

## ПРОБЛЕМИ БІОТЕХНОЛОГІЇ

УДК 57.083.12

М.А. Григор'єва

### ІММОБІЛІЗАЦІЯ ФЕРМЕНТІВ ЯК СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЕФЕКТИВНИХ БІОПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ПРАКТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

#### Вступ

У біологічних об'єктах ферменти перебувають у фіксованому стані на поверхні різних клітинних структур (частіше на мембранах), завдяки чому вони зберігають тривалий час свою активність. У технології довго використовувались препарати нативних ферментів, що обмежувало термін їх застосування. Досягнення ензимології сприяло детальному вивченню ферментів, завдяки чому було створено теоретичну базу для виробництва ферментів пролонгованої дії або іммобілізованих ферментних препаратів.

Відомо багато методів отримання іммобілізованих ферментів та інших білків. Впродовж останніх двох десятиріч вони визначались як водонерозчинні ферменти, нерозчинні ферменти, ферменти, які містяться в матриці, і як ферменти включені в масу гелю. Термін "іммобілізовані ферменти" запропонований для того, щоб охопити всі ці форми.

#### Постановка задачі

Мета статті – зробити огляд основних галузей застосування іммобілізованих ферментів і визначити сучасні та перспективні методи іммобілізації ферментів.

#### Огляд основних галузей застосування іммобілізованих ферментів

Створення біокатализаторів нового покоління – іммобілізованих ферментів – відкрило перед прикладною ензимологією нові перспективи. Іммобілізація ферменту – це методичний прийом, при якому молекулу біокатализатора включають у фазу, відокремлену від фази вільного розчину, але здатну обмінюватися з нею молекулами субстрату, ефектора або інгібітора [1, 2].

Іммобілізовані ферменти перед нативними попередниками мають такі переваги:

- гетерогенний каталізатор легко відокремлюється від реакційного середовища, що дає можливість зупиняти реакцію в будь-який момент та отримувати чистий від ферменту продукт;

- ферментативний процес з використанням іммобілізованих ферментів можна проводити безперервно, регулюючи швидкість реакції та вихід продукту;

- модифікація ферменту дозволяє змінити його властивості (специфічність, залежність каталітичної активності від рН та іонного складу, стабільність);

- використання іммобілізованих ферментів у медицині зумовлене зниженням їх імуногенності, алергенності і токсичності поряд із підвищеною стабільністю та пролонгованістю дії по відношенню до нативних аналогів [3, 4].

Ферменти як біологічні каталізатори застосовуються в різних галузях промисловості – харчовій, текстильній, фармацевтичній, шкіряній, в медицині, сільському господарстві, в тонкому органічному синтезі, для очищення стічних вод тощо [5–7]. Широко використовуються іммобілізовані ферменти та ферментні композиції в технологічних процесах харчової промисловості. Це – гідроліз крохмалю, білків, полісахаридів, освітлення вин, соків, покращення їх фільтрації, інтенсифікації процесів дифузії; в консервній промисловості – вдосконалення процесів рафінації і екстракції в масложировій промисловості, гідроліз масел, покращення якості харчових продуктів, удосконалення умов їх зберігання після обробки іммобілізованими ферментами [8–13].

На сьогодні найінтенсивніше розвивається саме медичний напрямок використання іммобілізованих ферментних препаратів і збільшується кількість таких розробок. Так, в апараті "штучна нирка", який призначений для очищення крові від різних шлаків, в тому числі й сечовини, за допомогою ультрафільтрації, використовується колонка з іммобілізованою уреазою [14]. Створення тест-систем на основі магнесорбентів з іммобілізованими антигенами з патологічних рубців дозволяє з високою ефективністю прогнозувати і діагностувати розвиток патологічних рубців в осіб, які мали травми чи перенесли операції [15]. Біокатализатори широко використовуються в апаратах для перфузійної очистки різних біологічних рідин [16]. Застосування композиційних афінних сорбентів з магнітними властивостями дозволило ство-

рити протичумні імунобіологічні препарати [17]. Імобілізовані ферменти використовуються з лікувальною метою й тоді, коли вони необхідні, але відсутні через різні патологічні процеси в організмі людини, наприклад для розчинення кров'яних тромбів [18].

Імобілізовані ферменти відкрили шлях до створення лікарських препаратів пролонгованої дії із зниженою токсичністю та алергенністю. Імобілізаційні підходи сприяють вирішенню проблеми спрямованого транспорту ліків в організмі [19, 20]. На основі нанодисперсних полімерних систем, до складу яких входять біогенні елементи і поверхнево-активні речовини, створені нові антисептичні препарати, наприклад повіаргол і катапол. Повіаргол застосовується в урології, хірургії та гінекології. Крім антимікробної активності, він проявляє імунотропну, антигіпоксичну та адаптогенну дії. Катапол високо ефективний при профілактиці та лікуванні ранової інфекції в хірургії. Він має високу віруліцидну дію відносно різних видів вірусів [21].

Перспективним є одержання біологічно активних полімерів медичного призначення співімобілізацією протеолітичних ферментів та антимікробних речовин з метою створення лікарських препаратів поліфункціональної дії. При цьому такі лікарські препарати набувають особливих властивостей, які пов'язані з їх полімерною природою, а саме пролонгованості дії та зменшення його токсичності. Так, на основі співімобілізації систем терполімер–протеаза "С" та стиромаль–норсульфазол–протеаза "С" створені фермент-полімерні комплекси з комбінованою дією, які можна використовувати як біологічно активні полімери медичного призначення для лікування опікових ран [22, 23]. Отримані композитні хитозаново-целюлозні плівки із змішаних розчинів полісахаридів у метилморфоліноксиді мають здатність набрякати у водних середовищах (збільшуючи об'єм на 500–600 %) і можуть зацікавлювати як розподільвальні мембрани або плівкові покриття на рани та опіки [24]. Було розроблено технологію створення медичної пов'язки з хімічно модифікованою целюлози, до якої за рахунок утворення хімічних зв'язків приєднані колагенолітичні ферменти, які входять до ферментного комплексу гепатопанкреасу краба. Ранове покриття зберігає високу терапевтичну активність [25]. Впродовж 15 років проводилися клінічні дослідження з використання інтерактивних ранових пов'язок, отриманих іммобілізацією

ферментів, та ліків на діальдегідцелюлозі. Ці терапевтичні системи пропонується використовувати для закриття ран при антропогенних та техногенних катастрофах, в аптечках першої допомоги всіх рівнів [26].

