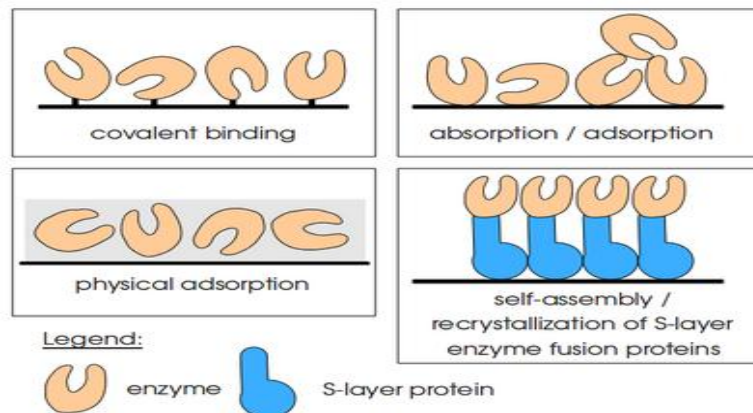


# Тақырып: Имобильденген клеткалар мен ферменттерді биоконверсияда қолдану



## Жоспар

- ✓ Ферменттерді имобильдеу әдістері мен қолданылуы
- ✓ Клеткаларды имобильдеу әдістері мен оларды биоконверсияда қолдану технологиялары.

## ➤ Ферменттерді иммобилиздеу

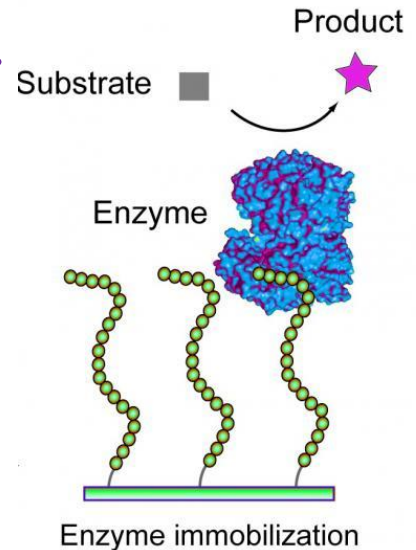
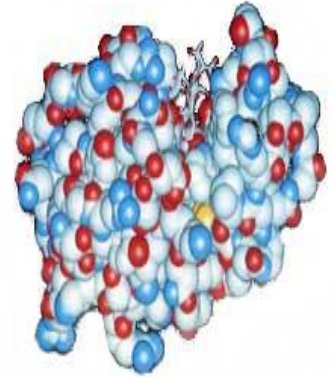
### ➤ *Иммобилизденген ферменттердің жалпы сипаттамасы*

□ Ферменттер мен ферменттік жүйелер түрлі өндірістік салаларда: медицинада, ауыл шаруашылығында, химиялық талдау т.б. қолданылады.

□ Ферменттердің табиғаты белоктық заттар болғандықтан, температураға өте сезімтал келеді, құрылымдық қасиеттері тұрақсыз, сақтауда бырқатар қиындықтар тудырады.

□ Сондай - ақ, ферменттерді реакция жүргеннен кейін реагенттер мен өнімдерден ажырату қиын болғандықтан, ферменттерді бірнеше рет қолдану мүмкіндігі төмен.

□ Бұл проблемаларды шешу үшін *ферменттерді иммобилиздеу әдістері* қолданылады. Әдістердің негізін **1916 жылы Дж.Нельсон және Е.Гриффин** салған, олар инвертазаны көмірде адсорбциялап, ферменттің осы күйде өзіндік катализдік ырықтығын сақтайтынын көресткен. “**Иммобилизденген ферменттер**” термині 1971 жылы заңдастырылды және белоктық молекулалардың кеңістікте кез келген қозғалысын шектеу деген түсініктеме берілді.



- *Ферменттерді иммобилизациялау* — олардың активті формаларын ерімейтін негізге немесе жартылай өткізгіш мембраналық жүйеге бекіту.
- Ферменттерді матрицаға бекіту: органикалық немесе бейорганикалық гельге (капсулаға) адсорбциялық, химиялық байланыс арқылы, және механикалық жолмен жүргізеді.
- Ферменттерді бекіту олардың *ырықты орталықтарына кірмейтін* және *ферменттік - тасымалдағыш комплекс түзуге қатыспайтын функционалдық топтары* арқылы жүргізіледі.
- Фермент тасымалдағыш немесе матрица түйіршікті материал тәрізді, талшықты құрылысты, беті пластинка тәрізді, іші қуыс талшық, трубка, капсула түрінде т.б. болуы мүмкін.
- Фермент тігілетін зат (матрица) құрайтын бөлшектердің мөлшерлері маңызды болып келеді, сондықтан бөлшектердің диаметрі 0,1—0,2 мм, матрицаның беттік ауданы үлкен болу керек.
- Фермент тігілетін зат (матрица) табиғи немесе синтетикалық полимер болуы мүмкін.

