

Иммобилизацияланған энзимдер

***Лектор: қауымдастырылған профессор, химия
ғылымдарының кандидаты Тюсюпова Бакыт
Баймуратовна***

Дәрістің жоспары:

- 1. Иммобилизацияланған ферменттердің жалпы сипаттамасы**
- 2. Ферменттерді тасымалдаушылардың классификациясы**
- 3. Физикалық иммобилизация артықшылығы мен кемшілігі**
- 4. Химиялық иммобилизация артықшылығы мен кемшілігі**

Иммобилизацияланған ферменттердің жалпы сипаттамасы

Ферменттер белоктық сипаттағы заттар болып табылады, сондықтан сақтау кезінде тұрақсыз, сонымен қатар термиялық әсерлерге сезімтал.

Ферменттерді әрекеттесуші заттар мен реакция өнімдерінен бөлу қиындықтарына байланысты қайта пайдалану **мүмкін емес**.

Иммобилизацияланған ферменттерді құру бұл мәселелерді шешуге көмектеседі.

Бұл әдіс **1916 жылы Дж.Нельсон мен Э.Гриффин** көміртегіге инвертазаны адсорбциялап, оның каталитикалық белсенділігін осы формада сақтайтынын көрсеткенде басталды.

Иммобилизация — төмен молекулалы лигандтардың, макромолекулалардың, жасушалық органеллалардың немесе жасушалардың белгілі бір тасымалдаушыға фиксациясы.

Иммобилизацияда фермент бетке немесе қатты тіректің ішіне бекітіледі, ашыту аяқталғаннан кейін реакциялық қоспадан оңай алынады. Ферментті қайта пайдалануға болады, бұл процестің құнын айтарлықтай төмендетеді.

Иммобилизацияның артықшылығы - ферменттің рН, температура және еріткіштердің өзгеруімен денатурациялану қабілетін шектеу арқылы тұрақтырақ болады. Мысалы, иммобилизацияланған глюкоза изомеразасы 65 °С температурада бір жыл бойы тұрақты болады, ал ерітіндіде ол бірнеше сағатта 45 ° С температурада денатурацияланады.

Иммобилизацияланған ферментті фермент арқылы әрекеттесуші заттарды өткізу және соңғы сатыда өнімді жинау арқылы үздіксіз (ашық) өндіру үшін пайдалануға болады.

ФЕРМЕНТТЕРДІ ИММОБИЛИЗАЦИЯЛАУ ТАРИХЫ

- 1916 Гриффин Е, Нельсон Дж. белсендірілген көмірге инвертазаны қосу арқылы адсорбцияны жүзеге асырды;
- 1939 Пфанмюллер Дж., Шлейх Г. үгінділерге протеолитикалық ферменттерді қосу арқылы ферменттерді иммобилизациялауға арналған бірінші патент алды;
- 1951 Кэмпбелл целлюлозаға ферментті бекітеді;
- 1953 Грубхофер Н., Шлейт Д. ерімейтін тасымалдаушыға пепсин, амилаза, РНҚазаны қолданған;
- 1969 Жапонияда L-амин қышқылдарының өндірісі жолға қойылды;
- 1970 Weissman J, Sess J қолданбалы липосомалар;
- 1971 АҚШ-та инженерлік энзимология бойынша 1-ші конференция өтті, онда иммобилизацияланған ферменттер термині заңдастырылды;
- 1973 глюкоза-фруктоза сироптарын шығаратын өнеркәсіптік зауыттар іске қосылды.

Иммобилизацияланған ферменттердің артықшылығы

1. Гетерогенді катализатор реакция ортасынан оңай бөлінеді, бұл кез келген уақытта реакцияны тоқтатуға, ферментті қайта пайдалануға және ферменттен таза өнім алуға мүмкіндік береді.

2. Иммобилизацияланған ферменттерді пайдаланатын ферментативті процесті катализделген **реакция жылдамдығын және өнім шығымын бақылау арқылы үздіксіз жүргізуге** болады.

3. Ферменттің модификациясы оның спецификасы (әсіресе макромолекулярлық субстратқа қатысты), каталитикалық белсенділіктің рН, иондық құрам және басқа да қоршаған орта параметрлеріне тәуелділігі, денатурациялық әсерлерге тұрақтылық сияқты қасиеттерін мақсатты түрде өзгертеді.

4. Жарық, дыбыс сияқты физикалық факторлардың әсері арқылы тасымалдаушы қасиеттерін өзгерту арқылы иммобилизацияланған ферменттердің **каталитикалық белсенділігін реттеуге** болады. Ферменттер ерімейтін тасымалдаушылармен байланысу арқылы да, белок молекулаларының төмен молекулалы екі функционалды қосылыстармен молекулаішілік немесе молекулааралық айқаспалы байланысы арқылы да, сондай-ақ еритін полимерге қосылу арқылы да иммобилизациялануы мүмкін.



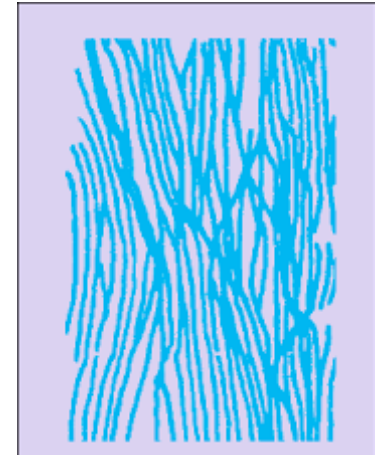
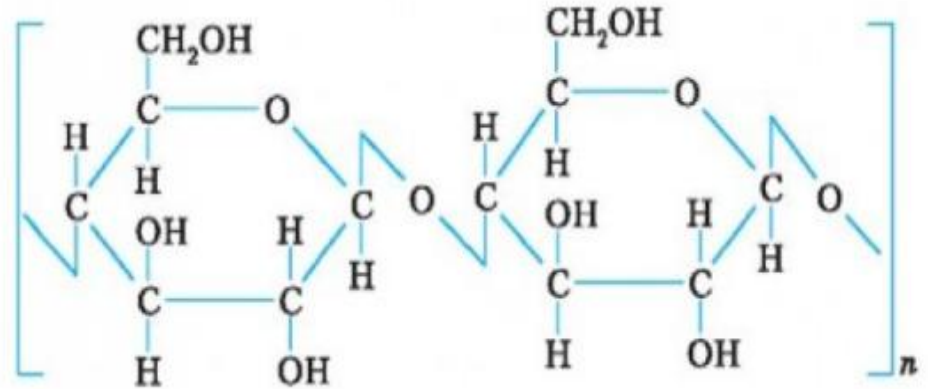
Тасымалдаушыларға келесі талаптар қойылады (Дж. Порат, 1974): :