Нині продовжується пошук нових лікарських препаратів, які при збереженні високих лікувальних властивостей не виявляють негативного впливу на організм людини. Таким вимогам відповідають препарати іммобілізованого протосубтиліну – профезим та імозимаза – для консервативного лікування трубної вагітності [27]. Препарати не всмоктуються в кров і не порушують її систему згортання, не мають антимітотичної і цитотоксичної дії, а також не викликають побічної дії.

Однією з основних задач при виробленні медичних препаратів на основі іммобілізованих ферментів є створення системи лікарських засобів з регульованою фармакокінетикою. Для розв'язання цих задач використовуються включення біологічно активних речовин у мікрокапсули, в тому числі і в ліпосоми. Ліпосомні препарати ефективні при лікуванні інфаркту мозку та ішемічній хворобі серця [28, 29]. Існують перспективні дослідження мультиферментних мікрокапсул, які імітують клітини живого організму [30]. Створено препарати пролонгованої дії (тромболітичні, фібрінолітичні, протеолітичні) для лікування серцево-судинних захворювань, тромбозів, тромбоемболій, інфарктів міокарда [31]. Стерильний апірогенний розчин іммобілізованих на поліетиленоксиді протеаз може використовуватися в медицині і ветеринарії при отриманні ін'єкційних препаратів іммобілізованих ферментів [32]. Ліпази, іммобілізовані на твердих носіях, можуть використовуватися як лікувальні засоби при лікуванні різних захворювань шлунково-кишкового тракту та порушенні жирового обміну [30].

### **Сучасні і перспективні методи іммобілізації ферментів**

Суть іммобілізації ферментів полягає в крипленні їх в активній формі до нерозчинної основи або включенні в напівпроникну мембранну систему. Існує два основних методи іммобілізації ферментів: фізичний та хімічний.

**Фізичні методи іммобілізації ферментів.** Фізичні методи полягають у зв'язуванні ферменту без участі ковалентних зв'язків. Вони поділяються на два типи: адсорбційні і механічні. При адсорбційній іммобілізації фермент утри-

мується на поверхні носія за рахунок електростатичних, гідрофобних та водневих зв'язків, а також дисперсійних взаємодій. При механічному способі іммобілізації відбувається включення ферменту в гелі, які зшиті поперечними зв'язками, включення ферменту в мікрокапсули, волокна, мембрани тощо [33–35]. Фізичні методи іммобілізації прості, швидкі й ефективні. Вони широко застосовуються в інженерній ензимології [33–38].

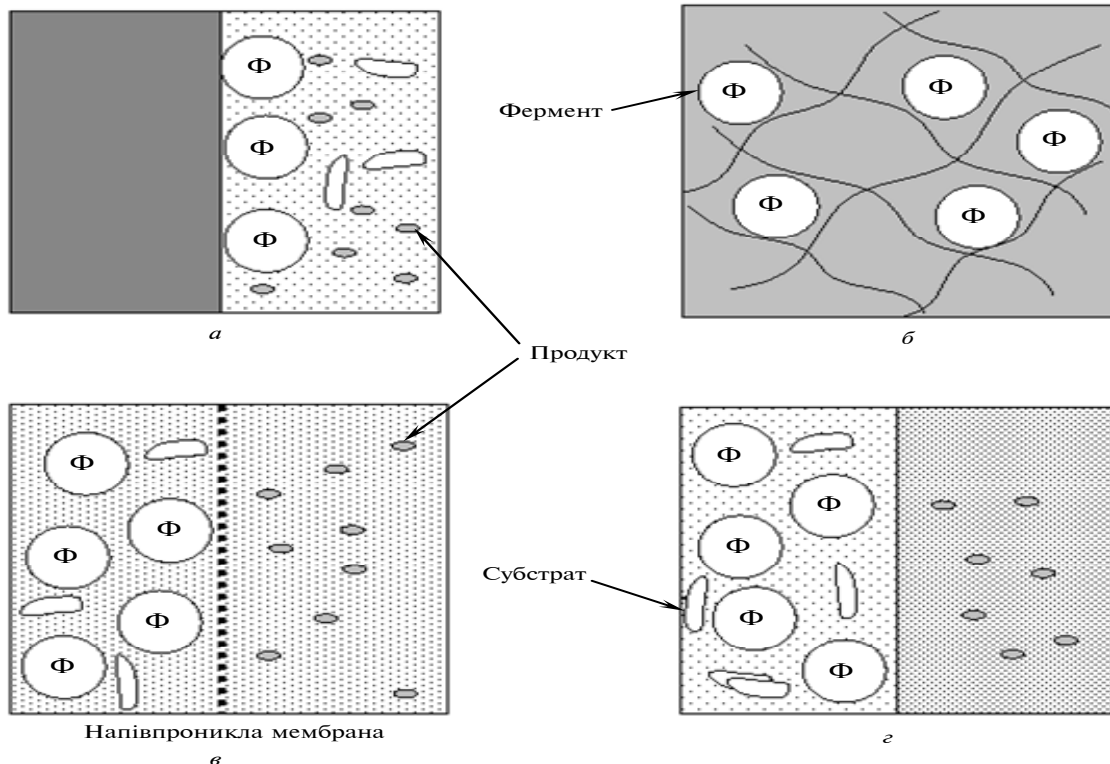
Виділяють чотири таких типи зв'язування ферментів (рисунок):

- адсорбція на нерозчинних носіях;
- включення в пори гелю;
- просторове відділення ферменту від об'єму реакційної системи за допомогою напівпроникної мембрани;
- включення в двофазне середовище, де фермент розчиняється і перебуває тільки в одній із фаз.

