскольку с одной стороны, невозможно осуществлять непрерывную подачу в реактор густой питательной среды, а с другой, трудно подобрать подходящий метод иммобилизации дрожжей и носитель, которые в этом случае обеспечили бы сохранность иммобилизации.

Второе, значительную проблему при использовании иммобилизованных биокатализаторов создает массоперенос, поскольку в последнем случае нельзя использовать традиционные для культивирования свободных клеток способы интенсивного перемешивания или барботации газов.

4.2. Основные принципы действия иммобилизованных микробных биокатализаторов

В исследованиях по иммобилизации микроорганизмов и их использования выделяют два основных направления, различающиеся по задачам:

1. Создание катализаторов для процессов биотрансформации различных органических соединений (расщепление или синтеза специфических связей, модификации конкретных групп и т. д.).

2. Создание катализаторов для реализации процессов биосинтеза различных органических соединений, в том числе первичных и вторичных метаболитов, из компонентов питательной среды.

Очевидные различия этих направлений определяют конкретные требования, предъявляемые к физиологическим характеристикам иммобилизованных клеток.

Прежде чем перейти к описанию принципов действия микробных биокатализаторов следует несколько слов сказать об используемой терминалогии.

1. «Жизнеспособные» (viable) иммобилизованные клетки – потенциально способные давать потомство. Жизнеспособными оказываются такие иммобилизованные клетки, которые могут делиться непосредственно в носителе (на носителе) либо размножаться после отделения от носителя.

Соответственно клетки «утерявшие» способность давать потомство, называются «нежизнеспособными» (non viable).

2. Растущие (growing) клетки – размножающиеся в конкретных условиях их эксплуатации, т. е. только непосредственно в иммобилизованном состоянии.

3. «Не растущие» (non growing) иммобилизованные клетки – не делящиеся в иммобилизованном состоянии, но метаболически активные. Для не растущих клеток может быть характерно увеличение размеров, веса, например за счет накопления внутриклеточных веществ, что приводит к увеличению общего веса иммобилизованной биомассы, несмотря на то, что деления клеток не происходит. Использование термина «не растущие» более правильно, чем «покоящиеся» (resting cell), так как последнее понятие относится к клеткам, которые временно (в связи со специфическими условиями) не делятся и активно не метаболизируют.

4. Понятие «живые» (living) и «неживые» клетки (dead) лучше не использовать, поскольку, если даже в клетке функционирует хотя бы единичный фермент, то нельзя назвать ее мертвой.

5. Метаболическая активность – активность основного метаболизма клеток.

6. Синтетическая активность – способность иммобилизованных клеток синтезировать целевой продукт. Важно отметить именно секреторную способность клетки, так как клетки, синтезирующие различные соединения, но накапливающие их внутри, не имеет смысла иммобилизовать.

По принципу своего действия все искусственные твердофазные биокатализаторы на основе микробных клеток по уровням своей сложности делят следующим образом:

Одноферментные системы без кофакторов – это простейшие каталитические системы, которые могут осуществлять одностадийные процессы биотрансформации.

Олигоферментные системы с регенерацией кофакторов. Такие катализаторы в принципе являются многоферментными и должны обеспечивать регенерацию кофакторов (обычно НАД и НАДН). Такие системы характеризуются способностью удерживать регенерируемые кофакторы.

Мультиферментные системы с регенерацией нескольких кофакторов. К таким системам относятся иммобилизованные клетки с высокой активностью основного метаболизма (катаболизма углеводов).

Мультиферментные системы, катализирующие сложные синтетические процессы, непосредственно связанные с основным метаболизмом клеток.

Для создания систем первых двух типов можно использовать единичные иммобилизованные ферменты или ферментные системы в специальных мембранных реакторах, а применение иммобилизованных клеток рассматривается как альтернативный вариант, упрощающий технологию приготовления биокатализатора и иногда способствующий стабилизации конкретного фермента за счет сохранения его естественного микроокружения в клетках.

Две другие системы можно создать только на основе иммобилизованных клеток, причем метаболически и синтетически активных. Продукты мультиферментных синтетических систем (белки, ферменты, полисахариды, нуклеозидтрифосфаты, первичные и вторичные метаболиты) являются соединениями, образование которых из исходных веществ в водной среде связано с увеличением свободной энергии ($\Delta G > 0$), и следовательно, эти реакции можно реализовать только в случае функционирования в клетке основного метаболизма, который снабжает вторичный синтез исходными продуктами, макроэргическими соединениями и регенерированными коферментами. Подобные катализаторы могут быть созданы только на основе интактных или незначительно измененных клеток, проявляющих безусловную способность к первичному метаболизму.

4.3. Подходы к выбору способа иммобилизации микробных клеток в реальных промышленных условиях

Когда вопрос о принципиальной возможности и необходимости какого-либо процесса на основе иммобилизованных микробных клеток решен, возникает проблема выбора иммобилизации и носителя. Для получения биокатализаторов можно использовать разные методы иммобилизации. Однако конкретные условия иммобилизации и носители подбираются таким образом, чтобы иммобилизованные клетки в наименьшей степени оказались повреждены, а структура матрицы не являлась по возможности диффузионным барьером. Никаких конкретных рецептов для получения заведомо метаболически и синтетически активных иммобилизованных клеток не существует.

Можно лишь указать на некоторые способы иммобилизации, которые использовать нецелесообразно:

– иммобилизация в полиакриламидном геле в обычных условиях вызывает резкое снижение метаболической активности клеток, причем снижается жизнеспособность популяции. Основными негативными факторами в этом случае являются токсическое действие акриламида, повышение температуры при полимеризации полиакриламидного геля и образование свободных радикалов. При криополимеризации акриламида получают жизнеспособные клетки, обладающие высокой метаболической активностью.

– малоперспективным является включение клеток носители, получаемые полимеризацией мономеров под действием УФ – или рентгеновского облучения, так как последние оказывают негативное воздействие на живые организмы.

– не рекомендуется обрабатывать клетки некоторыми бифункциональными агентами, такими, например как глутаровый альдегид, который часто используют для укрепления гелей, образованных природными полисахаридами.

В целом же, при выборе способа иммобилизации и носителя для создания эффективного биокатализатора следует, безусловно, руководство физиологическими и метаболическими особенностями используемого продуцента.

Существует несколько различных подходов для выбора способов иммобилизации по целям использования в конкретных производственных условиях:

1. Выбор по принципу действия иммобилизованных клеточных систем.

2. Выбор по масштабности биотехнологического процесса.

3. Выбор по специфике биотехнологического процесса.

Выбор по принципу действия иммобилизованных клеточных систем. Наибольший прогресс достигнут в использовании иммобилизованных клеток как катализаторов процессов биотрансформации.

В ряде случаев, как например получение L-аспариновой кислоты из фумарата аммония, или L-аланина из L-аспариновой кислоты, реализуется строго специфической ферментативной активностью клетки. Сохранение жизнеспособности, метаболической и синтетической активностей иммобилизованных клеток для осуществления таких одноферментных реакций не требуется, в некоторых случаях даже вредно, поскольку приводит к загрязнению реакционной среды побочными продуктами метаболизма клеток.

При получении биокатализатора для одноферментных трансформационных процессов часто клетки до иммобилизации (или в результате иммобилизации) частично или полностью разрушаются и, по сути дела, иммобилизуют не клетку, а фермент вместе с клеточным содержимым. В результате даже удается повысить уровень активности катализатора по сравнению со свободными клетками за счет разрушения клеточных оболочек, создающих диффузионные затруднения на пути субстрата к ферменту, и выделению продукта реакции.

При таком подходе отсутствует стадия выделения и очистки фермента для иммобилизации. Высокая стабильность катализатора на основе «разрушенных» клеток по сравнению с нативным ферментом может объясняться тем, что в результате выделения и очистки снижается стабильность фермента.

По мнению некоторых авторов в ряде случаев выделение из целой клетки фермента при приготовлении биокатализаторов нерационален, поскольку не реализует влияние естественного микроокружения на фермент. Именно, сохранение естественного микроокружения защищает фермент от различных неблагоприятных воздействий при иммобилизации.

В некоторых случаях целесообразно предварительно обработать клетки с целью снижения их общей метаболической активности и лишь затем проводить иммобилизацию. Например, проводят обработку клеток некоторыми органическими соединениями, нарушающими клеточную проницаемость (пермеабилизация). Необходимо, однако, проверить влияние такой обработки на активность интересующего фермента.

При использовании иммобилизованных клеток для полиферментной биотрансформации необходимы данные о влиянии на эффективность биотрансформации свойств носителя, условий самой иммобилизации и дальнейшего использования биокатализатора, т. е. необходимо поддержание не только структурной целостности, но и метаболической активности иммобилизованных клеток.

Выбор по масштабности биотехнологического процесса. Для реализации крупнотоннажного производства продуктов микробного синтеза или трансформации ряда веществ (аминокислоты, органические кислоты, спирты и т. д.) способ иммобилизации должен быть по возможности простым и недорогим. В качестве носителя следует использовать вещества и материалы с высокой механической прочностью и стабильностью.

Для нужд «малой» биотехнологии, примером которой является специальный тонкий органический синтез или трансформация, экономическая оценка биокатализатора (включая стоимость носителя) и требования

к носителям не так существенны, поскольку биокатализатор готовится в небольших количествах, а получаемый продукт, как правило, дорог.

Аналогичные соображения можно высказать и по поводу создания иммобилизованных клеточных систем для использования их в различного рода аналитических (биосенсорных) устройствах.

Выбор по специфике биотехнологического процесса. Единственная область применения иммобилизованных клеток, для которой конкретно указывается наиболее перспективный метод иммобилизации (адсорбционный – очистка сточных вод.

Для всех остальных типов биотехнологических процессов при выборе метода иммобилизации руководствуются комплексом требований и ограничений, которые мы с вами рассмотрели ранее.

4.4. Оценка физиологической и метаболической активностей клеток в иммобилизованном состоянии

В настоящее время накоплен значительный экспериментальный материал, свидетельствующий об увеличении стабильности иммобилизованных клеток по сравнению со свободно культивируемыми микроорганизмами. Стабильность выражается в более продолжительном активном функционировании клеток, при этом отмечается расширение pH и температурных оптимумов, большая устойчивость к негативным воздействиям окружающей среды.

Иммобилизованные клетки ингибируются более высокими концентрациями образованных ими продуктов, нежели свободные.

Среди факторов, определяющих стабильность иммобилизованных клеток (микробных, растительных, животных) и оказывающих влияние на морфологию, физиологию и метаболическую активность, выделяют следующие:

1. Метаболизм используемых клеток, плотность и равномерность распределения в носителе;
2. Свойства носителя (матрицы или подложки);
3. Природа микроокружения вокруг клетки;
4. Свойства среды, окружающей биокатализатор.

Таким образом, изменение физиологии и метаболизма клеток в иммобилизованном состоянии являются следствием не самой иммобилизации, т. е. обездвиживания клеток, а изменением физико-химических параметров окружающей их среды.

В этой связи возникает необходимость оценки физиологического состояния и метаболической активности иммобилизованных клеток.

Для анализа различных функциональных показателей клетки, таких как жизнеспособность, метаболическая и синтетическая активности, предлагаются методы, которые условно можно разделить на микробиологические, морфо-цитохимические и биохимические.

Микробиологические методы основаны на определение жизнеспособности клеток по их способности к воспроизводству. Клетки высевают, проращивают и подсчитывают образовавшиеся колонии. Эти способы длительны, трудоемки, требуют значительного числа повторностей и т. д.

Морфо-цитологические методы, примером которых может служить окрашивание витальными красителями или идентификация фермента по окрашенным или электрон-плотным продуктам ферментативных реакций. В этом случае получают лишь качественную информацию.

Биохимические методы подразумевают определение какой-либо ферментативной активности на целых клетках.

Очевидно, что для определения общей метаболической активности иммобилизованных клеток необходим высокочувствительный метод, который может быть применен к любым свободным и иммобилизованным клеткам. К таким методам относят методы, позволяющие следить за потреблением субстрата или образованием целевого продукта непосредственно в системе иммобилизованными клетками. Можно также контролировать основной метаболизм иммобилизованных клеток по потреблению кислорода или энергетического субстрата.

К недостаткам таких методов можно отнести то, что не во всех случаях скорость потребления кислорода или энергетического субстрата могут служить показателем активности основного метаболизма. Например, ряд бактерий содержат высокоактивную глюкозооксидазу. Потребление глюкозы и кислорода такими клетками не будет характеризовать их основной метаболизм, а лишь свидетельствовать об активности содержащейся в них глюкозооксидазы.

Наилучшим критерием влияния способа иммобилизации на клетки считается удельная синтетическая трансформационная продуктивность биокатализатора, которая определяется как количество целевого продукта, образованного единицей объема (или массы) катализатора в единицу времени.

Однако если в результате иммобилизации получается катализатор с низкой продуктивностью, невозможно выяснить, какая из стадий использованной методики оказала на клетки негативное воздействие.

По мнению ряда исследователей в качестве критерия при оценке уровня жизнеспособности клетки можно использовать концентрацию

внутриклеточного АТФ, поскольку известно, что энергия приобретаемая живыми клетками сохраняется в полезной форме главным образом в виде АТФ. Показано, что уровень АТФ мгновенно снижается при уменьшении метаболической активности клетки.

Одним из наиболее информативных методов определения АТФ является биолюминесцентный, в основе которого лежит реакция, катализируемая люцеферазой светляков (люциферин – люцеферазная активность).

Уникальным свойством биолюминесцентной системы светляков является то, что наряду с люцеферазой и люцифирином необходимым компонентом реакции является АТФ. Другой такой системы с потребностью в АТФ не обнаружено.

Таким образом, использование перечисленных способов дает возможность в соответствии с поставленными целями определять жизнеспособность иммобилизованных микробных биокатализаторов.

4.5. Промышленное использование иммобилизованных клеток микроорганизмов

Биотехнология по определению Европейской биотехнологической федерации позволяет извлекать выгоду в технологических процессах из свойств организмов и методов биохимии, микробиологии, генетики и химической технологии.

Промышленное внедрение иммобилизованных препаратов происходит в тех процессах, где продукт реакции не может быть получен без их участия или где стоимость продукта настолько превышает стоимость исходного сырья, что получаемая разница может окупить расходы на используемые препараты и их иммобилизацию. Именно этим объясняется в последнее время повышенный интерес к процессам иммобилизации и использованию иммобилизованных ферментов клеток.

Разработка технологических процессов с применением иммобилизованных ферментов и клеток проводится в разных странах, в первую очередь, в Японии, Италии, США, Дании, Голландии.

Современное промышленное производство продуктов микробного синтеза базируется на применение большого числа микроорганизмов различных таксономических групп, способных расти на различных средах, в том числе и на простых синтетических. Весьма широк и круг веществ, которые могут быть получены с помощью микроорганизмов.

В 60-е и в особенности в 70-е годы прошлого века проводились интенсивные исследования и прикладные разработки в области получения

и применения иммобилизованных биокатализаторов, причем в этом качестве использовались в основном ферменты или клетки микроорганизмов, имеющие в своем составе тот или иной «полезный» фермент.

Представление о возможности использования микроорганизмов в различных областях дает таблица.

Таблица 4.1.

Возможности применения микроорганизмов

1. Утилизация отходов, контроль за состоянием окружающей среды
2. Получение энергии (биоэнергия)
3. Получение кормов, пищи, напитков, изделий бытовой химии
4. Замена традиционного сырья на нетрадиционные
5. Добыча минерального сырья (в т.ч. из моря)
6. Очистка и концентрация веществ
7. Получение физиологически активных соединений
8. Применение для биосинтеза, биотрансформации и биодеградации
9. Применение для целей технической микробиологии
10. Использование в здравоохранении, ветеринарии
11. Использование в биоэлектронике

К 90-ым годам XX в. девять процессов с использованием иммобилизованных ферментов или клеток нашли крупномасштабное применение в ряде стран мира:

1. Производство глюкозо-фруктозных сиропов из глюкозы с использованием иммобилизованной глюкозоизомеразы.

2. Разделение рацемических смесей аминокислот с использованием иммобилизованной аминоацилазы.

3. Производство оптически активных D-аминокислот из аминокислот с использованием иммобилизованной гидантоиназы.

4. Синтез L-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты с использованием иммобилизованных микробных клеток, содержащих аспартазу.

5. Синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты с использованием иммобилизованных микробных клеток, содержащих фумаразу.

6. Ферментативная модификация антибиотиков с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы.

7. Получение глюкозо-галактозных сиропов из молочной сыворотки с использованием иммобилизованной лактозы.

8. Получение диетического безлактозного молока с использованием иммобилизованной лактозы.

9. Получение глюкозо-фруктозных спиртов из сахарозы с использованием иммобилизованной инвертазы.

Ряд процессов находятся в стадии отработки и обсуждения целесообразности их крупномасштабного применения. К ним в первую очередь относятся:

1. Получение глюкозы из частичных гидролизатов крахмала с использованием иммобилизованной глюкоамилазы.

2. Получение глюкозы и (или) этанола из целлюлозы с использованием связанной целлюлазы.

В технологическом плане преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с иммобилизованными ферментами и свободными клетками подобны отмеченным ранее:

– удешевление биокатализатора вследствие отсутствия необходимости выделения индивидуальных ферментов;

– возможность осуществления многоступенчатых процессов, в т. ч. тех, при которых требуется регенерация кофакторов;

– сохранение естественного микроокружения и конформационной стабильности ферментов внутри клеток и, следовательно, более высокого выхода по активности ферментов;

– возможность реактивировать иммобилизованные клетки (например, меняя состав питательной среды);

– возможность увеличения активности биокатализатора на основе иммобилизованных клеток за счет выбора фазы роста клеток перед иммобилизацией.

Иммобилизованные клетки можно использовать практически во всех известных сегодня биотехнологических процессах для получения ценных продуктов.

Мы не будем в деталях рассматривать все имеющиеся к настоящему времени технологические процессы, но на ряде примеров, тем более, что появились разработки их проведения с участием иммобилизованных клеток, остановим свое внимание.

Получение спиртов и кетонов. В настоящее время идет переоценка сырьевых ресурсов, вместе с этим происходит и переоценка возможностей применения биокатализаторов.

Растительная биомасса (лигноцеллюлоза), отходы промышленной или с/х переработки могут быть превращены в этанол, бутанол, ацетон и др. продукты путем прямой конверсии с помощью микроорганизмов. В этом случае применяются микроорганизмы, которые используют целлюлозу и гемицеллюлозу в качестве источника углерода (например, бактерии рода *Clostridium*). Но медленная скорость этих процессов и малый выход целевых продуктов затрудняют их внедрение в широкую промышленную практику.

Растительная биомасса, в первую очередь древесная, выращиваемая на специальных плантациях, а также отходы и вторичные продукты сбора и переработки древесины, лесохимической, льноперерабатывающей и др. отраслей промышленности, с/х отходы, муниципальные отходы в результате кислотного или ферментативного гидролиза превращаются в сахара (глюкозу и ксилозу). Глюкоза может быть получена также путем ферментативного гидролиза крахмального сырья, основой которого служат зерновые культуры и картофель. Еще одним источником сахаров (фруктозы) является инулин, содержащийся в топинамбуре. Фруктоза получается гидролизом инулина при использовании фермента инулиназы. Сахара содержатся в мелассе – вторичном продукте сахарной промышленности (остается после кристаллизации сахарозы).

Сахара являются углеродным субстратом для широкого круга микроорганизмов, использование которых в биотехнологии позволяет получить множество разнообразных продуктов как тонкого, так и тяжелого микробиологического синтеза.

Весьма важной задачей тяжелого микробиологического синтеза в первую очередь является получение топливного этанола. Необходимость существенного расширения производства этанола связано с его применением в качестве моторного топлива. Этанол чаще используется в смесях с бензином (газохол), однако после модификации двигателей его можно использовать и в чистом виде.

Наиболее развито производство топливного этанола в Бразилии, богатой запасами растительной биомассы, но не имеющей месторождений нефти и удовлетворяющая при этом 90 % транспортных потребностей за счет газохола.

Интересная идея применения этанола реализуется в США. Этанол используется в виде 5 % смеси с бензином вместо тнтраэтилсвинца, что улучшает экологическую ситуацию, т. е. предотвращает загрязнение среды соединениями свинца, выбрасываемы с выхлопными газами.

Из этанола можно осуществить химический синтез этилена (далее полиэтилена), а также бутадиена (далее каучука). Кроме того, с помощью специальных катализаторов (цеолитных) из этанола можно получить углеводороды – аналоги бензина.

Перспективы увеличения производства этанола безусловно связаны с широким применением иммобилизованных клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и др. дрожжей сахаромицетов, сбраживающих лактозу (этанол из отходов переработки молока) и др. бактерий.

Если для промышленных процессов на основе свободных клеток дрожжей производительность по этанолу равна 1–10 г/л·ч и время полного

сбраживания около 5–6 ч при концентрации сахаров 5–10 %, то для иммобилизованных дрожжей эти параметры составляют примерно 50 г/л·ч, 1 ч и 15–30 %, а для иммобилизованных бактерий производительность увеличивается до 100 г/л·ч, хотя концентрация сахаров не превышает 15 %. Важно отметить, что эксплуатация иммобилизованных биокатализаторов длится в ряде случаев до 12 месяцев.