- ❖ жоғары химиялық және биологиялық төзімділік;
- ❖ жоғары химиялық беріктік;
- ❖ фермент пен субстраттар үшін жеткілікті өткізгіштігі, кеуектілігі, үлкен меншікті бетінің ауданы;
- ❖ технологиялық қолайлы формалар (түйіршіктер, мембраналар) түрінде алу мүмкіндігі;
- ❖ оңай белсендіру;
- ❖ жоғары гидрофильділік;
- ❖ төмен баға.

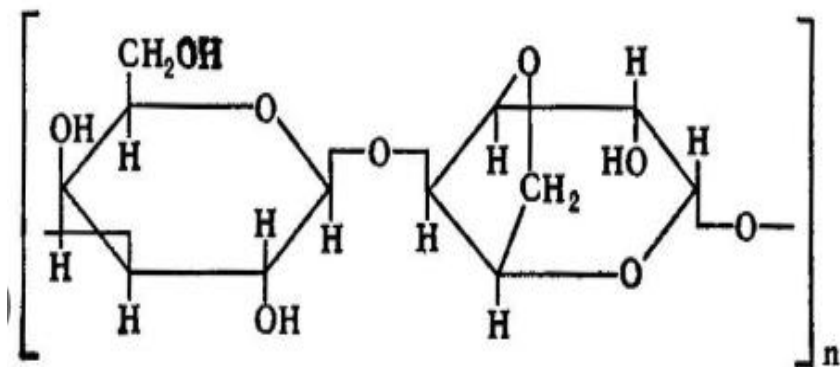
Түрлері	Материалдар
Органикалық – табиғи полимерлер	Полисахарид: крахмал, целлюлоза (қағаз), агароза (биогель), декстран, хитин, альгинат Липидтер Ақуыздар: гельдер, коллаген, желатин
Синтетикалық полимерлер	Талшықтар, түйіршіктер, түтіктер түрінде болуы мүмкін. Құрамы бойынша: Целлюлоза туындылары, нейлон, полистирол, полиэтилен, гельдер (полиакриламид), сефадекс Липосомалар, акрил қышқылы, N-винилпирролидон (полиамид қышқылы), полиуретан
Бейорганикалық тасымалдаушылар	Шыны, алюминий гидроксиді, титан гидроксиді, цирконий гидроксиді, темір гидроксиді, саз, керамика, құм, силикагель, цеолиттер, алюмосиликаттар, металдар және олардың оксидтері

Иммобилизациялау үшін ең көп қолданылатын полисахаридтерге целлюлоза, декстрин, агар-агар және олардың туындылары жатады

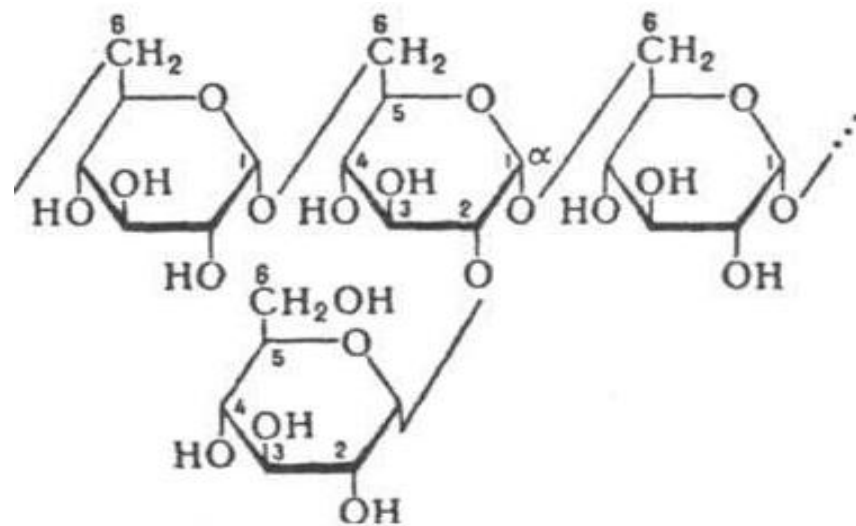
- **Целлюлоза** гидрофильді және көптеген гидроксил топтары бар, бұл оны осы топтарды ауыстыру арқылы өзгертуге мүмкіндік береді.
- Механикалық беріктігін арттыру үшін целлюлоза жартылай гидролиз арқылы түйіршіктеледі, нәтижесінде аморфты аймақтар жойылады. Олардың орнына кеуектілікті сақтау үшін кристалдық аймақтар арасында химиялық айқаспалы байланыстар енгізіледі.
- Түйіршікті целлюлозаны әртүрлі ион алмасу туындыларына айналдыру өте оңай



Агар-агар жақсы тасымалдаушы болып саналады. Оның қасиеттері химиялық кросс-байланыстырудан кейін жақсарады, мысалы, дипоксиді қосылыстармен. Мұндай агар ыстыққа төзімді, берік және оңай өзгертін болады.



Sephadex атауымен сатылатын декстрин негізіндегі тасымалдаушылар кеңінен қолданылады. Кептіру кезінде олар оңай кішірейеді және сулы ерітіндіде қатты ісінеді. Бұл тасымалдаушыларда гельдегі кеуектердің мөлшері айқаспалы байланыс дәрежесімен бақыланады.



Белоктар ферменттердің тасымалдаушысы

Артықшылықтары:

- көлемді
- биодеградацияға қабілетті
- жұқа (қалыңдығы 80 мкм) мембрана ретінде пайдалануға болады

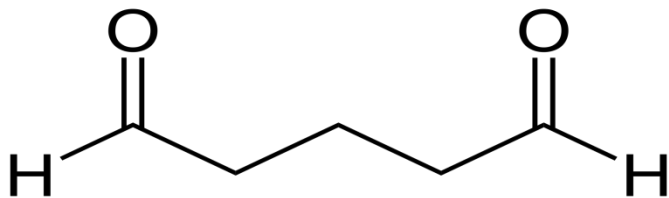
Ақуыз тасымалдаушыларға ферменттердің иммобилизациясы тігуші агенттер болмаған кезде де, олардың қатысуымен де жүзеге асырылуы мүмкін.