➤ **Иммобилденген ферменттердің артықшылықтары:**

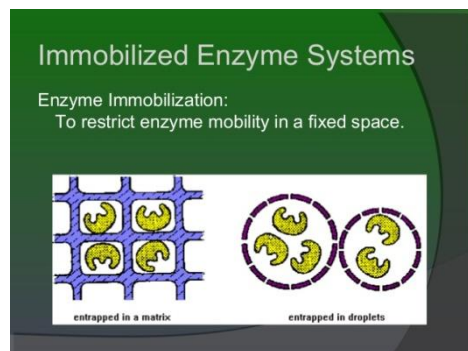
- 1. Гетерогенді катализатор реакциялық орталықтан оңай ажыратылады, реакцияны кез келген уақытта тотқатуға, **ферментті қайтара қолдануға** және ферменттен тазартылған өнімді алу мүмкіндігі болады.
- 2. Иммобилденген ферменттерді қолдану арқылы ферментативтік процесті катализдік реакцияның жылдамдығын және өнімді шығаруды бақылау арқылы **үздіксіз** жасауға болады.
- 3. **Ферментті модификациялау** арқылы мақсатты түрде оның қасиеттерін өзгерту мүмкінді, мәселен: ферменттің өзіндік спецификалық қасиетін (әсіресе макромолекулалық субстратқа қатысты), ортаның рН - на, иондық құрамына және басқа да параметрлеріне байланысты **катализдік ырықтығын, денатурациялық әсерлерге төзімділігін арттыру** т.б.
- 4. Фермент тасымалдағыш қасиетін физикалық факторлар (жарық, дыбыс) арқылы өзгерту негізінде **ферменттердің катализдік ырықтығын өзгертуге** болады.
- Ферменттерді иммобилиздеу ерімейтін субстраттарға тікелей байланыстыру және белок молекулаларын төмен молекулалы бифункционалды қосылыстармен молекула ішілік және молекула аралық тігу, сондай - ақ, еритін полимерге қосу арқылы жүзеге асырылады.

➤ **Ферменттер тігілетін заттың (матрицаның) жіктелуі**

- Имобилденген ферменттерді органикалық және бейорганикалық тасымалдағыштарға тігеді, олардың түрлері шектеулі болады.

• **Фермент тігілетін тасымалдағышқа (матрицаға) қойылатын талаптар (Дж.Порат, 1974):**

- ✓ химиялық және биологиялық қасиеттерінің тұрақтылығы жоғары;
- ✓ химиялық беріктігі жоғары;
- ✓ ферменттер мен субстраттарды өткізгіштік қабілеті жоғары, кеуекті, беттік ауданы үлкен;
- ✓ технологиялық тұғыда қолдануға ыңғайлы (түйіршікті, мембрана);
- ✓ оңай ырықтанатын;
- ✓ гидрофильділігі жоғары;
- ✓ құны арзан.



# Тасымалдағыштар (фермент тігілетін зат)

**органикалық**

**бейорганикалық**

**Төмен  
молекулалы**

**полимерлі**

**макро-  
поралы**

**Басқа  
түрлер**

**Ферменттер тігілетін тасымалдағыштардың түрлері**

# Enzyme Immobilization

Immobilization in carriers

Inclusions (soluble)

Crosslinking

Binding to carriers

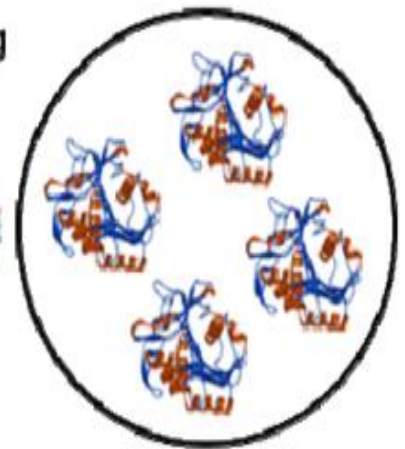
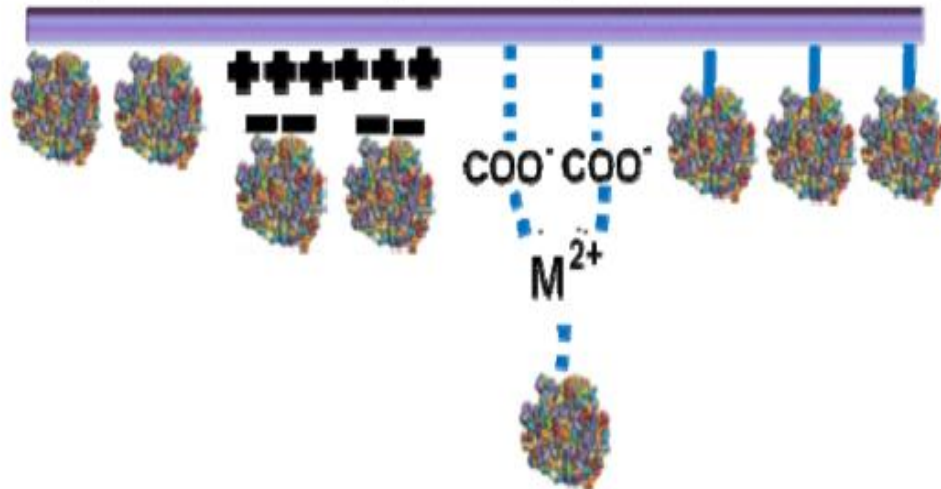
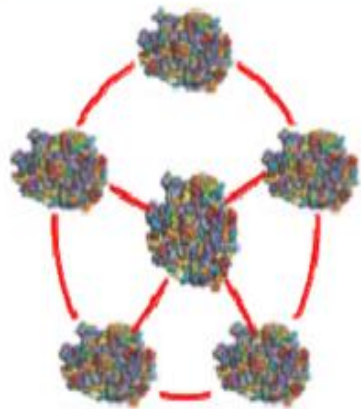
Encapsulation

Adsorption

Ionic binding

Complexation

Covalent binding



**Органикалық матрицалар (төмен және жоғары молекулалы)**

**табиғи**

**белокты**

**липидті**

**полисахаридті**

**синтетикалық**

**полиамидті**

**полиэфирлі**

**полиметиленді**



- Ферменттерді иммобилизациялауда **табиғи полисахаридті** және **полиметилді** типті **синтетикалық матрицалар** кең қолданысқа ие, ал қалған түрлері сирек қолданылады.
- Табиғи полимерлі матрицаларды жиі қолданылуы, олардың қолжетімді, құрамында химиялық реакцияларға тез түсетін реакциялық функционалдық топтардың болуымен, сондай - ақ, жоғары гидрофильділігімен сипатталады.
- **Кемшілігі:** қымбат, микроорганизмдердің әсерінен құрылысы тез бұзылады, тұрақсыз.
- Көбінесе ферменттерді иммобилизациялауға **полисахаридтер:** **целлюлоза, декстран, агароза** және **олардың туындылары** қолданылады.
- **Целлюлоза** гидрофилді, құрамында көптеген гидроксилді топтары болады, оларды басқа топтармен алмастырырып, модификациялауға мүмкіндік туады.
- **Механикалық беріктігін жоғарылату** үшін целлюлозаны жартылай гидролиздеп түйіршіктейді, нәтижесінде аморфты бөлімдері бұзылып, целлюлоза кеуекті құрылысты формаға ие болады, кеуектілікті сақтау үшін кристаллдық бөлімдерге химиялық тігістер жасайды.
- Түйіршікті целлюлозаны түрлі ион алмастырушы туындыларға, мысалы ДЭАЭ-целлюлоза, КМЦ т.б. айналдыруға болады.