Найпростіший метод іммобілізації ферментів — це адсорбція на нерозчинному носії (див. рисунок, *a*). Процедура іммобілізації полягає в змішуванні при придатних умовах ферменту і носія, інкубації і відділенні нерозчинного компонента суміші від розчинного компонента цент-

рифугуванням або фільтруванням. Головний недолік цього методу полягає в тому, що фермент може зв'язуватися з носієм недостатньо міцно. Адсорбція ферментів на такому носії, як ДЕАЕ-сефадексі здійснюється переважно за рахунок сольових зв'язків, що піддаються впливам незначних змін умов: рН, іонної сили, температури і природи розчинника, що може призводити до десорбції ферменту з носія [39]. Десорбцію ферменту може викликати також субстрат. Крім сольових зв'язків, при взаємодії ферменту з носієм можуть брати участь і водневі та ван-дер-вальсові сили. В ідеальному випадку іммобілізація ферменту не повинна приводити до втрати каталітичної активності.

У зв'язку з розвитком генної інженерії і приготуванням спеціальних середовищ для культивування органів та тканин появився інтерес до отримання розчинів амінокислот і низькомолекулярних пептидів. Так, вивчено можливість використання для гідролізу суміші пептидів ферменту з бактерій *Xanthomonas rubrilineans* з пептидазною активністю, іммобілізованого на оксиді алюмінію. Як виявилось, можна досить простим методом отримувати гідролізати з вмістом 60–65 % вільних амінокислот і 35–40 % діпептидів [40].



Способи іммобілізації ферментів: *a* — адсорбція на нерозчинних носіях; *b* — включення в пори гелю; *c* — відокремлення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани; *d* — використання двофазної реакційної суміші

Для адсорбційної іммобілізації ферментів і мікроорганізмів використовуються макроструктуровані керамічні носії з вмістом вуглецю. Проводяться систематичні дослідження з розробки високостабільного гетерогенного біокаталізатора для процесу неперервного гідролізу крохмалю на основі адсорбованої глюкоамілази [41]. Оптимальними адсорбентами і носіями для іммобілізації цього ферменту є керамічні матеріали, поверхня яких покрита каталітичним волокнистим вуглецем: на таких носіях стабільність глюкоамілази зростає на порядок порівняно з її стабільністю в розчині. Іммобілізована глюкоамілаза не втрачає високої біокаталітичної активності через 1–1,5 роки зберігання при кімнатній температурі [41, 42].

До фізичних методів іммобілізації належать насамперед включення ферменту в гель (див. рисунок, б).

Інтерес становить вивчення іммобілізації пектаваморину з метою отримання дешевого і стабільного біологічного каталізатора. Іммобілізація пектаваморину Г10Х проводилась включенням 30 мл семивідсоткового водного розчину ферментного препарату в поліакриламідний гель. Для покращення зв'язування ферменту в полімеризаційну суміш вводився глутаровий альдегід як модифікатор. Ступінь зв'язування пектаваморину при іммобілізації в гель становила 80–90 % із збереженням 55 % вихідної активності. Термічна стабільність іммобілізованого і нативного препаратів однакові. При цьому відзначалося збільшення пектиностеразної активності при зберіганні ферменту, іммобілізованого у поліакриламідний гель [34].

Існує спосіб включення в гель методом подвійної іммобілізації. Спочатку фермент іммобілізується на носії, а потім разом з ним (фермент і носій) вміщується в гель. Основною перевагою цього методу є можливість поєднати всі осойливості твердої матриці з можливістю варіювання мікрооточення ферменту шляхом підбору відповідної полімеризуючої системи. А до

недоліків цього методу слід віднести те, що більшість гелів мають істотні дифузійні обмеження, які перешкоджають взаємодії ферменту з високомолекулярними субстратами. Таким методом можна іммобілізувати  $\alpha$ -амілазу, глюкоамілазу, глюкооксидазу та ін. [43, 44]. Попередньо фермент адсорбується на порошкоподібних силікагелях, каоліні, желатині, крохмалі, целюлозі.

До фізичних методів належить мікрокапсулювання ферментів у напівпроникні мембрани (див. рисунок, в). Існує три принципи включення в капсулу: міжфазна поліконденсація, міжфазна коацервація і метод подвійного емульгування.

При мікрокапсулюванні використовуються штучні клітини з мембранами, подібні до мембран природних клітин. За допомогою мембран здійснюється контроль розмірів молекул, які проникають у середину клітини або виходять з неї. Великі молекули, такі, як ферменти або білки, утримуються всередині мікрокапсули, тоді як малі молекули субстрату і продукту можуть вільно дифундувати через синтетичну мембрану. Однією з переваг мікрокапсулювання перед рівномірним включенням ферменту є велика площа поверхні, яка припадає на одиницю активності іммобілізованого ферменту, що дозволяє використовувати високі концентрації ферменту у вихідному розчині і досягати високої ефективності дії іммобілізованого ферменту. Оскільки наявність у розчині ферменту не впливає на процес утворення мембран, то можна одночасно піддавати мікрокапсулюванню різні ферменти, клітини або біомолекули, що дає можливість здійснювати багатостадійні реакції. Активність, яка при цьому зберігається, як правило, помітно нижча, ніж активність вільних ферментів (см. таблицю).

При інкапсулюванні ферменти контактують з органічним розчинником і мономерами, які можуть їх легко денатурувати. Щоб уберегти фермент від інактивації, перед мікрокапсулю-

Таблиця. Мікрокапсульовані ферменти і кофактори [45]

Фермент	Мембрана	Зберігання активності після мікрокапсулювання, %	Час напівінактивації
Уреаза	Ацетатбутірат целюлози	20	Більше одного місяця
	Нітрат целюлози	37	Один тиждень
Каталаза	Нітрат целюлози	99	1,3 доби
Аргіназа	Найлон	32	Більше 16 діб
	Поліфталоліпіперазин	12	Більше 60 діб
Аспарагіназа	Нітрат целюлози	99	5 діб

ванням його змішують з полімерами, наприклад з бичим сироватковим альбуміном (БСА), гемоглобіном або поліетиленіміном (ПЕІ) [46].