Кемшіліктері:

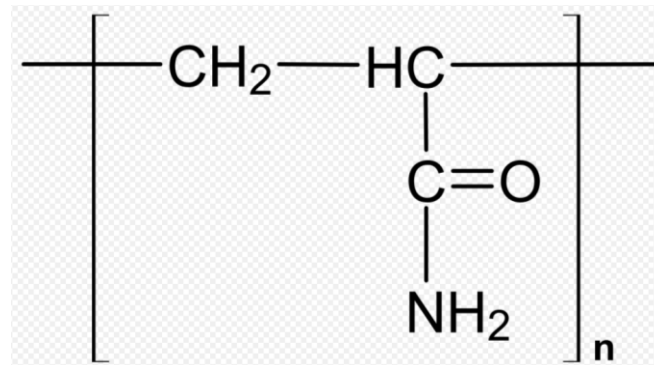
- жоғары иммуногенділік (коллаген мен фибринді қоспағанда)

Иммобилизация үшін құрылымдық (кератин, фибрин, коллаген), қозғалтқыш (миозин) және тасымалдау (альбумин) белоктары көп қолданылады.

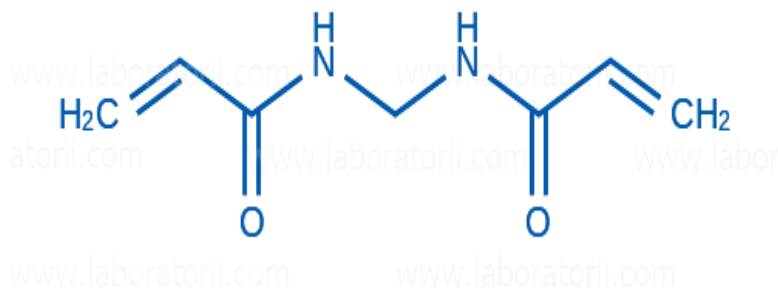
Синтетикалық тасымалдаушылар:



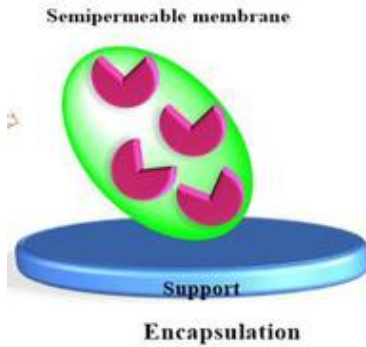
Глутарь альдегиді



Полиакриламид



N,N'-метиленбисакриламид



ИММОБИЛИЗАЦИЯ ӘДІСТЕРІ

Физикалық

Ерімейтін
тасымалдаушыларға
адсорбция

Кеуектерді гелмен
толтыру

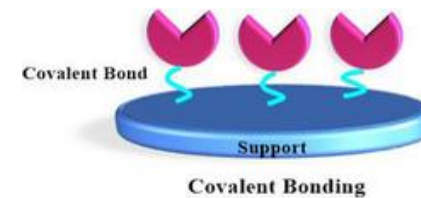
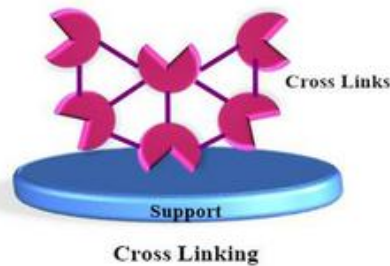
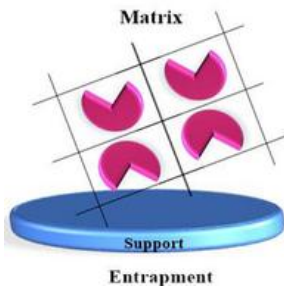
Инкапсуляция

Липосомаға енгізу

Химиялық

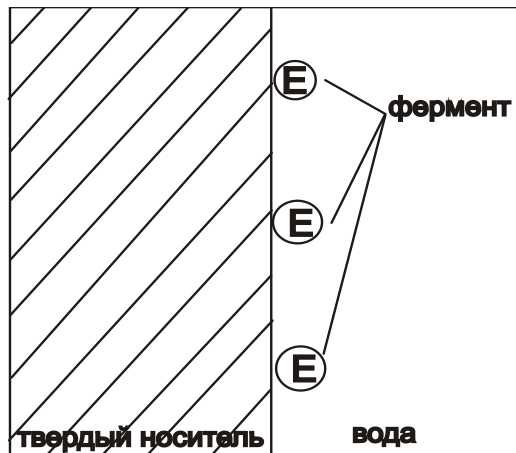
Ковалентті
байланыстыру

Сополимерлеу



Физикалық иммобилизация

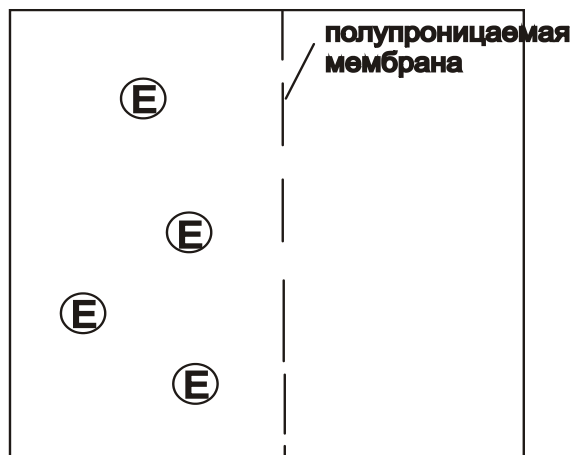
- Ерімейтін ортадағы адсорбция.
- Гельдерге енгізу.
- Жартылай өткізгіш бөлікті (мембрананы) пайдаланып ферментті реакция жүйесінің қалған бөлігінен кеңістікте бөлу.
- Фермент еритін және фазалардың бірінде ғана өмір сүре алатын екі фазалы ортаға ферменттің қосылуы.



