

Инженерная энзимология



- **Инженерная энзимология** – это перспективное научно-техническое направление биотехнологии, в котором удачно сочетаются самые современные достижения биохимии, молекулярной биологии, энзимологии и химической технологии.
- **Инженерная энзимология** – отрасль науки (биотехнологии), разрабатывающая методы создания высокоэффективных ферментов для промышленного использования.
- **Инженерная энзимология** – ваше определение=)

Формы ферментов в биотехнологиях



ФЕРМЕНТЫ

**Изолированные
ферменты**

**Внутриклеточные
ферменты**

Свободные

Иммобилизованные

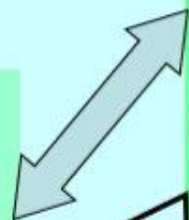
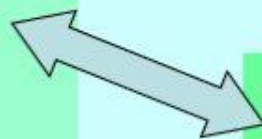
• **Биогеотехнология** – использование микроорганизмов для добычи полезных ископаемых, получение редкоземельных металлов, удаление метана в шахтах и т.п.

• **Инженерная энзимология** – использование каталитических функций ферментов в изолированном состоянии или в составе клеток для получения разнообразных продуктов.

• **Медицинская биотехнология** – создание средств или/и веществ медицинского назначения, препаратов крови, трансплантантов и биопротезов.

• **Биотехнология лекарственных средств** – из более 1000 наименований лекарственных средств, минимум треть производится или может быть произведено биотехнологически.

• **Иммунобиотехнология** – производство вакцин, иммуноглобулинов крови, иммуномодуляторов, моноклональных антител и т.п.



Источники ферментов



микроорганизмы

Бациллы – биосинтезаторы рибонуклеаз, дезоксирибонуклеаз и протеаз, а дрожжи – глюкоамилаз, инвертаз и кислой фос-фатазы

растения

Амилазы выделяют из ячменя, кислую фосфатазу из картофеля, пероксидазу из хрена

животные

*Из сердца КРС выделяют лактатдегидрогеназу, из желудка – щелочную фосфатазу.
Желудок свиней используют для получения пепсина*

Инженерная энзимология

- **Задачи инженерной энзимологии**
 1. Развитие прогрессивных методов выделения ферментов
 2. Стабилизация выделенных ферментов
 3. Иммобилизация ферментов
 4. Конструирование катализаторов с нужными свойствами
-

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: фермент 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:

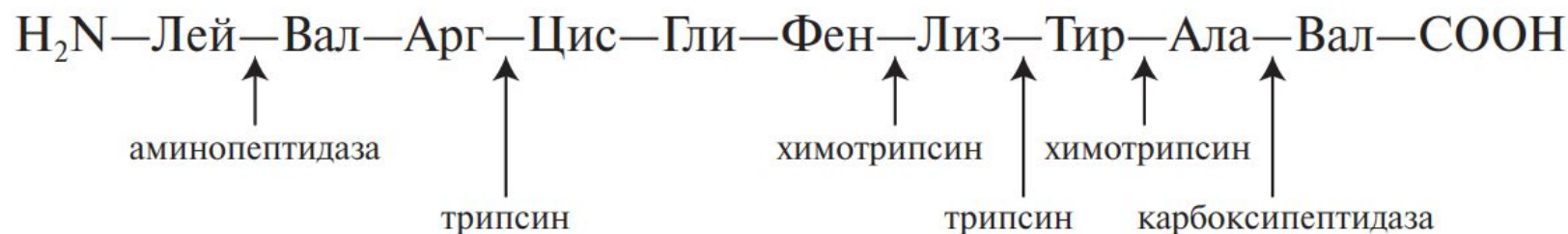
При низких концентрациях солей ($<0,1\text{M}$) катионы Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} и др. могут специфично взаимодействовать с металлопротеинами.

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

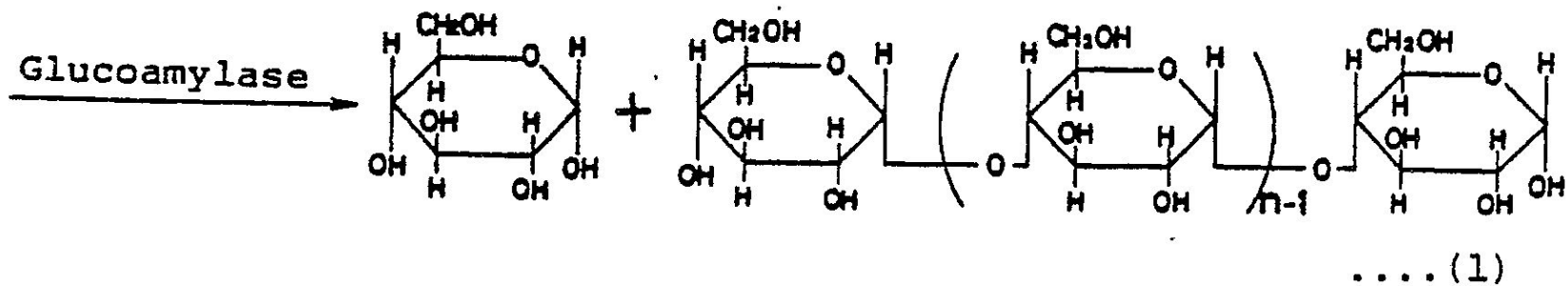
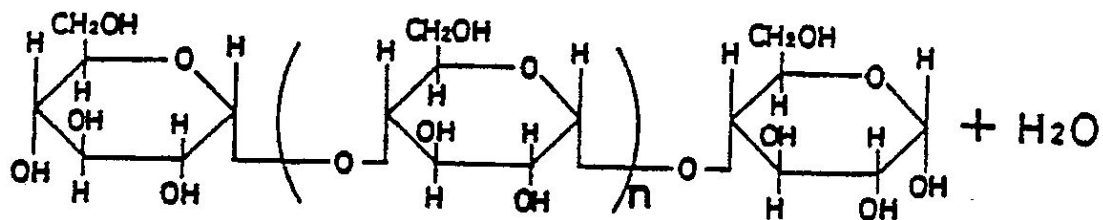
Пример: у α -Амилазы (из *Bacillus caldolyticus*)