При дослідженні впливу деяких водорозчинних полімерів – БСА, полівінілпіролідону (ПВП), полівінілового спирту (ПВС), поліетиленгліколю (ПЕГ), декстрану і гепарину натрію – на збереження активності аргінази при мікрокапсулюванні виявилось, що БСА, ПВП, ПВС і ПЕГ, як правило, сприяють збереженню активності аргінази, тоді як наявність декстрану і гепарину натрію не спричиняють ніякого впливу. Ймовірно, що гідрофобні ділянки полімерів першої групи екранують молекулу ферменту і тим самим захищають її в процесі мікрокапсулювання. Для збереження активності істотним фактором є також концентрація полімеру. Досліджено, що активність аргінази найкраще зберігається при концентрації БСА 1 % [46, 47]. Концентрація білка або іншого полімеру важлива також для підтримки осмотичного тиску.

При іммобілізації ферментів з використанням системи двофазного типу обмеження руху ферменту досягається завдяки його здатності розчинятися тільки в одній із фаз (див. рисунок, з). Субстрат і продукт ферментативного перетворення розподіляються між двома фазами відповідно до їх розчинності в них. Природа фаз підбирається таким чином, щоб продукт накопичувався у фазі, в якій нема ферменту. Після завершення реакції ця фаза відокремлюється і вилучається продукт. Перевагою системи двофазного типу є можливість здійснення ферментативних перетворень макромолекулярних субстратів, які неможливі при застосуванні жорстких носіїв з обмеженим розміром пор.

У праці [45] досліджувалась іммобілізація каталази в поліелектролітних мікросферах, які отримувались адсорбцією декстрансульфату і протаміну на комерційних меламінформальдегідних ядрах з подальшим гідролізом ядер при рН 1,7. Завдяки наявності в мікросферах однорідної матриці каталаза рівномірно сорбується всередині мікросфер і її кількість у них залежить від вихідної концентрації ферменту та рН розчину. Максимальний вміст каталази становить  $10^8$ – $10^9$  молекул на мікросферу. В [46] показано, що каталаза утримується в мікросферах за рахунок електростатичних і гідрофобних взаємодій і її активність у мікросферах збільшується із зменшенням кількості ферменту в їх середині. Отримані мікросфери можуть знайти

застосування для відділення і концентрування високомолекулярних білків.

Становить інтерес іммобілізація ферментів методом включення їх у “рідкі” мембрани, що складаються з поверхнево-активних водонерозчинних речовин із різними добавками і вуглеводневого розчинника. Цим способом можна іммобілізувати поліферментні системи, хімотрипсин та пероксидазу. Основною перевагою тут є те, що капсула легко регенерується після інактивації ферменту, а недоліками – можливість проникнення ферментів крізь рідкі мембрани і залежність переносу субстрату і продуктів реакції крізь мембрану від їх розчинності в ній [47].

Метод включення ферментів у волокна полягає в розчиненні волокна полімеру в органічному розчиннику, емульгуванні отриманого розчину з розчином чи суспензією ферменту і продавлюванні емульсії через тонкі отвори прядильного пристрою в рідину, що коагулює (наприклад, у толуол) [48]. Цим способом іммобілізується каталаза, ліпази, целюлази, амілази, глюкоамілази, лізоцим,  $\beta$ -галактозидаза.

Серед фізичних методів іммобілізації є включення в ліпосоми [28, 29]; в мембрани у формі порожнистих волокон [33].

**Хімічні методи іммобілізації ферментів.** До хімічних методів іммобілізації належать іммобілізація за допомогою ковалентного зшивання з полімерним носієм та поперечного зшивання ковалентними зв'язками молекул білка без носія.

Суттєвим недоліком цього способу є інактивація ферменту. Її можна запобігти, якщо проводити іммобілізацію при наявності субстрату, який захищає активний центр. Для ковалентного приєднання носій потрібно попередньо активувати. Активованій носій може реагувати з відповідними групами молекули ферменту: аміногрупами залишків лізину, а також функціональними групами залишків тирозину, гистидину, аргініну і цистеїну [49].

При ковалентній іммобілізації застосовують різні методи закріплення ферментів: бромціановий, азидний, ангїридний, ацилімідазольний, метод активованих ефірів; іммобілізація за допомогою карбодіімідів і реагенту Вудворда; ізоціанатний та ізотіоціанатний; методи за допомогою хлорпохідних 1,3,5-триазину, імідоєфірів та зв'язування за сульфгідрильними групами. Можлива ковалентна іммобілізація модифікованих ферментів, які потім зв'язуються з відповідним ферментом. При застосуванні цих

складних способів закріплення фермент може інактивуватися на 60–80 % в результаті екранування активного центру.

Особливу роль ковалентна іммобілізація відіграє у випадку водорозчинних систем. Важливе значення тут мають стеричні і конформаційні фактори, які визначають значною мірою взаємодію в розчині двох поліфункціональних полімерів – носія і білка.

У праці [50] було досліджено взаємодії водорозчинних сополімерів N-вінілпіролідону і різних епоксид- та альдегідвмісних мономерів з  $\alpha$ -хімотрипсином і гемоглобіном, а також із низькомолекулярними сполуками, які моделюють реакційно здатні ланки білкової макромолекули. На основі кінетичних досліджень було показано, що реакційна здатність функціональної групи полімеру відносно функціональних груп білка не є єдиним фактором, який визначає глибину протікання реакції і активність ферментної системи, яку отримують. Важливе місце займають будова макромолекулярного клубка полімеру, будова бокових ланцюгів (спейсерів), ступінь зв'язування полімеру і білка, підвищення якої при високій полярності спейсера призводить до сильного викривлення білкової глибини.

У праці [14] здійснено ковалентну іммобілізацію уреазу на активованому метоксіполіетиленгліколі-5000 (*m*PEG). Останній приєднується по  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-групам лізину в уразі. Досліджено різні молярні співвідношення уреазу та активованого *m*PEG для іммобілізації, при цьому оптимальним виявилось співвідношення 1:3.

Іммобілізацію ліпази фізичним і хімічним способами було проведено в [36]. Ферментний препарат виділяли з глибинної культури мікроміцету *Rhizopus oryzae* 1403 осадженням ферменту. Іммобілізацію здійснювали адсорбцією на стирсорбі і ковалентним зв'язуванням на аніонобмінній смолі АВ-17-2П глутаральдегідним методом. Встановлені оптимальні умови процесу з'єднання ферменту з носієм – це рН 6,5 та температура 32–35 °С (адсорбція) і 25 °С (ковалентне зв'язування). Ефективність іммобілізації становила 65 та 23 %, відповідно.

