

# **Инженерная энзимология**

Преподаватель:

к.б.н

**Кузнецова Екатерина Игоревна**

# Механизмы инактивации ферментов

## •1. *Изменение первичной структуры:*

### •1.1. *Разрыв полипептидной цепи:*

Жесткие условия (длительное кипячение в HCl) – гидролиз до отдельных ам-т.

При нагревании до 100 °С (рН 7-8), гидролиз пептидных связей незначителен.

Наиболее чувствительными к высокотемпературному гидролизу являются пептидные связи, образованные остатками *аспарагиновой кислоты*.

Протеазы (бактериальное загрязнение, автолиз).

## **Решение:**

В литературе практически отсутствуют примеры удачной реактивации подобным образом инактивированных ферментов.

## •1.2. Окисление функциональных групп фермента

•SH-группы цистеина и индольные фрагменты триптофана, при повышенной температуре, могут окисляться (сульфокси- соединения цистеина (SOH, SO<sub>2</sub>H) и образовываться продукты раскрытия индольного кольца триптофана.

## Решение:

• Реактивировать с помощью восстанавливающих агентов, в частности низкомолекулярных тиолов (например, цистеин или дитиотрейтол) .

### • 1.3. *Расщепление дисульфидных связей*

Вызывают : Тиолы и другие восстановленные соединений серы, например  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .

Продуктом восстановления дисульфидной связи (S-S) является:

- 1) тиольная форма (белок-SH)
- 2) смешанный дисульфид тиольной формы белка с восстанавливающим реагентом, например белок-S-SO<sub>3</sub>).

### • 1.3. *Расщепление дисульфидных связей*

- Щелочной гидролиз цистеина → дегидроаланин →  
Благодаря нуклеофильным свойствам взаимодействует  
с  $\text{NH}_2$ -группами лизина и  $\text{SH}$ - цистеина  
→ лизиноаланин и лантионин.
- Для полной деструкции всех S–S связей требуются достаточно жесткие условия (0,1–1М щелочь, 100 °С).
- Однако деструкция наиболее реакционноспособных S–S связей может проходить в достаточно мягких условиях – например, при температурах 60–80 °С и слабощелочных значениях pH.
- Следует учитывать при использовании ферментов в качестве добавок к моющим средствам.

## Решение:

- Добавление в среду тиолов приведет к расщеплению смешанного дисульфида и последующему образованию правильной S–S связи



## *1.4. Химическая модификация каталитических SH-групп.*

Катионы тяжелых металлов (Hg, Pb и Cu) связываются с SH-групп активного центра фермента



Образование соответствующих меркаптидов



Фермент инактивируется

## *1.5. Фосфорилирование белков in vivo.*

Под действием фосфорилазы и фосфатазы, содержащихся в полуочищенных ферментативных препаратах в виде примесей



Фосфорная кислота связывается с ОН-группами серина и треонина.



Конформационные изменения в белковой молекуле



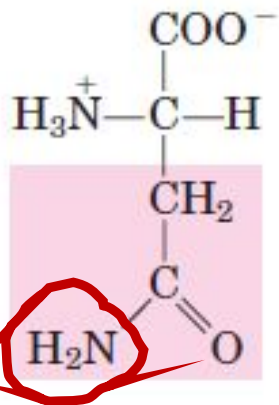
инактивацию фермента.

## **Решение:**

В литературе практически отсутствуют примеры удачной реактивации подобным образом инактивированных ферментов.

## 1.6. Дезаминирование остатков аспарагина.

При температурах (порядка 100 °С) и рН (порядка 4,0–5,0) происходит дезаминирование остатков аспарагина.



инактивации фермента.

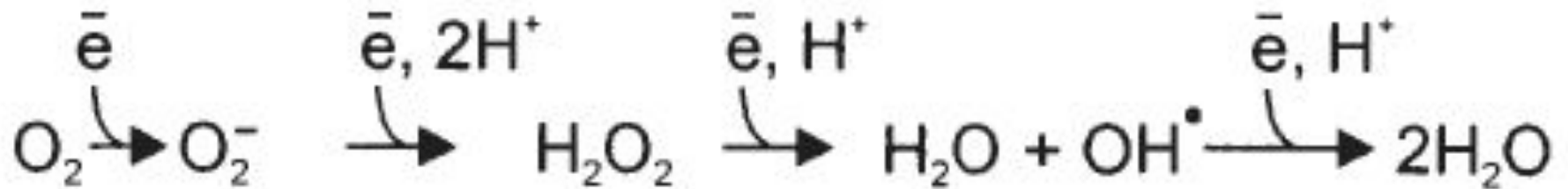
## **Решение:**

В литературе практически отсутствуют примеры удачной реактивации подобным образом инактивированных ферментов.