Первое в мире опытно-промышленное получение этанола (сырье – 15 % раствор тростниковой мелассы) с помощью иммобилизованных дрожжей осуществлено в Японии (производительность по этанолу – 20 г/л·ч. Другая японская фирма с такими же иммобилизованными клетками получает в сутки 2 400 л этанола (субстрат – 20 % раствор глюкозы).

Получают и другие продукты относящиеся к упомянутому классу соединений. Так, глицин получают, используя также иммобилизованные клетки *Sacharomyces cerevisiae*.

n-Бутанол, изопропанол и ацетон получают из сахаров с помощью бактерий *Clostridium sp*.. Указанные вещества находят применение в качестве добавок к бензину, при производстве пластификаторов, гидравлических жидкостей, смол, пластмасс и т. д.

В настоящее время наиболее развито производство n-бутанола. Тем не менее, ферментативное производство n-бутанола сократилось, поскольку более дешево получать его из нефтехимического сырья по сравнению с крахмалом и мелассой. Но с исчерпыванием запасов нефти внимание вновь будет обращено к возможностям микробиологического производства.

Получение органических кислот. Органические кислоты и их соли широко используются в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной, химической, металлургической и др. отраслях промышленности. Многие кислоты можно производить как химическим, так и микробиологическим путем. Первый путь более предпочтителен для технических нужд, второй – 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.

Хотя свойство продуцировать различные органические кислоты широко распространено среди микроорганизмов, на практике для их получения используют специальные штаммы, не синтезирующие побочные продукты.

В настоящее время семь органических кислот производится в промышленных масштабах, причем лимонную, глюконовую, кетоглюконо-

вую, итаконовую и яблочную кислоты получают только микробиологическим путем, а молочную и уксусную – химическими и микробиологическими способами.

Хорошие результаты по технологическому применению иммобилизованных клеток продемонстрированы при получении яблочной кислоты из фумарата. В 1974 г. японская фирма приступила к промышленному выпуску яблочной кислоты с помощью иммобилизованных клеток *Brevibacterium* разных видов. В итоге появилась возможность с помощью однократно приготовленной партии иммобилизованного биокатализатора получить до 100 т яблочной кислоты (в последующее время ежегодно производится до 180 т). Продолжительность функционирования иммобилизованных клеток составляет около 60 суток.

С помощью иммобилизованных микроорганизмов налажено получение глюконовой кислоты (продолжительность функционирования иммобилизованных клеток достигает 200 дней, продуктивность 10 г/л·ч).

Получение аминокислот. Растения и микроорганизмы способны сами синтезировать все нужные им аминокислоты, у человека синтезируется лишь 12 из 20 аминокислот, необходимых для жизнедеятельности. Восемь должны поступать с пищей и получили название незаменимых: валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан.

Аминокислоты используют в качестве вкусовых добавок, в парфюмерной, фармацевтической промышленностях и т. д.

Микробиологическому синтезу наряду с другими способами (химические, ферментативные методы) аминокислот в настоящее время отдается предпочтение, причем широко используются иммобилизованные клетки. С наибольшим успехом последние применяются при получении L-аспаргиновой кислоты или фумарата аммония. Процесс основан на использовании иммобилизованных клеток *E. coli*.

Промышленный процесс получения L-аланина и L-аспаргиновой кислоты на основе иммобилизованных клеток *Pceudomonas docunhae* основан японской фирмой.

Ведутся лабораторные разработки по получению иммобилизованных клеток – продуцентов других аминокислот: аргинина, триптофана, фенилаланина и т. д.

Получение витаминов. Витамины получают как с помощью химического синтеза, так и микробиологическим путем. Иммобилизованные клетки микроорганизмов для получения витаминов и промежуточных продуктов их синтеза опробованы пока только на лабораторном уровне.

Получение антибиотиков. Применение иммобилизованных биокатализаторов позволило достичь больших успехов в области получения антибиотиков. Важность и масштабы производства антибиотиков обусловлены их применением в медицине и ветеринарии как противомикробных и противоопухолевых препаратов.

Иммобилизованные клетки применяют как для биосинтеза собственно антибиотиков (в качестве вторичных метаболитов), так и для получения полусинтетических антибиотиков. Например, существенная доля 6-аминопенициллановой кислоты в России выпускается с помощью иммобилизованных микроорганизмов. Аналогично, в промышленном масштабе указанную кислоту получают в Японии (в обоих случаях иммобилизуют клетки *E. coli*).

Получение углеводов. Производство разнообразных углеводов: моно-, ди-, олигосахаридов и их производных, а также полисахаридов является важной биотехнологической проблемой, решаемой с помощью иммобилизованных клеток (о получении глюконовой кислоты и некоторых других углеводах мы уже говорили). Получаемые глюкозофруктозные смеси применяются при производстве тонизирующих напитков, мороженого, кондитерских и хлебобулочных изделий, консервированных фруктов и т. д.

В качестве биокатализаторов для производства этих сиропов используют иммобилизованную глюкозоизомеразу или микробные клетки, обладающие глюкозоизомеразной активностью. Использование иммобилизованных клеток, как показала практика, более экономично вследствие высокой стабильности внутриклеточного фермента и отсутствия необходимости его предварительного выделения.

Важную роль играют процессы микробиологической окислительной или восстановительной трансформации углеводов. Например, к окислительным процессам относится превращение глицерина в диоксиацетон (используется для придания изделиям из целлюлозных волокон несминаемости, устойчивости и т. д.; производные применяются как консерванты, фунициды и др.). Известны методы реализации процесса с помощью иммобилизованных клеток. Большое практическое значение имеют процессы гидролиза лактозы, сахарозы, рафинозы и целлобиозы.

Гидролиз лактозы с получением глюкозы и галактозы и гидролиз сахарозы с получением глюкозы и фруктозы являются хорошими примерами использования иммобилизованных биокатализаторов.

Кроме того, лактоза содержится в молоке и молочной сыворотке, причем часть людей не может употреблять молоко именно из-за наличия

в нем лактозы. Технология гидролиза лактозы основана на применении иммобилизованных грибных или дрожжевых ферментов. Тем не менее уже созданы промышленные установки для гидролиза лактозы с помощью иммобилизованных клеток, обладающих β-галактозидазной активностью (*Bacillus sp*.).

Инвертный сахар (почти эквивалентная смесь глюкозы и фруктозы) получают из сахарозы с помощью иммобилизованного фермента инвертазы на промышленных установках в России и США.

Рафиноза, или галактозилсахароза, является наиболее распространенным после сахарозы олигосахаридом, встречающимся в свободном виде в сахарной свекле и других растениях (при ферментативном гидролизе рафинозы образуется галактоза и сахароза). Американская компания использовала для превращения рафинозы иммобилизованный биокатализатор.

Гидролиз целлобиозы осуществлен иммобилизованными микроорганизмами с целлобиозной активностью.

К микробным продуктам, синтезируемым в больших количествах, относятся полисахариды – декстраны, маннаны, ксантаны. Для их получения используются, как правило, свободные клетки. Однако имеется опыт применения иммобилизованных клеток.

Декстраны служат заменителями плазмы крови, модифицированные декстраны используются в медицине, поперечно сшитые декстраны (сефадексы) применяются в качестве молекулярных сит для гельфильтрации. Молекулы декстранов построенные из остатков глюкозы, имеют небольшое количество ветвлений.

Ксантаны – это смолы, состоящие из остатков глюкозы, манозы 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.

Получение микробных ПАВ. МПАВ используются в различных областях. Но перспективы их использования связаны с проблемами утилизации и окисления микроорганизмами углеводородов нефти. МПАВ – эмульгаторы могут быть использованы в качестве детергентов (моющих средств) для очистки нефтеналивных емкостей, т. к. они более биодеградабельны по сравнению с синтетическими, для очистки морских нефтяных загрязнений, в реках и почвах и т. д. Кроме того, введение микроор-

ганизмов-продуцентов ПАВ повышает отдачу нефтеносных пластов. В последнем случае речь идет о жизнедеятельности закрепленных микроорганизмов на поверхности твердых частиц или жидкой пленке. Положительный опыт такого применения уже имеется.

Получение ферментов. В зависимости от области применения к ферментам предъявляют различные требования: чистота, состав, источник получения. Наиболее доступным и практически неограниченным источником ферментов в промышленном масштабе являются микроорганизмы, из которых возможно выделить любые из известных ферментов, создать условия для регуляции их биосинтеза, причем некоторые ферменты (целлюлазы, гемицеллюлазы) могут быть получены только с помощью микроорганизмов.

С точки зрения применения иммобилизованных клеток речь может идти в первую очередь о получении внеклеточных ферментов, среди которых промышленно важными являются амилазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, пектаза, лактаза, липаза, протеаза. Внутриклеточные ферменты – глюкооксидаза, каталаза, инвертаза и др., выделение которых требует разрушения клеточной стенки микроорганизма-продуцента, получать с помощью иммобилизованных микроорганизмов нецелесообразно.

Примеры ферментов, полученных с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов даны в таблице (4.2.)

Таблица 4.2

Примеры ферментов, полученных с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов

Фермент	Субстрат	Микроорганизмы	Носитель
α-Амилаза	Мясной экстракт, растворимый крахмал	Bacillus sabtilis	ПААГ
α-Амилаза	Дрожжевой экстракт, растворимый крахмал	B. amyloliquefacieus	Амберлит, каррагинан
α-Амилаза	Дрожжевой экстракт, триптон	E.coli	Пенополиуретан, пеносиликон
Целлюлазы	Целлобиаза, целлюлаза	Clostridium thermocellum	Криогель, поливиниловый спирт,
Целлюлазы	Жидкая питательная среда	Sporotrichum sp.	Полиэфирные волокна
Лигнин-пероксидаза	Глюказа	Phanerochaete chrysosporium	Нейлоновая ткань, полиуретан
Протеаза	Жидкая питательная среда	B. licheniformis	Анионообменная смола, ПААГ и др.

Период непрерывного функционирования установок по биосинтезу приведенных ферментов составляет обычно 5–15 суток. В некоторых

случаях, например для лигнинпероксидазы и полигалактуразы, выход ферментов в реакторе увеличивается в 5–10 раз по сравнению с их биосинтезом с помощью свободных клеток. Этот эффект связан с увеличением удельного содержания клеток в реакторе при применении в иммобилизованном виде.

Получение алкеноксидов. На примере алкеноксидов (этилена и пропилена) можно проиллюстрировать возможности иммобилизованных клеток для получения веществ, служащих сырьем в производстве полимеров, лакокрасочных покрытий и клеев. Химический синтез этих веществ является дорогостоящим и энергоемким.

Относительно недавно получение оксидов алкенов было предложено осуществить с помощью системы, состоящей из оксиредуктаз микроорганизмов – хлорпероксидазы, хлоргидринэноксидазы и глюкозо-2 оксидазы. В данном случае вместо трех биокатализаторов (ферментов) необходим один –клетка. Дополнительное упрощение состоит в реализации процесса на основе иммобилизованных клеток. Используются метанофорные бактерии и др.

Продуктивность процессов получения алкеноксидов составляет обычно 0,2–0,6 г на 1 г иммобилизованных клеток, период непрерывного функционирования реактора – до 10 суток.

Утилизация отходов. Применение иммобилизованных клеток для утилизации отходов – является весьма злободневной и острой проблемой. Большую роль в очистке воды играют микроорганизмы – деструктуры пестицидов, ПАВ, нефтяных загрязнений, других ксенобиотиков.

В основе биотехнологии очистки сточных вод лежат два подхода: в одном используют аэробные, в другом – анаэробные микроорганизмы. В аэробной очистке применяют активный ил (биопленку), представляющий собой скопление разнообразных микроорганизмов, видовой состав которых регулируется конкретными условиями.

В большинстве развитых стран мира используется аэробная очистка.

Аэробный способ очистки сточных вод основан на использовании двух систем: аэротенка и вторичного отстойника. Аэротенк – это открытое сооружение, через которое пропускается аэрируемая сточная вода и суспензия активного ила. В отстойнике – осуществляется доочистка воды. Применение активного ила относится в данной технологии к методам, связанным с использованием иммобилизованных клеток.

Однако существуют промышленные методы использования активного ила, где иммобилизацию осуществляют в «чистом виде». В этом случае создаются биофильтры, представляющие собой проточные емко-

сти с циркуляцией. Клетки прикреплены к поверхности пористого носителя (керамика, щебень, стекловолокно, синтетическое волокно и т. д.).

Глубина и скорость очистки сточных вод в биофильтрах выше, чем в аэротенках в 10–15 раз. Сточные воды перед биофильтром должны быть очищены от взвешенных частиц для предотвращения их быстрого забивания и заиливания. Процессы биологической очистки иммобилизованными клетками ускоряются по сравнению со случаем использования свободных клеток от 2 до 20 раз. В лучших случаях время очистки составляет несколько часов. Содержание органических примесей в стоках уменьшается от 10 до 1000 раз.

Анаэробные способы очистки применяются, как правило, для отработки высококонцентрированных стоков и осадков, содержащих большое количество органических веществ. Процесс брожения осуществляется в метантенках.

Анаэробное превращение органических веществ осуществляется в четыре этапа: фаза гидролиза (расщепление) биополимерных молекул (белков, липидов, полисахаридов и др.) на более простые; фаза ферментации мономеров до низших кислот и спиртов, аммиака, сероводорода; ацетогенная фаза (образование H_2, CO_2, ацетата); последняя метаногенная фаза ведущая к образованию конечного продукта – метана. Кроме метана, продуктом является CO_2 (их смесь образует биогаз). Получение и использование метана при сбраживании органических отходов, наряду непосредственно с очисткой, является одним из наиболее перспективных путей решения экологических и энергетических проблем.

Эффективность действия метантенков с иммобилизованными клетками в 2,5–3 раза выше, чем со свободными. Недостатком процесса с иммобилизованными клетками является то, что, они приспособлены для переработки растворимой органики. Поэтому они удобны для обработки сточных вод предприятий пищевой промышленности (молокоперерабатывающих, спиртовых заводов и др.).

Отдельной задачей, весьма важной, является биодеградация сложных смесей углеводородов и их производных в средах, загрязненных нефтью. Сточные воды нефтяной промышленности обычно очищают биологическим способом. Очистку морской поверхности также проводят путем ее биодеградации. Микроорганизмы в этих условиях находятся в иммобилизованном состоянии на поверхности капель.

Созданы опытные установки колонного типа с иммобилизованными клетками – деструктурами, через которые пропускают загрязненную нефтепродуктами воду.

Еще одна острая экологическая проблема – удаление из воды металлов (кадмия, свинца, цинка, урана, плутония). Биотехнологический принцип решения этой проблемы состоит в применении иммобилизованных клеток, аккумулирующих эти металлы.

Промышленные установки по извлечению металлов из источников вод функционируют в США, Венгрии.

Очистка воды является чрезвычайно крупномасштабным процессом, где необходимость и возможность применения иммобилизованных клеток полностью доказана. Насущной задачей является использование биотехнологических подходов в процессах отделения и концентрирования металлов из руд, которая относится к области биотехнологии. Кроме этого, к этой области относится обогащение и переработка руд и угля, экстракция остаточных количеств нефти из иссякающих месторождений.

Биогеотехнология. В основе биотехнологии извлечение металлов из руд, концентратов, горных пород лежат химические процессы, осуществляемые микроорганизмами или их метаболитами. В большинстве случаев клетки микроорганизмов используют в иммобилизованном состоянии.

Для выщелачивания металлов из сульфидных и смешанных руд и концентратов, из отходов пирометаллургического производства и удаления серы из угля используют *Thiobacillus ferroxidans* и др.

Микроорганизмы (бактерии, дрожжи) и их метаболиты используют также для извлечения химических элементов из силикатных и карбонатных руд, для выщелачивания золота.

К процессам, непосредственно катализируемых бактериями относится окисление железа:

$$4FeSO_4 + O_2 + 2H_2SO_4 \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 2H_2O$$

и окисление серы:

$$S_8 + 12O_2 + 8H_2O \rightarrow 8H_2SO_4$$

Ряд минералов окисляется некоторыми выщелачивающими микроорганизмами, например пирит:

$$4FeS_4 + 15O_2 + 2H_2O \rightarrow 2Fe_2(SO_4)_3 + 3H_2SO_4$$

и фалерит:

$$ZnS + 2O_2 \rightarrow ZnSO_4$$

Ион трехвалентного железа служит окисляющим агентом, переводящим в раствор многие минералы, например халькоцит:

$$CuS + 2Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow 2\ CuSO_4 + 4FeSO_4 + S^o$$

и уранит:

$$4UO_2 + Fe_2(SO_4)_3 \rightarrow 4UO_2SO_4 + 2FeSO_4$$

Выщелачивание, происходящее при участии иона трехвалентного железа, который образуется в результате жизнедеятельности бактерий, называют «непрямой» экстракцией.

В настоящее время бактериальное выщелачивание, известное как биогидрометаллургия или биоэкстрактивная металлургия, применяют в промышленных масштабах для перевода в растворимую форму меди и урана (выщелачивание отвалов и бедных руд); используют ацидофильные биобактерии.

Промышленное применение нашел также процесс удаления серы из угля, интенсификация добычи нефти.

Процесс удаления серы из угля предусматривает предварительную обработку бактериями *Thiobacillus ferrooxidans*, приводящую к окислению значительной доли серы (в виде пирита) до серной кислоты (60–98 % за 7–10 суток). Обработку угля проводят открытым способом, но ведется поиск методов введения микроорганизмов в пласты угля.

Интересен способ использования иммобилизованных микроорганизмов для увеличения добычи нефти. Около 50 % добываемой традиционными методами нефти остается в капиллярах пород месторождений. Интенсифицировать добычу нефти можно микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности. С этой целью в скважину вводят несколько сот метров посевного материала, содержащего раствор мелассы, что приводит к увеличению выхода нефти. Этот эффект обусловлен влиянием продуктов жизнедеятельности микроорганизмов: газы (CO_2, CH_4, N_2, H_2) уменьшают вязкость и увеличивают давление, полисахариды (альгинат, декстран, ксантан и др.) и ПАВ (глицериды, липиды и др.) уменьшают поверхностное натяжения на фазе раздела нефть – вода, низкомолекулярные растворители (спирты, китоны) снижают вязкость, а органические кислоты (муравьиная, масляная, молочная и др.) увеличивают проницаемость пород. Выход увеличивается на 16–20 %.

Биологические методы добычи ископаемых экономически выгодны. Эти методы позволяют разрабатывать бедные и сложные по составу месторождения, осваивать глубинные места залегания, обеспечить ком-

плексную утилизацию сырья, исключить загрязнение окружающей среды элементами сырья.

Проведение анализов. На основе иммобилизованных клеток, как уже отмечали, создан ряд биоселективных электродов. В одном случае основой (датчик) служат селективные для продукта реакции электродов (см. раздел 3.5). В качестве сенсора на определенные соединения служат иммобилизованные клетки. Другой принцип анализа с помощью иммобилизованных клеток основан на использовании термисторов. Прибор с высокой чувствительностью регистрирует изменение температуры, сопровождающие метаболические процессы микроорганизмов при наличии соединения в анализируемой пробе.

Число использования иммобилизованных клеток микроорганизмов в анализе растет. Некоторые примеры приведены в табл. 4.3.

Таблица 4.3

Примеры применения иммобилизованных клеток в анализе

Микроорганизм	Носитель	Датчик	Анализируемое вещество
Azotobacter vinelandii	Диализная мембрана	NH_3 – эл.	Нитрит
Bacterium cadaveris	— // —	— // —	L-аспартат
Brevibacterium lactofermentum	Целофановая мембрана	O_2 – эл.	Сахара
Clostridium acidiurici	Диализная мембрана	NH_3 – эл.	L-серин
C. butiricum	Ацетилцеллюлозный фильтр	Pt – эл.	Муравьиная кислота
Escherichia coli	Целофановая мембрана	CO_2 – эл.	Глутаминовая кислота
Leusonostoc mesenteraides	Ацетилцеллюлозный фильтр	O_2 – эл.	Фенилаланин
Methilomonas flaqellata	— // —	O_2 – эл.	Метан
Saccharomyces cervisiae	ПААГ	термистор	Арсенат
— // —	ПААГ	— // —	Глюкоза

Следует отметить, что чувствительность анализа составляет, обычно, десятки и сотни микромолей анализируемого вещества в одном миллилитре, время анализа – несколько минут, объем анализируемой пробы – десятки микролитров.

4.6. Характеристика реакторов с иммобилизованными клетками

Системы с иммобилизованными клетками должны обеспечить технологические и экономические преимущества по сравнению с традици-

онными процессами на основе свободных клеток. Важную роль в реализации таких преимуществ играет аппаратурное обеспечение процессов с иммобилизованными клетками, т. е. конструкции реакторов, где осуществляются биокаталитические процессы.

Система с ограничивающей ее поверхностью и протекающими в ней биохимическими процессами называется реактором (биореактором). Реакторы могут работать в периодическом режиме, периодическом режиме с доливом субстрата, полупериодическом и непрерывном проточном режимах.