- **Декстран негізіндегі матрицалар** кең таралған, оларды **"сефадекстер"** деп атайды.
- ❑ **Сефадекстерді** құрғатып, кептіргенде оңай жиырылады, ал судағы ерітіндіде қатты ісінеді.
- ❑ Осындай тасымалдағыштарда саңылаулардың мөлшері гелде тігілу арқылы бақылады.
- ❑ Декстрандар тобына **крахмал** да жатады.
- ❑ **Химиялық модификацияланған крахмал агенттермен (формальдегидпен) тігіледі.** Осындай жолмен губка тәрізді крахмал алынады, оның ферменттерге және гидролизге төзімділігі жоғары болады.
- ❑ Декстран негізінде суда еритін препараттар дәрі дәрмек тасымалдағыштар ретінде медицинада қолданылады.
- **Тасымалдағыш – Агар.** Оның қасиеті диэпоксиднді қосылыстармен тігу арқылы жақсартады. Ондай агар қыздыруға төзімді, берік, әрі оңай модификацияланатын қасиетке ие.

## ➤ Тасымалдағыш белоктардың артықшылықтары:

- ✓ сыйымдылығы жоғары,
- ✓ биодеградацияға қабілетті,
- ✓ өте жұқа мембрана (қалыңдығы 80 мкм) түрінде қолдануға болады.
- ✓ ферменттерді белоктық тасымалдағыштарда иммобилиздеу тігілетін агенттер қатысуымен және олардың қатысуынсыз да жүргізуге болады.
- ✓ белоктар іргелі биологиялық зерттеулер мен медицинада қолданылады.

□ *Кемшілігі:* тасымалдағыштар ретінде олардың жоғары иммуногендік қасиетіне (коллаген және фибриннен басқа) байланысты.

□ Көбінесе құрылымдық (кератин, фибрин, коллаген), жиырылғыш (миозин) және транспорттық (альбумин) белоктары қолданылады.

## ➤ Синтетикалық полимерлі қосылыстарды қолдану:

- ✓ ферменттерді ковалентті жолмен бекіту;
- ✓ ферменттерді сорбциялық иммобилизациялау;
- ✓ гельдер алу;
- ✓ микрокапсулалар алу.

➤ *Стирол негізіндегі полимерлер* сорбциялық иммобилизацияға қолданылады. Олардың құрылысы ірі кеуекті, изопоралы және гетеропоралы құрылысты болуы мүмкін. Полимерлі гидрофилді тасымалдағыштарды алу үшін *акрил қышқылының туындысы - акриламид* қолданылады.

➤ Ферменттер мен клеткаларды полиакриламид гельге бекіту кең таралған әдіс, ол торлы құрылысты қатты кеңістіктік болып келеді. Полиакриламид гель химиялық әсерлерге төзімді болып келеді.

- Синтетикалық полимерлі қосылыстарды ферменттерді ковалентті және сорбциялық иммобилизациялауға, гельдер мен микрокапсулалар алу үшін қолданады. Стирол негізіндегі полимерлер сорбциялық иммобилизацияға қолданылады. Олардың құрылысы ірі кеуекті, изопоралы және гетеропоралы құрылысты болуы мүмкін. Полимерлі гидрофилді тасымалдағыштарды алу үшін акрил қышқылының туындысы акриламид қолданылады.
- Ферменттер мен клеткаларды полиакриламид гелге бекіту кең таралған әдіс, ол қатты кеңістіктік торлы құрылысты болып келеді. Полиакриламид гель химиялық әсерлерге төзімді болып келеді.
- Полиамидті тасымалдағыштар амидті топтары  $-C(O)-NH-$ . Қайталанатын гетеротізбекті полимерлер болып келеді. Мысалы, N-винилпирролидон негізіндегі полимерлерге организмде баяу ыдырайтын ферменттерді иммобилиздеуге қолданады. Сонымен қатар, олар биологиялық инертті болғандықтан, медициналық мақсатта қолданады. Кемшілігі: организмде жинақталу қабілетінде. Осыған байланысты, табиғи полимерлер көп қолданылады, олар организмде ферменттермен гидролизденеді. Сондықтан дәрілік препараттардың құрамына көбінесе декстран, ал синтетикалық тасымалдағыштардан N-винилпирролидон негізіндегі полимерлер қолданылады.