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)
α -Амилаза	Добавление 50–70 % сорбита	Повышение термической устойчивости и устойчивости при хранении
Химотрипсин	Добавление 50–90 % глицерина	Повышение устойчивости к протеолизу
β -Галактозидаза	Добавление 5–10 % этанола или изопропанола	Повышение термической устойчивости; метанол или <i>n</i> -пропанол в тех же концентрациях дестабилизируют фермент



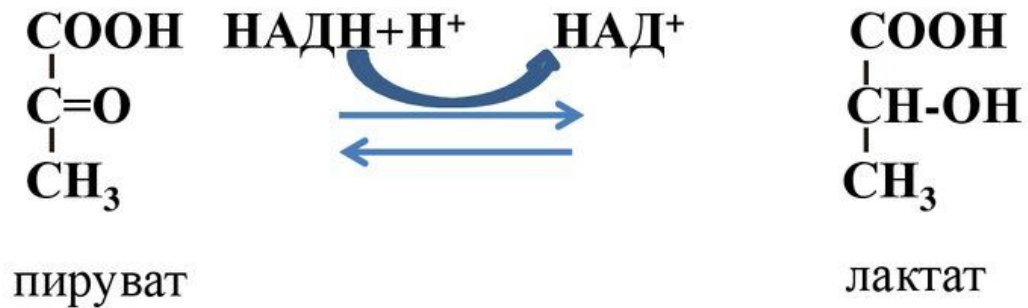
Глюкоамилаза



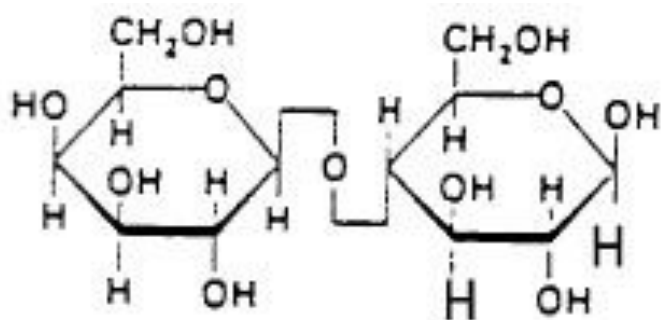
Лактатдегидрогеназа

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)

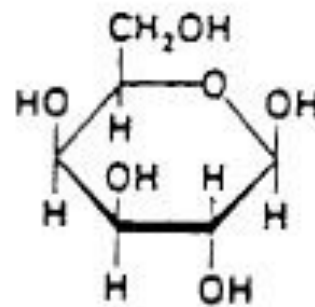
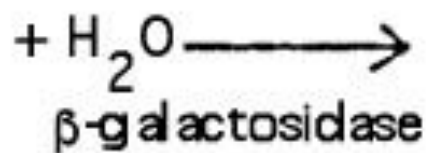
КФ 1.1.1.27