## 1.7. Радиационная инактивация ферментов

$\gamma$ -облучение и УФ-свет

Воздействуют на функциональные группы ферментов, пептидные связи и SH-группы остатков цистеина.



Супероксид  $\rightarrow$  пероксид  $\rightarrow$  гидроксильный радикал

## *2. Агрегация*

- Наблюдается при повышенной температуре, при экстремальных значениях рН, в присутствии некоторых химических соединений.
- Чем выше концентрация, тем быстрее идет агрегация.
- Гидрофобные взаимодействия и водородные связи, возможно образование дисульфидных мостиков между отдельными белковыми молекулами

## Решение:

- Необходимо разрушить межмолекулярные ковалентные и нековалентные контакты с помощью концентрированных растворов мочевины и гуанидинхлорида, экстремальных значений pH.
- Если при агрегации ферментов образовались межмолекулярные S-S -мостики, в среду вносят в относительно невысоких концентрациях (мкмоль/л) тиолсодержащие реагенты (например, цистеин или дитиотрейтол).
- При таких концентрациях внутримолекулярные S-S связи в белке, как правило, не затрагиваются.



### *3. Инактивация ферментов поверхностным натяжением*

- Поверхностное натяжение на границе раздела между воздухом и чистой водой составляет 80 дин/см.
- Пенообразование вызывает денатурацию ферментов, адсорбированных на границе раздела фаз.

## **Решение:**

Добавление ПАВ снижает поверхностное натяжение до 1 дин/см.

- #### *4. Сорбция белка на стенках реакционного сосуда*
- Сорбция за счет нековалентных взаимодействий приводит к уменьшению концентрации фермента в растворе.
  - Необходимо учитывать при работе с разбавленными белковыми растворами (концентрация  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  моль/л).
  - Под влиянием денатурирующих факторов способность белков сорбироваться на стенках реакционного сосуда может возрасти.

## Решение:

Десорбция фермента со стенок реакционного сосуда достигается за счет разрушения неспецифических взаимодействий между белком и сорбционными центрами на поверхности сосуда.

Можно использовать экстремальные значения рН, концентрированные растворы мочевины или гуанидинхлорида.

## *5. Диссоциация олигомерных белков на субъединицы*

Вызывают: Мочевина, детергенты, кислоты или же нагревание.

Приводят к:

- конформационным изменениям отдельных субъединиц;
- агрегации субъединиц;
- диссоциации кофакторов из активных центров;
- модификации функциональных групп, которые в олигомерном белке были экранированы от контакта с растворителем.

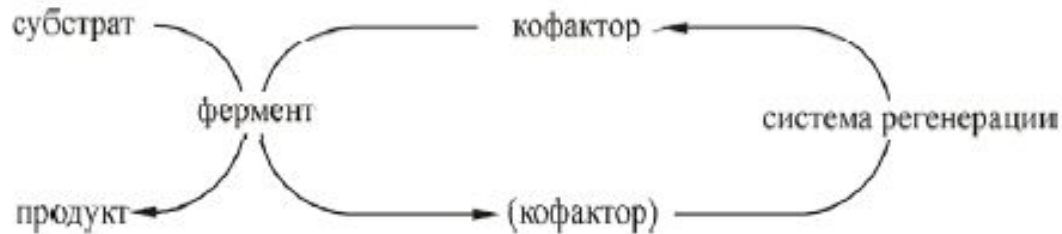
## *6. Десорбция кофактора из активного центра фермента*

Вызывает: нагревание, действие хелаторов, диализ

Если диссоциация кофактора сопровождается значительными конформационными сдвигами или химической модификацией важных функциональных групп → фермент инактивируется необратимо.

Если при этом не произошло существенного изменения белковой конформации, то добавление в среду избытка кофактора приводит к реактивации фермента.