Высокая концентрация иммобилизованных клеток в рабочем объеме требует высоких скоростей массопередачи, особенно для аэробных процессов. В этих условиях необходимо обеспечение клеток кислородом, который является лимитирующим в данном случае фактором скорости образования целевого продукта. Это приводит к необходимости интенсивного перемешивания среды в рабочем объеме.

Механическая прочность иммобилизованных клеток часто недостаточна, поэтому ее следует компенсировать разработкой реактора соответствующей конструкции. Исходя из этого, реакторы с иммобилизованными клетками имеют свои особенности, их классифицируют по относительному движению частиц твердой фазы (биокатализатора). Выделяют два типа: с отсутствием или наличием движения твердой фазы. Это довольно условная классификация.

Рассмотрим некоторые типы реакторов (рис. 4.1).

Реактор периодического действия: представляет собой емкость с мешалкой, в которую помещен биокатализатор и раствор субстрата (питательная среда).

После окончания процесса, иммобилизованные клетки отделяют от продуктов центрифугированием или фильтрацией, и цикл начинается вновь.

Недостатки: низкая производительность, большая потеря биокатализатора (хотя для свободных клеток наиболее распространен).

Проточный реактор с перемешиванием отличается тем, что после каждого каталитического цикла не происходит отделение биокатализатора, субстрат периодически доливается, периодически отделяются продукты. Эффективность выше, чем у периодического.

Проточные реакторы могут иметь неподвижный или перемешиваемый слой катализатора. В первом реакторе иммобилизованные клетки упакованы в колонны, образуя неподвижный слой. Субстрат проходит через слой биокатализатора сверху или снизу.

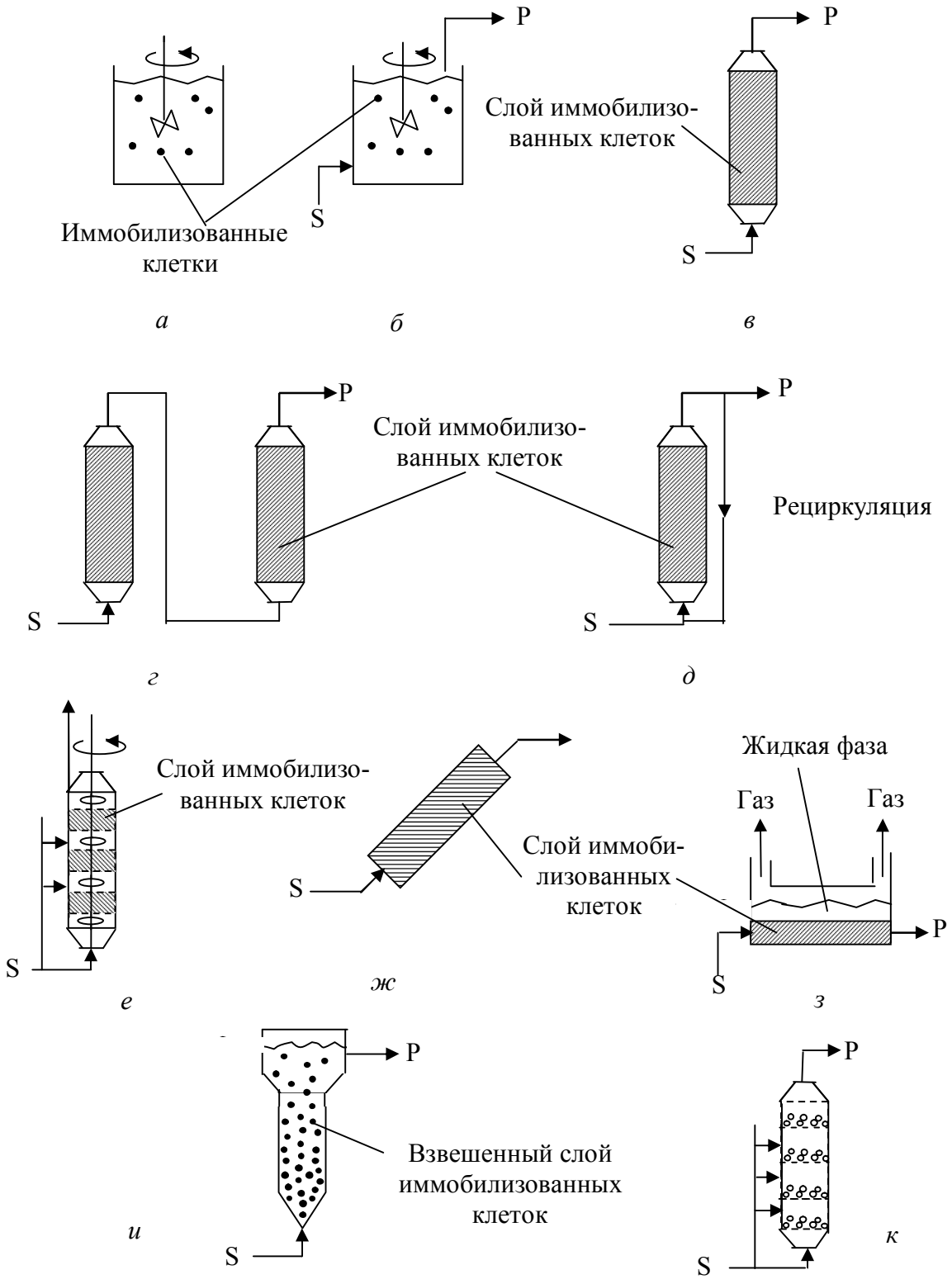


Рис.4.1. Типы реакторов: *а* – периодического действия; *б* – проточный с перемешиванием; *в* – с неподвижным слоем (проточный); *г* – серия реакторов с неподвижным слоем; *д* – с рециклом; *е* – секционный с неподвижным слоем; *ж* – наклонный; *з* – горизонтальный с неподвижным слоем; *и* – проточный с взвешенным слоем; *к* – секционный проточный с взвешенным слоем

Концентрация субстрата максимальна на входе, а продуктов – на выходе из реактора. Реакторы такого типа нашли промышленное применение, в частности для очистки сточных вод, получения уксусной, яблочной аспарагиновой кислот и др. Из реакторов первого типа следует отметить еще реактор с неподвижным слоем с рециркуляцией.

Проточные реакторы с перемешиваемым слоем биокатализатора могут быть с взвешенным слоем, а также с движущимся фиксированным слоем. Реакторы с взвешенным слоем характеризуются быстрым поступлением субстрата снизу для поддержания взвешенного состояния биокатализатора. Но при этой скорости поступления не должны уноситься частицы с входящим потоком жидкости. В данном случае реализуется режим, промежуточный между полным перемешиванием (как в проточном растворе с перемешиванием) и отсутствием перемешивания в неподвижном реакторе.

Относительная скорость движения жидкости и гранул в реакторе со взвешенным слоем невелика, что невыгодно с точки зрения обеспечения биокатализатора субстратом. Более удобными считаются реакторы с движущимся фиксированным слоем. Реакторы с упорядочным расположением биокатализатора бывают пластинчатые, кассетные, с вращающимися дисками.

При использовании иммобилизованных живых клеток критическим фактором является диффузия газов по сравнению с другими компонентами реакции. Газ, выделяемый живыми клетками, может захватывать частицы (иммобилизованные клетки) и вызывать их всплывание, что приводит к снижению каталитической активности биокатализатора. Для избежания этого явления реактор модифицируется. Например, в колончатом реакторе на расстоянии 2–4 см ниже выпускного патрубка раствора устанавливается металлическая сетка с соответствующим размером ячеек. Сетка жестко прикрепляется к стенкам реактора для предотвращения ее поднятия.

Мембранные реакторы – представляют собой аппарат, в котором одновременно осуществляется два процесса – управляемое культивирование свободных организмов в объеме реактора и удаление продуктов (и замена их субстратом) с помощью мембранного модуля.

По типу мембраны разделяются на фильтрационные и диализные: в первом случае массоперенос через мембрану осуществляется за счет разницы давления по обеим сторонам мембраны; во втором, за счет градиента концентраций.

Материал фильтрационных мембран может быть различным – керамические и металлокерамические фильтры, полимерные матрицы, ионообменные мембраны.

Разработаны мембранные реакторы, которые характеризуется прикрепленными клетками к мембране или находящимися внутри самой мембраны. Чаще всего для этого используют в качестве мембраны полые волокна, на поверхности которых закреплены клетки и через них поступает субстрат, и отводятся продукты.

Мембранные реакторы применяют для получения ферментов, антибиотиков, витаминов, аминокислот, органических кислот, этанола, ацетона и т. д.

Мембранные реакторы относятся к оборудованию нового поколения.

Глава 5. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Изолированные растительные клетки, как и клетки микроорганизмов, можно культивировать в искусственных условиях. Культуры растительных клеток и тканей давно уже используются для получения биопрепаратов. Из известных природных соединений более 90 % можно обнаружить в высших растениях.

Культивируемые растительные клетки тотипотентные, т. е. в них может экспрессироваться вся генетическая информация, и, следовательно, любое вещество, находящееся в интактном растении, можно получить, культивируя клетки данного растения.

В настоящее время многие из промышленно важных соединений, используемых в фармацевтической, пищевой, парфюмерной и т. д. отраслях, выделяют из тканей растений. Эти вещества имеют сложное химическое строение, и поэтому их трудно получить другими способами.

Для получения таких соединений используют культуру растительных клеток; за последнее десятилетие в этой области достигнуты значительные успехи. Так около 20 лет назад в Японии (1983) был впервые внедрен промышленный способ получения природного соединения (шиконина), основанный на культивировании растительных клеток.

Однако для промышленного использования растительных клеток с целью получения широкого спектра органических соединений необходимо решить ряд проблем, а именно учитывать характерный для растительных клеток медленный рост, способность к агрегации, низкий выход, генетическую нестабильность и т. д. – все эти факторы затрудняют их использование в крупных масштабах.

Для устранения указанных недостатков в последние годы проводятся исследования по использованию иммобилизованных растительных клеток.

Первое сообщение об иммобилизации растительных клеток в гранулированных полимерах появилось в 1979 г. В последние годы высказывается мнение, что с помощью иммобилизации можно частично или даже полностью преодолеть ряд указанных затруднений, препятствующих крупномасштабному использованию растительных клеток.

За счет чего устраняются недостатки при иммобилизации растительных клеток?

Во-первых, за счет более длительной стационарной фазы, наблюдаемой у иммобилизованных растительных клеток, можно решить проблемы, связанные с замедлением роста клеток (наработкой биомассы).

Во-вторых, с помощью иммобилизации можно частично преодолеть нежелательные последствия процесса агрегации клеток за счет получения относительно гомогенного препарата гранул геля, содержащих клетки.

В-третьих, у иммобилизованных растительных клеток, как уже отмечалось, наблюдается удлинение стационарной фазы, а наработка продукта происходит тогда, когда клетки находятся в неделящемся состоянии, т. е. в период наименее вероятного возникновения генетических изменений.

В-четвертых, проблема низкой механической устойчивости растительных клеток решается путем включения клеток в защитную полимерную матрицу.

Одно из преимуществ иммобилизованных растительных клеток – это возможность индуцированной экскреции веществ, накопленных внутри клетки с помощью периодической пермеабилизации. При этом биомассу можно использовать многократно в течение достаточно длительного времени.

5.1. Методы определения жизнеспособности иммобилизованных растительных клеток

Для сохранения биосинтетической активности большое значение имеет жизнеспособность клеточных препаратов. Для ее определения используют ряд методических приемов.

Окрашивание. Окрашивание, в частности флуоресцеиндиацетатом (ФДА), часто используют для определения жизнеспособности клеток. После адсорбции ФДА клетками при наличии эстеразной активности он деацетилируется и становится флуоресцирующим. Окрашенные клетки рассматривают с помощью микроскопа, снабженного УФ-источником света.

Отношение клеток, находящихся в данный момент времени на какой-либо стадии митоза, к их общему числу в популяции, выраженное в процентах, называют митотическим индексом (МИ). По его изменению в течение инкубации можно судить о жизнеспособности клеток. Удобным красителем для окраски хромосом после фиксации является карбол-фиксин. Зависимость митотического индекса от времени инкубации

для суспендированных в среде и иммобилизованных растительных клеток представлена на рисунке 5.1.

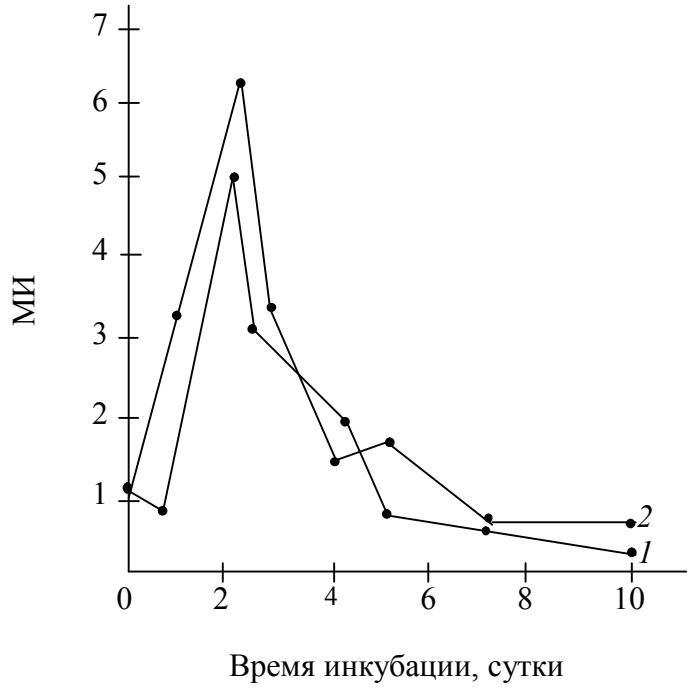


Рис. 5.1. Митотический индекс для суспендированных (*1*) и включенных в агорозный гель (*2*) клеток *Catharanthus roseus*

Дыхание – критерий жизнеспособности клеток. Измерения проводят в течение инкубации через различные промежутки времени, например, с помощью кислородного электрода Кларка.

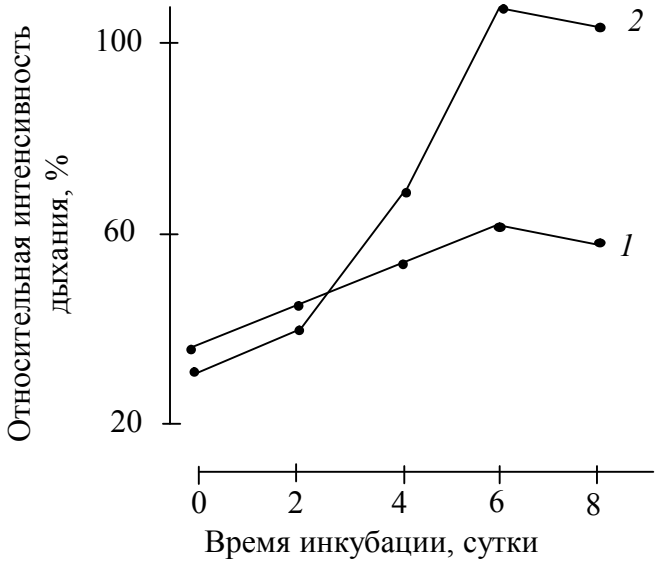


Рис.5.2. Дыхание клеток *C. roseus,* включенных в альгинатный гель (*1*), и тех же клеток после растворения полимера (*2*)

Клетки, суспендированные в среде (сырой вес 100–200 мг), или соответствующее количество иммобилизованных клеток (общий объем 5 мл) инкубируют при 25 ^{0}С. Регистрируют потребление кислорода, определяют сухой вес клеток и рассчитывают удельную скорость дыхания (рис. 5.2).

Очень часто дыхание иммобилизованных клеток менее интенсивно, чем дыхание такого же количества суспендированных клеток, что объясняется диффузионными затруднениями внутри полимерной сетки.

Рост и деление клеток. Увеличение числа и веса клеток является хорошим показателем их жизнеспособности. Однако в культуре число растительных клеток определить очень трудно, поскольку клетки растут в виде агрегатов различных размеров. Гораздо проще определить вес клеток (сырой или сухой) (рис.5.3).

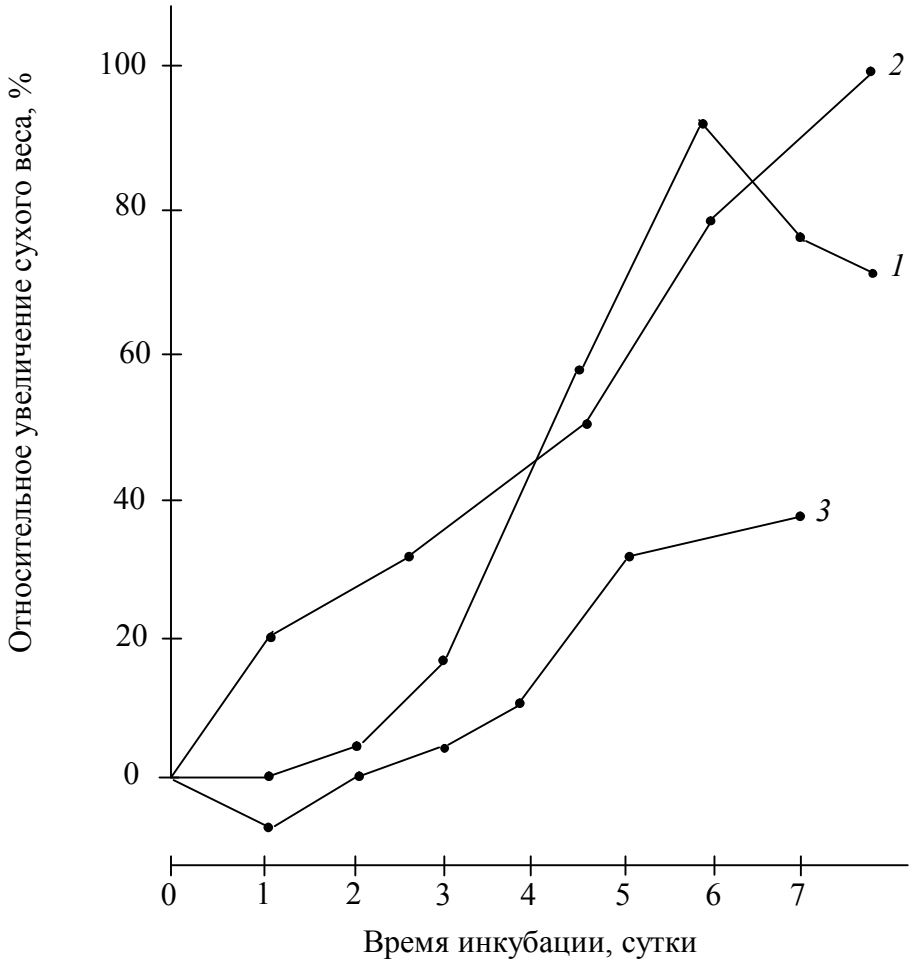


Рис 5.3. Зависимость увеличения сухого веса суспендированных (*1*), иммобилизованных в агарозном (*2*) и альгинатном (*3*) гелях клеток сои от времени инкубации

Сухой вес иммобилизованных клеток рассчитывается, исходя из предположения, что вес полимерной матрицы во время инкубации не изменяется.

Метод измерения скорости деления, несмотря на его длительность, выгодно отличается от предыдущего, поскольку позволяет оценить способность иммобилизованных клеток воспроизводству. Критерием жизнеспособности служит коэффициент деления – отношение числа проросших клеток к числу посеянных.

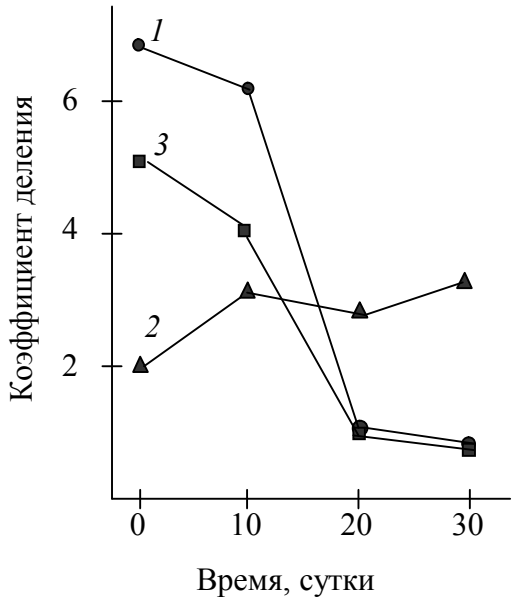


Рис.5.4. Изменение коэффициента деления клеток *Chlorella* в процессе хранения в темноте при 4 ^{0}C: *1* – контроль, *2* и *3* – клетки, иммобилизованные в Са-альгинатном геле и агаре соответственно

Иммобилизация клеток *Chlorella* оказывает существенное влияние на способность к делению после длительного хранения в темноте при низких температурах (рис. 5.4). В то время как коэффициент деления иммобилизованных в агаре и суспендированных клеток через десять дней хранения начинал снижаться к двадцатому дню, то при иммобилизации в Ca^{2+}-альгинатном геле сохранялся на стационарном уровне в течение всего времени хранения.