Препарати іммобілізованої  $\alpha$ -амілази пліснявого гриба *Aspergillus oryzae* отримано ковалентним зв'язуванням на АЕ-целюлозі за допомогою глутарового альдегіду, на сефадексі У-200 та сефарозі 4В – бромціановим методом, на КМ-целюлозі, аміноаеросилі та карбокси-

аеросилі – за допомогою карбодимідів, а також на крохмалю [51].

У праці [52] досліджено фібринолітичну активність іммобілізованої урокінази на трекових мембранах. Показано, що ферментна активність урокінази зберігається при її сорбції на сироватковому альбуміні, адсорбованому на трекових мембранах. Модифіковані за допомогою урокінази плазмодифільтри запропоновано використовувати для інфузії в кров'яне русло з метою лізису тромбів.

Методи ковалентної іммобілізації ферменту ліпази на біосорбентах, отриманих активацією поверхні поруватого носія методами окислення та діазотування (носії складається з 10–70 % метилметакрилату, 10–70 % метилакрилату, 5–40 % ненасиченого мономеру на основі етилену, 10–25 % дивінілбензолу), були розроблені в [53]. Отримані каталітично активні та стабільні ферментні препарати можуть використовуватись у медицині для лікування різних захворювань шлунково-кишкового тракту та порушень жирового обміну. В [54] проведено включення ферментного комплексу лізорицефіну в розчині гідрофільних полімерів (поліетиленоксид (ПЕО-400), полівініловий спирт, полівінілпіролідон та поліетиленгліколь, зшиті тетраборатом натрію), та здійснено іммобілізацію на перев'язувальних засобах. Отримано іммобілізовані препарати з 80–100 %-ним збереженням літичної активності.

Іммобілізація ферментів у полімерних мікрокапсулах викликає великий науковий та практичний інтерес [55]. Особливої уваги заслуговує мікрокапсулювання ферментів у готові поліелектролітні мікрочастинки (мікрокапсули та мікросфери, що містять всередині однорідну, слабо зшити, гелеподібну матрицю), що проводиться в м'яких умовах [56].

У праці [57] проведено іммобілізацію літичного ферментного комплексу *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* на марлі за допомогою гідрофільних полімерів і полівінілового спирту, який зшитий бурою, сумісно з лужною протеазою, включенням у полімерні плівки. Отримано препарати з високим збереженням літичної активності, стабільні при зберіганні та  $\gamma$ -опроміюванні. Доведено перспективність використання іммобілізованого на марлі ферментного комплексу як потенційного бактеріолітичного препарату при захворюваннях ЛОР-органів: хронічних отитах, отитах грибкової етіології і в офтальмології та в опіковій терапії.

Найбільш цікавими та перспективними для розв'язання біотехнологічних задач є синтетичні матеріали та неорганічних природні матеріали з силікатним скелетом, що включають до свого складу катіони Al, Ca, Fe, Mg та лужних металів. Перші відрізняються високою хімічною стійкістю і досить термостійкі для проведення термічної стерилізації. Перевагами останніх є структурна стабільність, термостабільність, бактеріальна стійкість, стійкість до органічних розчинників, регулювання розміру пор, велика швидкість встановлення сорбційного матеріалу, здатність матриць до легкої регенерації [58, 59].

Серед неорганічних природних носіїв із силікатним скелетом найширше застосовується ентеросорбент аеросил – синтетичний аморфний високодисперсний кремнезем (ВДК, “Силікс”) [60, 61].

В основі механізму біологічної активності силіксу лежать властивості поверхні, зумовлені особливостями її структури і хімічної природи [62, 63].

Було створено ранозагоювальний та кровоспинний засіб, який являє собою дисперсію метакаоліну та високодисперсного кремнезему (аеросил А-300) у спиртовому екстракті волоського горіха [64]. Клінічні випробування при лікуванні хворих на гемофілію проводилися в Інституті гематології та трансфузіології Академії медичних наук. Було показано, що застосування композиції в комплексному лікуванні хворих на гемофілію дає можливість знизити рівень ендотоксикації і опосередковано підвищити прокоагулянтну активність крові, а в цілому – прискорити відновлення організму хворого після геморагічного ускладнення. Клінічними випробуваннями встановлено, що структурно-механічні властивості дисперсій забезпечують розподіл лікарських засобів у системі і сприяють звільненню діючих речовин та їх біологічній доступності.

Л.Г. Мішиною та її колегами розпочато роботу над впровадженням у клінічну практику очної суспензії на основі силіксу [65]. Підґрунтям її виконання стали результати попередніх досліджень, в яких вивчалась фізико-хімічна стабільність і лікувальна дія суспензії ВДК в експерименті з лужним опіком рогівки ока. Одержані результати свідчать про доцільність використання інстиляцій 2,5 % колоїдної суспензії силіксу, виготовленої на ізотонічній буферній системі, в комплексному лікуванні хімічних опіків рогівки та запальних процесів

переднього відділу ока [66, 67]. Було виявлено, що дослідні препарати суспензії з вмістом силіксу 2–2,5 % характеризуються досить високими показниками адсорбційної і антимікробної активності [65].

Було вивчено механізм зв'язування антибактеріального препарату – левоміцетину з поверхнею частинок ВДК, досліджено його десорбцію у водне середовище [68]. Було виявлено, що сам ВДК не тільки має виражену детоксикаційну дію, але і сприяє підвищенню біологічної активності ряду лікарських засобів [69, 70]. Це дало підстави для розробки нових композиційних матеріалів на основі ВДК і адсорбційно закріплених на його поверхні антимікробних фізіологічно активних речовин, які слабоборозчинні у воді і завдяки цьому здатні утримуватися на поверхні твердих частинок протягом певного проміжку часу, навіть після занурення їх у водні системи [68].

