

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ПРОМЫШЛЕННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ДИЗАЙНА»**

ВЫСШАЯ ШКОЛА ТЕХНОЛОГИИ И ЭНЕРГЕТИКИ

Е.Ю. Демьянцева, А.В.Парфенова

СПОСОБЫ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Учебно-методическое пособие

**Санкт-Петербург
2018**

УДК 678.5 (075)

ББК 24. 7я7

Д 326

Демьянцева Е.Ю., Парфенова А.В. Способы инкапсулирования ферментов: учебно-метод. пособие/ВШТЭ СПбГУПТД - СПб., 2018.- 20 с.

Пособие содержит теоретический материал и указания по выполнению экспериментальных работ по анализу сырья для инкапсулирования ферментов и методов получения капсул.

Предназначено для бакалавров направления подготовки 18.03.01 «Химическая технология», обучающихся по профилю «Технология и переработка полимеров».

Рецензент: канд.хим.наук, доцент кафедры органической химии ВШТЭ СПбГУПТД М.В. Шафеева.

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом университета в качестве учебно-методического пособия.

© Демьянцева Е.Ю., Парфенова А.В., 2018

© Высшая школа технологии и энергетики
СПбГУПТД, 2018

Оглавление

Введение.....	4
Материалы (носители) для иммобилизации ферментов.....	6
1. Методы иммобилизации ферментов	8
1.1. Физические методы иммобилизации ферментов.....	9
1.1.1. Адсорбции ферментов на нерастворимых носителях.....	9
1.1.2. Иммобилизация ферментов путём включения в гель	10
1.1.3. Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры	11
(инкапсулирование и включение ферментов в липосомы)	11
1.1.4. Включение в двухфазную среду.....	12
1.2. Химические методы иммобилизации ферментов	13
2. Характеристика основных и вспомогательных веществ для получения капсул	13
Желатин	14
Альгинат натрия.....	14
Лабораторная работа.....	17
Библиографический список	19

Введение

Ферменты (от лат. *fermentum* — закваска, брожение), или энзимы (от греч. *enzyme*-в дрожжах), являются веществами белковой природы, которые используются живыми организмами для катализа многих химических реакций. Все ферменты (в настоящее время их более 3000) разделены на различные классы в соответствии с теми химическими реакциями, которые они катализируют. Каждый класс состоит из подкласса, уточняющего природу субстрата, кофермента или характер превращения. Источником фермента может служить любой живой объект, поэтому они могут быть как растительного, так и животного происхождения. В настоящее время для получения ферментов и ферментных препаратов используют микроскопические грибы, бактерии и дрожжи. Как известно, в клетках ферменты находятся не в растворённой форме, а прикреплены к определённым структурам и локализованы в органеллах. Это связано с тем, что ферменты не стабильные соединения и при воздействии ряда физических и химических факторов могут инактивироваться. Имобилизованными ферментами называют ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства. Имобилизация (*immobilisatio*; лат. *immobilis* – неподвижный) – ограничение подвижности молекул ферментов, позволяющие закрепить их активный центр, сохраняя максимальную работоспособность в течение длительного времени, не подвергаясь структурным изменениям.

Имобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами:

- такие ферменты представляют собой гетерогенные катализаторы, легко отделяющиеся от реакционной среды;
- могут использоваться многократно;
- обеспечивают непрерывность каталитического процесса.

Кроме того, иммобилизация ведёт к изменению свойств фермента:

- субстратной специфичности;
- устойчивости;
- зависимости активности от параметров среды.

Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов. Так, происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60%-ом полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом.

Это обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

Микро - и нанокапсулирование биологически активных веществ (БАВ) - одно из наиболее интенсивно развивающихся направлений в технологии лекарственных и косметических средств. Традиционные методы микрокапсулирования позволяют получить полидисперсные частицы с размерами более 2 мкм. Использование микроэмульсий (лиофильных, монодисперсных систем) в технологии инкапсулирования БАВ позволило бы обеспечить их парентеральное (инъекционное) введение и импульсный режим высвобождения в организме. К сожалению, сведения о применении микроэмульсий для инкапсулирования БАВ немногочисленны и отрывочны.

Материалы (носители) для иммобилизации ферментов.

Материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими свойствами:

- нерастворимостью;
- высокой химической и биологической стойкостью;
- значительной гидрофильностью;
- достаточной проницаемостью как для ферментов, так и для субстратов и продуктов реакции;
- способностью носителя легко активироваться.