Определение pH. О жизнеспособности растительных клеток можно судить по скорости защелачивания среды в ответ на освещение. В этом случае об интактности клеток судят по величине сдвига pH незабуференной среды при переходе от темноты к освещению. Степень подщелачивания среды в результате активизации процесса фотосинтеза и поглощения углекислоты при включении света указывает на уровень жизне-

способности клеток. Изменения pH среды легко регистрируется pH-электродом.

Несмотря на то, что концентрация клеток в иммобилизованном препарате практически не изменилась на протяжении всего периода хранения, в первые четыре дня скорость подщелачивания среды резко возрастала, в то время как в суспензии в этот период – не изменялась (рис. 5.5).

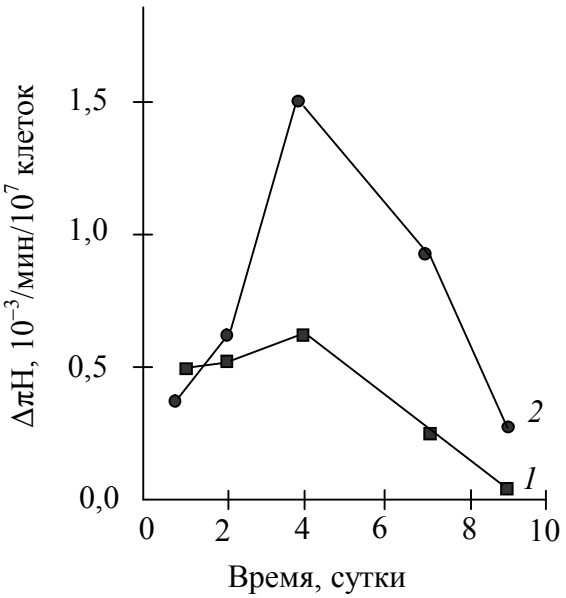


Рис. 5.5. Скорость фотоиндуцированного подщелачивания среды для клеток, хранящихся на свету при комнатной температуре: *1* – контроль; *2* – иммобилизованные клетки

В последующие дни в обоих вариантах скорость подщелачивания неуклонно снижалась, оставаясь более высокой у иммобилизованных клеток. Таким образом, иммобилизованные клетки (в альгинате кальция) поддерживают более высокий уровень метаболизма по сравнению с суспендированными.

5.2. Способность иммобилизованных растительных клеток к биосинтезу

В клетках высших растений протекает множество химических реакций, которые можно использовать для синтеза сложных органических соединений. Наряду с реакциями биотрансформации (биоконверсии) такими как гидроксилирование, метилирование и др., в растительных клетках осуществляется синтез органических соединений de novo из более простых соединений углерода.

Иммобилизованные растительные клетки, сохранившие жизнеспособность, как показано, характеризуются высокой биосинтетической активностью. Приведем некоторые примеры биосинтеза физиологически активных веществ иммобилизованными растительными клетками.

Биотрансформация (биоконверсия). К наиболее распространенным реакциям биотрансформации у растений, в первую очередь, относится реакция *12-β-гидроксилирования.* Примером может служить гидроксилирование производного дигитоксина с образованием производного дигоксина, представляющего промышленный интерес. Эту реакцию осуществляют как суспендированные клетки *Digitalis lanata* в периодическом или непрерывном режимах.

В периодическом режиме клетки *Digitalis*, иммобилизованные в альгинатном геле, могут быть использованы для гидроксилирования метилдигитоксина в метилдигоксин в течение 180 суток (если каждые трое суток гранулы геля с иммобилизованными клетками переносить в свежую среду). В данном случае время использования иммобилизованных клеток значительно превышает соответствующее время для клеток, суспендированных в среде. Следовательно, с помощью иммобилизованных клеток удается получить более высокий выход продукта на единицу биомассы.

Реакцию восстановления двойной связи можно продемонстрировать на примере синтеза различных индолсодержащих алкалоидов (аймалицин, серпентин, катартин), культивируемыми клетками *Catharanthus roseus.* Конечным ферментом биосинтеза ацмалицина является катенаминредуктаза (рис. 5.6).

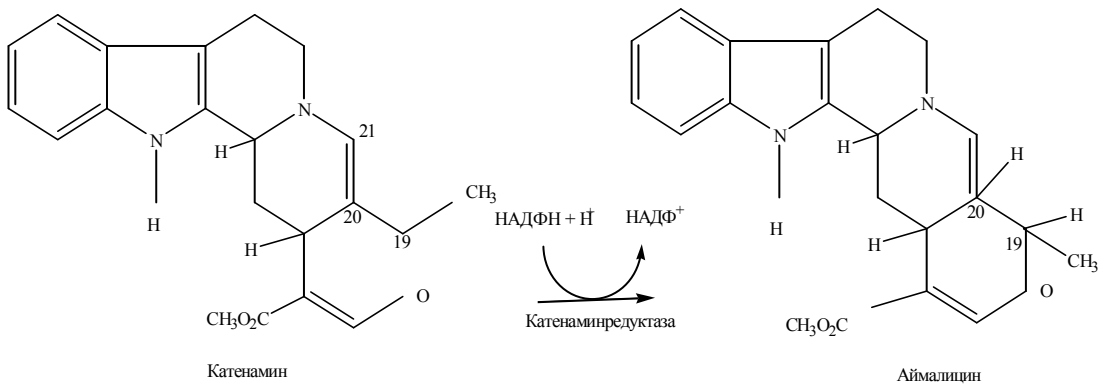


*Рис. 5.6.*Синтез аймалицина из катенамина

Для превращения катенамина в изомеры аймалицина используют клетки *C. roseus*, включенные в агарозный гель. Для лучшей экскреции клетки обрабатывают соединениями, повышающими проницаемость

клеточных мембран. Выход продукта зависит от вида используемых инкубационных сред (табл. 5.1).

Таблица 5.1

Биоконверсия катенамина в изомеры аймалицина с помощью клеток *C. roseus*, включенных в агарозный гель

Инкубационная среда	Относительный выход аймалицина, %
Полная [1)]	100
– NADPH + $NADP^+$ + изоцитрат	85
– NADPH + изоцитрат	35
– NADPH	25
– Катенамин	9

[1)] 1 г гранул геля с иммобилизованными клетками в 10 мл, 50 мМ К-фосфатного буфера с pH 7,5, содержащего 11 мкМ катенамина, 1 мМ NADPH и 28 мМ меркаптоэтанола.

Синтез из предшественников. Если для соединения известен путь биосинтеза и доступны вещества – предшественники, то его выход можно существенно увеличить, добавляя эти предшественники в питательную среду. Для указанного ранее синтеза аймалицина в клетках *C. roseus* отдаленными предшественниками этих изомеров являются триптамин и секологанин. Методика синтеза аймалицина из этих соединений сводится к следующему. Пропускают многократно через колону среду, содержащую триптамин (25 мкмоль) и секологанин (25 мкмоль), экстрагируют липофильные продукты реакции из водной фазы с помощью хлороформа и вновь подают на колону. Или просто инкубируют клетки в среде, содержащей триптамин (1,25 мкмоль) и секологанин (1,25 мкмоль), встряхивают на качалке (100 об/мин) и через 2 и 5 суток отбирают пробы и определяют содержание аймалицина (табл. 5.2).

Таблица 5.2

Синтез аймалицина из триптамина и секологанина суспендированными в среде и иммобилизованными клетками C. roseus

Препарат клеток	Относительный выход продукта, %	
	2 суток	5 суток
Суспендированные в среде	91	100
Включенные в альгинатный гель	125	176
Включенные в агарозный гель	99	114
Включенные в гель агара	81	95
Включенные в гель каррагинана	70	82

Синтез de novo. При синтезе de novo сложных органических веществ из простых органических соединений с помощью культивируемых

растительных клеток используется большая часть путей клеточного метаболизма.

В настоящее время известно лишь несколько примеров синтеза de novo сложных органических соединений с помощью иммобилизованных растительных клеток.

Можно привести два примера синтеза de novo: индолслдержащих алкалоидов и антрахинонов.

Индолсодержащие алкалоиды, такие как аймалицин и серпентин, удалось получить с помощью клеток *C. roseus*, включенных в альгинатный и полиакриламидный и другие гели (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Синтез de novo аймалицина из сахарозы клетками *Catharanthus roseus* (относительный выход продукта после 2 недельной инкубации)

Препарат	%
Суспендированные клетки	100
Включенные в альгинатный гель	140
Включенные в агарозный гель	100
Включенные в агаровый гель	88

Атрахиноны синтезируются различными культурами растительных клеток. Иммобилизованные в альгинатном геле клетки *Morinda citrifolia* синтезируют в 10 раз больше продукта, чем суспендированные в среде. Так после 22 суток инкубации количество атрахинона, синтезируемое суспендированными и иммобилизованными клетками *M. citrifolia,* составляла 1 и 9,5 нмоль на клетку соответственно.

Экскреция продукта из клеток. Очень часто вторичные продукты метаболизма накапливаются внутри культивируемых клеток (в вакуолях), что, до некоторой степени, ограничивает применение иммобилизованных растительных клеток. Одним из основных преимуществ иммобилизованных биокатализаторов является возможность их длительного использования, но это требует перехода, накопленного внутри продукта в окружающий раствор.

Внеклеточные продукты. Ряд продуктов метаболизма клеток выделяется в межклеточную среду. Эти вещества можно получать с помощью иммобилизованных клеток без особых затруднений в реакторе непрерывного действия. Так, клетки *D. lanata* (см. выше) использовали для превращения дигитоксина в дигоксин в колоночном реакторе непрерывного действия в течение 70 суток.

Внутриклеточные продукты. В ряде случаев, как уже отмечалось, вещества, накапливаемые внутри культивируемых клеток, после иммобилизации переходят в межклеточную среду (спонтанная экскреция).

Именно таким образом происходит экскреция индолсодержащих алкалоидов из иммобилизованных клеток *C. roseus*.

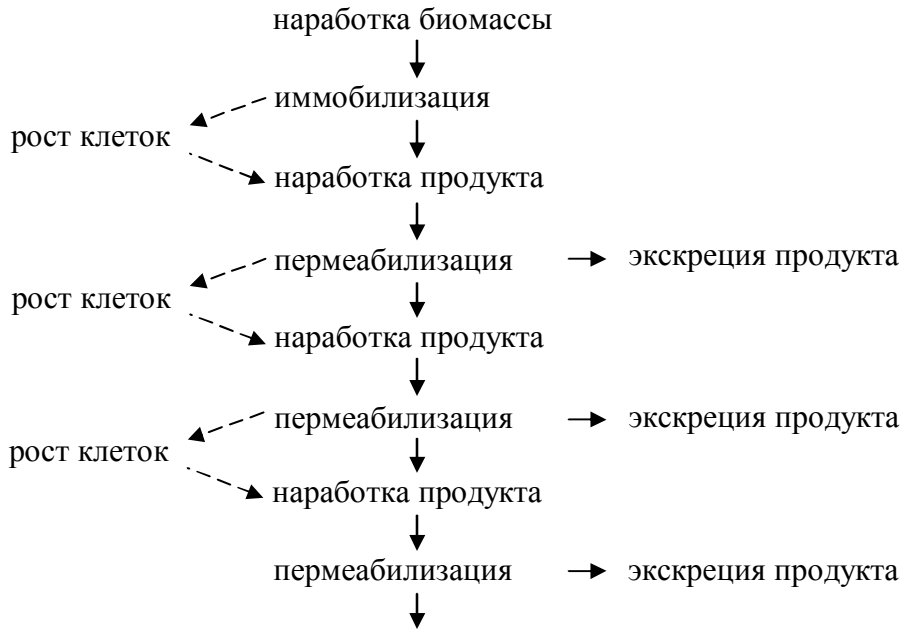


Рис. 5.7. Схема получения соединений, синтезируемых растительными клетками, с индуцируемой экскрецией продукта (стадия роста не обязательна)

Спонтанная экскреция все же встречается довольно редко. Поэтому в настоящее время разрабатываются методы, с помощью которых можно индуцировать экскрецию желаемого продукта из иммобилизованных клеток. Индукция высвобождаемого продукта повышается при обработке клеток веществами, повышающими проницаемость клеточных мембран (пермеабилизация), причем такая обработка не влияет ни на жизнеспособность, ни на биосинтетическую активность иммобилизованных клеток. В этой связи один и тот же препарат иммобилизованных клеток можно использовать для многократной наработки продукта в циклическом режиме (рис. 5.7).

Таким образом, применение иммобилизованных растительных клеток весьма обнадеживает. По-видимому, иммобилизация представляет собой перспективный метод, с помощью которого удается частично или полностью решить проблемы, связанные с использованием культур растительных тканей для получения физиологически активных органических соединений.

5.3. Особенности физиологии иммобилизованных растительных клеток

Иммобилизованные растительные клетки заметно отличаются по своим физиологическим свойствам от интактных. Выполнение к настоящему времени работы показали, что наибольшее влияние на скорость деления, фотосинтез и дыхание оказывает включение клеток в полисахаридные гели. Как отмечается, скорость роста иммобилизованных клеток в целом ниже, чем в суспензии, хотя возможная утечка клеток из матрикса затрудняет интерпретацию результатов.

Тем не менее, содержание хлорофилла в иммобилизованных клетках более высокое по сравнению со свободными, что, правда, может быть связано с частичным уменьшением освещенности в иммобилизованных препаратах. Это, как известно, может приводить к увеличению синтеза фотосинтетических пигментов. Однако, с другой стороны, отмечалось, что уровень хлорофилла в иммобилизованных клетках *Euglena* после трех месяцев хранения составлял 90 % от исходного. Правда, свободные клетки подвергались феофитинизации через 7 дней. Для клеток *Chlorella*, иммобилизованных в Са-альгинатном геле, активность ряда ферментов, участвующих в процессах фотосинтеза, и метаболизм гликолата оставались неизменными в течение 6 месяцев хранения.

Накопленные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о стабилизирующем воздействии иммобилизации в Са-альгинатном геле на хлорофилл-белковый комплекс, в частности клеток *Botryococcus*.

Изучение скорости фотосинтетического выделения кислорода выявило его увеличение втрое у иммобилизованных в Са-альгинате клеток *Botryococcus* по сравнению со свободными. В то же время у иммобилизованных в альбуминглутаральдегидальгинатном геле клетках *Scenedesmus* скорость фотовыделения кислорода была только на 5 % выше, чем в суспензии, что, возможно, объясняется токсичным влиянием глутаральдегида.

Еще один параметр физиологической активности клеток – интенсивность дыхания. Средняя скорость дыхания иммобилизованных в Са-альгинате клеток *Chlorella* была ниже, чем в суспензии, причем среднее значение зависело как от размера частиц матрикса, так и от концентрации клеток внутри матрикса. Эти исследования позволили предположить, что только часть клеток в гранулах сохраняла метаболическую активность. Интенсивность дыхания иммобилизованных в Са-альгинате клеток *Catharanthus roseus* почти в 2 раза ниже, чем в тех же клетках по-

сле растворения полимерного матрикса. Объясняют это явление диффузионными затруднениями внутри матрикса.

Электронно-микроскопические исследования роста и морфологии иммобилизованных клеток водорослей показали, что иммобилизация в полиуретане мало изменяет их морфологию. Включение клеток в Са-альгинатный гель вызывает появление складчатости у *Chlamydomonas*, значительное ограничение роста клеток *Chlorella* на периферии гранул. Предположительно, это происходит вследствие ограничения доступа CO_2 внутрь матрикса. Иммобилизованные в альгинате колонии *Botryococcus* имели более регулярную форму и в 2,5 раза больший размер по сравнению со свободными клетками. Клетки *Solanum aviculare*, включенные в Са-альгинатный гель, не только приобретали округлую форму по сравнению со свободными клетками, но и образовывали более многочисленные колонии.

Цитологические исследования *Euglena* с использованием трансмиссионной электронной микроскории продемонстрировали, что иммобилизация в Са-альгинате и хранение гранул в темноте при 4 ^{0}C в 0,1 М $CaCl_2$ стабилизировали клетки в одном и том же состоянии на протяжении нескольких лет. Таким образом, иммобилизованные клетки могут успешно использоваться для долговременного хранения штаммов в коллекциях культур.

Включение клеток в полисахаридные гели особенно эффективно в случае культур протопластов, поскольку иммобилизация при сохранении функциональных свойств обеспечивает дополнительную защиту от механических стрессов и микробного заражения. Например, иммобилизация протопластов культуры клеток в агарозе и Са-альгинатном гелях представляет собой уникальный инструмент исследований, позволяющих установить корреляцию между составом внеклеточного матрикса и морфогенетическим ответом клеток.

Таким образом, можно сделать вывод, что включение клеток в полисахаридные гели существенно изменяет физиологические и биохимические процессы в клетках. Причины такого изменения метаболизма до конца не ясны. Вероятно, в каждом конкретном случае они различны. Иногда причина кроется в особенностях конструкции биореактора на основе иммобилизованных клеток, которые позволяют удалять продукты реакции, исключая тем самым возможность ингибирования метаболических процессов, и предотвращают вредное воздействие перемешивания. Но большинство авторов, анализируя эффект иммобилизации, делает вывод, что изменения метаболизма в иммобилизованных клетках вызваны перераспределением энергии вследствие изменения клеточного цикла и роста.

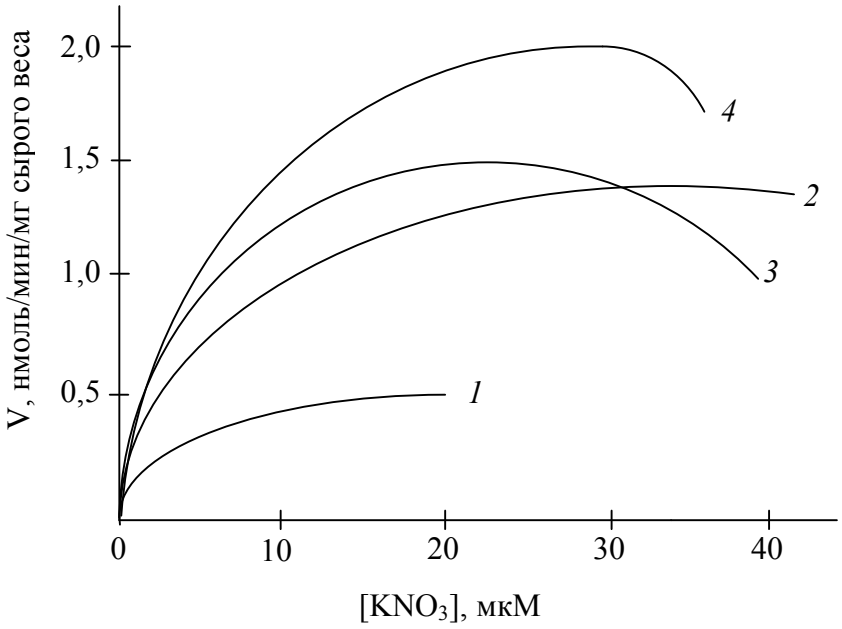


Рис 5.8. Влияние иммобилизации на скорость поступления NO_3^- в клетки *Chlorella: 1* – контроль; *2* – Са-альгинатный гель; *3* – агаровый гель; *4* – Са/Ва- альгинатный гель

Описанные во многих работах явления спонтанной экскреции вторичных метаболитов в клетках, иммобилизованных в полисахаридных гелях, косвенно подтверждают факт модификации плазмалеммы в результате взаимодействия с полисахаридным матриксом. В этом случае должны наблюдаться изменения транспортно-барьерных свойств, что можно проследить при измерении ионных потоков через мембрану. В этой связи нами проведены опыты с измерением потоков ионов NO_3^- и K^+ суспендированных и иммобилизованных клеток. Нитраты являются исключительно важным элементом минерального питания и используются в первичных и вторичных процессах обмена веществ, поэтому представлялось целесообразным исследование процесса поступления NO_3^- в суспендированные и иммобилизованные клетки. Исследования проводились с помощью ионселективного электрода.

В иммобилизованных клетках было выявлено увеличение максимальной скорости (V_{max}) поглощения NO_3^- по сравнению с контролем в 3–5 раз в зависимости от материала носителя. Как видно из рис. 5.8, V_{max} в клетках, иммобилизованных в Са-альгинатном геле, превышала тот же параметр в суспензии в 3 раза, в Са/Ва-альгинатном геле – в 4,6 раза, в агаровом геле – в 3,8 раза.