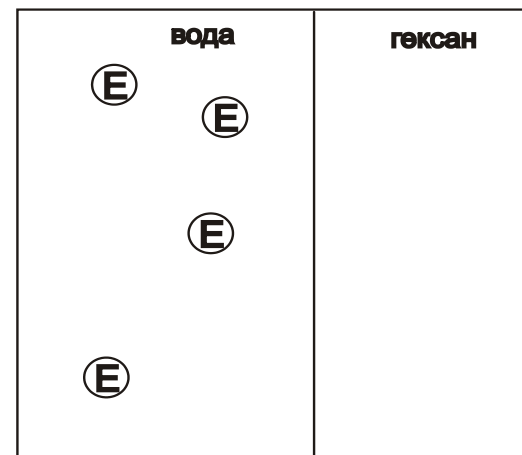
а)



б)



в)

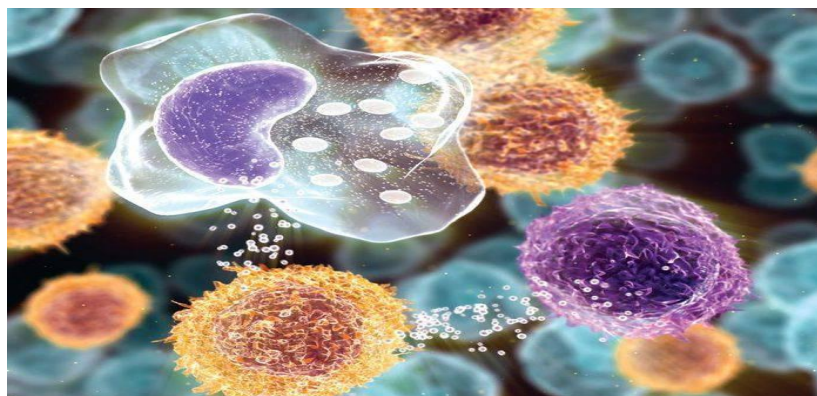


г)

ФИЗИКАЛЫҚ АДСОРБЦИЯ

- Тасымалдаушы матрицаның бетінде ферменттің физикалық байланысуын қамтиды.
- Тасымалдаушы органикалық немесе бейорганикалық болуы мүмкін.
- Адсорбция процесі Вандер Вааль немесе сутегі байланыстары сияқты әлсіз әрекеттесулерді қамтиды.
- Тасымалдаушылар: кремний диоксиді, бентонит, целлюлоза және т.б.

Ферменттердің адсорбент бетіндегі активтілігі бірнеше факторларға, яғни ферменттердің **беттік тобы мен адсорбент** арасында мынадай әрекеттесулер жүруіне тәуелді:



1. Ван-дер-ваальстік әрекеттесу
2. Электрстатикалық әрекеттесу
3. Сутектік байланыстар
4. Гидрофобтық байланыстар

Ферменттердің адсорбциясына сыртқы факторлардың әсері



Сорбент
кеуектілігі
мен
меншікті
бетінің
ауданы.

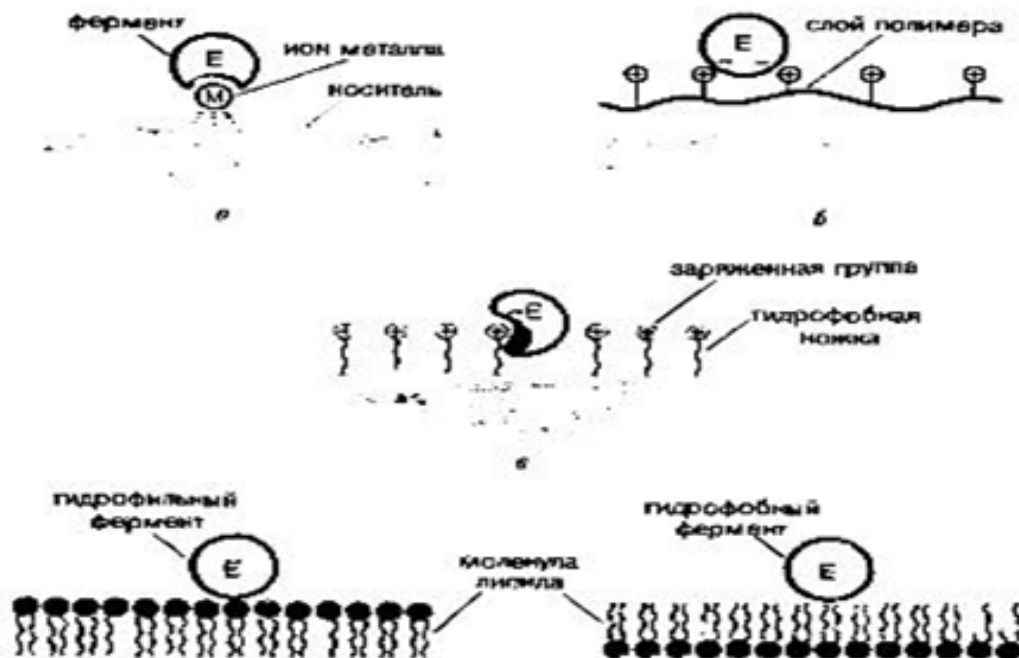
Орта
қышқылды
лығының
әсері, яғни
рН мәні

Ферменте
рітінідісін
ің иондық
күші

Адсорбция
жүргізудегі
орта
температу-
расы

Фермент
ерітіндісінің
концентра-
циясы

Сорбентті алдын ала түрлендіру (модификациялау)



Алдын ала модификацияланған сорбенттер фермент пен адсорбент арасындағы байланысты мықтырақ етіп, оның катализаторлық қасиетін жоғарылатады. Тағы да бір мысал фермент пен адсорбенттің табиғатына байланысты олардың сорбциялану қасиеті төмен болуы мүмкін. Сондықтан Мұнда фермент мына металдармен комплекс түзеді Ti, Sn, Zr, V, Fe.