# Регенерация кофакторов



*Способы регенерации:*

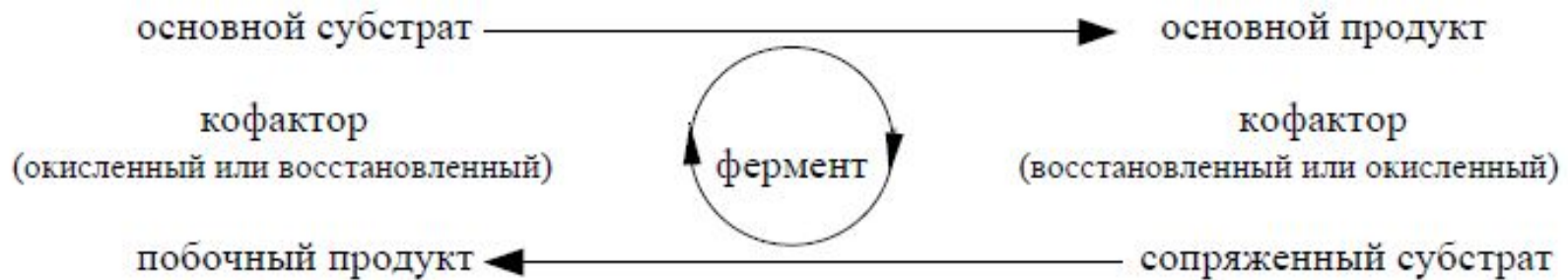
**Ферментативный** (методы с использованием сопряженных субстратов или ферментов)

**Неферментативный** (химические и электрохимические подходы)

# Ферментативный способ

## *1. Использование сопряженных субстратов.*

В систему вводят избыточное количество сопряженного субстрата того же фермента:



Пример: при работе алкогольдегидрогеназы расходуется НАДН.



# Ферментативный способ

## *1. Использование сопряженных субстратов.*

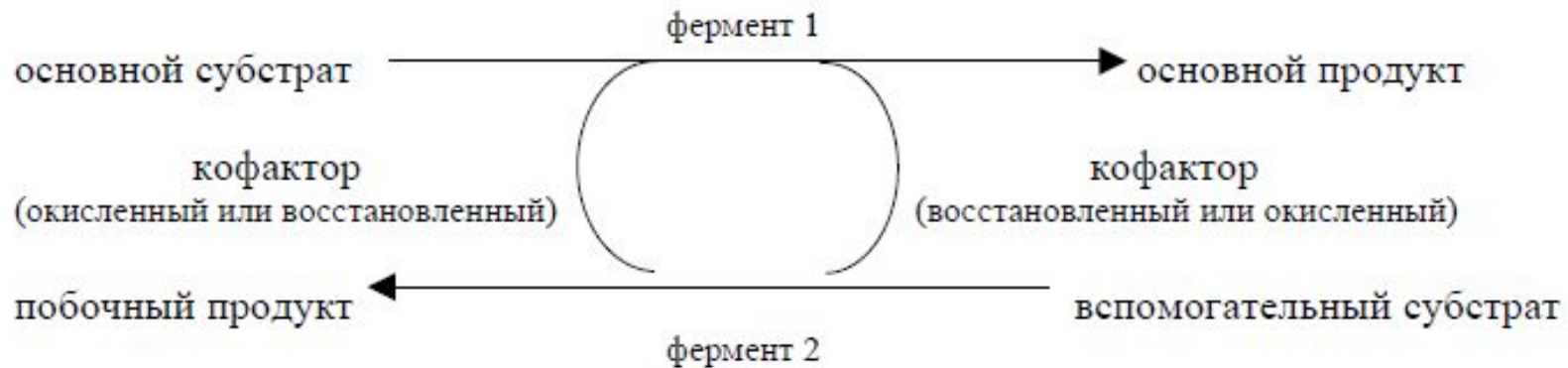
Недостатка:

- используются высокие концентрации сопряженного субстрата, так как равновесие реакции сильно сдвинуто в сторону образования спирта;
- усложняет процедуру выделения основного продукта из реакционной смеси.

# Ферментативный способ

## 2. Использование сопряженных ферментативных реакций

• В систему, дополнительно вводят фермент 2, функционирование которого обеспечивает регенерацию кофермента.