Фізико-хімічну взаємодію компонентів лікарської суспензії “Офтасил” на основі ВДК між собою, а також з білком вивчалась у праці [71]. Як білкові препарати використовувались желатина, яєчний альбумін та альбумін людський, і глюкоза (фармакопейний препарат). Результати дослідження свідчать про те, що силікс у складі багатокомпонентної лікарської суспензії має меншу білоксорбційну активність, але її абсолютне значення (близько 280 мг/г для желатини) цілком достатнє для забезпечення детоксуючого ефекту (згідно з аналітичною нормативною документацією на силікс його білоксорбційна активність має бути не менше 220 мг/г). В мікробіологічних дослідженнях було встановлено, що силікс і глюкоза не погіршують антимікробні властивості левоміцетину [65].

## Висновки

Методи іммобілізації набувають все більшого поширення в біотехнології. Наприклад, ефективність ферментативних процесів, які використовуються в таких галузях народного господарства, як медицина, енергетика, харчова промисловість, мікроелектроніка, вдалося збільшити за допомогою іммобілізації ферментів. Однак застосування ферментів обмежено через їх низьку стабільність і високу собівартість чистих ферментів. Тому зараз для іммобілізації використовують не тільки ферменти, а й клітини та органели.

Питання, пов'язані з іммобілізацією ферментів, становлять інтерес з погляду на те, що

методи, розроблені в процесі роботи з цими біокатализаторами, були широко використані і в іммобілізації інших типів білків, а також у таких галузях, як афінна хроматографія, гомо- і гетерофазні методи синтезу і аналізу поліпептидів і полінуклеотидів, імуносорбційні методи.

Необхідно відзначити різноманітність форм систем із ферментом, які отримують іммобілізацією за допомогою полімерів. Серед цих форм – гранули, волокна, мембрани, трубки, порошки, кільця, покриття, а також препарати, які використовують у розчинному вигляді, а

саме форми, що визначаються задачами практичного застосування.

Однак роботи з пошуку оптимальних, економічних методів іммобілізації, які дають можливість отримувати препарати з максимальною активністю і покращеними технологічними характеристиками, інтенсивно продовжуються. Однак єдиної думки про механізми і тенденції зміни властивостей ферментів після і під час іммобілізації немає. Даний технологічний прийом при отриманні ферментних препаратів потребує подальшого вдосконалення.

М.А. Григорьева

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Рассмотрены основные области практического применения иммобилизованных ферментов. Установлено, что широкое распространение на сегодня получило использование иммобилизованных биопрепаратов в медицине и фармации. Описаны основные традиционные и перспективные методы иммобилизации ферментов. Показаны преимущества и эффективность получения биопрепаратов с использованием иммобилизации.

M.A. Grygorieva

ENZYMES IMMOBILIZATION AS A METHOD OF EFFECTIVE BIOPREPARATIONS PRODUCTION FOR THE PRACTICAL PURPOSES

The research described in this paper considers the main fields of immobilized enzymes application. This study reveals some traditional and promising techniques of enzyme immobilization and proves the widespread of using immobilized enzymes in medicine and pharmaceuticals. Experimental evaluations demonstrate the promise of biopreparations production, utilizing the method of immobilization.

1. *Клесов А.А.* Инженерная энзимология и проблемы биотехнологического производства // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1986. – № 2. – С. 89–93.
2. *Клесов А.А.* Инженерная энзимология на промышленном уровне // Итоги науки и техники. Биотехнология. – 1989. – 18. – С. 184–191.
3. *Применение ферментов в медицине:* Тез. докл. республ. науч. конф. – Симферополь, 1987. – 152 с.
4. *Лукашева Е.В., Трешалина Е.М., Березов Т.Т.* Перспективы использования ферментов в терапии // Матер. конгресса “Биотехнология: состояние и перспективы”. – М., 2005. – 166 с.
5. *Назаров Н.М., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. и др.* Биотрансформация органических веществ ассоциативной бактериальной культурой // Авиокосм. и экол. медицина. – 2004. – № 5. – С.42–46.
6. *Cambell D., Miiller C., Reardon K.* Development of a fiber optic enzymatic biosensor for 1,2-dichloroethane // Biotechnol. Lett. – 2006. – N 12. – P. 883–887.
7. *Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.В., Грегирчак Н.Н.* Использование иммобилизованных на керамзите кле-  
ток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – 41, № 1. – С. 58–63.
8. *Рахимов М.М.* Из опыта применения иммобилизованных ферментов в пищевой промышленности // Тез. докл. ВНИТИ антибиотиков и ферментов медицинского назначения “Получение и применение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, промышленности”. – Л., 1980. – С. 132.
9. *Вагабов М.-З.В., Керимова З.М., Мальцева Т.В., Корнева О.С.* Применение ферментных препаратов с целью ускоренного гидролиза инулина при производстве этилового спирта // Биотехнология. – 2005. – № 1. – С. 34–36.
10. *Патент 2204600, Россия.* Способ получения иммобилизованной глюкоамилазы / В.Ф. Селеменев, О.Ф. Стоянова, И.В. Шкутина, В.Б. Смирнова. – Воронеж: Воронеж. гос. ун-т. – Оpubл. 20.05.03, Бюл. № 14. – 2 с.
11. *Рудзе И.Д., Жеребцов Н.А., Слепокурова Ю.И. и др.* Иммобилизация глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* 466, некоторые свойства препарата // Прикл. биохимия и микробиология. – 2001. – 37, № 2. – С. 202–208.