- **Ферменттерді иммобилиздеу әдістері:**

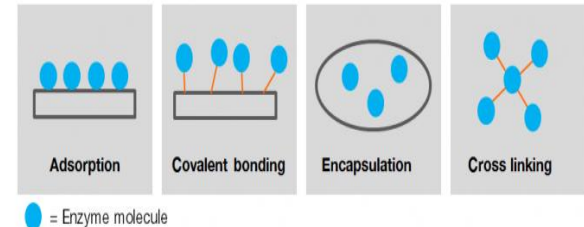
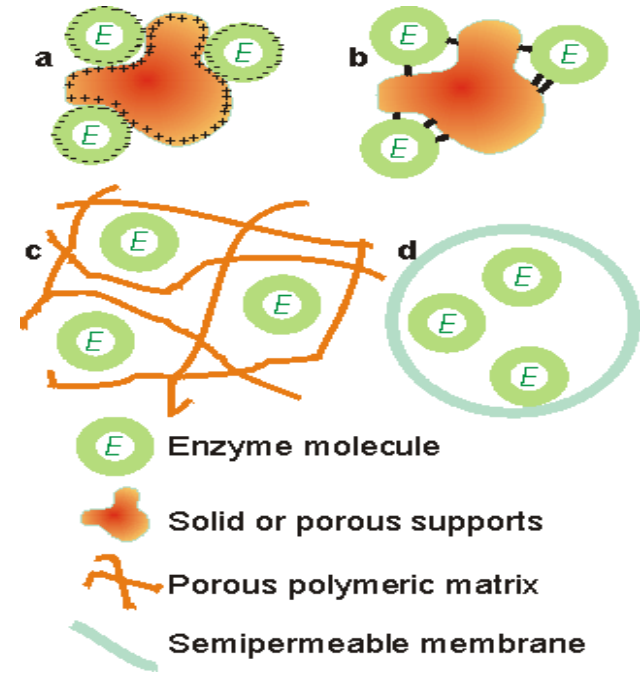
- **Физикалық және химиялық**

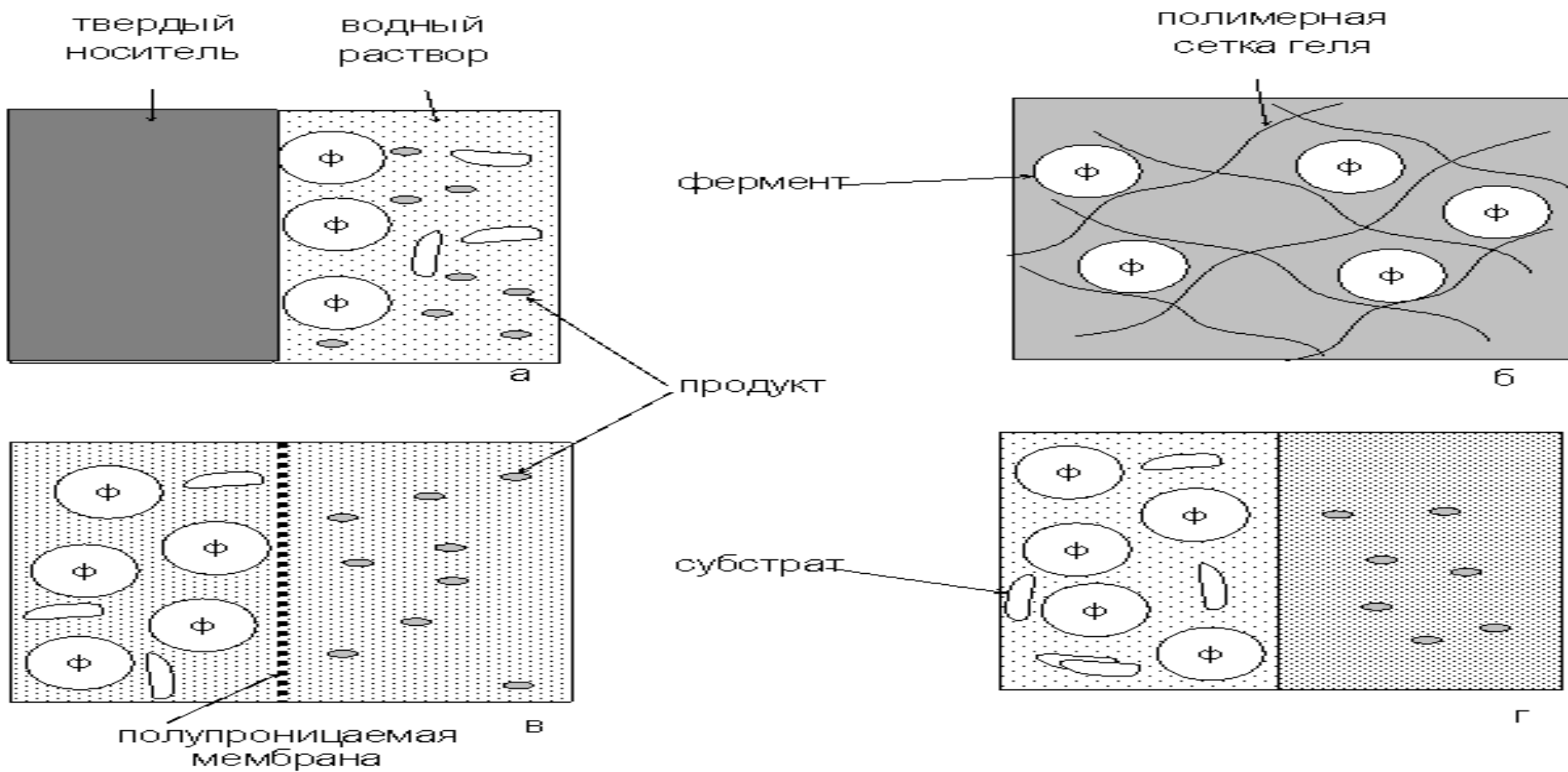
- **Ферменттерді физикалық жолмен иммобилизациялау** - ферменттер ортадағы органикалық заттармен ғана байланыса алатын жағдайда орындалады.

- Фермент тасымалдағышпен ковалентті байланыспайды.

- **Ферменттеді байланыстырудың төрт түрі бар:**

- 1) ерімейтін тасымалдағыштарға адсорбциялау;
- 2) гель саңылауларына бекіту;
- 3) ферменттерді реакциялық ортадан жартылай өткізгіш (мембрана) жүйе арқылы бөлу;
- 4) екі фазалық ортаға қосу, бұл ортада фермент еритін фаза құрамында болады.