Используемые в системе ферменты должны иметь разную субстратную специфичность

# Неферментативные способы

## *1. Химические методы.*

- Используются дитионит натрия и некоторые соли пиридиния:

+ Низкая стоимость.

-могут ингибировать отдельные ферменты.

- Флавиновые коферменты

# Неферментативные способы

## *2. Электрохимические методы.*

Прямое электрохимическое восстановление или окисление.

“-” появления в процессе регенерации ферментативно неактивных форм кофермента, например в результате его димеризации.

СТАБИЛИЗАЦИЯ  
ФЕРМЕНТОВ  
В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ  
СИСТЕМАХ

# **Проблемы возникающие при использовании ферментов в биотехнологических процессах:**

- .Повышенные температуры
- .Экстремальные значения рН
- .Высокие концентрации органических растворителей или ПАВ.
- .Невозможность многократно использовать фермент.
- .Сложность при разделении фермента от продукта.

# Основные подходы для стабилизации ферментов :

1. Добавление стабилизирующих веществ в среду, в которой хранится фермент или проводится ферментативная реакция.

2. Химическая модификация фермента.

3. Иммобилизация фермента.

# Стабилизация ферментов с помощью:

*.Субстратов или их аналогов:*

Фермент-субстратный комплекс часто более устойчив, чем свободный фермент.

*Пример:* Лактатдегидрогеназа в присутствии лактата более термоустойчив.



# Стабилизация ферментов с помощью:

## *2. Органических растворителей:*

Многоатомные спирты стабилизируют некоторые ферменты за счет повышения устойчивости внутримолекулярных водородных связей белка.

*Пример:* Химотрипсин в присутствии 50–90 % глицерина более устойчив к протеолизу

# Стабилизация ферментов с помощью:

## 3. Солей:

При низких концентрациях солей ( $<0,1\text{M}$ ) катионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  и др. могут специфично взаимодействовать с металлопротеинами.

Некоторые из них - кофакторы.

$\text{Ca}^{2+}$  способен стабилизировать третичную структуру ряда белков благодаря образованию ионных связей с двумя различными аминокислотными остатками.

*Пример:* у  $\alpha$ -Амилазы (из *Bacillus caldolyticus*)

$\text{Ca}^{2+}$  значительно повышает термическую устойчивость.

Фермент	Способ стабилизации	Результат стабилизации
Глюкоамилаза	Добавление аналогов субстрата – глюкозы, глюконолактона	Повышение термической устойчивости
Лактатдегидрогеназа	Добавление субстрата (лактата) или эффектора (фруктозодифосфата)	Повышение термической устойчивости; дестабилизация в присутствии другого субстрата (пирувата)
$\alpha$ -Амилаза	Добавление 50–70 % сорбита	Повышение термической устойчивости и устойчивости при хранении
Химотрипсин	Добавление 50–90 % глицерина	Повышение устойчивости к протеолизу
$\beta$ -Галактозидаза	Добавление 5–10 % этанола или изопропанола	Повышение термической устойчивости; метанол или <i>n</i> -пропанол в тех же концентрациях дестабилизируют фермент

# Химическая модификация фермента

1. Фермент принимает более стабильную конформацию.
2. Введение в белок новых функциональных групп приводит к образованию дополнительных стабилизирующих водородных связей или солевых мостиков.
3. При использовании неполярных соединений усиливаются гидрофобные взаимодействия.
4. Модификация гидрофобных областей поверхности белка гидрофильными соединениями уменьшает площадь неблагоприятного контакта внешних неполярных остатков с водой.

*Пример:* глутаровый альдегид

## **Иммобилизация фермента позволяет:**

- Повысить устойчивость фермента (нагреванию, автолизу, действию агрессивных сред и т. д)
- . Многократно использовать фермент
- . Отделять фермент от реагентов и продуктов реакции.
- . Прерывать реакцию в нужный момент.

**Иммобилизованные ферменты** – это препараты ферментов, молекулы которых связаны с носителем, сохраняя при этом полностью или частично свои каталитические свойства.