Ферменттердің адсорбциялық активтілігін жоғарылатуда **моноқабаттық липидті** қолдануға болады. Ол гидрофильдік және де гидрофобтық ферменттердің де сорбциялық қабілетін жоғарылата алады

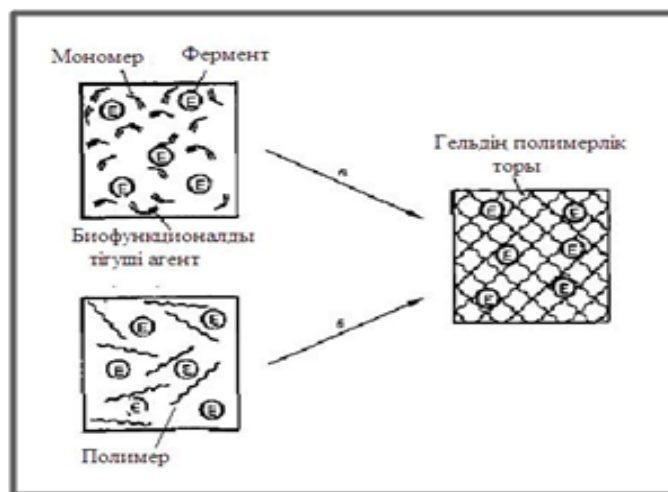
Модификация әдістерінің жетістіктері мен кемшіліктері

Жетістіктері оның сорбенттерінің қол жетімділігі мен арзандығын жатқызамыз. Оған кез келген конфигурациясы мен кеуектілікті бере аламыз. Сонымен қатар әдістерінің соншалықты қарапайым болуы. Және бұл әдістер ферменттерді тазартуға да қолайлы.

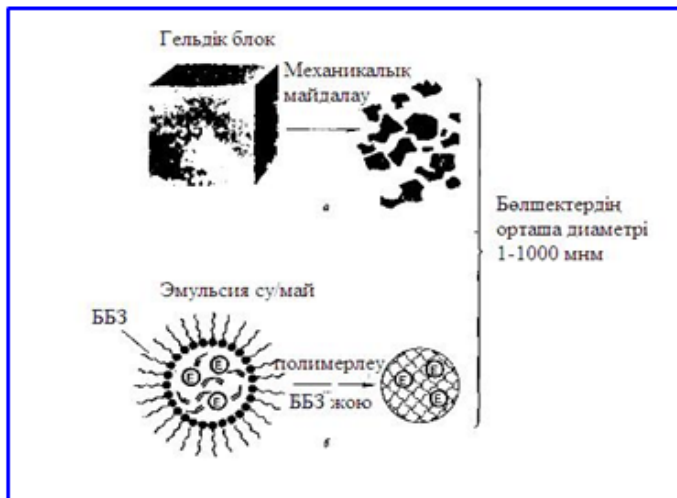
Кемшілігі фермент пен сорбент арасында байланыстың әлсіз болуы, жоғарыда айтылғандай қандай да бір сыртқы фактордың әсерінен ферменттің денатурацияға түсуі. Мысалы қандайда биокатализаторды жоғалту немесе соңғы өнімді ластауы. Бұл әдістердің тағы бір кемшілігі ортақ оптималды мәліметтердің болмауы

Кеуектерді гельмен толтыру әдісі

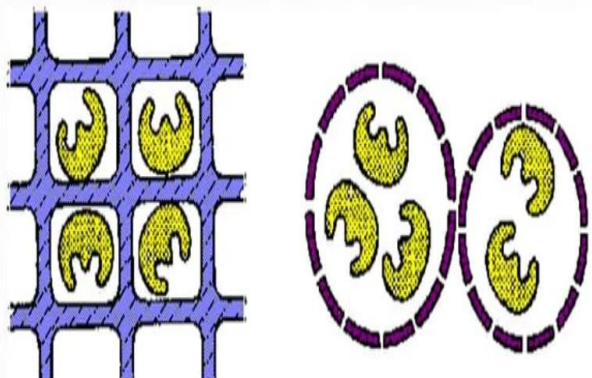
Торларының тығыздығы соншалықты фермент молекуласының өлшемінен екі есеге дейін кіші болады. Сондықтан да ол ерітіндіге өтіп кете алмайды. Негізі екі әдіс бар, соның бірі ферментті мономердің сулы ерітіндісіне алдын ала енгізіп, содан кейін полимерлейді.



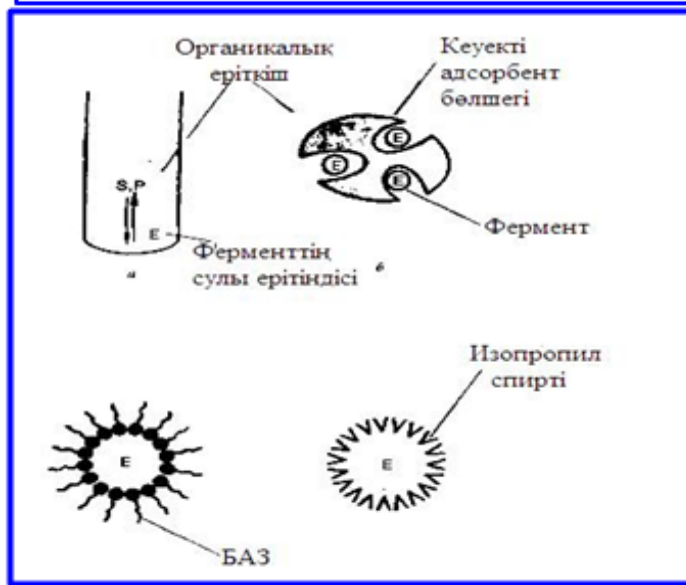
Ал екінші әдісте ферментті дайын гелге қосалы, оны кейін бірнеше әдістермен гелдейді



Әдістің артықшылығы орындалу әдістерінің қарапайымдылығы мен қажетті геометриялық формада сорбенттерді ала алу мүмкіндіктеріміз. Кейбір полимерлік гелдері механикалық, химиялық және жылулық тұрақтылығы бар, ол оны бірнеше рет қолдануға мүмкіндік береді.



Ферменттің ерігіштігін пайдаланып екі фазалық жүйеге енгізу



Сумен араласпайтын органикалық еріткіште ферментті модификациялау.

А) ерітінді органикалық еріткіш+су;

Б) Ерітпейтін сорбент алдын ала ферменттері енгізілген;

Г) БАЗ қосылып мицелла түріне айналдырылған фермент;

Д) микроэмульсиядағы ферменттер.