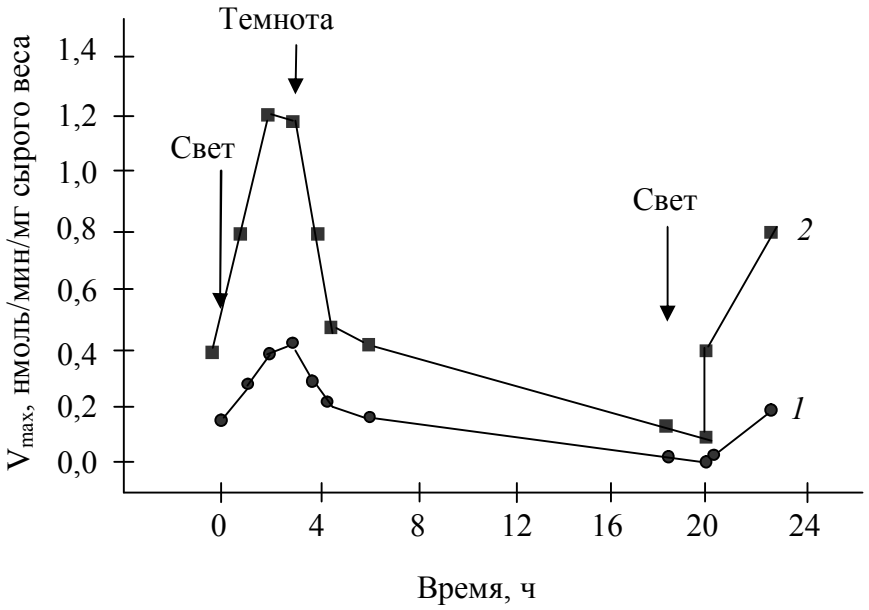


Рис.5.9. Световая зависимость скорости поглощения нитратов клетками *Chlorella*: *1* – контроль, *2* – клетки, иммобилизованные в Са-альгинатном геле

Так как перенос NO_3^- через плазмалемму осуществляется пассивной и активной транспортными системами и регулируется многочисленными внутренними и внешними факторами, мы исследовали влияние освещенности pH среды и ингибиторов метаболизма на транспорт нитратов в иммобилизованных клетках.

Отсутствие качественных различий pH-зависимостей, а также в активации светом (рис. 5.9) транспорта NO_3^- позволяет предположить, что иммобилизация не затрагивает внутриклеточные механизмы регуляции поступления и ассимиляции нитратов.

Для всех использованных ингибиторов не было выявлено достоверных различий в значениях полумаксимальной концентрации ингибирования транспорта нитратов в свободных и иммобилизованных клетках (табл. 5.4).

Таблица 5.4

Влияние ингибиторов протонной помпы и клеточного метаболизма на скорость поглощения нитратов в клетках *Chlorella vulgaris*

Ингибитор	Концентрация полумаксимального ингибирования, IC_{50}, мкМ	
	суспензия	иммобилизованные клетки
Na_2VO_4	51,5 ± 4,6	48,7 ± 5,3
ДЭС	5,1 ± 0,5	5,3 ± 3,2
Диурон	2,3 ± 1,1	3,3 ± 2,7

Таким образом, иммобилизация не оказывает заметного действия на энергозависимые транспортные системы плазмалеммы.

Было замечено, что активация нитратного транспорта зависела от времени с момента иммобилизации. Максимальный эффект наблюдался на вторые – четвертые сутки после включения клеток в Са-альгинатный гель. В то же время, добавление в суспензию 0,4 %-ного раствора альгината натрия в 2,5 раза увеличивал максимальную скорость переноса нитратов через плазмалемму, что по величине близко с действием иммобилизации в Са-альгинатном геле.

При подробном изучении воздействия составных компонентов геля – свободного альгината и ионов Ca^{2+} на транспорт NO_3^- было показано, что увеличение концентрации Ca^{2+} в среде в диапазоне 0,1–1 мМ мало влияло на скорость поглощения нитратов (рис.5.10, *б*). Альгинат натрия при этом значительно стимулировал поглощение NO_3^-, но лишь до определенного предела. Начиная с концентрации полисахарида около 1 % V_{max} снижалась, а при концентрации 1,4 % ингибировалась на 95 % (см. рис.5.10, *а*).

Полученные результаты позволяют предположить, что эффект активации нитратного транспорта связан с влиянием молекул альгината на транспортные характеристики плазмалеммы. Активируя перенос нитратов при низких концентрациях, альгинат натрия при повышении его содержания выше 1 % оказывает угнетающее воздействие на клетку.

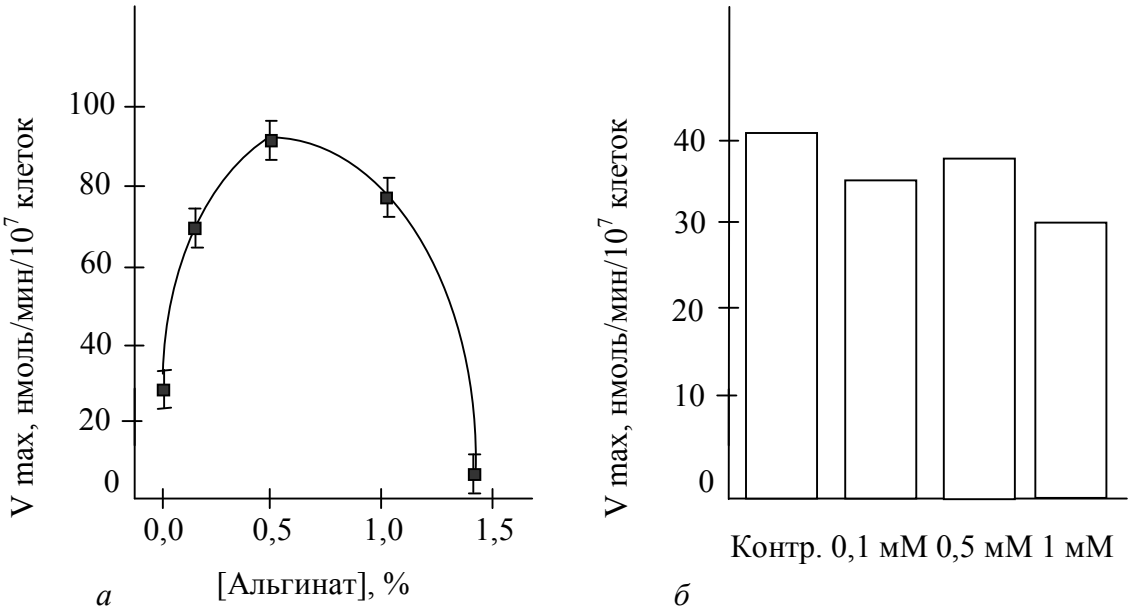


Рис.5.10. Влияние свободного альгината (*а*) и Ca^{2+} (*б*) на скорость поглощения нитратов

Другим важным ионом, определяющим осмотические и коллоиднохимические свойства цитоплазмы, является калий, основной потенциалобразующий ион в растительной клетке. В этой связи представлялось также необходимым выявить различия в поступлении K^+ в иммобилизованные клетки; измерения проводились с использованием радиоактивного химического аналога $^{86}Rb^+$.

Иммобилизация в Са-альгинатном геле уменьшала скорость накопления K^+ в клетках *Chlorella* на 20–25 %, т. е. вызывала эффект, противоположный действию на транспорт нитратов (рис. 5.11).

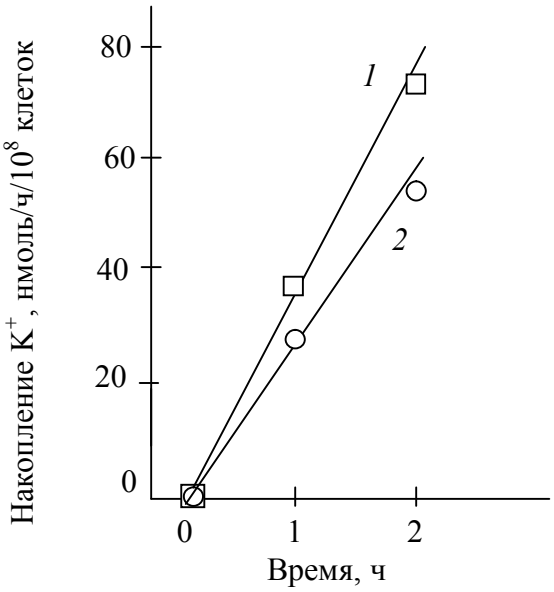


Рис.5.11. Зависимость накопления калия клетками *Chlorella* от времени: *1* – контроль; 2 – клетки, иммобилизованные в Са-альгинатном геле

Как и в случае нитратного транспорта, изучали влияние составных компонентов полисахаридного матрикса на скорость входящих потоков K^+. Добавление в инкубационную среду Ca^{2+} в пределах концентраций 0,1–1,0 мМ активировала накопление K^+ в суспензии клеток. Альгинат натрия (0,01–1 %) вызывал падение скорости накопления калия клетками хлореллы. Степень подавления транспорта калия внутрь клеток нелинейно зависела от концентрации альгината в среде.

Для контроля степени адсорбции полисахаридом ионов калия из среды мы исследовали влияние альгината натрия на содержание K^+ в растворе (рис. 5.12).

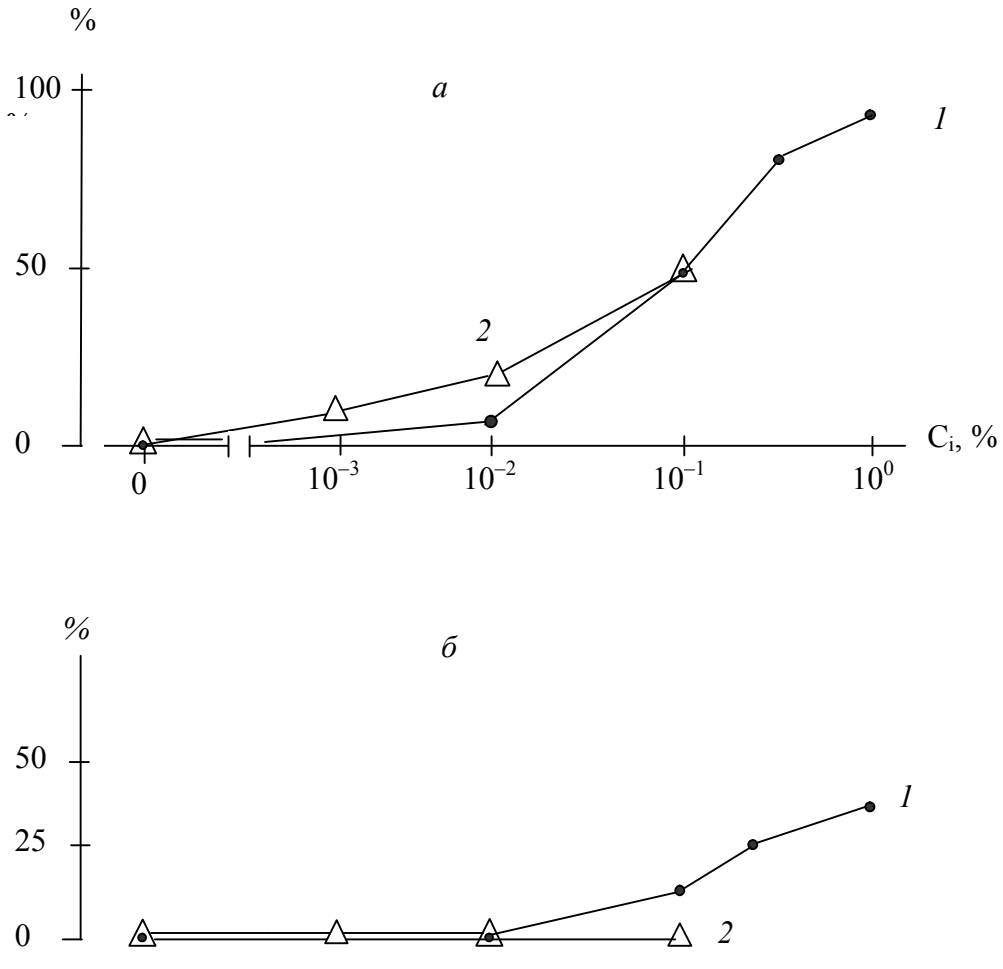


Рис.5.12. Зависимость степени ингибирования поступления K^+ в клетки *Chlorella (а)* и сорбции ионов K^+ на носители (*б*) от концентрации альгината (*1*) и карбоксиметилцеллюлозы (*2*)

Сопоставление полученных данных показало, что степень адсорбции альгинатом K^+ намного меньше, чем ингибирование накопления K^+ в клетках. Таким образом, влияние иммобилизации на транспорт K^+, как и на транспорт нитратов, вероятно опосредовано взаимодействие плазмалеммы с молекулами альгината.

Для выявления возможных механизмов взаимодействия молекул носителя с плазмалеммой изучалось влияние полисахаридов различной природы на накопление K^+ в клетках хлореллы. В отличие от нейтрального фиколла отрицательно заряженные декстрансульфат и карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) вызывали сходное с альгинатом ингибирование потоков K^+ в клетки. И хотя эффекты снижения скорости накопления K^+

под действием альгината или декстран-сульфата могут быть частично обусловлены сорбцией ионов калия полисахаридами, КМЦ действует на мембрану, не сорбируя ионов K^+. Следовательно, именно заряд полисахаридов играет ключевую роль при взаимодействии с клеточной мембраной.

В целях детализации мембранотропного влияния альгината был проведен ряд электрофизиологических экспериментов на клетках *Nitella flexilis*. Добавление в раствор ИПВ 0,2–0,8 % альгината натрия вызывало обратимое снижение разности потенциала покоя клеток *Nitella flexilis* на 20–50 мВ, при концентрации альгината выше 1 % клетки через 20 минут инкубации погибали.

Анализ мгновенных вольт-амперных характеристик (рис. 5.13) показал, что 0,8 %-ный альгинат существенно увеличивал проводимость плазмалеммы как в режиме деполяризации, так и при гиперполяризации. Эффект сохранялся и после отмыва в контрольном растворе. Полученные результаты означают, что начиная с определенной концентрации альгината, имеет место прямой эффект полисахарида на мембрану, состоящий, по-видимому, в деструктуризации липидной фазы мембраны, появлении в ней динамических дефектов, что вызывает увеличение неселективной утечки.

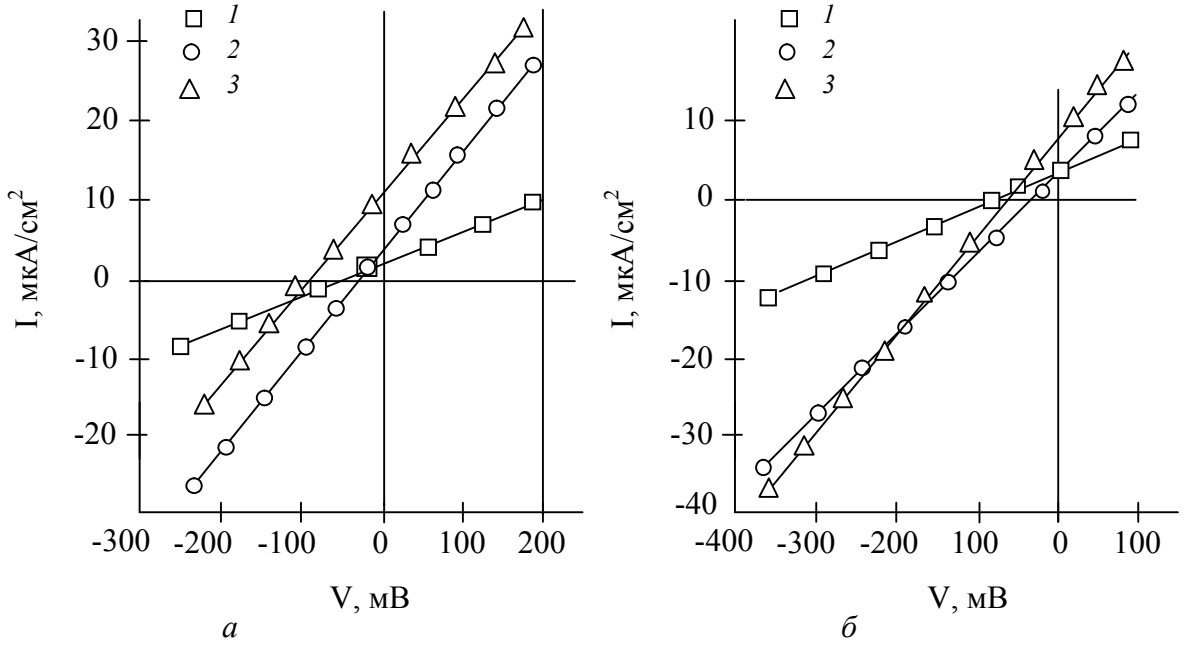


Рис.5.13. а – потенциал фиксации –20 мВ, *б* – потенциал фиксации –160 мВ;
1 – контроль, *2* – 0,8 % альгината Na, *3* – после отмыва в ИПВ

Это приводит к деполяризации мембраны, что в свою очередь вызывает изменения в величине ионных потоков через мембрану, в частности, через калиевые каналы и систему транспорта нитратов.

Таким образом, на основании полученных результатов и литературных данных, можно сделать вывод о том, что иммобилизация растительных клеток в полисахаридных гелях, особенно в альгинате Са, изменяет клеточный метаболизм, стабилизирует мембрану и способствует длительному сохранению жизнеспособности клеток. Этот метод иммобилизации может быть рекомендован как для использования в промышленных установках, так и для длительного хранения штаммов водорослей и культур растительных клеток в течение длительного времени.

Глава 6. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ ЖИВОТНЫХ

Ограниченность использования иммобилизованных животных клеток в значительной мере была обусловлена трудностью их культивирования. За последние годы достигнуты большие успехи в разработке методов контролируемого культивирования in vitro млекопитающих. Можно выделить несколько факторов, которые способствовали быстрому развитию этой области биотехнологии, а именно: 1) получение непрерывных, полностью охарактеризованных клеточных линий; 2) обнаружение специфических факторов роста; 3) разработка аппаратуры для культивирования изолированных клеток в оптимальных условиях.

Быстрое развитие методологии культивирования клеток оказало огромное влияние на научные исследования во многих областях биологии. Постоянно упрощаются и совершенствуются в частности, методики выделения и изучения продуктов клеточного метаболизма, таких как гормоны, ферменты и антитела.

Иммобилизованные поверхностно-активные клетки тканей животных играют все большую роль во многих областях биологии. Иммобилизованные клетки обычно сохраняют высокую степень функциональной дифференцировки, что облегчает изучение регуляции клеточного метаболизма гормонами и ростовыми факторами, а также способствует изучению механизмов модификации клеточных функций под действием различных эффекторов, например лекарственных препаратов и токсинов. Так, иммобилизованные гепатоциты нашли широкое применение в исследованиях метаболизма чужеродных веществ в печени.

6.1. Методы выделения и иммобилизации клеток

Большинство клеток твердых тканей, таких как ткани почек, печени, кожи, являются поверхностно-активными.

В зависимости от подходов, используемых для прикрепления изолированных клеток к твердой подложке, или матрице, используют различные методики культивирования клеток тканей животных и человека.

Из-за поверхностно-активных свойств in vitro их можно культивировать только в виде тонких пластов или монослоев, непосредственно связанных с поверхностью подложки. Отдельные клетки, об-

разующие этот монослой, контактируют как с соседними, так и с самой подложкой, поэтому их можно рассматривать как иммобилизованные. Однако, в отличие от иммобилизованных растительных клеток и ферментов, связывание между поверхностно-активными клетками млекопитающих и твердой подложкой обычно проводят без специальной физической или химической обработки. Это связывание осуществляется благодаря исходной активности препарата изолированных клеток, совместимости клеток с твердой подложкой, а также наличию в сыворотке или специально добавленных в среду веществ, способствующих связыванию клеток.

Для некоторых видов клеток (например, клеток лимфобластоидного происхождения), обладающих особыми свойствами, разработана иная система культивирования. Клетки растут и размножаются в суспензии без предварительной иммобилизации, что облегчает разработку промышленных способов их культивирования.

При культивировании поверхностно-активных клеток требуется большая площадь поверхности носителя, а также адекватное и строго контролируемое поступление питательных веществ и кислорода, что вплоть до последнего времени сдерживало их крупномасштабное применение. Благодаря разработке методов культивирования на микроносителях, при которых клетки выращивают в виде монослоев, иммобилизованных на гранулах полистерола, стекла или декстрана, стало возможным культивирование поверхностно-активных клеток в суспензии.

Жизнеспособные, чувствительные к действию эндогенных веществ (гормона) клетки можно выделить либо из нормальных, либо из патологических тканей человека или же из аналогичных тканей животных. в любом случае изолированные клетки получают, подвергая образцы тканей ферментативному диспергированию. При этом чтобы избежать некроза и получить максимальный выход жизнеспособных клеток, ткань следует измельчать как можно быстрее. Все операции следует проводить в стерильных условиях. Измельчение тканей начинают с приготовления срезов толщиной 0,5–1,0 мм с помощью микротома, успешно можно применять ножницы и пинцет (рис. 6.1). Ферментативное диспергирование осуществляют с помощью трипсина в колбе, получая в конечном итоге суспензию жизнеспособных клеток.

Непосредственно перед иммобилизацией определяется плотность популяции клеток и оценивается их жизнеспособность.

Иммобилизация поверхностно-активных клеток на твердой подложке – процесс многоступенчатый, который обычно начинается с адсорбции на отрицательно заряженной поверхности подложки специальных веществ, способствующих прикреплению клеток. К таким веществам относятся гликопротеины, получаемые из сыворотки, либо из клеток определенных типов (диплоидные фибробласты, часто встречающихся в виде примесей в первичных культурах эпителиальных клеток).