В зависимости от природы носители делятся на:

- органические материалы;
- неорганические материалы.

Органические полимерные носители можно разделить на 2 класса: а) природные; б) синтетические. В свою очередь, каждый из классов органических полимерных носителей подразделяется на группы в зависимости от их строения. Среди природных полимеров выделяют: белковые; полисахаридные; липидные носители, а среди синтетических: полиметиленовые; полиамидные; полиэфирные носители.

К преимуществам природных носителей следует отнести:

- доступность;
- полифункциональность;
- гидрофильность,

а к недостаткам – высокую стоимость.

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

Из природных аминсахаридов в качестве носителей для иммобилизации применяют хитин, который в значительных количествах накапливается в виде отходов в процессе промышленной переработки крабов и креветок. Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Среди белков практическое применение в качестве носителей нашли структурные протеины, такие как: кератин, фиброин, коллаген и продукт переработки коллагена – желатин. Эти белки широко распространены в природе, поэтому доступны в больших количествах, дешёвы и имеют большое число функциональных групп для связывания фермента. Белки способны к биодegradации, что очень важно при конструировании иммобилизованных ферментов для биотехнологических целей.

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

Их преимущество:

- Механическая прочность
- Возможность варьирования в широких пределах величины пор и введения различных функциональных групп.

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

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

Основное преимущество неорганических носителей: лёгкость регенерации. Подобно синтетическим полимерам неорганическим носителям можно придать любую форму и получать их с любой степенью пористости.

Итак, к настоящему времени создано огромное число разнообразных носителей для иммобилизации ферментов. Однако для каждого индивидуального фермента, используемого в конкретном технологическом процессе, необходимо подбирать оптимальные варианты как носителя, так и условий и способов иммобилизации.

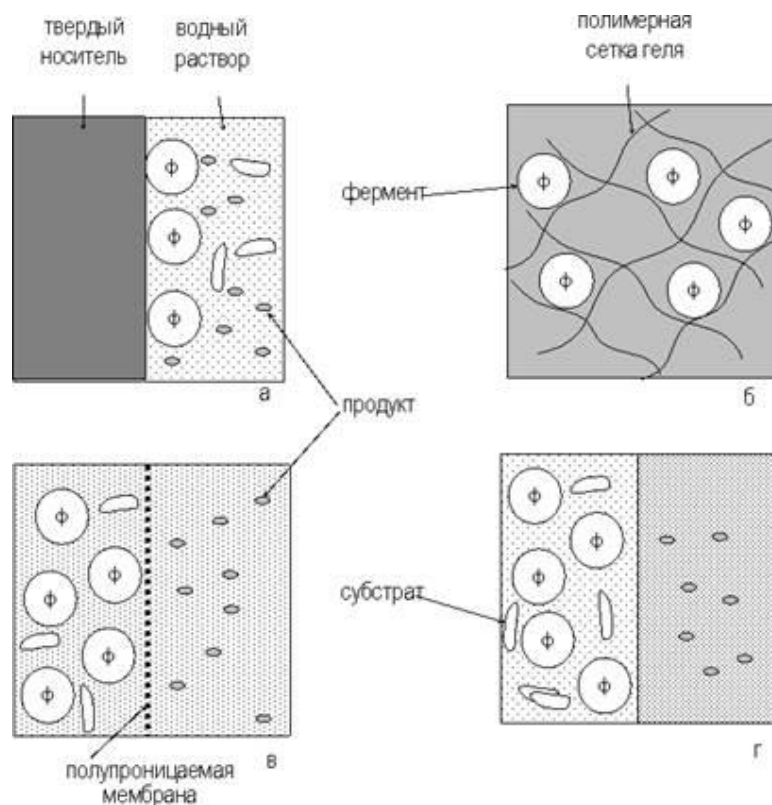
1. Методы иммобилизации ферментов

Существует два основных метода иммобилизации ферментов: физический и химический.

Физическая иммобилизация ферментов представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями. Существует четыре типа связывания ферментов:

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включение в поры геля;
- пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны);
- включение в двухфазную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из фаз.

Перечисленные подходы проиллюстрированы на рисунке.