β-галактозидаза

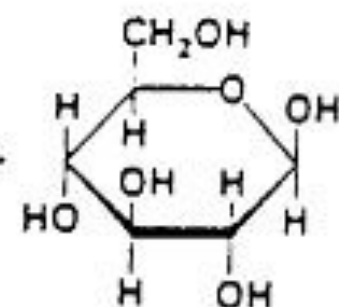


Lactose



Galactose

+

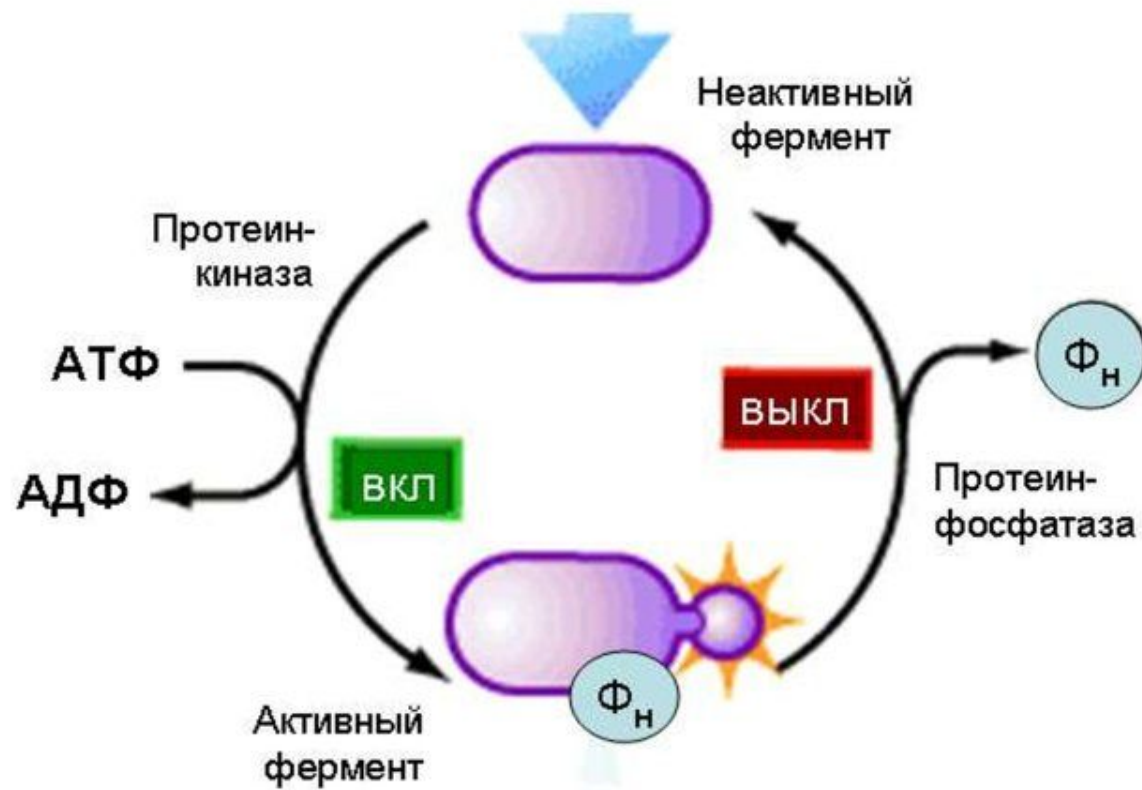


Glucose

Химическая модификация фермента

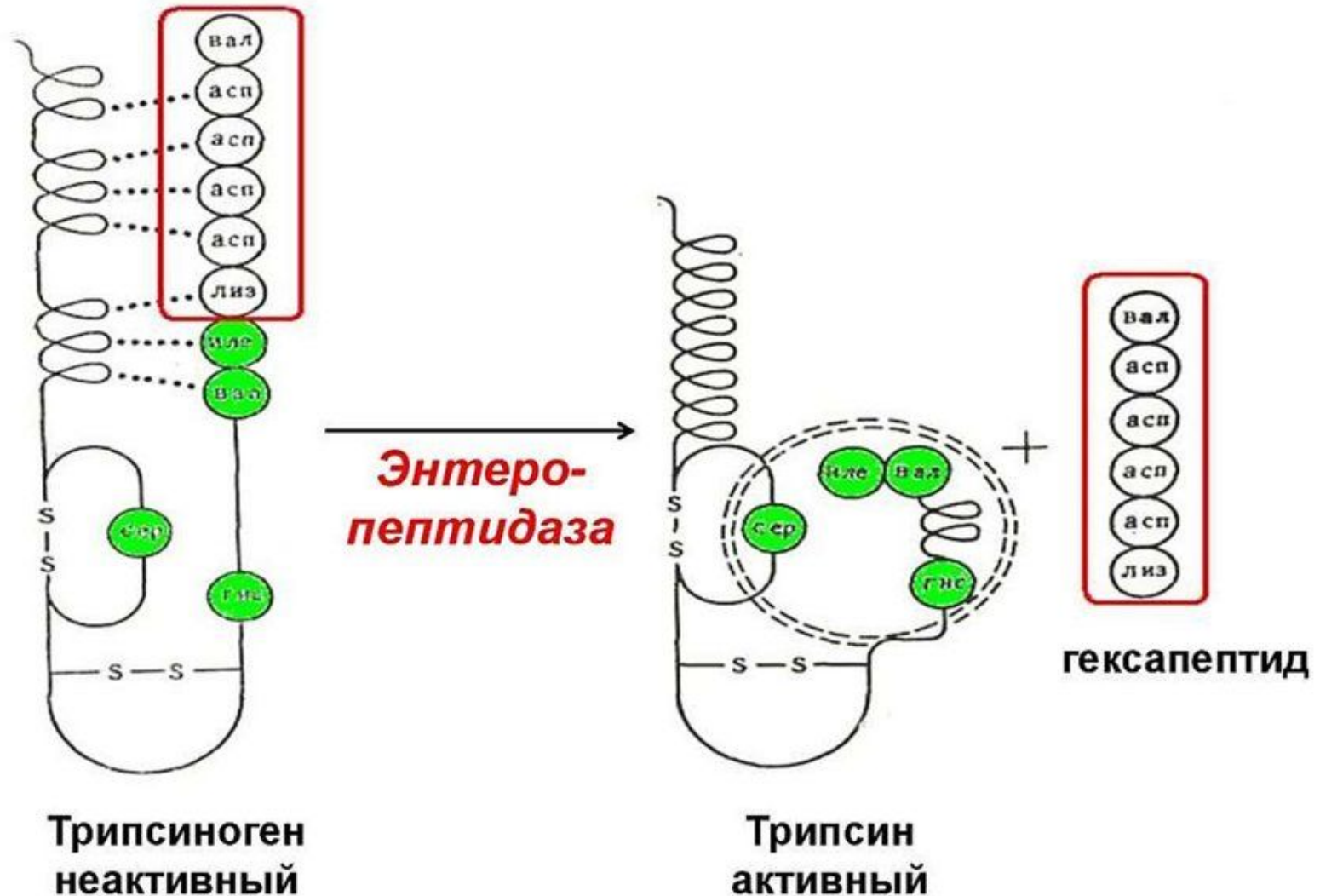
1. Фермент принимает более стабильную конформацию.
2. Введение в белок новых функциональных групп приводит к образованию дополнительных стабилизирующих водородных связей или иных слабых взаимодействий.
3. При использовании неполярных соединений усиливаются гидрофобные взаимодействия.
4. Модификация гидрофобных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

Химическая модификация ферментов. Фосфорилирование.