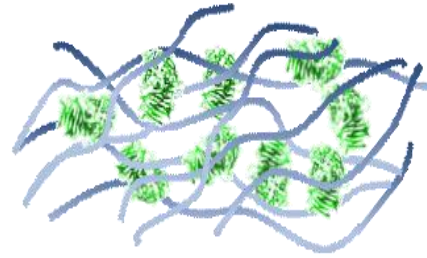




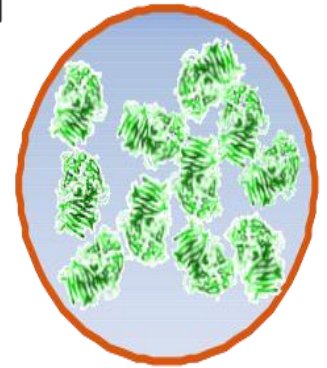
Ферменттерді иммобилизациялау әдістері: а – ерімейтін тасымалдағыштарда адсорбциялау, б – гель саңылауларына бекіту, в – ферменттерді жартылай өткізгіш мембрана арқылы бөлу, г – екі фазалық реакциялық орта қолдану.

# ENZYME IMMOBILIZATION

## ENTRAPMENT

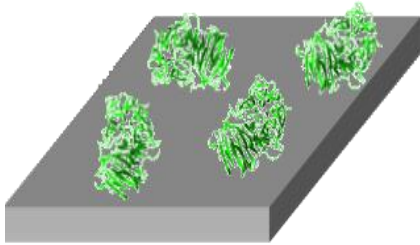


Matrix entrapment

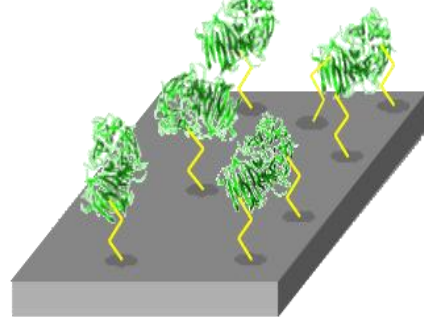


Encapsulation

## BINDING TO SUPPORTS

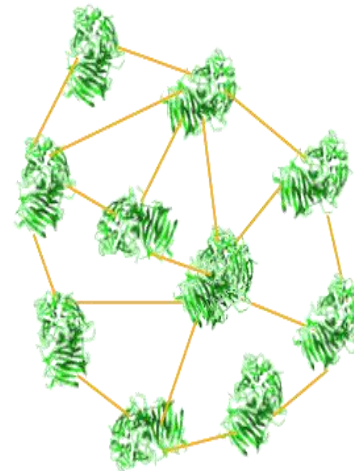


Adsorption



Covalent binding

## CROSS-LINKING

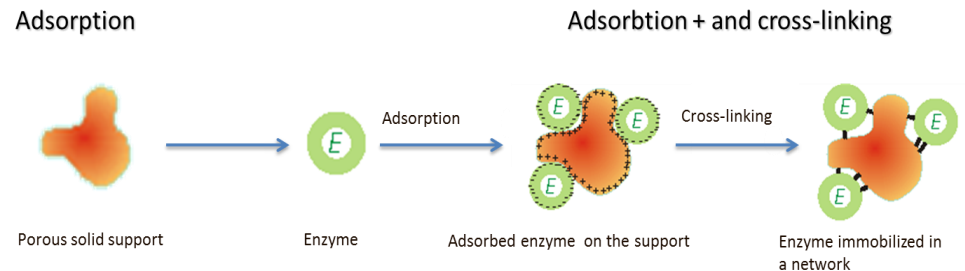




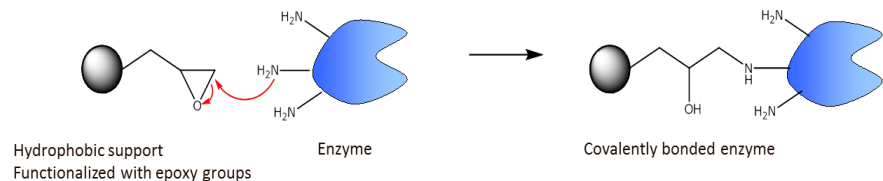
➤ **Адсорбциялық иммобилизация** (1916 ж) өте қарапайым әдіс, ферменттің судағы ерітіндісі мен тасымалдағыш арасындағы байланыс арқылы жүзеге асады. Адсорбцияланбаған белокты жуғаннан кейін иммобилизденген фермент қолдануға дайын болады.

□ Тасымалдағышта адсорбцияланған фермент молекуласы тасымалдағыштар мен беттік белоктық топтар арасындағы **спецификалық емес байланыстар** түзеді, олар:

- ✓ ван-дер-ваальс,
- ✓ сутектік,
- ✓ электростатикалық
- ✓ гидрофобты.



Covalent Immobilization (hydrophobic support functionalized with epoxy groups)



- ❑ Әр бір байланыс түрлері тасымалдағыштың химиялық табиғатынан және фермент молекулаларының бетіндегі функционалдық топтардан тәуелді болады.
- ❑ Тасымалдағыштар мен ферменттер арасындағы байланыс өте берік болады, алайда биокатализатордың сорбциясы кезінде оның құрылысы бұзылуы мүмкін.
- ❑ Мысалы, цифадекс гранулаларында өсімдік клеткалары адсорбцияланғанда клетка қабықтары тасымалдағыштың беттік рельефін қайталап деформацияланады.
- ❑ Әдістің артықшылығы тасымалдағыштар ретінде сорбенттердің қолжетімділігі мен арзандығы болып табылады. Оларға кез келген конфигурациялық формалар беріп, кеуектілігін арттыруға болады.
- ❑ Адсорбциялық бекітуде ферменттерді тазарту мәселесі шешіледі, өйткені белоктар мен тасымалдағыштардың өзара байланысуында өзіндік спецификалық қасиеттері болады.
- ❑ Әйтседе, бұл әдісте тасымалдағыш пен белоктың өзара байланысы кей жағдайда берік болмайды. Сонымен қатар, адсорбциялық иммобилиздеу әдісінің ортақ рекомендациялары жоқ, сондықтан тасымалдағыштарды таңдау және белгілі бір ферментті иммобилиздеудің оптималды жағдайын жасауда қиындықтар туындайды.