12. *Abbas H., Comeu L.* Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor* sp. // *Enzyme and Microb. Technol.* – 2003. – N 5. – P. 589–595.
13. *Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Терентьева Т.Г. и др.* Получение и адсорбция на неорганических носителях интактных клеток *Arthrobacter* sp. – продуцента глюкозоизомеразы // *Международ. научн. конф. “Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии”*. – Минск–Раков, 2006. – С. 385–388.
14. *Ткачук В.А.* Клиническая биохимия. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – С. 59–81.
15. *Лаврешин П.М., Гобеджишвили В.К., Хутов А.Б. и др.* Прогнозирование избыточного рубцеобразования в хирургии // *Хирургия*. – 2007. – 8, № 5. – С. 38–42.
16. *Кузник Б.И.* Физиология и патология системы крови. – Чита, 2000. – С. 178–190.
17. *Грядских Д.А.* Синтез композиционных аффинных сорбентов с магнитными свойствами и их технологическое использование при изготовлении чумных иммунобиологических препаратов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Ставрополь, 2004. – 20 с.
18. *Применение иммобилизованных ферментов* // *Итоги науки и техники ВИНТИ. Биотехнология*. – М., 1986. – 187 с.
19. *Торчилин В.П., Максименко А.В., Тищенко Е.Г. и др.* Лекарственные препараты иммобилизованных ферментов с повышенным сродством к месту действия // *Антибиотики и мед. биотехнология*. – 1986. – № 2. – С. 122–127.
20. *Валуев И.Л., Валуев Л.И., Платэ Н.А.* Новые возможности метода биоспецифической хроматографии // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 2003 – 39, № 4. – С. 478–482.
21. *Panarin E.* Drugs based on polydisperse polymer systems // *Biotechnology: state and perspective of development*. – М., 2005. – P. 49–52.
22. *Краюткіна О.М.* Імобілізація ліполітичних і протеолітичних ферментів та сульфамідних лікарських препаратів на полімерних носіях: Автореф. дис. ... канд. хім. наук: 02.00.06. – Львів, 2000. – 19 с.
23. *Краюткіна О.М., Чуйко Л.С.* Вивчення процесу одночасного структурування та іммобілізації системи фермент–полімерний носій // *Наук. зап. Тернопіл. держ. ун-ту ім. В. Гнатюка. Сер. Хімія*. – 2000. – Вип. 4. – С. 35–39.
24. *Роговина С.Э., Голова Л.К., Бородин О.Е., Вихорева Г.А.* Целлюлозно-хитозановые пленки, полученные из смесей полисахаридов в метилморфолинноксиде // *Хим. волокна*. – 2002. – № 1. – С.18–21.
25. *Патент 2268751, Россия.* Медицинская повязка, содержащая комплекс протеолитических ферментов, включая коллагенолитические протеазы, из гепатопанкреаса краба / А.А. Белов, В.Н. Филатов, Е.Н. Белова, Н.В. Филатов. – Оpubл. 27.01.06, Бюл. № 03. – 3 с.
26. *Филатов В.Н.* Ферментные препараты на текстильных материалах. Интерактивные раневые покрытия // 3-й Московский междунар. конгр. “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. – М., 2005. – Ч. 2. – С. 219.
27. *Семендяев А.А.* Малоинвазивная хирургия и пролонгированный протеолиз иммобилизованными протеиназами в лечении трубной беременности // *Гинекология*. – 2001. – 3, № 4. – С. 23–29.
28. *Патент 6984397, США. МПК А 61 К 9/127.* Liposome preparation / Jiro F., Hajime K., Akihiro K., Kazumi O.: Fujisawa Pharmaceutical Co. – № 10/636731; Заявл. 08.09.03; Оpubл. 10.01.06; НПК 424/450. – 3 с.
29. *Патент 6855277, США. МПК В 01 J 13/02.* Method and apparatus for liposome production / Baker M., Heriot W.: Optime Therapeutics. Inc. – № 10/298143; Заявл. 15.11.02; Оpubл. 15.02.05; НПК 264/43. – 2 с.
30. *Патент 2260046, Россия. МПК С 12 Т 11/08.* Клеточный микрочип и его применение в способе исследования живых клеток / А.Д. Мирзабеков, Т.В. Наседкина, Д.О. Фесенко. – Оpubл. 10.09.05, Бюл. № 25.
31. *Эллиот В., Эллиот Д.* Биохимия и молекулярная биология / Пер. с англ. – М.: НИИ Биомедицинской химии РАМН, 2000. – С. 281–291.
32. *Патент 2270861, Россия.* Способ получения водорастворимого иммобилизованного ферментного препарата протеаз / А.В. Артамонов, О.В. Гришин, А.В. Троцкий, Е.И. Верещагин, В.Н. Карунин, Т.В. Махнева: ЗАО Аксис. – Оpubл. 27.02.06, Бюл. № 6. – 3 с.
33. *Вирник А.Д., Красовская С.Б. Кильдеева Н.Р. и др.* Иммобилизация ферментов в структуре волокон и пленок // *Антибиотики и медицинская биотехнология*. – 1986. – № 2. – С. 117–121.
34. *Богатский А.В., Давиденко Т.И., Арешидзе И.В.* Иммобилизация пектаваморина Г10х включением в гель // *Прикл. биохимия и микробиология*. – 1979. – XV, № 5. – С. 747–750.
35. *Ghosh D., Sarathi P., Priyabrata S.* Glucose biosensor with polymer microencapsulated enzyme // *J. Indian Chem. Soc.* – 2002. – N 9. – P. 782–783.
36. *Шеламова С.А., Селеменев В.Ф., Янышева Н.В.* Ковалентная и адсорбционная иммобилизация липазы *Rhizopus oryzae* 1403 // *Всерос. симп. “Биотехнология микробов”*: Тез. докл. – М., 2004. – С. 97.
37. *Vadilio R., Busscher H., Norde W. et al.* Comparison of atomic force microscopy interaction force between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2004. – N 9. – P. 5441–5446.
38. *Rodrigues A., Cabral M., Taipa A.* Immobilization of *Chromobacterium viscosum* lipase on Eudragi S-100: Coupling, characterization and kinetic application in organic and