**Методы иммобилизации:**

**1.Химические**

**2.Физические**

# Методы иммобилизации:

В качестве носителей могут применяться:

## *1) Органические материалы:*

- 1.1) природные (полисахариды, белки, липиды)
- 1.2) синтетические полимерные носители

## *2) Неорганические материалы* (матрицы на основе силикагеля, глины, керамики, природных минералов и т. д.)

## **Методы физической иммобилизации:**

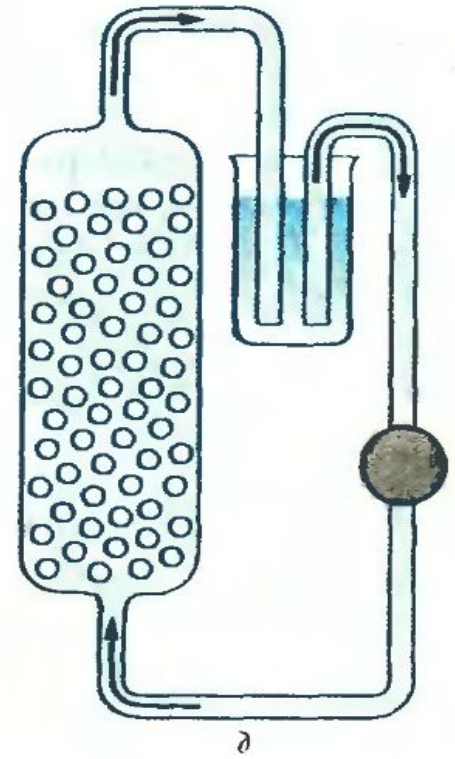
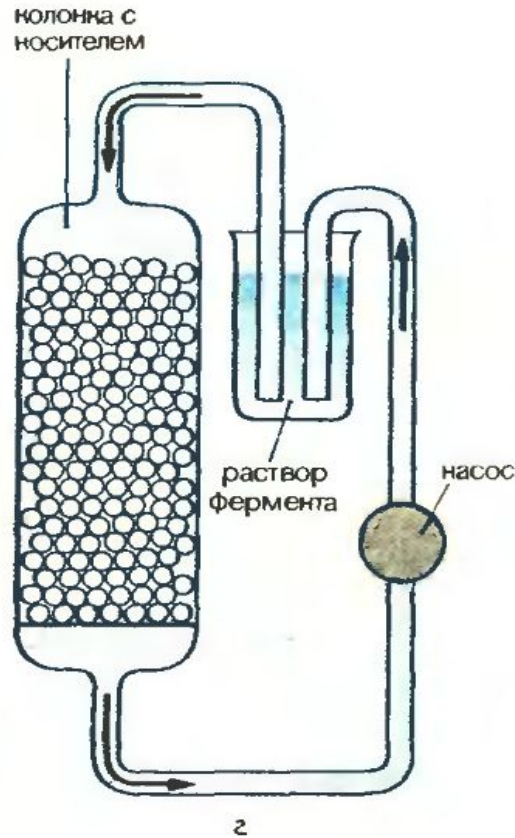
- 1) адсорбция фермента на нерастворимом носителе в результате электростатических, гидрофобных, вандер-ваальсовых и др. взаимодействий;
- 2) включение фермента в полупроницаемую капсулу, в полупроницаемую мембрану;
- 3) механическое включение фермента в гелевые структуры;
- 4) Включение в двухфазную систему.



# Методы физической иммобилизации:

## 1) адсорбция фермента на нерастворимом носителе

Достигается путем контакта водного раствора фермента с носителем



## **Методы физической иммобилизации:**

### *1) адсорбция фермента на нерастворимом носителе*

Факторы влияющие на адсорбцию:

- . Удельная поверхность и пористость носителя
- . Значение рН (на не ионообменниках максимум адсорбция в изоэлектрической точке белка)
- . Ионная сила раствора (возрастание ионной силы – десорбция фермента, но иногда обратная ситуация “высаливание”)
- . Концентрация фермента.
- . Температура ( с одной стороны денатурация, с другой ускоренная диффузия)