Артықшылығы	Кемшілігі
Химиялық модификациясыз	Фермент тесіктерден ағып кетуі мүмкін
Салыстырмалы түрде тұрақты формалар	Диффузияның шектелуі
Оңай өңдеу және қайта пайдалану	Бақыланатын микроорта жағдайларының болмауы

Инкапсуляциялау

Инкапсуляция – капсула ерітіндісінің бір тамшысын жартылай өткізгіш мембрана капсулаға қоршау.

- Капсула целлюлоза нитратынан және нейлоннан тұрады.
- Инкапсуляция әдісі арзан және қарапайым, бірақ тиімділік көбінесе ферменттің тұрақтылығына байланысты, дегенмен катализатор капсула ішінде өте тиімді сақталады.
- Техника медицина ғылымымен шектелген
- Бұл әдісте ферменттің көп мөлшері иммобилизацияланады, бірақ ең үлкен кемшілігі – зақымданбаған мембранамен тек шағын субстрат молекуласы ғана пайдаланылады.

Физикалық иммобилизация

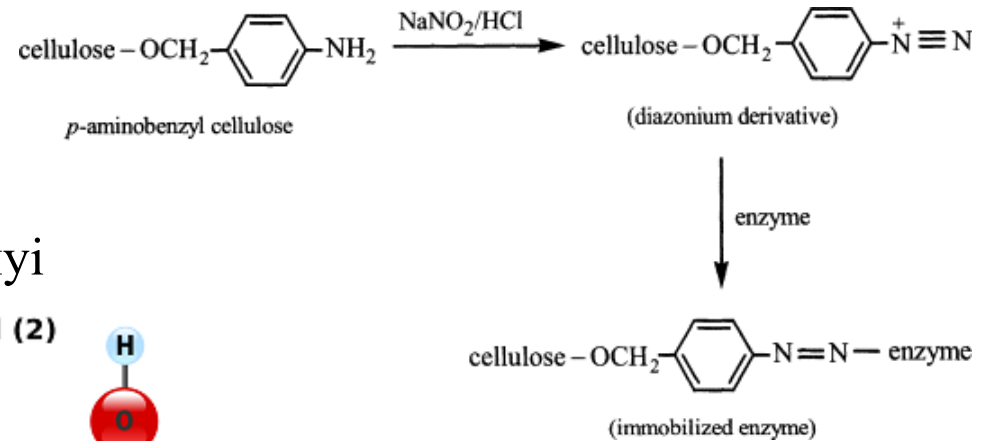
Артықшылығы	Кемшілігі
Техниканың қарапайымдылығы	Десорбция және оның салдары. Бұл сорбцияның қайтымды болуына байланысты, ол ерітіндінің рН және иондық күші, температура, тасымалдаушының меншікті бетінің ауданы мен кеуектілігі, субстрат концентрациясы және басқа факторларға байланысты.
Сорбенттердің қолжетімділігі және арзандығы	Байланыстыруға арналған салыстырмалы түрде төмен бет ауданы
Иммобилизацияланған препаратқа кез келген пішінді беру мүмкіндігі	Ферменттің микробтық шабуылға ұшырауы

Ковалентті байланыстыру

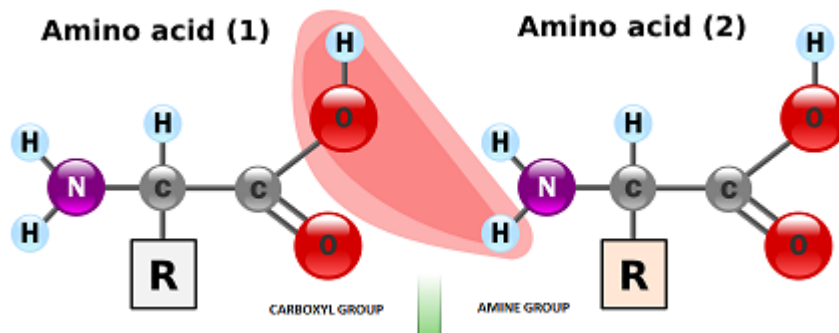
- ✓ **Коваленттік байланыс** ферменттің химиялық тобы мен тасымалдаушы бетіндегі химиялық топтар арасында түзіледі.
- ✓ Ковалентті байланыс *pH, иондық беріктік* және басқа да кең ауқымды айнымалы жағдайларында қолданылады.
- ✓ Иммобилизация қадамдары байланыстырушы агентті бекіту, содан кейін активтендіру процесі немесе функционалды топтың қосылуы және соңында ферменттің қосылуын қамтиды.
- ✓ Иммобилизацияда тасымалдаушының әртүрлі түрлері қолданылады, мысалы *көмірсулар ақуыздары* және *амин тасымалдаушылары, бейорганикалық тасымалдаушылар* және т.б.
- ✓ Ковалентті байланыстыру ферменттің бетіндегі белгілі бір топқа бағытталуы мүмкін (мысалы, амин, гидроксил, тирозил және т.б.).
- ✓ Ферменттердің негізгі байланыс түзетін *топтары - COOH* және – *NH* топтары болып табылады.

Ковалентті байланысудың әртүрлі әдістері

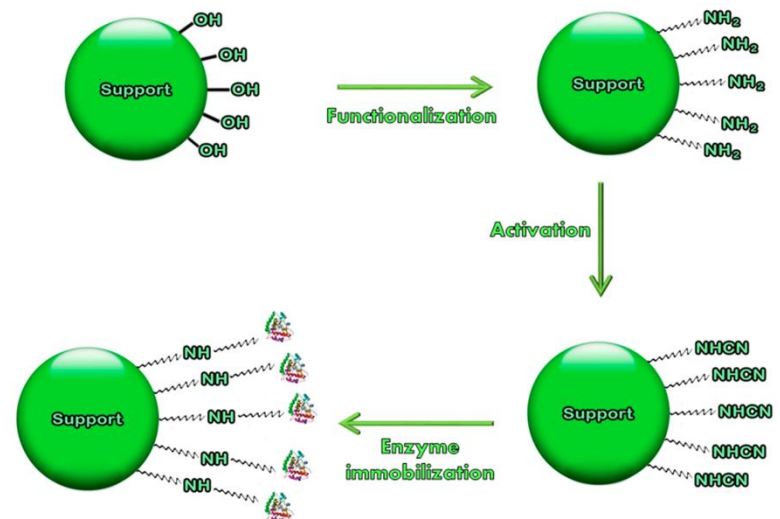
- Диазотация** (амин туындылары және ферменттің тирозил немесе гистидил топтары арасында)



- Пептидтік** байланыстың түзілуі



- Топтық** белсендіру
(целлюлоза, сефадекс, сефароза және т.б.)