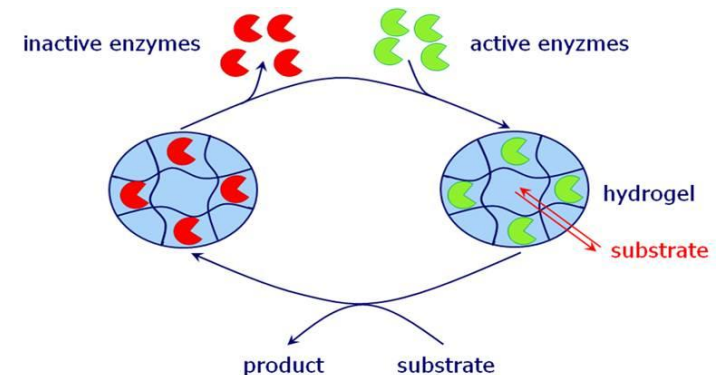
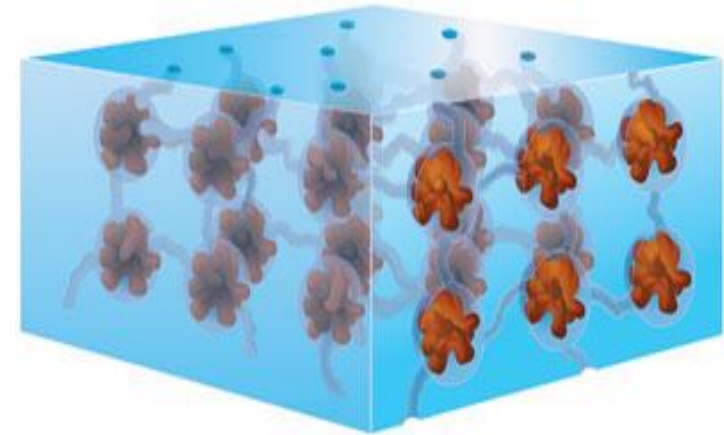
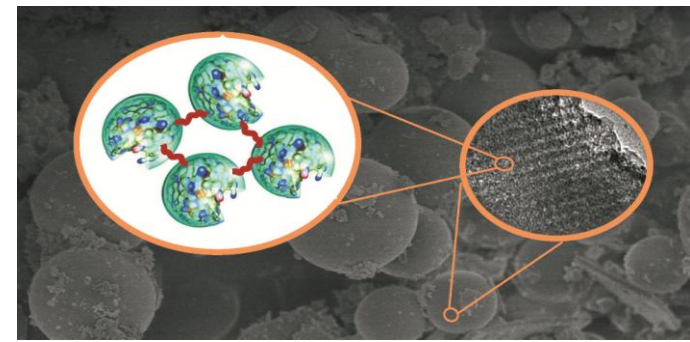
- **Ферменттерді гелде иммобилизациялау.**
- Фермент молекуласы тасымалдағыштың полимерлі тізбектердің үш өлшемді (трехмерная) торлардан құрылған гелге тігіледі.
- Торлар фермент молекуласының көлемінен кіші болғандықтан, гелге бекінген молекулалардың босауына тосқауыл болады. сондай ақ, ферменттер гелдің полимерлі тізбектерімен иондық және сутекті байланыстармен байланысады.
- гелдің полимерлі тізбектерінің кеңістіктері сумен толтырылады. Мысалы акрил қышқылының полимерлі гелдің құрамында 50 - 90% су болады.
- ***Гелде ферменттерді иммобилизациялау жолдары:***
- 1) ферменттерді мономердің судағы ерітіндісіне қосып, полимеризация жүргізу нәтижесінде құрамында иммобилденген ферменттер бар ***полимерлі гель түзіледі.*** Реакциялық қоспаға бифункционалды (бір молекулада екі қос байланыс болады) агенттер тігіледі, нәтижесінде полимердің үш полимерлік құрылымды тор қалыптасады.
- 2) ферментті дайын полимер ерітіндісіне қосып, ***гель тәрізді күйге*** айналдырады.

□ **Полимерлі гель құрамына ферменттерді иммобилизациялау әдісі** әр түрлі конфигурациядағы препараттарды алу мүмкіндігін береді, әрі биокатализатордың тасымалдағышта біркелкі жайылуын қамтамасыз етеді.

■ Бұл әдіс **әмбебап**, кез келген ферменттерді, полиферментті жүйелерді, клетка бөлшектері мен клеткаларды иммобилизациялауға қолданады,

■ Гельге бекітілген **фермент тұрақты**, бактериялық залалдану болған жағдайда инактивациядан берік қорғалған (ірі бактериялық клеткалар полимерлі матрицаның майда пораларға кіруге қабілетсіз) болады.

■ Екінші жағынан субстраттың ферментке диффузиялануына тосқауыл болып, **препараттың катализдік тиімділігін төмендетеді** (жоғары молекулалы субстраттарға бұл әдіс мүлдем қолданылмайды).



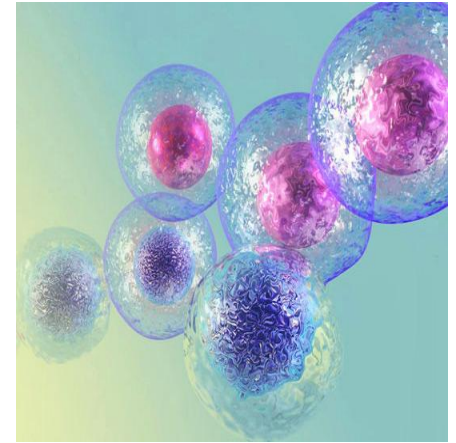
➤ *Мембраналарды қолдану арқылы ферменттеді иммобилиздеу* принципі ферменттердің судағы ерітіндісін субстрат ерітіндісінен жарптылай өткізгіш мембрана арқылы бөлініп тұрады.