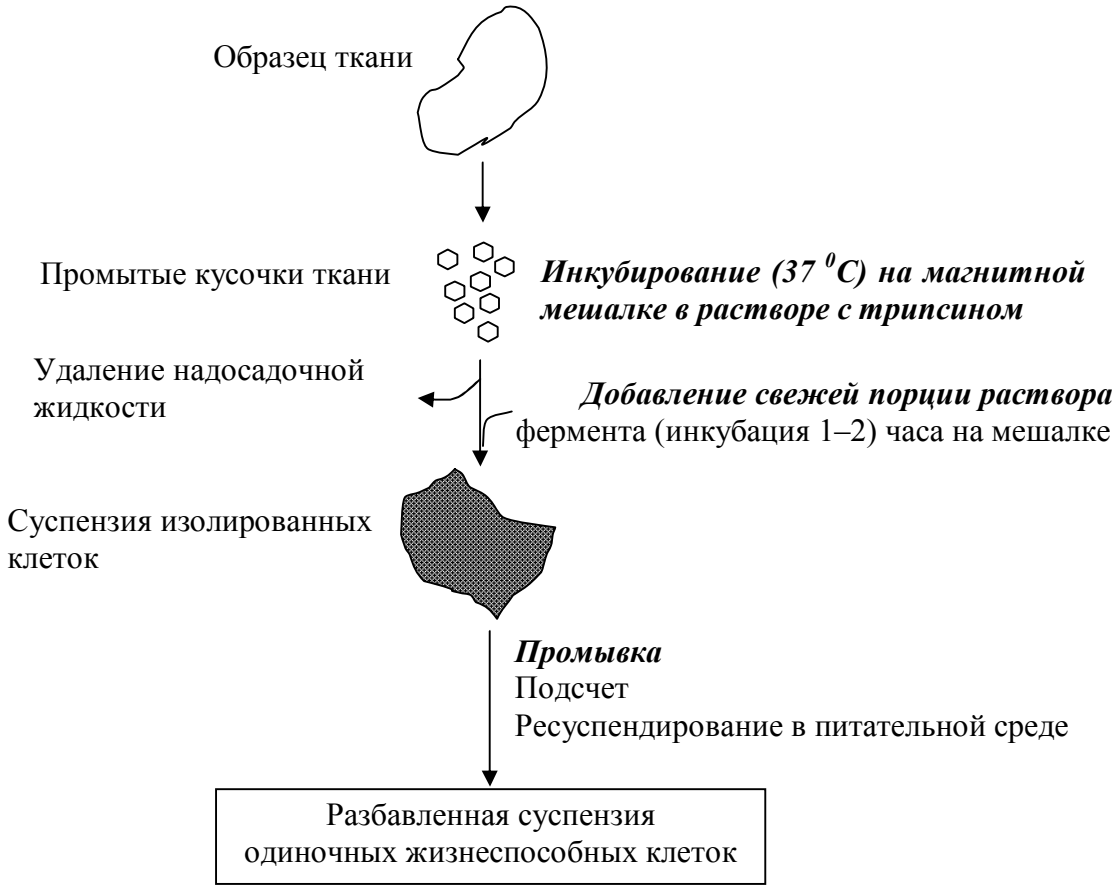


Рис.6.1. Схема приготовления суспензии изолированных жизнеспособных клеток из свежеполученного образца ткани

Кроме того, из эпителиальных клеток выделяют особые факторы связывания, которые осуществляют прикрепление клеток к подложке, связывая гликопротеины клеточной поверхности с предварительно адсорбированными сывороточными или фибробластными гликопротеинами (рис.6.2).

ГС – гликопротеины сыворотки
ГКП – гликопротеины клеточной поверхности
ФС – факторы связывания

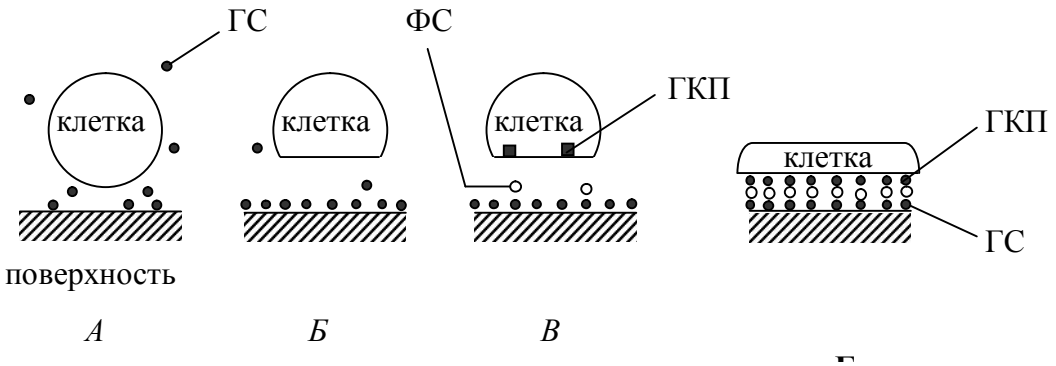


Рис6.2. Прикрепление и организация в монослой свежеприготовленных клеток:
А – молекулы гликопротеина, полученные из культурной среды, обогащенной сывороткой, адсорбируются на поверхности (электростатическое взаимодействие) лунки;
Б – клетки, полученные из целой ткани оседают на поверхность лунки через 1–2 часа после нанесения;
В – факторы связывания, полученные из клеток, прикрепляют клетки к поверхности, связывая сывороточные гликопротеины с гликопротеинами клеточной поверхности;
Г – через ~ 24 часа иммобилизованные клетки распластываются по поверхности, образуя монослой.

Таким образом, иммобилизация клеток достигается благодаря первоначальному контакту и последующему распластыванию клеток на поверхности, в результате чего формируется монослой. Образование тесной связи между поверхностью клетки и подложкой и по существу структурная и функциональная стабильность монослоя в большей степени зависят от присутствия в среде гликопротеинов, способствующих прикреплению клеток.

6.2. Общие принципы биотестирования

Широко используются иммобилизованные монослои клеток в системе биотестирования. Биотестирование – это оценка качественного и количественного содержания физиологически активных веществ (эффектора) по ответной реакции (тест-реакция) клеток-мишеней (тест-объект). Тест-объект (клетка, ткань, организм) – это жизнеспособные биологические структуры разных уровней организации.

Тест-реакция характеризуется изменением какого-либо показателя под воздействием эффектора (стимулятора). Этот показатель получил название тест-параметра и определяется количественной характеристикой проявления тест-реакции.

В клинической и экспериментальной эндокринологии использование биотестов облегчает определение, например гормонов, как в здоровом, так и больном организме. В этой связи рассмотрим основные критерии и принципы, используемые при разработке и конструировании систем для биотестирования (в частности гормонов), а также дадим описание простейшего способа его реализации.

Клетки, иммобилизованные на твердой подложке, представляют собой весьма удобный объект для выполнения различных операций биотестирования. Так, упрощаются процедуры введения контрольного и тестируемого стимуляторов. При этом клеточный монослой не нарушается, а «перенос» культуральной среды между инкубационными стадиями сведен до минимума. Экскретируемые клеткой вещества можно легко определять, отбирая через определенные промежутки времени культуральную среду и анализируя ее, в то время как внутриклеточные продукты метаболизма можно выделять и изучать после полного лизиса клеток и их обработки специальными реагентами. И, наконец, уникальная пространственная конфигурация клеток, организованных в монослои, способствует быстрому и одновременному действию стимулятора на все клетки культуры, благодаря чему достигается почти одинаковый объект всех клеток. К тому же если повторы культур структурно идентичны, то с помощью иммобилизованных клеток удается достичь высокой чувствительности биотестирования.

Выбор клеток-мишений, наиболее подходящих для биотеста на какое-либо определенное физиологически активное вещество, обуславливается как его природой исследуемого, так и стабильностью in vitro и характеристиками ответа используемых клеток.

В результате взаимодействия между стимулятором гормоном или медиатором и специфическими рецепторами соответствующих клеток-мишений в нормальных условиях in vivo происходят изменения в клеточном метаболизме: накапливаются метаболиты, расходуются вещества-предшественники, экскретируются в межклеточную среду специфические продукты метаболизма. Однако после извлечения тканей-мишеней из организма и ферментативного диспергирования изолированные клетки могут терять ряд специфических функциональных свойств, характерных для интактной ткани, и поэтому на препаратах иммобилизованных клеток не всегда возможно продемонстрировать полную последовательность функциональных ответов, обычно возникающих, например, при гормональной стимуляции исходной ткани. Тем не менее, во многих случаях при сохранении степени дифференцировки в условиях in vitro, возможно выбрать несколько специфичных, ярко выраженных ответов

клеток, на основе которых можно разработать метод биотестирования данного гормона.

При изучении различных метаболических ответов, а также при выборе оптимального метода измерений биологической активности (биотестирования) данного физиологически активного вещества следует оценивать каждый из ответов по следующим четырем критерием:

– специфичность ответа;

– чувствительность ответа;

– точность определения в выбранном интервале доз гормона;

– воспроизводимость ответа при использовании клеточных препаратов;

Охарактеризуем каждый из четырех критериев, рассматривая гормональный эффект.

Итак, *специфичность ответа*. Не исключено, что действие других гормонов, особенно гормонов, имеющих сходную с исследуемым структуру, может вызвать подобный ответ. Однако в большинстве случаев уровень специфичности функционального объекта на действие исследуемого регулятора можно обеспечить, тщательно подбирая клетки-мишени, условия их инкубации и блокирование рецепторов структурно сходными, но биологически неактивными молекулами.

Чувствительность ответа определяют, как наименьшее количество стимулятора, которое удается отличить от нулевой дозы при заданных условиях; его находят, построив для исследуемого гормона, кривую доза – ответ.

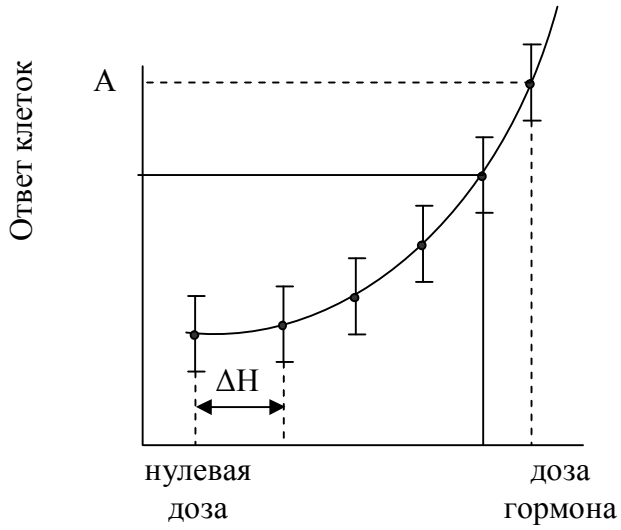


Рис.6.3. Определение чувствительности биотеста и дозы исследуемого гормона по кривой доза-ответ стандартного стимулятора

Можно установить, как влияют на чувствительность биотеста изменения условий инкубации, таких как плотность клеток-мишеней в монослое, время действия стимулятора, ионная сила и pH среды, а также выбрать условия, в которых чувствительность используемого биотеста максимальна (рис. 6.3).

Точность измерения (определения) действия гормона, или показатель эффективности анализа, определяют по графикам зависимости точности измерения от дозы гормона. Эти графики можно использовать для сравнения эффективности биотеста в различных интервалах доз исследуемого гормона, т. е. на различных участках стандартной кривой, а также для изучения влияния различных условий инкубации или каких-либо веществ на эффективность биотеста в любом заданном интервале доз гормона.

При оптимизации условий проведения биотеста следует стараться подобрать условия для наиболее точного определения действия стимулятора, по крайней мере, в интересующем, а желательно в максимально широком интервале доз.

Воспроизводимость результатов биотестирования играет решающую роль при интерпретации полученных результатов. Используя отдельные монослои клеток, полученные из одной и той же исходной ткани, в различных, но следующих одна за другой процедурой биотестирования можно достичь хорошей воспроизводимости, при которой отклонения между биотестами не превышают 10–15 для доз гормона, приходящего на участок максимальной точности кривой доза-ответ.

1. Подводя итог, следует подчеркнуть, что выбранный для определения какого-либо гормона ответ монослоев клеток-мишеней должен соответствовать следующим критерием: Быть высокоспецифичным по отношению к исследуемому гормону.

2. Обладать высокой чувствительностью.

3. Обеспечивать достигнутую точность определения гормона в необходимом интервале доз.

4. Обеспечивать высокую воспроизводимость как внутри каждой клетки, так и между препаратами клеток, полученными из различных исходных тканей.

6.3. Схема проведения биотестирования

После получения суспензии изолированных клеток из исходной ткани, чувствительной к исследуемому агенту, перед иммобилизацией определяют, как уже отмечалось, плотность популяции клеток и оцени-

вают их жизнеспособность. Затем готовят повторы монослоев, которые будут использоваться в качестве тканей-мишеней для биотеста. Для этого в лунки платы вносят определенное количество исходной клеточной суспензии, добиваются максимальной идентичности повторов слоев. Это достигается с помощью пипетки с фиксированным объемом. В каждую лунку вносится одинаковое количество клеток (рекомендуется приблизительно $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл культуральной среды). При более высокой концентрации клеток ответ на действие стимулятора не достигает максимального значения, что объясняется уменьшением для стимулятора доступных рецепторов в результате скученности и избыточного количества клеток.

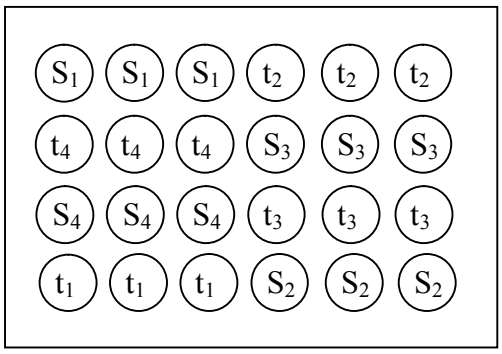


Рис.6.4. Распределение тестируемого и контрольного стимуляторов на плате с иммобилизованными клетками:
t – тестируемые образцы; s – стандартные (контрольные) образцы.

Платы помещают в термостат (+37 ^{0}C) и атмосферу насыщенную водяными парами для избежания испарения культуральной среды.

Для хранения жизнеспособности клеток после иммобилизации каждые 3–4 суток среду удаляют с поверхности монослоев культур с помощью стерильной пастеровской пипетки и вакуумного насоса, добавляют предварительно нагретую свежую порцию той же среды. Необходимо также следить, чтобы при смене среды монослои не высыхали.

Изолированные клетки, полученные непосредственно из целых тканей ферментативным диспергированием, можно поддерживать в первичной культуре в иммобилизованном состоянии в течение 10–14 суток. При этом они способны сохранять высокую специфичность и чувствительность по отношению к соответствующим стимуляторам, т. е. сохранять свойства, предопределенные in vivo функциональными характеристиками исходной ткани.

Установлено, что in vivo функциональные характеристики чувствительных к гормонам тканей зависят не только от возраста и пола, но также от физиологического состояния живых организмов.

Повторы монослоев клеток, полученные из одной и той же ткани или одного и того же посева клеток, должны быть идентичны по их способности

реагировать на действие определенной дозы стимулятора. Основное требование, предъявляемое к биотесту, и заключается в том, что каждая отдельная доза эффектора проверяется на достаточном количестве тест-объектов или повторов. Это требование выполняется при использовании иммобилизованных клеток одного монослоя. Однако чтобы провести последующую статистическую обработку получаемых результатов используется 3–4 повтора.

Распределение тестируемого и контрольного стимуляторов на плате с иммобилизованными клетками представлены на рис. 6.4. В данном случае каждую дозу стимулятора вносят в три лунки, содержащие клеточные монослои, т. е. на стандартной 24-луночной плате размещали восемь групп троекратных повторов доз эффектора.

В пределах одной и той же платы для биотестирования все инкубационные лунки, а следовательно и все монослои, находятся в одинаковых условиях (температура, влажность, концентрация CO_2 в воздухе, состав питательной среды). При проведении биотестирования следует соблюдать два условия.

Первое из них состоит в том, что необходимо обратить особое внимание на время действия стимулятора на клетки, которое должно быть одинаковым для всех монослоев на плате. Следует прекращать инкубацию точно в таком же порядке, в каком добавляли стимулятор к клеткам, что особенно важно в случае стандартных препаратов стимулятора, поскольку значение ответов клеток на их действие используют для построения графика зависимости доза-ответ. Так, при нанесении стимулятора на монослои в порядке возрастания доз любое заметное различие во времени инкубации монослоев с минимальной и максимальной дозами стимулятора может привести к искажению кривой доза-ответ. Однако если ответ на каждую дозу гормона до его удаления уже достиг максимального уровня, некоторые отклонения во времени инкубации не оказывают существенного влияния на величину ответа клеток.

Второе условие состоит в том, что при разработке и практическом применении биотеста, основанного на использовании повторов монослоев клеток, необходимо подобрать соответствующие методы контроля за проведением биотестирования. Необходимо выявлять любые значительные отклонения между величинами ответов клеток на действие стандартного препарата стимулятора в различных платах с повторами культур и устранять их причины.

Использование клеток в качестве ткани-мишени возможно через 7–10 суток после начала культивирования иммобилизованных клеток. Последовательность основных операций проведения биотестирования приведена на рисунке 6.5 и состоит в следующем.

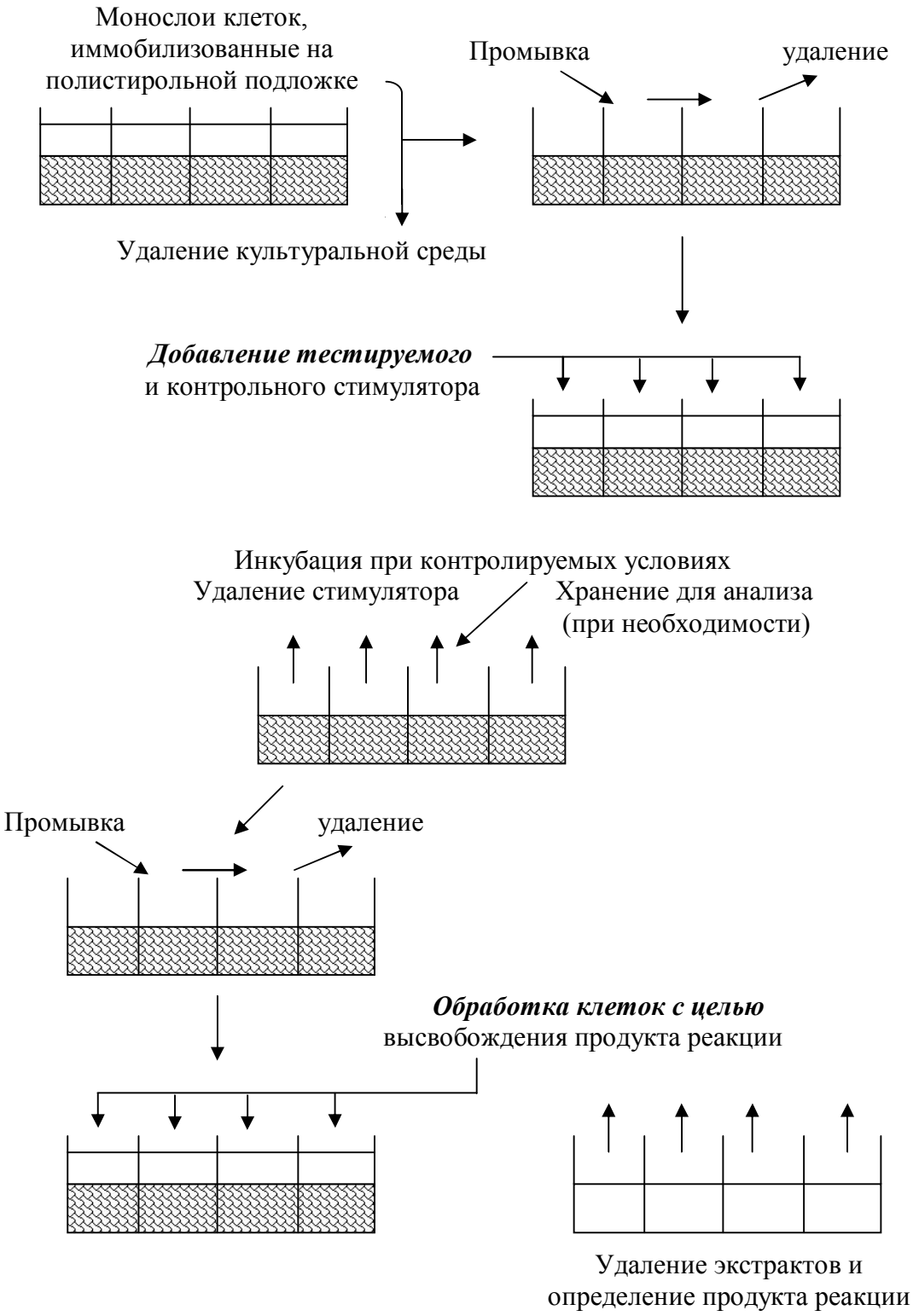


Рис.6.5. Последовательность операций при проведении биотестирования

С помощью стерильной пастеровской пипетки удаляют питательную среду, используемую на начальной стадии культивирования клеток (нельзя касаться пипеткой слоя клеток, допускать высыхания монослоев после удаления среды). Затем каждый монослой быстро промывается 37 ^{0}С солевым раствором Хэнкса, который затем удаляется, как описано выше.