Ковалентті байланыстыру

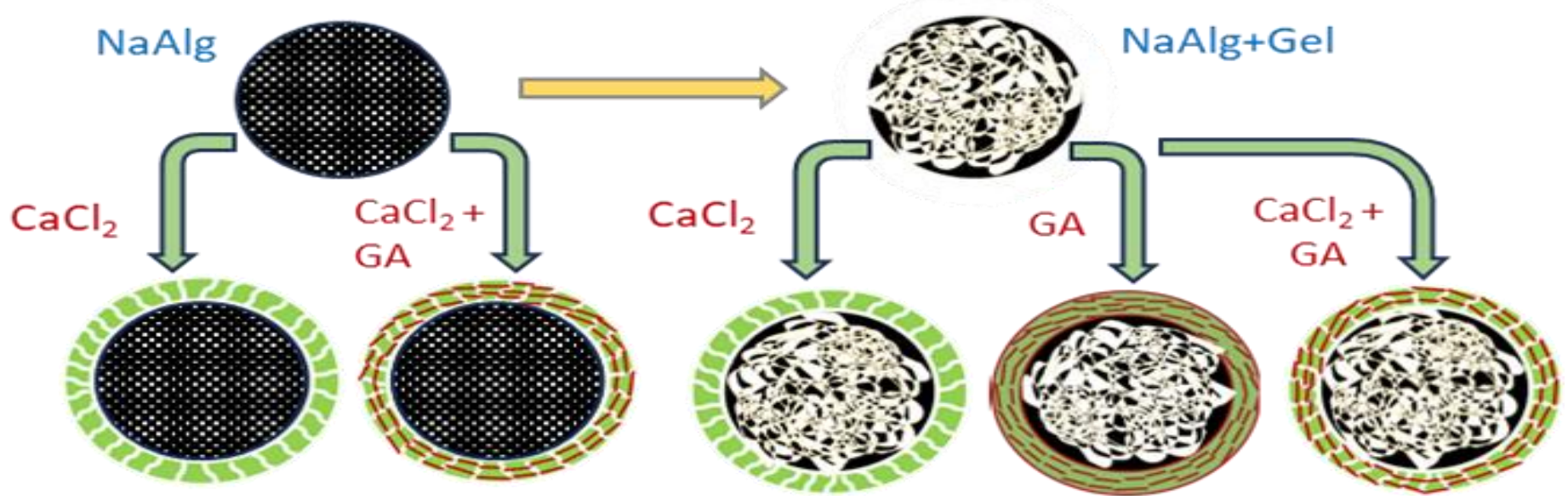
Артықшылығы	Кемшілігі
Ферменттерді иммобилизациялаудың ең көп қолданылатын әдісі	Техникалық жағынан күрделірек
Иммобилизацияланған ферменттік препараттар тұрақты және шаймалауы минималды	Әртүрлі қымбат химиялық заттарды және ұзақ уақытты қажет етеді

Кросс-байланыстыру н/е сополимерлеу

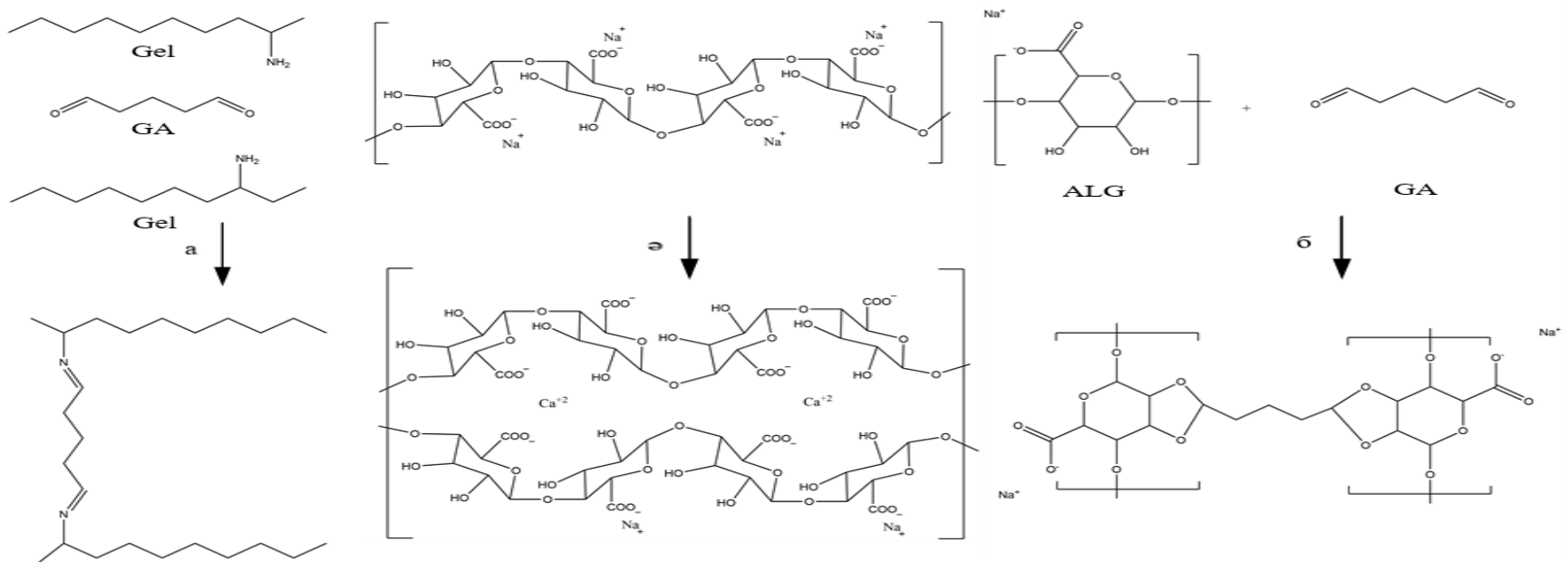
✓ **Кросс - байланыстыру** ферменттің әртүрлі молекулалары арасындағы глутаральдегид сияқты көпфункционалды реагент арқылы коваленттік байланыспен сипатталады.