## **Методы физической иммобилизации:**

### *1) адсорбция фермента на нерастворимом носителе*

#### *Преимущества:*

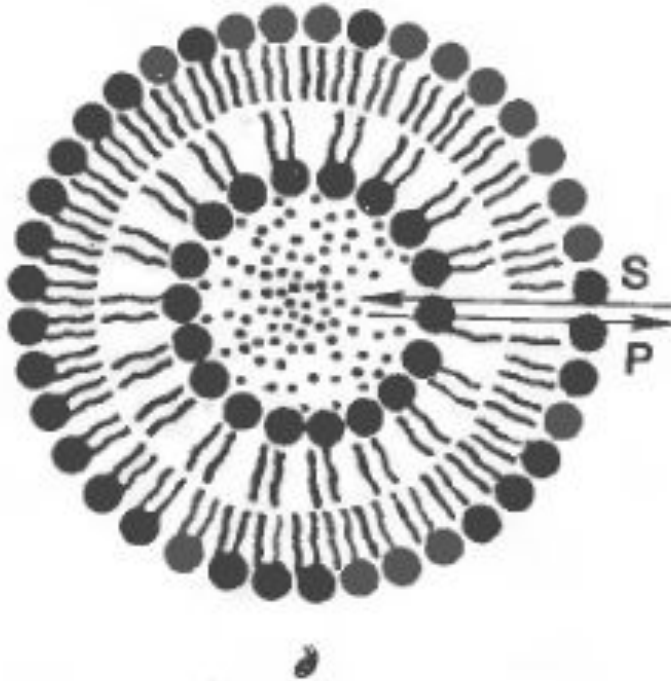
- ) Относительная простота методики*
- ) Доступность носителей*

#### *Недостатки:*

- ) Недостаточная прочность связывания*
- ) Многие носители биodeградируемы*

# Методы физической иммобилизации:

2) включение фермента в полупроницаемую капсулу, в полупроницаемую мембрану



## **Методы физической иммобилизации:**

***2) включение фермента в полупроницаемую капсулу, в полупроницаемую мембрану***

*Преимущества:*

) Относительная простота методики

) Защита от микроорганизмов

) Нет диффузионных ограничений (т.к. отношение поверхности к площади велико и толщина мембраны невелика)