Способы иммобилизации ферментов: а - адсорбция на нерастворимых носителях; б – включение в поры геля; в – отделение фермента с помощью полупроницаемой мембраны; г – использование двухфазной реакционной среды

1.1. Физические методы иммобилизации ферментов

1.1.1. Адсорбции ферментов на нерастворимых носителях

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

Адсорбция была первым методом иммобилизации ферментов (Дж. Нельсон, Э. Гриффин, 1916 г.), но и сейчас не потеряла своего значения и стала широко распространённым способом получения ферментов в промышленности. В литературе описано получение адсорбционным способом более 70 иммобилизованных ферментов с использованием таких носителей, как кремнезём, активированный уголь, графитовая сажа, различные глины, пористое стекло, полисахариды, синтетические полимеры,

оксиды алюминия, титана и других металлов. Последние применяются наиболее часто.

Эффективность адсорбции молекулы белка на носителе определяется пористостью носителя. Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается крайней простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем при перемешивании. С этой целью раствор фермента смешивают со свежим осадком, например, гидроксида титана, и высушивают в мягких условиях. Активность фермента при таких условиях иммобилизации сохраняется практически на 100%, а удельная концентрация белка достигает 64 мг на 1 г носителя.

К недостаткам адсорбционного метода следует отнести невысокую прочность связывания фермента с носителем. При изменении условий иммобилизации может произойти десорбция фермента, его потеря и загрязнение продуктов. Существенно повысить прочность связывания фермента с носителем может предварительная его модификация (обработка ионами металлов, полимерами, белками, гидрофобными соединениями, монослоем липида).

1.1.2. Иммобилизация ферментов путём включения в гель

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

1. Фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включёнными в его ячейки молекулами фермента.
2. Фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние.

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

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объёме носителя. Все гели обладают высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью, благодаря чему обеспечивается возможность многократного использования фермента, включённого в его структуру.

1.1.3. Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры

(инкапсулирование и включение ферментов в липосомы)

Сущность этих способов иммобилизации заключается в отделении водного раствора фермента от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомолекулярные молекулы субстратов, но задерживающей большие молекулы фермента. Разработаны две модификации этого направления, которые представляют собой микрокапсулирование и включение ферментов в липосомы.

Инкапсулирование

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

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

Достоинство метода микрокапсулирования – простота, универсальность, возможность многократного использования нативного

фермента, поскольку он может быть отделён от непрореагировавшего субстрата процедурой простого фильтрования. Особенно существенно, что методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но и целые клетки и отдельные фрагменты клеток.

К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

Включение ферментов в липосомы

Близким к инкапсулированию вариантом иммобилизации является метод включения водных растворов ферментов в липосомы, т. е. двойные липидные (жировые) шарики. Впервые данный метод был применён для иммобилизации ферментов Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 году. Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель. Оставшуюся тонкую плёнку липидов выдерживают в водном растворе, содержащем фермент. В процессе выдержки происходит самовпитывание (самосборка) липидных структур липосомы, содержащих данный раствор фермента.

Ферменты, иммобилизованные путём включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и биотехнологических целях.

1.1.4. Включение в двухфазную среду

При иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента в объеме системы достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативного превращения распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в этих фазах. Природа фаз подбирается таким образом, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует. После завершения реакции эту фазу отделяют и извлекают из нее продукт, а фазу, содержащую фермент, вновь используют

для проведения очередного процесса. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

1.2. Химические методы иммобилизации ферментов

Представляют иммобилизацию ферментов путём образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем – наиболее массовый способ получения промышленных биокатализаторов.

В отличие от физических вариантов, эти методы иммобилизации обеспечивают прочную и необратимую связь фермента с носителем и сопровождаются стабилизацией молекулы энзима. Однако расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создаёт трудности в осуществлении каталитического процесса. Ферменты отделяют от носителя с помощью вставки (сшивки или спейсера), в роли которой чаще всего выступают полифункциональные агенты бромциан, гидразин, глутаровый диальдегид. В этом случае структура иммобилизованного фермента включает носитель, вставку и фермент, соединённые между собой ковалентными связями.

2. Характеристика основных и вспомогательных веществ

для получения капсул

Для получения капсул применяют пленкообразующие высокомолекулярные вещества, способные давать эластичные пленки и характеризующиеся определенной прочностью: зеин, парафин, жиры и воскоподобные вещества, метилцеллюлоза, этилцеллюлоза, полиэтилен, поливинилхлорид, альгинат натрия, желатин, соли акриловой кислоты и др.