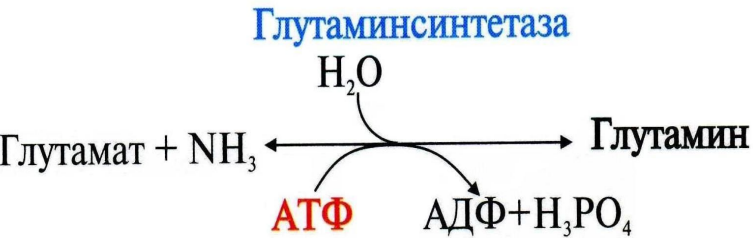


ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ

Частичный протеолиз

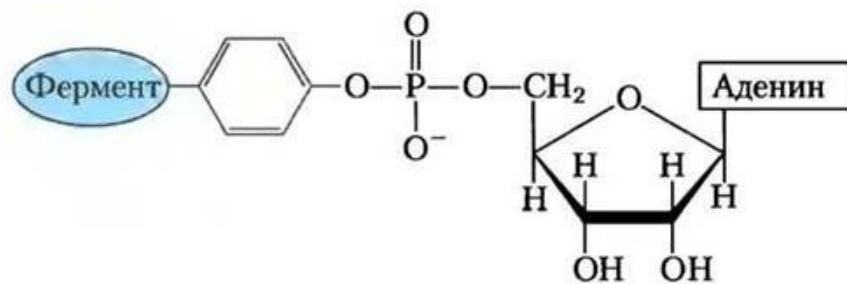
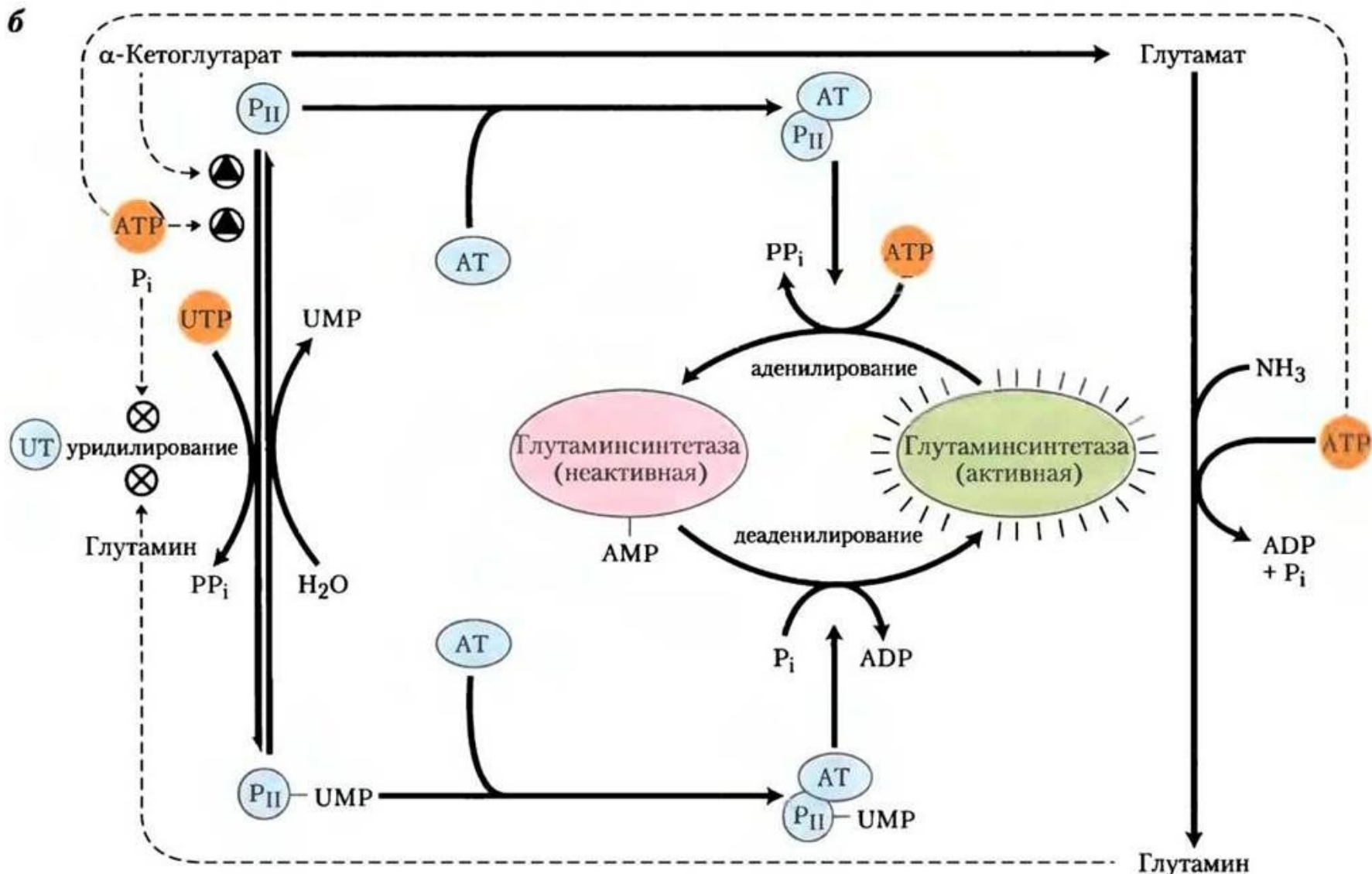


ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛ



У бактерий обнаружены две системы ковалентной модификации ферментов:

1. Присоединение/отщепление остатка адениловой кислоты (аденилирование/деаденилирование) приводит к изменению активности глутаминсинтетазы *Escherichia coli*.
2. Присоединение/отщепление остатка уксусной кислоты (ацетилирование/деацетилирование) приводит к изменению активности цитратлиазы у фотосинтетической бактерии *Rhodospseudomonas gelatinosa*.

a**б**

Иммобилизованные ферменты

— препараты ферментов, молекулы которых связаны с матрицей, или носителем (например, целлюлозой), сохраняя при этом свои каталитические свойства.