*Недостатки:*

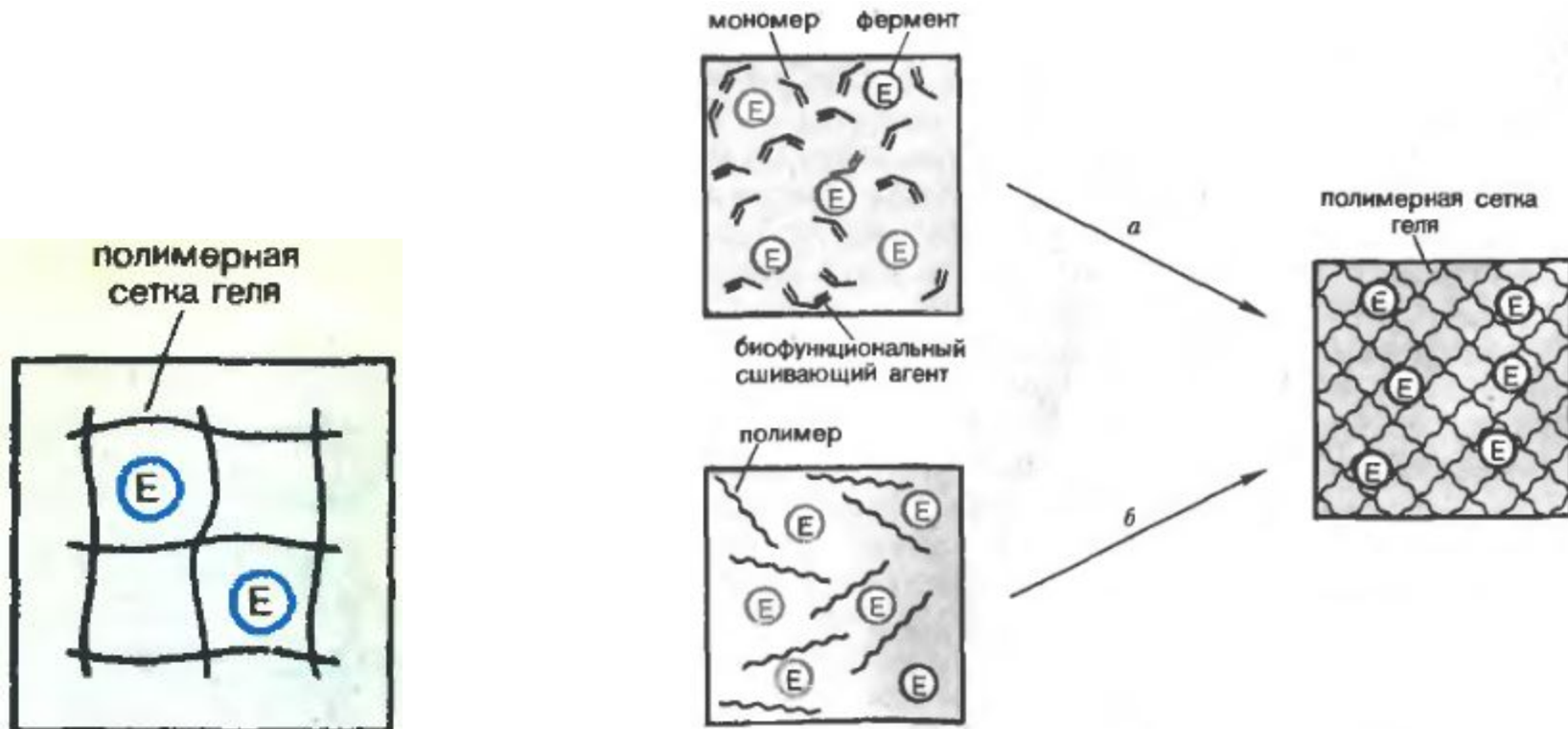
) Биodeградируемы

) Не применим для высокомолекулярных субстратов

# Методы физической иммобилизации:

## 3) механическое включение фермента в гелевые структуры

Фермент включается в трехмерную сетку полимерных цепей, образующих гель.



## Методы физической иммобилизации:

### *3) механическое включение фермента в гелевые структуры*

Необходимо учитывать:

.Соответствие размера пор размеру фермента.

.Природа матрицы (т.к. она создает микроокружение для фермента, может создавать рН отличное от рН раствора и повышать сродство субстрата к матрице, что повышает скорость ферментативной реакции )

## **Методы физической иммобилизации:**

*3) механическое включение фермента в гелевые структуры*

*Преимущества:*

1) Относительная простота методики

2) Повышенная механическая, химическая и тепловая стойкость матриц.

3) Происходит стабилизация фермента

4) Фермент защищен от бактериального повреждения

*Недостатки:*

1) Не применим для высокомолекулярных субстратов

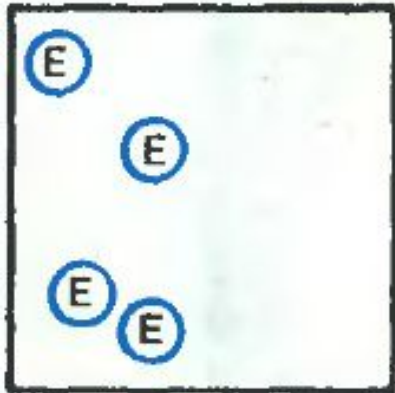


# Методы физической иммобилизации:

## 4) Включение в двухфазную систему

Фермент растворим только в одной из фаз, а продукт - в другой

Позволяет работать в высокомолекулярными субстратами.



# Методы химической иммобилизации:

Образованию ковалентных связей между ферментом и носителем.

*Преимущества:*

- 1) Высокая прочность конъюгата
- 2) Можно повышать стабильность фермента

*При иммобилизации ферментов необходимо соблюдать следующие условия:*

1. Активные группы матрицы не должны блокировать каталитический центр фермента.
2. Иммобилизации не должны приводить к потере активности фермента.

Весьма перспективным является использование в качестве биокатализаторов иммобилизованных клеток.

Т.к. можно избежать:

1) дорогостоящие стадии выделения и очистки ферментов

2) необходимости их последующей стабилизации

# Термозимы

Стабильны в условиях высокой температуры, высоких концентраций солей и экстремальных значений pH.

Гипертермофильные микроорганизмы, встречающиеся среди *Archaea* и *Bacteria*, живут при температурах 80–100 °C.

Механизмы ответственны за термоустойчивость ферментов у термозимов:

Между мезофильными и термофильными версиями ферментов - высокая степень гомологии последовательности и структуры.

Так, последовательности термостабильных дегидрогеназ из *Pyrococcus* и *Thermotoga* на 35 и 55% соответственно идентичны последовательности мезофильной дегидрогеназы из *Clostridium*.