Наиболее распространенными формообразующими материалами для производства капсул являются желатин и альгинат натрия.

Желатин

Желатин – продукт частичного гидролиза коллагена, образующего главную часть соединительной ткани позвоночных. В основе белковой молекулы желатина лежит полипептидная цепь, образуемая 19 аминокислотами, большинство из них незаменимы для организма человека.

Желатин легко и быстро усваивается, нетоксичен и не оказывает побочных реакций.

Характерным свойством желатина является способность его растворов застудневать при охлаждении, образуя твердый гель. На этом свойстве желатина основано изготовление желатиновых капсул.

Для получения стабильной капсульной оболочки в состав желатиновой основы могут входить различные вспомогательные вещества: пластификаторы, стабилизаторы, консерванты, ароматизирующие вещества, красители и пигменты.

Главными недостатками желатиновых капсул являются: высокая чувствительность к влаге, а также малая антимикробная устойчивость желатина. Для устранения этих недостатков существует несколько способов. Одним из них является нанесение покрытия, которое надежно защищает оболочки от действия влаги, в то же время, не препятствуя быстрому разрушению их в желудке. Введение в состав специальных консервантов предотвращает попадание микроорганизмов.

Альгинат натрия

Альгинат натрия – полисахарид природного происхождения, широко используемый в пищевой и фармацевтической промышленности. В технологических процессах он используется как загуститель, вещество для капсулирования, стабилизатор, влагоудерживающий агент, гелеобразователь. В медицине альгинат натрия используется как энтеросорбент, он способен хорошо связывать и выводить из организма радионуклиды и тяжелые металлы, а также может способствовать заживлению ран. Свойство натрия

альгината как стабилизатора широко используют в производстве эмульсий, кремов и лосьонов в косметологии. Также известно, что альгинатные капсулы возможно использовать для инкапсулирования витаминов, эфирных масел, лактоферрина и других биологически активных веществ, необходимых человеку.

В пищевой индустрии применяется в качестве стабилизатора-эмульгатор и желеобразующий агент (E401). Используют при изготовлении мармелада, фруктовых желе, конфет, осветления соков.

В природе альгинат натрия находится в форме альгиновой кислоты в клеточных стенках бурых морских водорослей.

Альгинат натрия организмом не усваивается. Попадая в желудок, он распадается до альгиновой кислоты и практически полностью выводится естественным путем.

Коллаген

(от греч. kolla-клей и -genes - рождающий, рожденный), фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани животных (кожи, связок, сухожилий, костей, хрящей и др.) и обеспечивающий ее прочность. Коллаген, или тропоколлаген - наиболее распространенный белок животного мира. Молекула коллагена (мол.масса около 300 тыс., длина 300 нм, толщина 1,5 нм) имеет стержневидную структуру и состоит из трех так называемых α -цепей (мол. масса около 100 тыс.), формирующих правозакрученную тройную спираль таким образом, что один виток спирали α -цепи содержит три аминокислотных остатка. Три α -цепи в свою очередь объединяются в структуру, слегка закрученную в правую спираль. Коллаген- гликопротеин и в зависимости от источника содержит на 1000 аминокислотных остатков от 2 до 80 углеводных остатков (в основном в виде моно- или дисахаридов), связанных O-гликозидной связью с HO-группой HO—Lys. Стабилизация молекулы коллагена осуществляется благодаря

электростатическим и гидрофобным взаимодействиям, а также водородными и ковалентными поперечными связями между α -цепями. Нативный коллаген плохо растворим в воде при pH около 7. При умеренном нагревании в водных растворах коллаген денатурирует с разрывом нековалентных связей; α -цепи расплетаются, "плавятся" с образованием желатина. Биологическая роль коллагена определяется его способностью образовывать упорядоченные надмолекулярные агрегаты фибриллы (волокна), которые выполняют главные опорно-механические функции в различных типах соединительной ткани. Фибриллы состоят из повторяющихся тропоколлагеновых структур, уложенных вдоль волокна в виде параллельных пучков по типу "голова к хвосту". Получаемый из коллагена желатин (он легко образует студни) используют в пищевой промышленности, при изготовлении фотографических материалов, как среду для культивирования микроорганизмов в микробиологии.