❑ Жартылай өткізгіш мембрана арқылы субстраттың кіші молекулалары оңай өтсе, ал үлкен молекулаларға тосқауыл болады.

❑ Әдістің модификациясы ретінде жартылай өткізгіш мембраналардың табиғаты мен оларды алу әдістерімен ерекшелінеді.

❑ Ферменттердің судағы ерітіндісін микрокапсулалардың ішіне бекітуге болады (жұқа полимерлі қабықшалары бар тұйықталған сфералық көпіршіктер).

❑ Қос қабатты эмульгациялау нәтижесінде органикалық полимер ерітіндісінің тамшыларынан құралған сулы эмульсия құрылады, оның құрамында ферменттердің судағы ерітіндісінен құралған ұсақ тамшылар болады. Аз уақыттан кейін ерітінді қатып, иммобильденеген ферменттері бар сфералық полимерлі бөдшектер қалыптасады.



- Егер суда ерімейтін полимерлердің орнына молекулалық массалары жоғары сұйық көмірсулар қолданылса бұл әдісті *сұйық мембраналарды қолдану арқылы ферменттерді иммобилдеу* деп атайды.
- Жартылай мембраналарды қолдану арқылы ферменттерді иммобилдеу әдістерінің модификациясына талшықтарды қолдану әдісін де жатқызады (бұл жағдайда құрамында ферменттер бар тамшылардың орнына талшықтар түзіледі) және липосомалар қосылады.
- Мембраналық жүйелерді қолдану арқылы ферменттерді көп мөлшерде бөліп алу мүмкіндігі болады.
- *Әдістің кемшілігі* жоғары молекулалық субстраттардың ферментативтік процеске қатыса алмауында болып табылады.
- *Екі фазалық жүйені қолдану арқылы иммобилдеу әдісі* - ферменттер екі фазаның біреуінде ғана еріп, ал екінші фазада ерімейтін күйде болады, осындай жағдайда ферменттер бекітіледі.
- Ферментативтік процестерден кейін түзілген өнім екі фазаның ортасында жинақталады. Фазалардың табиғатын түзілетін өнім құрамында ферменттері жоқ фазада жинақталатындай етіп таңдайды. Реакция аяқталғаннан кейін сол фазаны бөліп алып, одан өнімді тазартып алады. Ал фермент бар фазаны ферментативтік процеске қайта қолданады.

# • Клеткаларды иммобилизациялау

- Микроорганизм клеткаларын иммобилиздеу туралы ақпарат ең алғаш рет XX ғасырдың 70-шы жылдары пайда болды, ал өндірісте қолданылуы алғаш рет Жапон елінде 1974 ж жүзеге асты. Осы әдіс арқылы аспарагин қышқылы алынды.

## □ *артықшылығы:*

- ✓ ферменттерді бөліп алу және тазартуға кететін шығын болмайды;
- ✓ реакция өнімдерін алу және тазартуға кететін шығын төмендейді;
- ✓ ырықтығы мен тұрақтығы жоғары;
- ✓ үздіксіз және жартылай үздіксіз автоматтандырылған процестерді жасау;
- ✓ экзогенді кофакторларсыз полиферменттік жүйелердің ұзақ жұмыс жасау қабілетіне ие болуы.

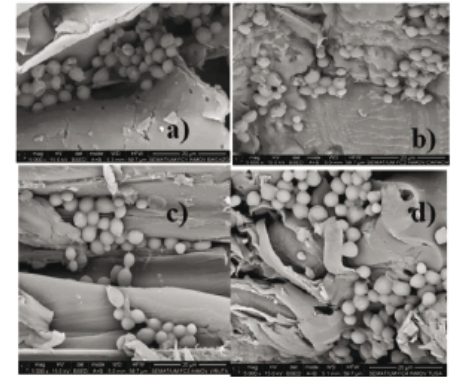
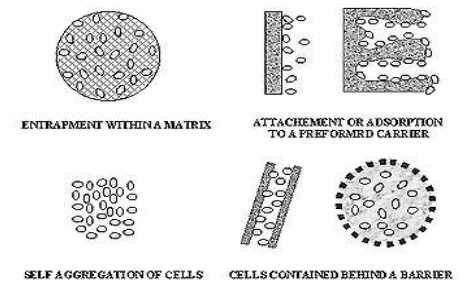
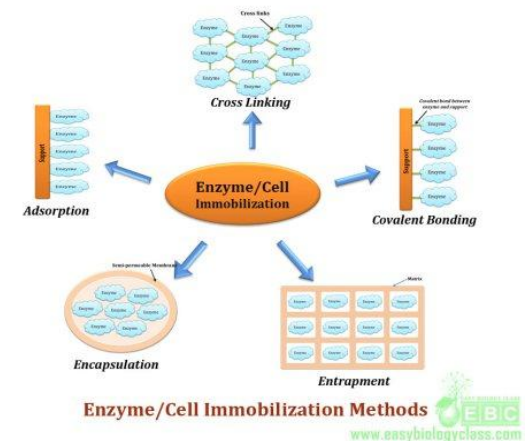
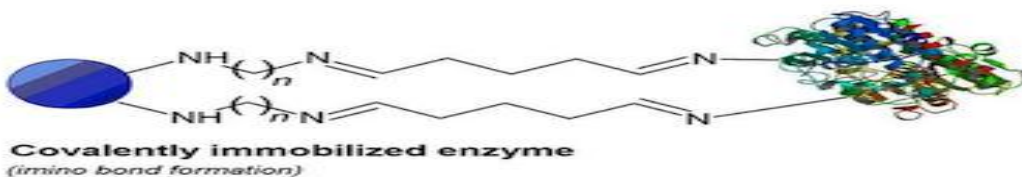
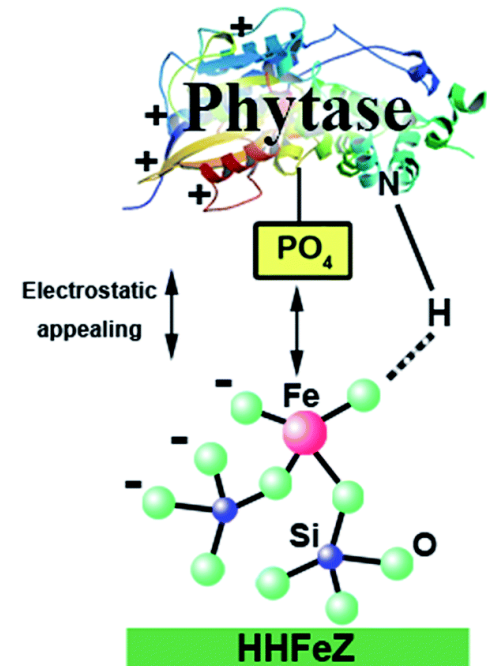