Преимущества иммобилизованных ферментов:

- более высокая стабильность ферментных препаратов,
- возможность их удаления из реакционной среды и его повторного использования,
- длительность хранения,
- возможность создания непрерывных процессов на ферментных колонках,
- получение продукта реакции, не загрязнённого ферментом



Преимущества иммобилизованных ферментов

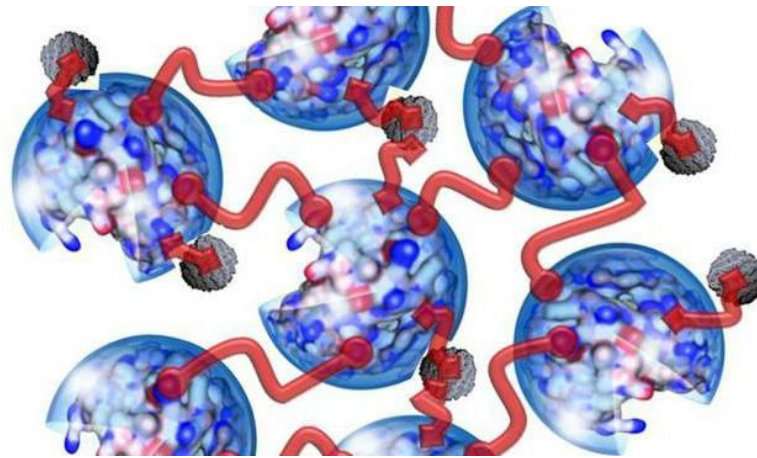
- **ТЕХНОЛОГИЧНОСТЬ**
- **ПРОСТОТА МАНИПУЛЯЦИЙ**
- **ПОВЫШЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ** (ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ ПРИ ХРАНЕНИИ)

Недостатки иммобилизованных ферментов

- **ПОНИЖЕННАЯ КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**
- **ИЗМЕНЕННАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧЕОСТЬ**
- **ДИФФУЗИОННЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ**

Иммобилизация фермента позволяет:

- Повысить устойчивость фермента (нагреванию, автолизу, действию агрессивных сред и т. д)
- .Многokrратно 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 иммобилизации ферментов

Физические

Химические

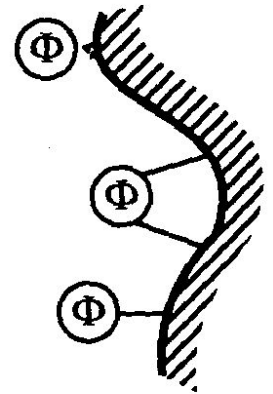
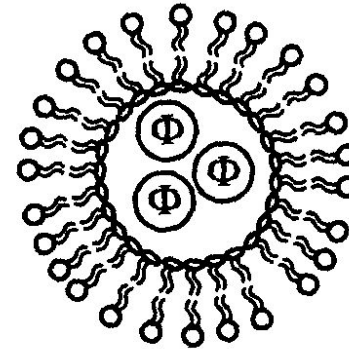
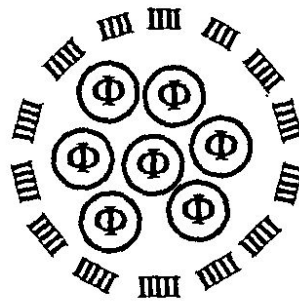
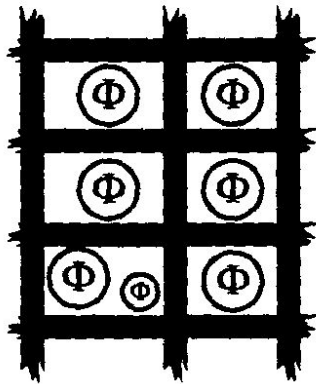
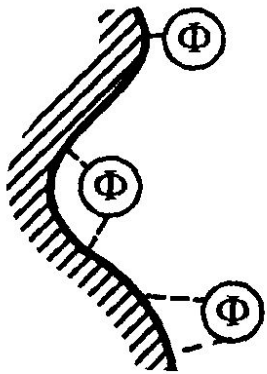
Адсорбция