На каждый монослой наносится тестируемый или контрольный стимулятор и культуры помещают в термостат (инкубатор). По истечении необходимого времени инкубации стимулятор удаляется с поверхности монослоев.

Монослой промывается солевым раствором Хэнкса, который вновь удаляется. В каждую лунку добавляют 0,3 мл 12 % (вес/объем) хлорной кислоты. Добавляя кислоту преследуют три цели: прекратить действие стимулятора, вызвать лизис клеток, разделить белковые и небелковые компоненты. В заключение определяют содержание специфического продукта реакции, находящегося в растворимой или нерастворимой в кислоте форме с помощью подходящего для данного вещества метода количественного анализа. Таким образом, по окончании инкубации с гормоном проводят экстракцию продуктов реакции из иммобилизованных клеток или инкубационной среды и оценивают ответ клеток на каждую дозу стимулятора, определяя количество продуктов реакции в каждом экстракте.

Полученные значения ответов клеток представляются в виде калибровочной кривой, обычно в виде кривой доза-ответ (см. рис. 6.3), где приведены средние значения и стандартные отклонения (SD). Последовательность операций следующая:

– рассчитывают среднее значение ± SD ответа клеток на каждую дозу стандартного препарата;

– строят график зависимости доза-эффект;

– экстраполируя с помощью калибровочной кривой рассчитывают биологически активную дозу стимулятора для каждого из определяемых образцов

Для объективной оценки эффективности приема биотестирования необходимо использовать подходящие тщательно разработанные способы контроля за качеством их проведения. Такие способы включают, главным образом, количественную оценку колебаний величины ответов клеток от опыта к опыту на действие строго определенных доз ряда стандартных препаратов.

Любой способ контроля за проведением серии последовательных процедур биотестирования, основанный либо на проверке способности к ответу отдельных культур клеток разных исходных тканей, либо на реги-

страции постепенных изменений характеристик ответов какого-либо штамма клеток для непрерывного культивирования, должен включать в себя многократное определение реакции клеток на действие строго определенной дозы контрольного стимулятора. При этом способе контроля любое заметное отклонение величины наблюдаемой реакции клеток от среднего значения ответа может свидетельствовать об изменении свойств культуры клеток и, следовательно, может указывать на то, что результатами данной серии следует пренебречь. На практике для большинства биотестов эти способы простейшего контроля легко выполнить, включив в схему проведения биотестирования анализ ответов клеток на действие соответствующих доз стандартного препарата (кривая доза-ответ).

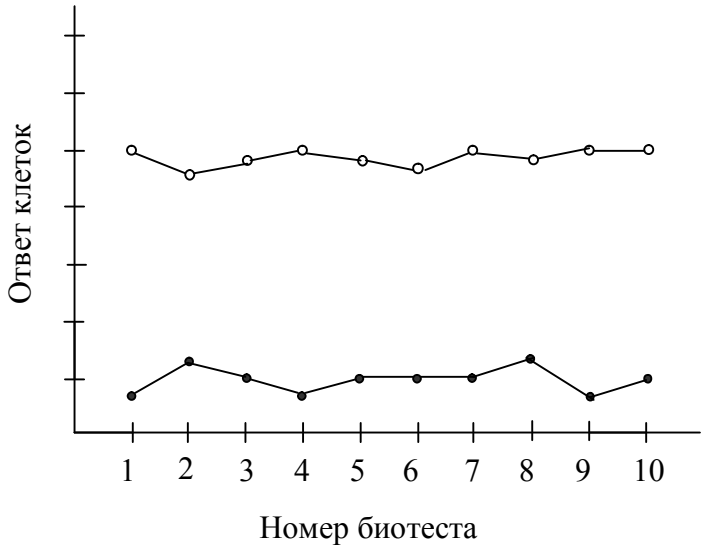


Рис. 6.6. Простейшая схема контроля за проведением биотестирования

Для более тщательного контроля процедуры проведения биотестирования среди выбранных доз гормона должно быть несколько доз из всего диапазона, наиболее часто встречающиеся в тестируемых образцах. В случае определения гормонов в сыворотке крови человека значение этих доз должны входить в диапазон физиологических доз тестируемого гормона. Можно также включать дополнительные дозы стандартных препаратов сравнения, соответствующие пределу чувствительности биотеста, т. е. очень низкие дозы. При биотестировании образцов сыворотки с повышенным содержанием гормона следует использовать дозы стандартного препарата, превышающие нормальный физиологический уровень тестируемого гормона. Для каждой серии биотестов, основан-

ных на применении клеток, полученных из различных исходных тканей или субкультур стабильных клеточных линий, ответы клеток на действие отдельной дозы стандартного препарата следует представлять графически (рис. 6.6). В этом случае значение ответов клеток на действие данной дозы в контролируемом биотесте можно сравнить со средним значением ответов клеток на действие той же дозы тестируемого гормона, полученным в предшествующей серии опытов. Результаты биотестирования, в которых величины ответов клеток отклоняются от величины (среднее значение ± SD) следует считать недостоверными, и ими можно пренебречь.

6.4. Анализ содержания тиреотропного гормона (ТТГ) с помощью иммобилизованных клеток щитовидной железы

Рассмотрим конкретный пример определения биологической активности ТТГ с использованием в качестве тест-объекта фолликулярных клеток щитовидной железы человека. Процедура биотестирования состоит в следующем. Суспензию жизнеспособных фолликулярных клеток щитовидной железы человека готовят ферментативным диспергированием кусочков ткани. Каждый препарат клеточной суспензии готовят только из одного образца щитовидной железы. Через четыре дня после начала культивирования фолликулярные клетки щитовидной железы уплощаются и прикрепляются к поверхности лунки полистерольной платы. Образованные монослойные культуры клеток используют в качестве тканей-мишеней для биотестирования ТТГ. Если менять среду каждые 3–4 суток, то монослои сохраняют способность к ответу в течение 4–7 суток. Затем уже начинается дифференцировка клеток и избыточный рост фибробластов, т. е. происходят изменения, влияющие на характер ответной реакции.

Биологическую активность ТТГ можно определять несколькими способами. Наиболее эффективный – это метод, базирующий на использовании способности ТТГ стимулировать накопление внутриклеточного цАМФ. цАМФ можно определить методом конкурентного связывания с белком, обладающим высокой специфичностью по отношению к определяемому нуклеотиду. Измеряют цАМФ и другими методами, например, основанными на использовании антител, специфичных к цАМФ. Преимущество последнего метода – его повышенная чувствительность, благодаря чему можно определить очень низкие концентрации. Но при достаточном количестве цАМФ чаще пользуются методом связывания с

белком, поскольку последний можно хранить при – 20 ^{0}C в течение длительного времени (2–3 года).

Для замены менее доступных препаратов ТТГ человека одновременно проводится биотестирование активности бычьего ТТГ.

По данным о накоплении внутриклеточного цАМФ в монослойных клетках щитовидной железы в ответ на действие бычьего и человеческого ТТГ строились кривые доза-ответ (рис. 6.7). Следует подчеркнуть, что соотношение между ответом клеток и дозой стимулятора зависит от времени инкубации, температуры, pH, ионной силы инкубационной среды.

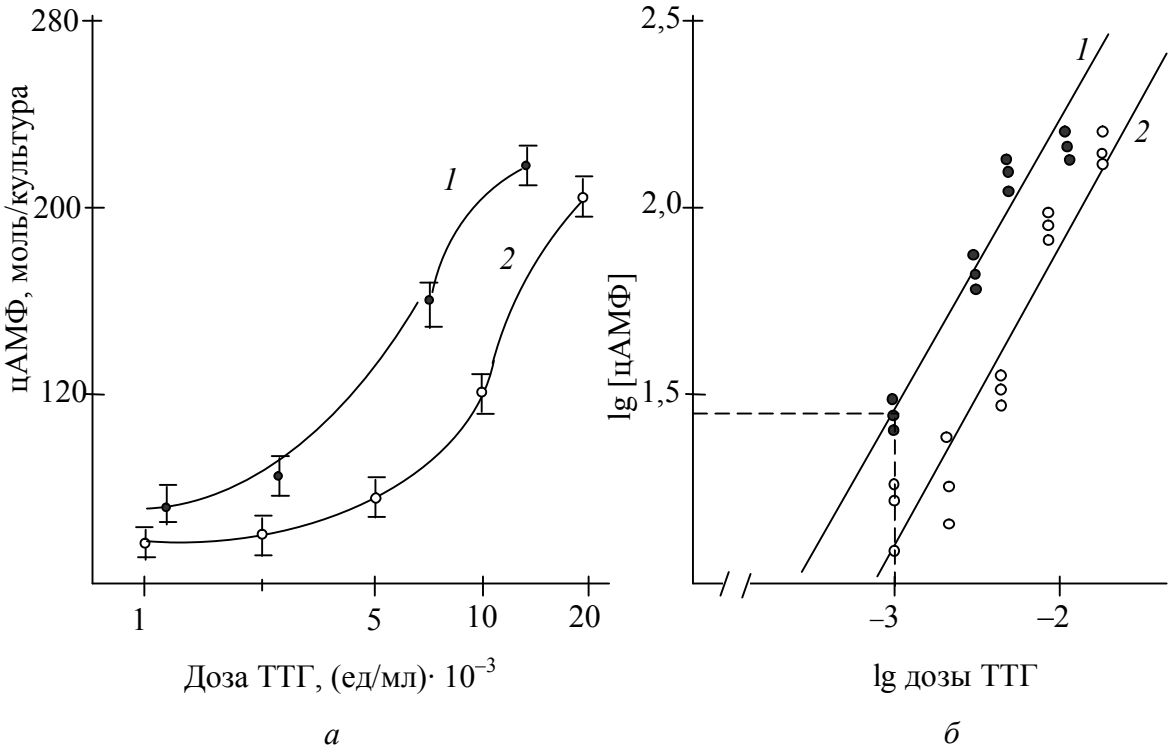


Рис.6.7. Зависимость-эффект (по накоплению цАМФ) монослойных культур клеток щитовидной железы на действие гормона:
в обычных (*а*) и логарифмических (*б*) координатах:
1 – бычий ТТГ; *2* – ТТГ человека

Поэтому необходимо следить за тем, чтобы условия инкубации при биотестировании обоих исследуемых препаратов ТТГ были одинаковыми. Полученные зависимости доза-ответ для удобства сравнения были представлены в логарифмических координатах.

В логарифмических координатах кривые зависимости ответов клеток на действие возрастающих доз бычьего и человеческого ТТГ оказались линейными и параллельными. В этом случае легко рассчитать от-

ношения активности этих двух препаратов. Активность бычьего ТТГ оказалась в 2,5 раза выше, чем человеческого. Таким образом, каждую дозу определяемого препарата бычьего ТТГ можно выразить в единицах активности ТТГ человека, т. е. менее доступные препараты ТТГ человека можно успешно заменить на препараты бычьего ТТГ и использовать их в качестве «вторичных стандартов» при проведении биотестирования.

В конечном итоге содержание ТТГ в анализируемой пробе определяют экстраполируя количество цАМФ до пересечения с прямой 1 калибровочного графика (см. рис. 6.7, *б*) и последующем перенесением на ось абсцисс; затем корректируют на указанный выше коэффициент 2,5 и получают количество ТТГ в пробе, которое в данном случае составляет $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ ед/мл.

При проведении анализа с помощью биотеста при построении калибровочной кривой доза-эффект кроме физиологических следует включать пониженные и повышенные дозы стандартного препарата. Использование биотестов, обладающих высокой специфичностью, позволяет достаточно эффективно провести идентификацию физиологически активных веществ, в частности гормонов, в исследуемых пробах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в самых различных областях нашей жизни, от медицины до военной промышленности, от переработки пищевых продуктов до микроэлектронных сенсоров используются уникальные способности биологических систем.

Разработка практических методов или приборов, включающих в качестве компонента биологический элемент, в значительной степени зависит от выбора биологического объекта и наличия соответствующих методик.

В данных условиях на первое место выдвигаются проблемы, связанные с выбором технологически оправданного варианта для решения поставленных задач. Поэтому и возникла идея закрепления фермента или клетки *на* или *в* нерастворимом носителе с целью определения преимущества данного подхода.

Надо отметить, что методы иммобилизации приобретают все более важное значение в биотехнологии. Например, при создании систем, требующих повышение специфичности и стабильности препаратов.

Применению биотехнологий для производства различных видов топлива и химических соединений, в том числе лекарств и гормонов, уделяется особое внимание, и в этом отношении применение иммобилизованных ферментов и клеток обладает большими потенциальными возможностями. Использование иммобилизованных препаратов для различных целей синтеза или трансформации веществ в ряде случаев повышает технологичность создаваемых новых производств или модификации существующих.

Однако применение иммобилизованных ферментов в практических целях все же ограничено, особенно из-за высокой стоимости чистых препаратов. Живая клетка, в отличие от фермента представляет собой готовый биотехнологический реактор, который обладает рядом преимуществ. Например, для непрерывных процессов появляется принципиальная возможность более длительной эксплуатации иммобилизованных клеток по сравнению с обычным однократным использованием свободных культур, в результате иммобилизации повышается устойчивость препаратов к действию различных инактивирующих внешних факторов, повышается продуктивность осуществляемых превращений субстратов в конечные производные и т. д.

С другой стороны, из приведенного материала можно заметить, что существует неоднозначность в трактовках по использованию иммобилизованных препаратов. Это определяется многообразием причин, в част-

ности видам используемых организмов, их особенностями, типом носителя и способом иммобилизации, а также конкретными задачами каждого технологического процесса. Так, с помощью включения препаратов в матрицу носителя, как правило, предотвращается попадание в среду отмирающей части иммобилизованной популяции клеток, а адсорбционные методы закрепления их на нерастворимых носителях аналогичного эффекта обеспечить не могут.

Для успешной разработки какого-либо процесса на основе иммобилизованных препаратов необходимо представлять себе совокупность всех имеющихся проблем, хорошо ориентироваться в научной и патентной литературе и знать основные методы создания биокатализатора.

Таким образом, при подготовке молодых специалистов в области биотехнологии необходимо учитывать междисциплинарный характер данной отрасли, базирующийся на глубине и широте знаний в смежных сферах.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Березин И. В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной энзимологии // избранные труды. М.: Наука, 1990.
2. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / под редакцией Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988.
3. Синицын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И., Спасов С. Д. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. М.: МГУ, 1994.
4. Применение иммобилизованных ферментов. Итоги науки и техники ВИНИТИ. Сер. Биотехнология. М. 1986.

Дополнительная

1. Тривен М. Иммобилизованные ферменты. М.: Мир, 1983.
2. Иммобилизованные клетки в биотехнологии. Пущино. 1987.
3. Скрябин Г.К., Кощеенко К.А. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. В кн. Биотехнология. М: Наука, 1984.
4. Колесов А. А. Инженерная энзимология на промышленном уровне. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М. 1989.
5. Иммобилизованные клетки микроорганизмов (теория и практика). Пущино. 1987.

2. ПРАКТИЧЕСКИЙ РАЗДЕЛ

Методические указания к лабораторным работам по курсам «Иммобилизованные клетки и ферменты» и «Биосенсорные системы» / В. М. Юрин, А. П. Кудряшов – Минск: БГУ, 1999. – 16 с.

РАБОТА № 1
Иммобилизация клеток микроводорослей

Вводные пояснения

Иммобилизацию можно рассматривать как физическое разделение катализатора (клеток, клеточных фракций или ферментов) и растворителя, при котором молекулы субстрата и продукта могут легко обмениваться между фазами. Разделение катализатора и растворителя может быть достигнуто либо адсорбционным или ковалентным связыванием с нерастворимым органическим или неорганическим носителем, либо связыванием отдельных молекул катализатора друг с другом с образованием агрегатов или сополимеров. Химическая модификация, которой подвергаются ферменты или клетки в процессе такой иммобилизации, может нежелательным образом изменять их каталитические и другие свойства. По этой причине предпочитают включение препаратов в гель. В этом случае клетки или ферменты отделяют от остального раствора включением в толщу носителя или инкапсулированием. Таким образом, катализатор можно включить в полимерную сетку, например полиакриламидного геля или геля альгината кальция, путем полимеризации или поперечного сшивания компонентов геля в присутствии ферментов или клеток.

Препараты иммобилизованных клеток находят широкое применение в биотехнологии: они используются для получения физиологически активных веществ, для создания биосенсорных устройств, для очистки среды и т.д

а) Иммобилизация клеток Chlorella включением в гель альгината кальция

Альгинат – основной структурный полисахарид бурых морских водорослей. В присутствии моновалентных катионов полисахариды даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор, тогда как в присутствии двухвалентных катионов, особенно кальция, наблюдается образование геля. Поскольку гель образуется в мягких условиях, в нем можно иммобилизовать живые клетки. Именно это применение альгината получило наиболее широкое распространение.

Материалы и оборудование: 3 % раствор альгината натрия, 0,2 М $CaCl_2$, паста клеток *Chlorella*, шприц емкостью 5 мл с иглой диаметром 1 мм для формирования капель смеси или пипетка на 10 мл с диаметром выходного отверстия 3 мм

Ход работы: Осторожно смешать 100 мг пасты клеток водоросли и 10 мл раствора альгината натрия. Полученную смесь поместить в шприц емкостью 5 мл и капать в сосуд, содержащий 150 мл охлажденного 0,2 М раствора $CaCl_2$, таким образом, чтобы образовывались гранулы диаметром 1-2 мм. Оставить гранулы альгината кальция с включенными в них клетками в растворе $CaCl_2$ на 20 мин для затвердевания.

б) Иммобилизация клеток хлореллы включением в агар-агаровый гель

Агар-агар – смесь полисахаридов получаемых из некоторых видов бурых водорослей. При охлаждении горячих водных растворов агар-агара образуется гель. Стабилизация геля осуществляется за счет водородных связей между отдельными молекулами полисахарида. Затвердевание геля происходит при температуре 42-35° С. Агар-агар не изменяет кислотности среды и не производит химического повреждения клеточных структур, поэтому возможно включение живых клеток в агаровый гель без их существенного повреждения

Материалы и оборудование: Сухой агар-агар, паста клеток *Chlorella*, шприц емкостью 5 мл, стеклянный капилляр, мерный цилиндр емкостью 100 мл, магнитная мешалка, водяная баня, химический стакан объемом 0,5-0,8 л.

Ход работы: 2 г агар-агара смешать с 50 мл дистиллированной воды нагретой до 80 – 90° С. Смесь поместить в кипящую водяную баню и перемешивать до полного растворения агар-агара.

Приготовить густую суспензию клеток хлореллы, смешав 100 мг пасты клеток водоросли с 0,5 мл дистиллированной воды.

В химический стакан налить 0,4 л воды нагретой до 45° С. В этот стакан поместить на 10 мин сосуды с раствором агар-агара и суспензией клеток водоросли для уравновешивания их температуры.

Смешать весь объем суспензии с 2 мл 4% раствора агар-агара. Затем эта смесь помещается в шприц и пропускается через охлаждаемый капилляр, в котором и осуществляется формирование тонкого цилиндра геля с заключенными в нем клетками, в мерный цилиндр с охлажденной до 10°С водой. Процедура иммобилизации должна осуществляться быстро, чтобы избежать затвердевания геля в шприце.

Иммобилизованные указанными способами клетки хлореллы тщательно отмыть дистиллированной (три раза с выдерживанием в каждом

объеме воды по 10 мин). После отмыва препараты поместить в сосуды, содержащие 50 мл воды, а затем в холодильник. Эти препараты используются для выполнения работы № 2.

Задание. Определите время, необходимое для проведения иммобилизация клеток водоросли указанными способами. Определите выделяются ли клетки в среду при легком перемешивании препаратов иммобилизованных гелей.

РАБОТА № 2
Определение жизнеспособности иммобилизованных клеток *Chlorella*

Вводные пояснения

Процедура иммобилизации зачастую приводит к гибели основной массы клеток, обусловленной токсическим воздействием исходных реагентов (мономер, концентрированных растворов хлоридов кальция и бария, органических растворителей и т.п.) или воздействие высоких температур. По этой причине зачастую процедура иммобилизации производится в условиях снижения метаболической активности клеток (понижение температуры до 0^0С и ниже). Однако даже в этих условиях возможна гибель определенного количества исходного материала в приготовленных препаратах. Контроль жизнеспособности организмов, включенных в гель, – важная технологическая задача. В простейшем случае для определения жизнеспособности производится разрушение геля (химическое или механическое) с последующим определением способности освобожденных клеток к росту.

Зачастую такая процедура неприемлема, поскольку предполагается разрушение препарата, которое, в свою очередь, приводит к повреждению клеток. Кроме того, определение таким методом жизнеспособности клеток требует значительных затрат времени.

Гораздо точнее и оперативнее можно оценить жизнеспособность иммобилизованных клеток по их метаболической активности без разрушения препарата. Определение метаболической активности производится различными способами: окрашиванием, определением активности дыхания и фотосинтеза, способности к биосинтезу различных соединений.

Окрашивание флуоресцеиндиацетатом (ФДА) часто используют для определения жизнеспособности клеток. После абсорбции ФДА при наличии эстеразной активности он деацетилируется и становится флуоресцирующим. Окрашенные клетки рассматривают с помощью микроскопа, снабженного УФ- источником света.