- biphasic media // *Enzyme and Microb. Technol.* – 2002. – N 1-2. – P. 133–141.
39. Карпов А.В., Пенчук Ю.Н., Вережка С.В. Применение иммобилизованных индукторов в технологии получения природных интерферонов I типа в культурах клеток. Использование гранулированных носителей // *Биотехнология.* – 2006. – № 1. – С. 30–35.
40. Неклюдов А.Д., Денякина Е.К. Гидролиз пептидов иммобилизованными бактериальными пептид-гидролазами // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 2004. – 40, № 4. – С. 435–441.
41. Коваленко Г.А., Комова О.В., Симаков А.В. и др. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. I. Адсорбция глюкоамилазы // *Биотехнология.* – 2002. – № 3. – С. 55–66.
42. Коваленко Г.А., Комова О.В., Симаков А.В. и др. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. II. Биокаталитические свойства адсорбированной глюкоамилазы // *Там же.* – № 5. – С. 81–93.
43. Колесник Л.А. Иммобилизация  $\alpha$ -амилазы. Свойства иммобилизованного фермента // *Прикл. микробиология.* – 1995. – № 2. – С. 20–25.
44. Дудинова И.О. Иммобилизация щелочной протеазы и  $\beta$ -галактозидазы на полимерных носителях: Дис. ... канд. техн. наук: 02.00.10. – К., 1995. – 172 с.
45. Taqieddin E., Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate-chitosan core-shell microcapsules // *Biomaterials.* – 2004. – 25. – P.1937–1945.
46. Патент 04215901, США. МПК В 01 J 13/02. Microbial encapsulation / N. Gordon (США); Заявл. 29.09.2004; Опубл. 05.04.2006. – 3 с.
47. Артюхов А.А., Штильман М.И., Тсатсакис А.М. и др. Сшитые макропористые гидрогели поливинилового спирта для медицины и биотехнологии // 3-й Международный конгр. “Биотехнология: состояние и перспективы развития”. – М., 2005. – С. 49.
48. Володькин Д.В., Балабушевич Н.Г., Сухоруков Г.Б., Ларионова Н.И. Включение белков в полиэлектролитные микрочастицы путем послыной адсорбции полиэлектролитов на агрегатах белка // *Биохимия.* – 2003. – 68, вып. 2. – С. 283–289.
49. Тривен М.Д. Иммобилизованные ферменты. – М., 1988. – 236 с.
50. Cui J., Wu J., Lirong Y., Sun Z. Huaxue fanying gongcheng yu gonyi // *Chem. React. Eng. and Technol.* – 2005. – N 1. – С. 43–48.
51. Колесник Л.А. Иммобилизация  $\alpha$ -амилазы. Свойства иммобилизованного фермента // *Прикл. микробиология.* – 1995. – № 2. – С. 20–25.
52. Соловьев А.Ю. Сорбционная иммобилизация ферментов на трековых мембранах плазмодифильтра ПФМ-800 // *Эфферентная терапия.* – 2003. – 9, № 3. – С. 62–65.
53. Воробьева О.В. Биосорбенты для иммобилизации белковых комплексов ферментных препаратов // *Биотехнология.* – 2004. – № 2. – С. 70–75.
54. Романовская И.И. Иммобилизация литического ферментного комплекса лизорицефина // *Прикл. биохимия и микробиология.* – 1999. – 35, № 1. – С. 68–71.
55. Albayrak Y. Immobilization of  $\beta$ -Galactosidase on Fibrous Matrix by Polyethyleneimine for Production of Galacto-Oligosaccharides from Lactose // *Biotechnology Progress.* – 2002. – 18. – P. 240–251.
56. Wei X., Ligeng Q., Lin M., Dong H. A novel method for enzyme immobilization: direct encapsulation of acid phosphatase in nanoporous silica host materials // *J. of Nanoscience and Nanotechnology.* – 2001. – 1. – P. 83–93.
57. Романовская И.И., Тагунова И.К., Пухлик С.М., Чаланова Р.И. Иммобилизация литического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* // *Одес. мед. журн.* – 2007. – № 1. – С. 24–29.
58. Auliffe M., Joseph C., Smith C., Ward E. Concerted enzyme immobilization within polycation-templated silica // *American Chemical Society. Washington.* – 2005. – P. 84–96.
59. Storey B., Duncan A., Chakrabarti C. Immobilization of amyloglucosidase using two forms of polyurethane polymer // *Biochemistry and Biotechnol.* – 2003. – 23. – P. 221.
60. Чуйко А.А. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наук. думка, 2003. – 416 с.
61. Kovalenko G., Kuznetsova E., Mogilnykh Y. et al. // *Carbon.* – 2001. – 39, N 7. – P. 1133–1143.
62. Куришук К.В., Пентюк О.О., Погорелый В.К. Энтеросорбент “Силікс”. – К.: Біофарма, 2003. – 16 с.
63. Пентюк О.О., Погорелый В.К., Чуйко Н.В. Лікувальні властивості ентеросорбенту силіксу – аморфного ультрадисперсного кремнезему // *Медична хімія.* – 2003. – 5, № 1. – С. 95–98.
64. Паховчишин С.В., Панько А.В., Суховій М.В. та ін. Структурно-механічні та лікувальні властивості рано-загоювальної та кровоспинної композиції на основі каоліну та кремнезему // *Фарм. журн.* – 2006. – № 6. – С. 73–77.
65. Мішина Л.Г., Геращенко І.І., Осолодченко Т.П., Луцук М.Б. Вивчення адсорбційних властивостей очної суспензії на основі високодисперсного кремнезему // *Там же.* – № 1. – С. 74–78.
66. Патент 35827А, Україна. Спосіб лікування хімічних опіків та гнійно-запальних процесів переднього відділу ока / Т.Ю. Буглова, Ю.Й. Салдан, І.І. Геращенко та ін. – Опубл. 16.04.01, Бюл. № 3.

67. Патент 52744, Україна. Спосіб одержання лікарської форми на основі аморфного високодисперсного діоксиду кремнію / О.О. Чуйко, М.Б. Луцук, Є.П. Воронін та ін. – Опубл. 15.10.03, Бюл. № 1.
68. Крупська Т.В., Барвінченко В.М., Касперський В.О. та ін. Адсорбційне закріплення левоміцетину на поверхні високодисперсного кремнезему // Фарм. журнал. – 2006. – № 2. – С. 59–63.
69. Чуйко А.А. Кремнезему в медицине и биологии // Сб. науч. тр. – Киев–Ставрополь, 1993. – 259 с.
70. Мішина Л.Г., Безпалюк Н.А., Геращенко І.І., Габчак О.Л. Дослідження фізико-хімічної взаємодії в системі високодисперсний кремнезем–білок–левоміцетин у водному середовищі // Фарм. журн. – 2007. – № 2. – С. 69–72.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції  
8 жовтня 2007 року