✓ **Кросс - байланыстыру** қатты тірек болған/болмаған кезде фермент молекулаларының молекулааралық айқаспалы байланысын қамтиды.

✓ Бұл әдіс фермент молекулаларымен ковалентті байланысатын көпфункционалды реагенттің көмегімен 3 өлшемді **кросс** байланысқан фермент агрегатын (суда ерімейтін) шығарады.



Инсулинді иммобилизациялауға арналған гидрогель матрицаларының дизайны



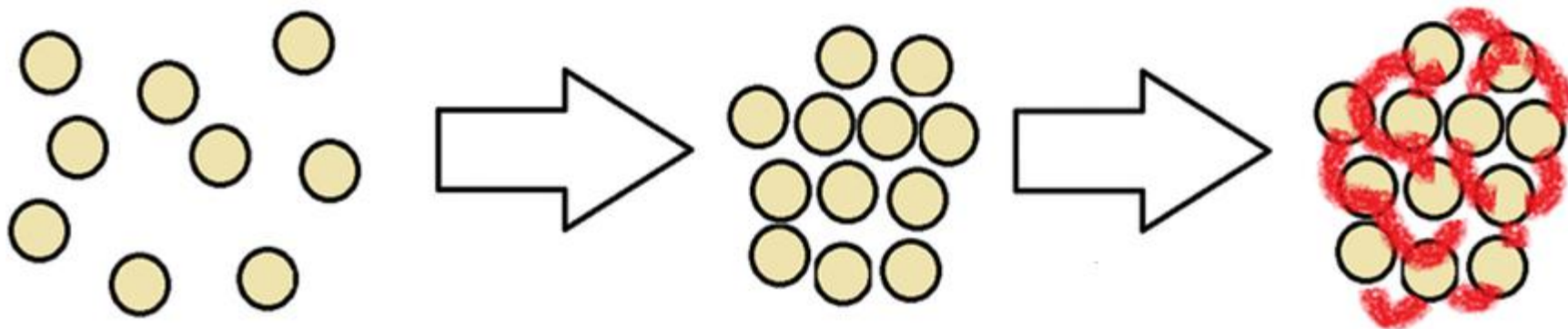
Полимерлі матрицалардың Ca²⁺ ионымен GA қатысында тігілу механизмдері

Кросс-байланыстырудың артықшылықтары:

1. Өте аз десорбция (фермент қатты байланысқан)
2. Жоғары тұрақтылық (яғни pH , *ион және субстрат концентрациясы*)

Кросс-байланыстырудың кемшіліктері:

1. Кросс байланыстыру белсенді орталықта айтарлықтай өзгерістерге әкелуі мүмкін.
2. Үнемді емес.



ҚОРЫТЫНДЫ:

Иммобилизация – ферменттерді қатты тасымалдаушы бетіне бекітіп, олардың ерімелі күйден бөлінбейтін күйге өтуі. Бұл әдіс ферменттердің тұрақтылығын арттырып, оларды бірнеше рет қолдануға мүмкіндік береді. Өнеркәсіпте, медицинада, биотехнологияда кең қолданыс табуда. Тасымалдаушылар органикалық (мысалы, агароза, декстран), бейорганикалық (шыны, кремний, алюмосиликаттар) және полимерлі материалдар болуы мүмкін. Таңдау ферменттің табиғаты мен қолдану саласына байланысты. Физикалық әдісте ферменттер тасымалдаушы бетіне физикалық күштер (сорбция, тұтылу, инкапсуляция) арқылы бекітіледі. Артықшылығы – жұмсақ жағдайларда жүргізіледі, кемшілігі – ферменттердің ағып кету қаупі жоғары. Химиялық иммобилизация фермент пен тасымалдаушы арасында ковалентті байланыс түзу арқылы жүргізіледі. Бұл әдіс тұрақты, ферменттің көп реттік қолдануына мүмкіндік береді. Бірақ белсенді орталық зақымдалмауы үшін реакция шарттары мұқият таңдалуы тиіс.

Пысықтау сұрақтары:

1. Иммобилизацияланған ферменттердің қандай артықшылықтары бар? Иммобилизация фермент белсенділігіне қалай әсер етеді?
2. Органикалық және бейорганикалық тасымалдаушылардың айырмашылығы неде?
3. Инкапсуляция және сорбция әдістерінің айырмашылығы қандай? Физикалық иммобилизацияның артықшылықтары мен кемшіліктері қандай?
4. Химиялық иммобилизацияда фермент пен тасымалдаушы арасында қандай байланыс түзіледі?
5. Бұл әдістің артықшылықтары мен тәуекелдері қандай?
6. Химиялық иммобилизация кезінде фермент белсенділігіне қандай қауіп төнеді?

Пайдаланылган әдебиеттер:

1. Жигулина А. А., Галсанова И. Ц. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ //Природные соединения и здоровье человека. – 2023. – С. 135-138.
2. Лавлинская М. С. и др. Адсорбционная иммобилизация ферментов на альгинатах: свойства и применение препаратов на их основе. Краткий обзор //Сорбционные и хроматографические процессы. – 2023. – Т. 23. – №. 5. – С. 924-937.
3. Полозова, П. Р., & Протасова, Д. А. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ. Бюллетень Северного государственного медицинского университета.–Ар, 104.
4. Zdarta J. et al. Enhanced wastewater treatment by immobilized enzymes //Current Pollution Reports. – 2021. – Т. 7. – С. 167-179.
5. Tang K. H. D. et al. Immobilized enzyme/microorganism complexes for degradation of microplastics: A review of recent advances, feasibility and future prospects //Science of the Total Environment. – 2022. – Т. 832. – С. 154868.
6. Maghraby Y. R. et al. Enzyme immobilization technologies and industrial applications //ACS omega. – 2023. – Т. 8. – №. 6. – С. 5184-5196.

Назарларыңызға рахмет!!!