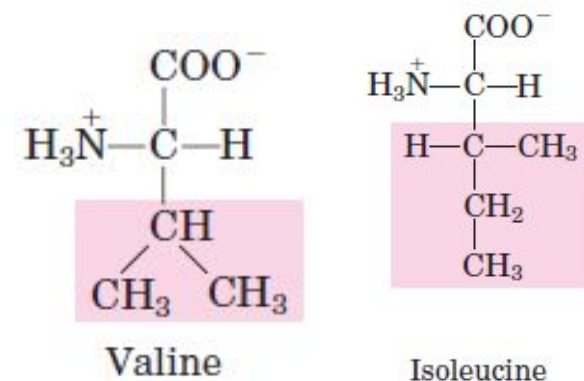
Было обнаружено, что дегидрогеназа из *Pyrococcus furiosus* ( $T_m = 105\text{ }^\circ\text{C}$ ) содержит 35 изолейцинов, в то время как дегидрогеназы из *Thermotoga maritima* ( $T_m = 95\text{ }^\circ\text{C}$ ) и *Clostridium symbiosum* ( $T_m = 55\text{ }^\circ\text{C}$ ) только 21 и 20 изолейцинов соответственно.

Термостабильные ферменты содержат меньше глицина: *Cs* дегидрогеназа содержит 48 остатков глицина, а дегидрогеназы из *Tm* и *Pf* только 39 и 34 глицина соответственно.

***Больше изолейцина и меньше глицина.***

# Взросшая термостабильность коррелирует:

с увеличением жесткости белковой структуры за счет уменьшения содержания остатков глицина,  
с улучшением гидрофобных контактов в ядре дегидрогеназы из Pf в результате замены валина изолейцином. (В результате сайт-направленного мутагенеза приводящего к замене изолейцина на валин термостабильность мутантов уменьшалась).





## Механизмы стабилизации:

- минимизация доступной площади гидрофобной поверхности белка;
- оптимизация упаковки атомов белковой молекулы (минимизация отношения поверхность/объем);
- оптимизация распределения зарядов (достигается благодаря устранению отталкивающих взаимодействий, а также в результате организации взаимодействий между зарядами в своеобразную сеть)
- Уменьшение количества впадин

# Применение ферментов из экстремофилов

Современные технологии молекулярной биологии и генной инженерии позволяют:

1) получать достаточные количества ферментов из экстремофилов для их последующего анализа и практического применения.

2) клонирование и экспрессия этих ферментов в мезофильных организмах.

## Применение ферментов из экстремофилов:

Крахмал используется для производства сахаров. Сначала процесс ведется при (95–105 °С) и при значениях рН 6–6,5.

На следующем этапе температура снижается до 60°С и рН=4,5.

Использование термостабильных ферментов ( $\alpha$ -амилазы, глюкоамилазы, ксилоизомеразы), выделенных из гипертермофилов, позволит:

) проводить процесс в одну стадию и при одних и тех же условиях

) отказаться от дорогостоящих ионообменников

## Применение ферментов из экстремофилов:

Наиболее термостабильные  $\alpha$ -амилазы были обнаружены у *archaea Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus*, *Desulfurococcus mucosus*, *Pyrodictium abyssi* и *Staphylothermus marinus*. Гены амилазы из *Pyrococcus sp.* были клонированы и экспрессированы в *E.coli* и *Bacillus subtilis*.

# Применение ферментов из экстремофилов:

## Протеолитические ферменты

Сериновые щелочные протеиназы широко используются в качестве добавок к моющим средствам.

Протеиназы из экстремофилов сохраняют нативность при высоких температурах, в присутствии высоких концентраций детергентов и других денатурирующих агентов. *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Staphylothermus*, *Desulfurococcus* и *Sulfolobus*. Максимальную активность эти ферменты проявляют при температурах

# Применение ферментов из экстремофилов:

## ДНК-полимеразы

Термостабильные ДНК-полимеразы используются в ПЦР и играют важную роль в генной инженерии. Термостабильные полимеразы были обнаружены у гипертермофилов *Pyrococcus furiosus* и *Pyrococcus litoralis*, а также у термофилов *Thermus aquaticus*.

**• Благодарю за внимание!**