Лабораторная работа

АНАЛИЗ ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ КАПСУЛ

1. Приготовление желатиновой массы

Состав желатиновых масс для получения капсул, включающий желатин, глицерин, консервант и очищенную воду, имеет соотношение указанных компонентов, масс%: желатин 35–45; глицерин 31–35; консервант 0,12–0,25; остальное очищенная вода.

В качестве консерванта используют нипагин, нипазол, метабисульфит натрия, салициловую кислоту и другие разрешённые к применению в медицине. Для получения оболочки капсул различного цвета в желатиновую массу допускается введение красителя в частности кислотного красного 2С, кофейного напитка «Цикорий» или «Ячменный».

Оптимальное содержание желатина и глицерина определяет эластичность пленки и технологичность изготовления конечного изделия.

Вязкость должна быть между 45 с и 2 мин.

Желатиновую массу на основе указанных компонентов готовят следующим образом.

В реактор подают очищенную воду и глицерин, в полученной смеси при 60–65 °С растворяют консервант и перемешивают. В случае изготовления цветной желатиновой массы перемешиванием в нее добавляют краситель. Затем смесь охлаждают до 13–20 °С, добавляют желатин и перемешивают под вакуумом при остаточном давлении 0,2–0,3 кгс/см² до образования рассыпчатой массы. Затем массу нагревают до 75–80 °С и расправляют желатин. Расплавленную массу вакуумируют для удаления воздуха при остаточном давлении 0,2–0,3 кгс/см² и температуре 75–80 °С в течение 1–2,5 ч. Затем массу выдерживают 1–2 ч при 70–78 °С без вакуума.

Готовую желатиновую массу направляют в термостат, где поддерживают температуру 55–65 °С. Полученная масса имеет следующие

показатели: содержание влаги 28–34 %; относительная вязкость от 45 секунд до 2 минут.

2. Методика проверки качества массы

Свежеприготовленную желатиновую массу, нагретую до 65 °С, растягивают между большим и указательным пальцем. Смотрят, образуется ли единая пленка, не растягивающаяся на нити и волокна; если есть ощущение липкости и клейкости после отлипания от пальцев рук, то при дальнейшем использовании такой ЖМ образуются качественные капсулы.

1. Если не образуется пленка, значит, желатиновая лента не будет формироваться в капсулы (будут склеиваться с одной стороны или шов совсем не будет образовываться), следовательно не хватает желатина.
2. Если остаётся липкое клейкое ощущение, то не хватает глицерина и не будет обеспечена дальнейшая пластичность ЖМ.

Библиографический список

1. Гамаюрова В.С. Ферменты. Лабораторный практикум : учеб.пособие / В.С. Гамаюрова, М.Е. Зиновьева. — СПб.: Проспект Науки, 2011. – 256 с.
2. Литвинова Т.П. Медицинские капсулы: учеб.пособие/ Т.П. Литвинова, Г.П. Грядунова, И.В. Давигора; под ред. И.С. Ажгихина. – М.: Первый московский мед.ин-т им. И.М. Сеченова, 1974. - 48 с.
3. Милованова Л.Н. Технология изготовления лекарственных форм.- Ростов- на -Дону: Медицина, 2002.
4. Глинов В.А. Микрокапсулирование и микрогранулирование.-М.: Химия, 1979.-160 с.
5. Чуешов В.И. Промышленная технология лекарств: учебник в 2 т./ В.И. Чуешов, О.И. Зайцев, С.Т. Шебанова, М.Ю. Чернов / под ред. В.И. Чуешова. - Харьков: МТК-Книга, Изд-во НФАУ, 2008. Т. 2.
6. Твердые желатиновые капсулы [Электронный ресурс] – URL: <http://www.realcaps.ru/capsule.shtml>. - 10.04.2012г.

Учебное издание

Елена Юрьевна ДЕМЬЯНЦЕВА
Александра Валерьевна ПАРФЕНОВА

СПОСОБЫ ИНКАПСУЛИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Учебно-методическое пособие

Редактор и корректор Т.А.Смирнова

Техн.Редактор Л. Я. Титова

Темплан 2018, поз.125

Подп. к печати 20.12.2018.

Формат 60x84/16.

Бумага тип №1.

Печать офсетная.

Печ.л.1,25; Уч.-изд.л. 1,25.

Тираж 50 экз.

Изд. № 125.

Заказ

Ризограф Высшей школы технологии и энергетики Санкт-Петербургского государственного университета промышленных технологий и дизайна, 198095, СПб., ул. Ивана Черных,4.