Увеличение веса клеток является хорошим показателем их жизнеспособности. Сухой вес иммобилизованных клеток рассчитывают, исходя из предположения, что масса полимерной матрицы не изменяется.

О жизнеспособности клеток судят также по измерению интенсивности их дыхания, которое можно определять в течение инкубации через различные промежутки времени. Измерения проводят с помощью кислородного электрода Кларка по стандартной методике.

В данной работе определение жизнеспособности клеток основано на регистрации фотосинтетического поглощения CO_2 из среды, скорость которого оценивается по изменению (подщелачиванию) среды. Предлагаемый способ характеризуется простотой и высокой чувствительностью и позволяет проводить экспрессную оценку жизнеспособности иммобилизованных клеток водорослей без разрушения геля.

Материалы и оборудование: pH-метр, электроды для определения pH, магнитная мешалка, секундомер, осветитель, суспензии свежесобранных и после 7 дневного хранения клеток *Chlorella* в холодильнике, препараты иммобилизованных клеток *Chlorella*, хранящиеся 7 дней после иммобилизации.

Ход работы Суспензию клеток *Chlorella*, содержащую 300 мг сырого веса свежесобранных водорослей в 100 мл дистиллированной воды, поместить в измерительную ячейку для pH-метрии, Сосуд с суспензией экранируется от света черной бумагой. Измерение pH среды производится при интенсивном перемешивании суспензии с помощью магнитной мешалки. После установления показаний прибора на постоянном уровне и регистрации величины pH_0 необходимо снять светонепроницаемый экран и включить подсветку и секундомер. Через каждые 3 минуты регистрируются величины среды (pH_i) и определяют скорость подщелачивания среды (V) по формулам:

$$V = \Delta pH/(t_i - t_{i-1}),$$
$$\Delta pH = (pH_i - pH_{i-1})$$

где pH_i и pH_{i-1} – значения pH среды в моменты времени t_i и t_{i-1}, соответственно; $(t_i - t_{i-1}) = 3$ мин.

Произвести аналогичные измерения, поместив в измерительную ячейку pH-метра суспензию клеток водоросли, хранящуюся в холодильнике 7 дней, а затем – препараты иммобилизованных клеток *Chlorella*, содержащие эквивалентное количество водорослей. Результаты измерений занести в таблицу:

Время с начала освещения, мин	Суспензия клеток Chlorella				Иммобилизованные клетки			
	Свежесобранные		после 7 дней хранения		в альгинате кальция		в агар-агаре	
	ΔpH	V, ед.pH/мин	ΔpH	V, ед.pH/мин	ΔpH	V, ед.pH/мин	ΔpH	V, ед.pH/мин
0								
3								
6								
9								

Задание. Сравните скорости фотоиндуцированного подщелачивания среды суспендированными и иммобилизованными клетками водоросли. Постройте графики зависимостей скорости подщелачивания среды от времени с начала освещения водорослей для суспензий и иммобилизованных препаратов. Определите, как влияет хранение водорослей на скорость подщелачивание среды. Основываясь на величинах скорости фотоиндуцированного изменения pH среды, сделайте выводы о сохранении жизнеспособности клеток иммобилизованнных в альгинатном и агаровом гелях.

3. КОНТРОЛЬ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Задания для самоконтроля

1. Дайте определение. Иммобилизация – это …..
2. Дайте определение. Биотрансформация – это …..
3. Дайте определение. Пермеабилизация – это …..
4. Дайте определение. Биотестирование – это …..
5. Перечислите преимущества иммобилизованных ферментов.
6. Перечислите преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с иммобилизованными ферментами.
7. Перечислите требования, предъявляемые к материалам, которые используются в качестве носителя для иммобилизации.
8. Приведите примеры полисахаридных природных носителей
9. Приведите примеры белковых и липидных носителей.
10. Приведите примеры синтетических органических носителей.
11. Приведите примеры неорганических носителей.
12. Что из перечисленного относится к преимуществам (А) и недостаткам (Б) синтетических органических носителей. Ответ запишите в виде А13…Б24….
    1) неустойчивость к воздействию микроорганизмов;
    2) наличие функциональных групп в исходном и модифицированном состояниях, легко вступающих в различные химические реакции;
    3) механическая прочность;
    4) низкая способность к биодеградабельности;
    5) легкость регенерации;
    6) возможность придания любой конфигурации и различной степени пористости;
    7) возможность применения в виде тонкой пленки (толщина 80 мкм).
13. Что из перечисленного относится к преимуществам (А) и недостаткам (Б) неорганических носителей. Ответ запишите в виде А13…Б24….
    1) устойчивость к воздействию микроорганизмов;
    2) наличие большого количества различных функциональных групп в исходном и модифицированном состояниях, легко вступающих в различные химические реакции;
    3) способность к биодеградации;
    4) низкая способность к биодеградабельности;
    5) возможность получения липосом;
    6) легкость регенерации;
    7) возможность придания любой конфигурации и различной степени пористости.

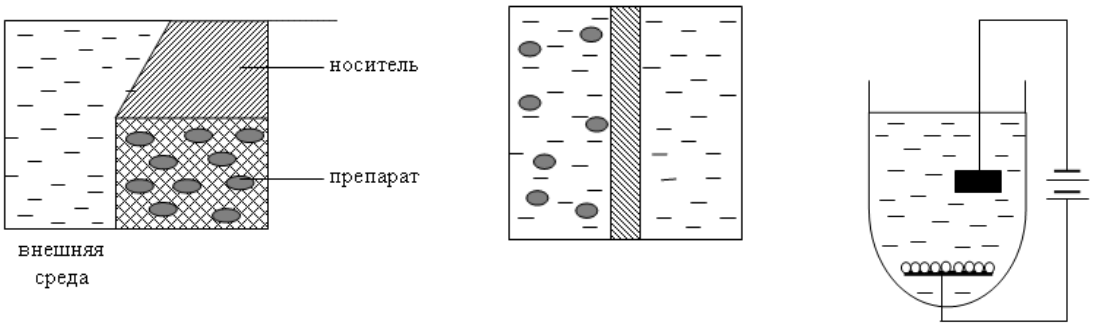
14. Что из перечисленного относится к преимуществам (А) и недостаткам (Б) природных органических носителей. Ответ запишите в виде А13…Б24….
    1) способность к биодеградации;
    2) механическая прочность;
    3) низкая способность к биодеградабельности;
    4) отсутствие возможности к регенерации;
    5) неустойчивость к воздействию микроорганизмов;
    6) наличие функциональных групп в исходном и модифицированном состояниях, легко вступающих в различные химические реакции;
    7) самая низкая стоимость по сравнению с другими носителями.
15. Установите соответствия. Ответ запишите в виде А2Б1В4Г3

Способ иммобилизации	Тип носителя
А) иммобилизация на поверхности носителя Б) иммобилизация в массе носителя В) иммобилизация металлохелатным способом Г) иммобилизация с использованием мембранной технологии	1) гидроксид титана в комплексе с полисахаридами; 2) альгинат кальция; 3) пористые волокна; 4) активированный уголь

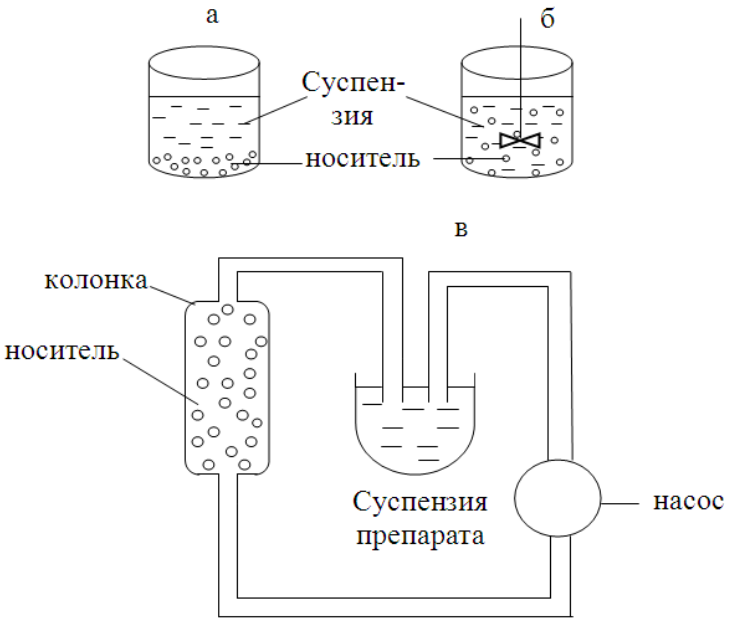
16. Перечислите типы взаимодействий (сил), за счет которых осуществляется адсорбционная иммобилизация.
17. Выберите ПРАВИЛЬНЫЕ утверждения:
    1) адсорбционная иммобилизация биокатализатора может осуществляться за счет электрических сил;
    2) при необратимой иммобилизации происходит образования ковалентных связей;
    3) иммобилизация в массе носителя обеспечивается только за счет механического обездвиживания;
    4) при создании биосенсоров используется иммобилизация на основе мембранной технологии;
    5) микрокапсулирование является одних из способов иммобилизации в массе носителя;
    6) микрокапсулы, полученные методом диспергирования, имеют строго одинаковые размеры;
    7) при иммобилизации ферментов металлохелатным способом группы, способные выступать в роли лигандов, должны находиться в области активного центра фермента;
    8) иммобилизация на поверхности носителя является необратимой.
18. Выберите НЕПРАВИЛЬНЫЕ утверждения:
    1) адсорбционная иммобилизация биокатализатора может осуществляться за счет электрических сил;

2) при необратимой иммобилизации происходит образования ковалентных связей;
3) иммобилизация в массе носителя обеспечивается только за счет механического обездвиживания;
4) при создании биосенсоров используется иммобилизация на основе мембранной технологии;
5) микрокапсулирование является одних из способов иммобилизации в массе носителя;
6) микрокапсулы, полученные методом диспергирования, имеют строго одинаковые размеры;
7) при иммобилизации ферментов металлохелатным способом группы, способные выступать в роли лигандов, не должны находиться в области активного центра фермента;
8) иммобилизация на поверхности носителя может быть только необратимой.

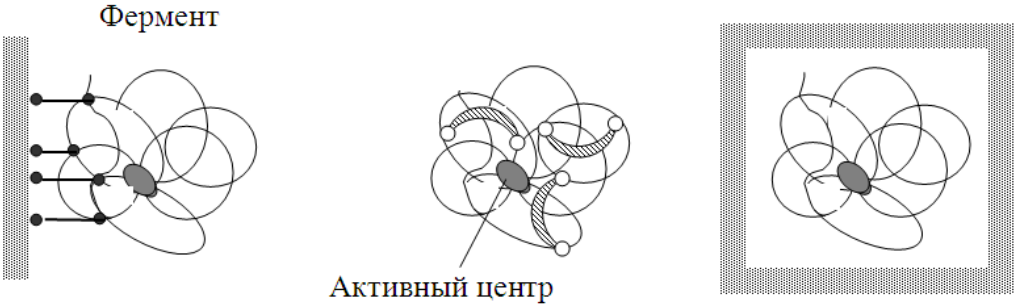
19. Как называются указанные на рисунке способы иммобилизации:



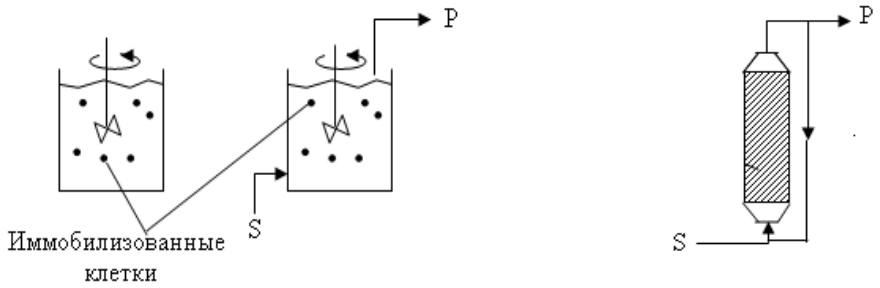
20. Как называются указанные на рисунке способы адсорбционной иммобилизации:



18. Как называются указанные на рисунке способы стабилизации ферментов с помощью иммобилизации:



19. Как называются указанные на рисунке типы реакторов для иммобилизованных клеток:



20. Перечислите крупномасштабные биотехнологические процессы с использованием иммобилизованных ферментов или клеток микроорганизмов.
21. Перечислите требования, предъявляемые к производственному штамму микроорганизмов.
22. Перечислите преимущества иммобилизованных растительных клеток.
23. Приведите примеры практического использования иммобилизованных растительных клеток.
24. Перечислите преимущества иммобилизованных животных клеток.
25. Назовите критерии, которые учитываются в процедурах биотестирования физиологически активных веществ с помощью иммобилизованных клеток животных.

Вопросы для подготовки к зачету

1. Общие принципы иммобилизации.
2. Иммобилизация ферментов как составная часть инженерной энзимологии.
3. Преимущества и недостатки иммобилизованных ферментов.
4. Преимущества иммобилизованных клеток.
5. Крупномасштабные промышленные процессы на основе иммобилизованных клеток и ферментов.

6. Требования к материалам, используемым в качестве носителей. Классификация носителей.
7. Природные органические носители: типы, преимущества, недостатки.
8. Основные характеристики полисахаридных природных носителей.
9. Белковые и липидные природные носители.
10. Синтетические органические носители: основные типы, преимущества, недостатки.
11. Носители неорганической природы.
12. Классификация методов иммобилизации. Способы физической и химической, обратимой и необратимой иммобилизации.
13. Адсорбционная иммобилизация: типы носителей, природа взаимодействий, способы, преимущества и недостатки.
14. Иммобилизация путем включения в гели: примеры носителей, техника, преимущества, недостатки.
15. Иммобилизация на основе мембранной технологии: варианты, преимущества и недостатки.
16. Иммобилизация путем включения в двухфазную реакционную среду.
17. Ковалентное связывание биокатализатора с поверхностью носителя.
18. Ковалентная поперечная сшивка.
19. Иммобилизация металлохелатным способом.
20. Сравнительная характеристика разных способов иммобилизации (адсорбция, ковалентное связывание, включение в гели, на основе мембранной технологии).
21. Влияние иммобилизации на каталитическую активность и конформацию фермента.
22. Влияние иммобилизации на стабильность ферментов.
23. Эффекты диффузии реагентов в катализе иммобилизованными ферментами.
24. Промышленные процессы на основе иммобилизованных ферментов.
25. Ферментные электроды.
26. Применение иммобилизованных ферментов в медицине.
27. Требования к производственному штамму микроорганизмов.
28. Подходы к созданию иммобилизованных микробных биокатализаторов.
29. Типы иммобилизованных микробных биокатализаторов по принципу действия, масштабности и специфике биотехнологического процесса.
30. Параметры для оценки физиологического состояния клеток микроорганизмов в иммобилизованном состоянии.
31. Получение аминокислот, органических кислот, спиртов и кетонов, антибиотиков с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов.
32. Использование иммобилизованных микробных клеток для трансформация стероидов, утилизации отходов, очистки сточных вод, получения ферментов, создания аналитических устройств.

33. Характеристика биореакторов для иммобилизованных клеток микроорганизмов.
34. Применение культур растительных клеток для получения БАВ, их преимущества и недостатки.
35. Преимущества иммобилизованных растительных клеток в качестве продуцентов БАВ.
36. Процессы биотрансформации с участием иммобилизованных растительных клеток.
37. Биосинтетические процессы с участием иммобилизованных растительных клеток.
38. Экскреция целевых продуктов иммобилизованными растительными клетками.
39. Методы определения жизнеспособности и метаболической активности иммобилизованных растительных клеток.
40. Системы культивирования иммобилизованных растительных клеток.
41. Типы культур животных клеток, техника их получения.
42. Преимущества культур животных клеток. Способы культивирования *in vitro* животных клеток.
43. Способы иммобилизации животных клеток. Микроносители. Преимущества иммобилизованных животных клеток.
44. Использование иммобилизованных животных клеток в процедурах биотестирования.

Темы рефератов

1. История развития методов иммобилизации ферментов.
2. История развития методов иммобилизации микробных, растительных и животных клеток.
3. Научные разработки по иммобилизации ферментов и клеток в Республике Беларусь.
4. Использование полисахаридных природных носителей для иммобилизации клеток и ферментов.
5. Иммобилизация клеток и ферментов с помощью синтетических органических носителей.
6. Иммобилизации клеток и ферментов с помощью неорганических носителей.
7. Способы иммобилизации микробных клеток.
8. Способы иммобилизации растительных клеток.
9. Способы иммобилизации животных клеток.
10. Иммобилизация клеточных органелл.
11. Способы иммобилизации ферментов.
12. Крупномасштабные промышленные процессы на основе иммобилизованных ферментов.

13. Использование иммобилизованных биокатализаторов в тонком органическом синтезе.
14. Использование иммобилизованных биокатализаторов для утилизации отходов и очистки сточных вод.
15. Применение иммобилизованных ферментов и клеток в процедурах биотестирования.
16. Использование иммобилизованных биокатализаторов в медицине.
17. Направления использования иммобилизованных растительных клеток.
18. Характеристика биореакторов для иммобилизованных микробных биокатализаторов.
19. Системы культивирования иммобилизованных растительных клеток.
20. Системы культивирования иммобилизованных животных клеток.

4. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЙ РАЗДЕЛ

Учебно-программные материалы

Типовая учебная программа по учебной дисциплине «Иммобилизованные клетки и ферменты» для учреждений высшего образования по специальностям 1-31 01 01 Биология (по направлениям) направлениям специальности 1-31 01 01-01 Биология (научно-производственная деятельность) и 1-31 01 01-03 Биология (биотехнология)

http://elib.bsu.by/handle/123456789/3315

Учебная программа учреждения высшего образования (рабочий вариант) по учебной дисциплине «Иммобилизованные клетки и ферменты» для специальностей 1-31 01 01 Биология (по направлениям) направлениям специальности 1-31 01 01-01 Биология (научно-производственная деятельность), 1-31 01 01-03 Биология (биотехнология) доступна по адресу

http://elib.bsu.by/handle/123456789/98213

Учебная программа учреждения высшего образования по учебной дисциплине «Иммобилизованные клетки и ферменты» для специальности 1-31 01 02 Биохимия доступна по адресу

http://elib.bsu.by/handle/123456789/103088

Учебная программа учреждения высшего образования (рабочий вариант) по учебной дисциплине «Иммобилизованные клетки и ферменты» для специальности 1-31 01 02 Биохимия доступна по адресу

http://elib.bsu.by/handle/123456789/105922

Список рекомендуемой литературы и Интернет-ресурсов

ЛИТЕРАТУРА

О с н о в н а я:

1. *Березин, И. П.* Иммобилизованные ферменты / И.П. Березин Н.Л. Клячко, А.В. Левашов и др. М.: Высш. школа, 1987.

2. *Бодей, С. П.* Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / С.П. Бодей, П. Броделиус, И.М.А. Кабрал и др. М.: Мир, 1988.

3. *Бутенко, Р. Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. М.: ФБК-ПРЕСС. 1999.

4. Применение иммобилизованных ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. М.: ВИНИТИ, 1986.

5. *Синицын, А. П.* Иммобилизованные клетки микроорганизмов / А.II. Синицын, Е.И Райнина, В.И. Лозинский, С.Д. Спасов М.: Изд-во Моск. ун-та, 1994.

6. *Юрин, В. М.* Иммобилизованные клетки и ферменты: курс лекций / В.М. Юрин. Минск: БГУ, 2006.

Дополнительная:

1. *Валиханова, Г. Ж.* Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. Алматы: Конжык. 1996.

2. *Зубов, В. П.* Молекулярное конструирование полимерных материалов для биотехнологии и медицины / В.П. Зубов, А.Е. Иванов, Л.С. Жигис и др.// Биоорганическая химия. 1999. Т.25. №11. С.868-880.

3. Иммобилизованные клетки в биотехнологии. Пущино, 1987.

4. *Колесов, А. А.* Инженерная Энзимология на промышленном уровне / А.А. Колесов. Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология М.: ВИНИТИ, 1989 Т. 18.

5. *Корочинский, А. В.* Исследование возможности создания иммобилизованных структур на базе пробиотиков // А.В. Корочинский, В.В. Верниковский, Э.Ф. Степанова // Успехи современного естествознания. 2010. №5. С. 34-38.

6. *Скрябин, Г. К.* Иммобилизованные клетки микроорганизмов Биотехнология / Г.К. Скрябин, К.А. Кощеенко. М.: Наука, 1984.

7. *Тривен, М.* Иммобилизованные ферменты / М. Тривен. М.: Мир, 1983.

8. Application of Cell Immobilisation Biotechnology / ed. V. Nedic, R. Willaert. Springer, 2005.

Интернет-ресурсы:

1. Темников Д.А., Мезина З.Р. Обучающий интернет-курс «Основы культивирования клеток животных». – Казань: Казанский университет, 2003. www.ksu.ru/nilkto/cell
2. Кузьмина Н.А. Интерактивный учебник по биотехнологии. 2011-2013. http://www.biotechnolog.ru