Figure 8. Scanning electron microscopic (SEM) of the four immobilized carriers: a) bagasse, b) com leaves, c) wood shavings, and d) com cobs



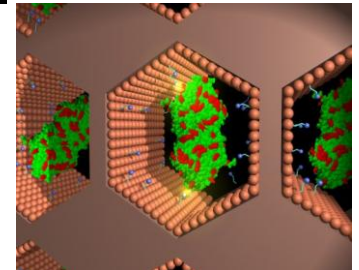
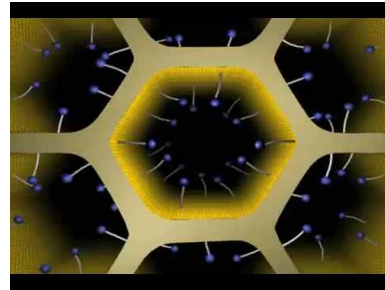
- **Химиялық әдіс.**
- Химиялық әдіс – клетка қабығындағы активті топтар мен матрицаның бифункционалды реагенттерімен (мысалы, глутар альдегидімен) арасындағы ковалентті байланыстар арқылы байланысады.





➤ **Физикалық әдістер** - адсорбция және агрегация.

- Гельдер, мембраналар және талшықтарға клеткалардың иммобилизациясы физикалық және химиялық әрекеттесумен жүзеге асады.
- Химиялық иммобилизациялау әдістері сирек қолданылады және тірі клеткаларды бекітуге жарамайды.
- Көбінесе гелдер, мембраналар мен талшықтарға бекіту қолданылады. Осындай жолмен бекітілген клеткалар тіршілікке қабілетті болады, қоректік ортада гелдің үстіңгі қабатында көбеюге қабілетті болады. Иммобилденген клеткалардың биокатализдік ырықтығы ғылым мен техника салаларында қолданылады:
  - ✓ аминқышқылдар, органикалық қышқылдар, антибиотиктер, стероидтар, көмірсулар, көмірсутектер, нуклеотидтер мен нуклеозидтердің биосинтезі мен трансформациясында қолданылады;
  - ✓ сыра және шарап өндірісінде;
  - ✓ табиғи және ағын суларды тазартуда;
  - ✓ ағын сулардан металдарды алуда;
  - ✓ күн энергиясының ассимиляциясында;
  - ✓ сутекті күн элементтерін жасауда;
  - ✓ азотфиксацияда;
  - ✓ электродтарды дайындауда анализдік мақсаттарда.



- Микроорганизм клеткаларын иммобилизациялау нәтижесінде амин қышқылдарды, органикалық қышқылдарды және антибиотиктерді синтездеу саласында жапон ғалымдардың жасаған ғылыми зерттеу жұмыстарының үлесі зор.
- Мәскеу мемлекеттік университетінде микроорганизм клеткаларын иммобилизациялау арқылы аспарагин қышқылын алу технологиялары жасалған. Армирленген полиакриламидты гельге бекітілген *E.coli* клеткалары тіршілік барысында (110 тәулікте) аспарагин қышқылын өндіреді.
- Клеткаларды иммобилизациялауда тек микроорганизмдерің клеткаларын ғана қолданып қоймай, өсімдіктер және жануарлардың клеткалары мен ұлпаларын да қолдануға болады, нәтижесінде физиологиялық ырықты қосылыстар алынады.

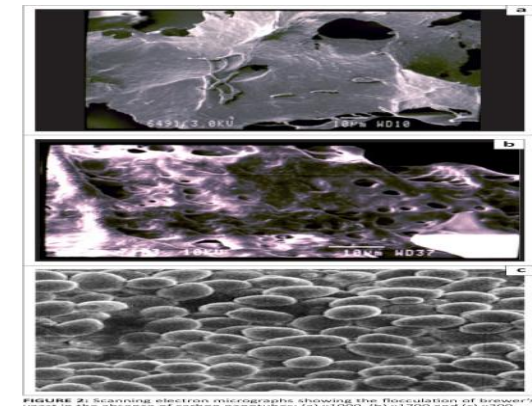
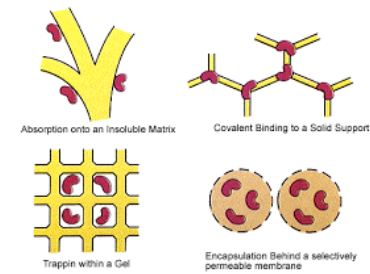


FIGURE 2. Scanning electron micrographs showing the flocculation of brewer's yeast in the absence of carbon nanotubes: (a)  $\times 1000$ , (b)  $\times 1700$  and (c)  $\times 3000$ .