Включение
в гель

Инкапсули-
рование

Включение
в липосомы

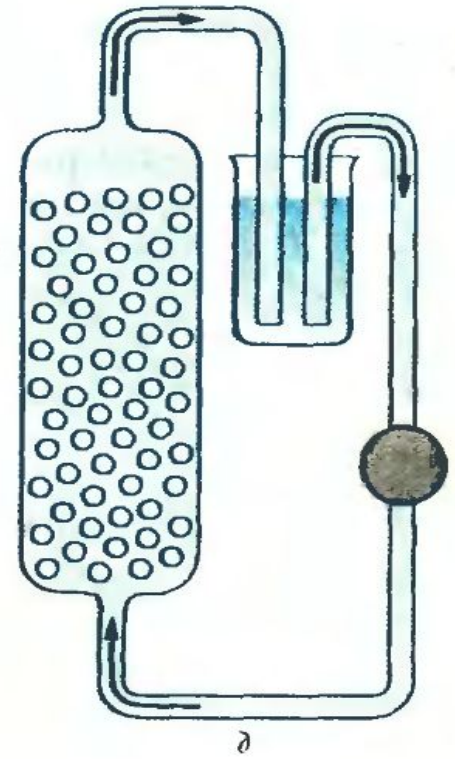
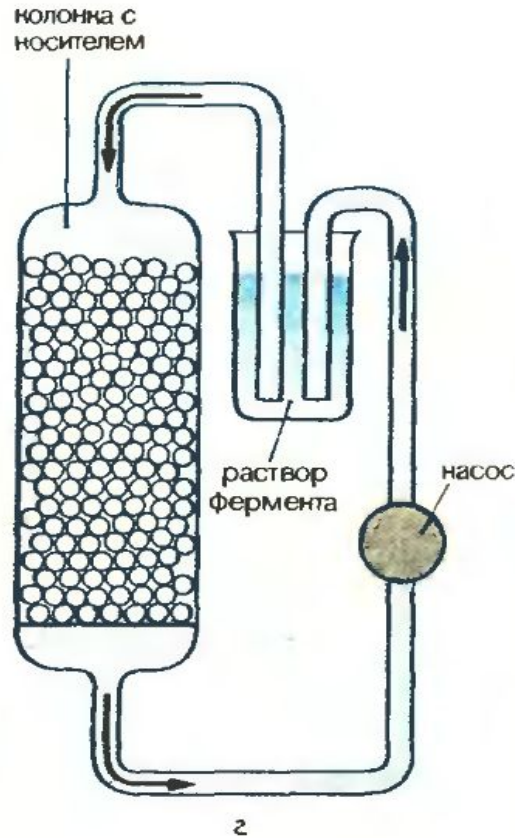
Ковалентное
связывание



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:

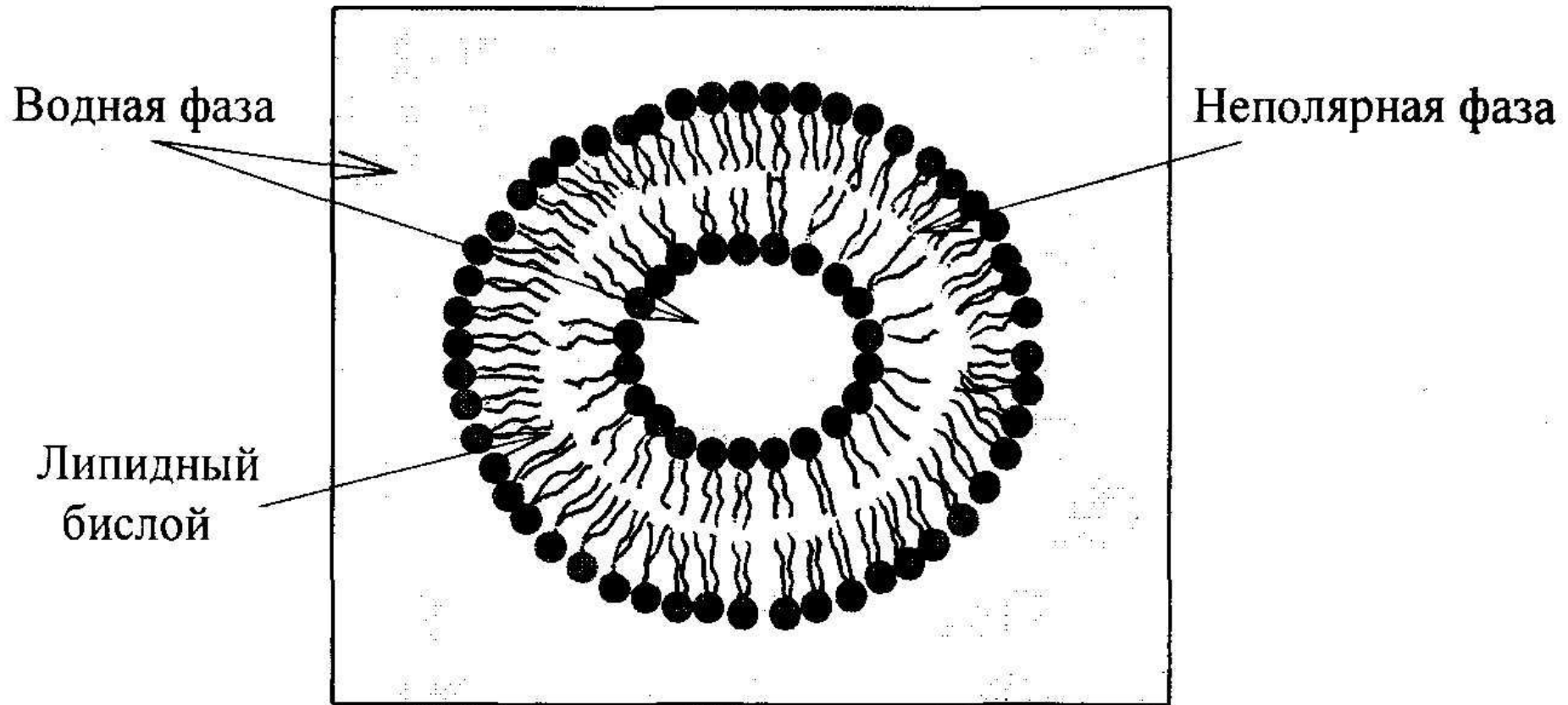
-) Относительная простота методики*
-) Доступность носителей*

Недостатки:

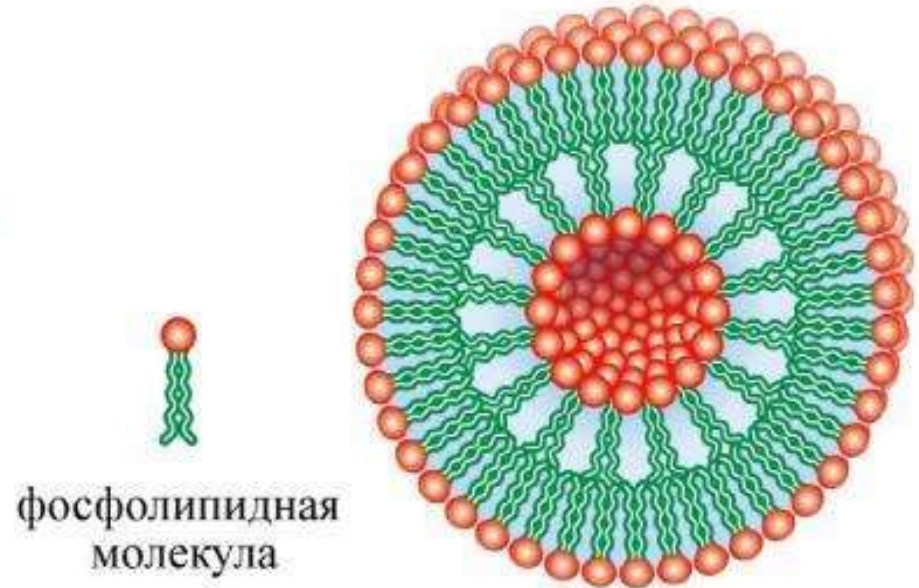
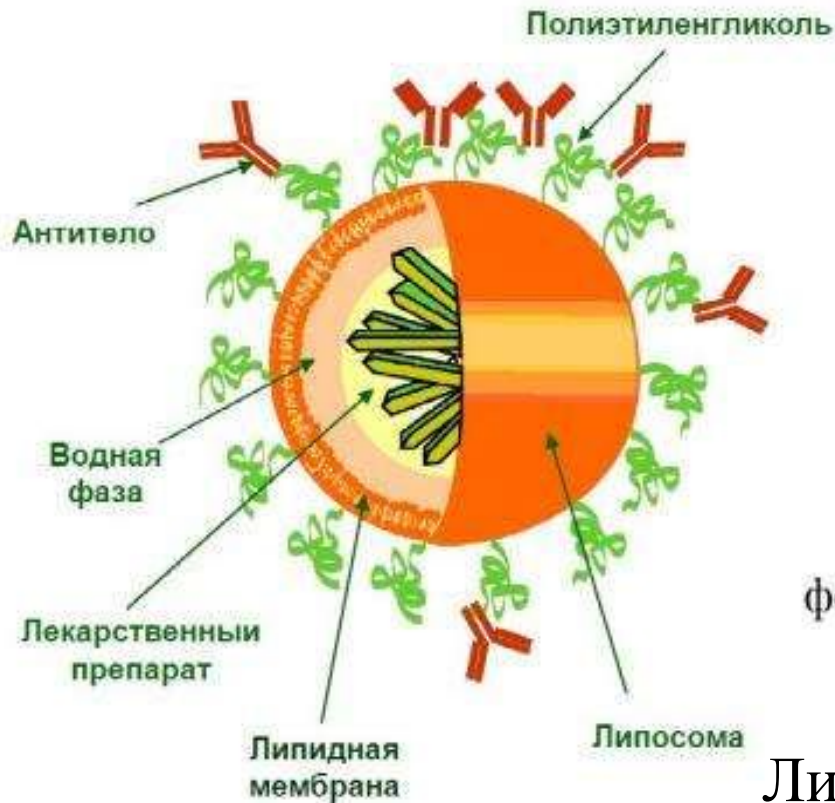
-) Недостаточная прочность связывания*
-) Многие носители биodeградируемы*

Методы физической иммобилизации:

2) включение фермента в полупроницаемую капсулу, в полупроницаемую мембрану



Липосомы



Липосомы — сферические везикулы (пузырьки), имеющие один или несколько липидных бислоёв. Образуются в смесях фосфолипидов с водой.

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:

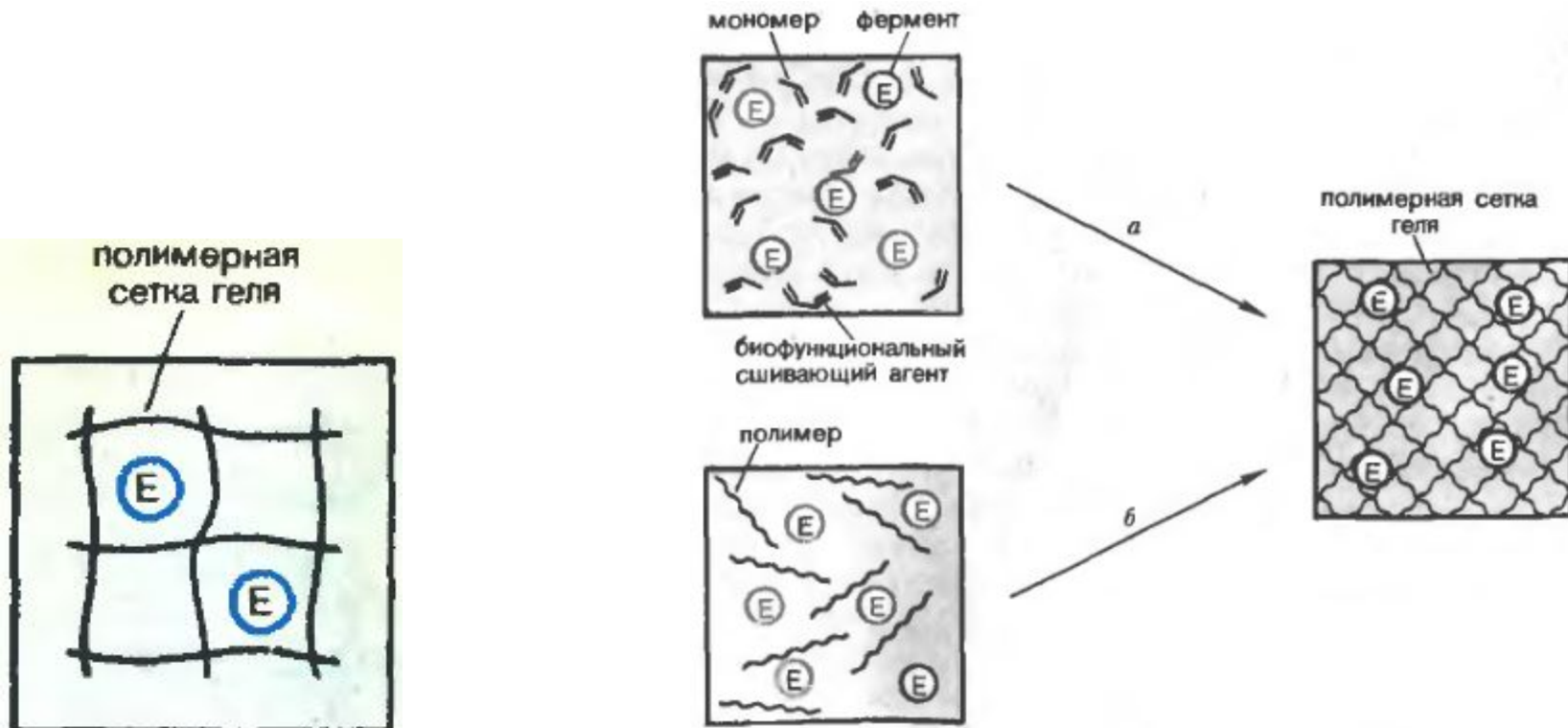
) Биodeградируемы

) Не применим для высокомолекулярных субстратов

Методы физической иммобилизации:

3) механическое включение фермента в гелевые структуры

Фермент включается в трехмерную сетку полимерных цепей, образующих гель.



Иммобилизация путем включения в гель

. Способ иммобилизации вещества путем включения в трехмерную структуру полимерного геля широко распространен благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных веществ, но и даже интактных клеток. Иммобилизацию веществ в геле осуществляют двумя способами. В первом случае вещества вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами. Во втором случае вещество вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние. Для первого варианта используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, силикагеля, для второго - гели крахмала, агар-агара, каррагинана, агарозы, фосфата кальция.

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение энзима в объеме носителя. Большинство гелевых матриц обладает высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивает возможность многократного использования вещества, включенного в его структуру. Однако метод непригоден для иммобилизации ферментов, действующих на водонерастворимые субстраты.

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:

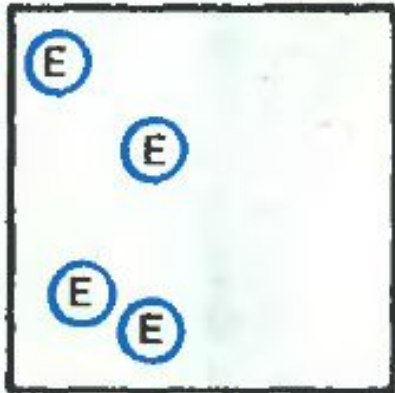
1) Не применим для высокомолекулярных субстратов

Методы физической иммобилизации:

4) Включение в двухфазную систему

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

Позволяет работать в высокомолекулярными субстратами.



При **иммобилизации ферментов с использование 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.

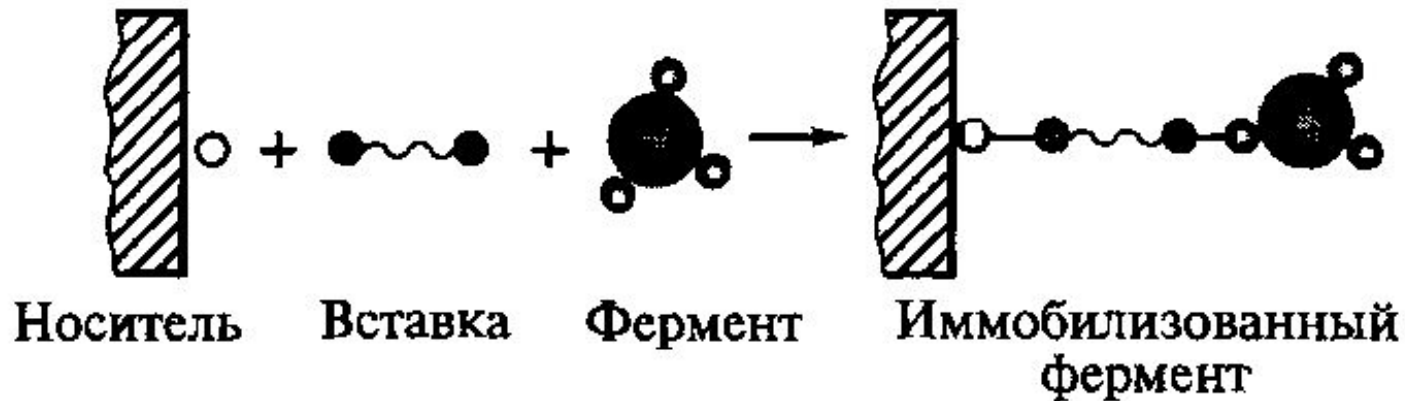
Одним из **важнейших преимуществ** систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

Методы химической иммобилизации:

Образовании ковалентных связей между ферментом и носителем.

Преимущества:

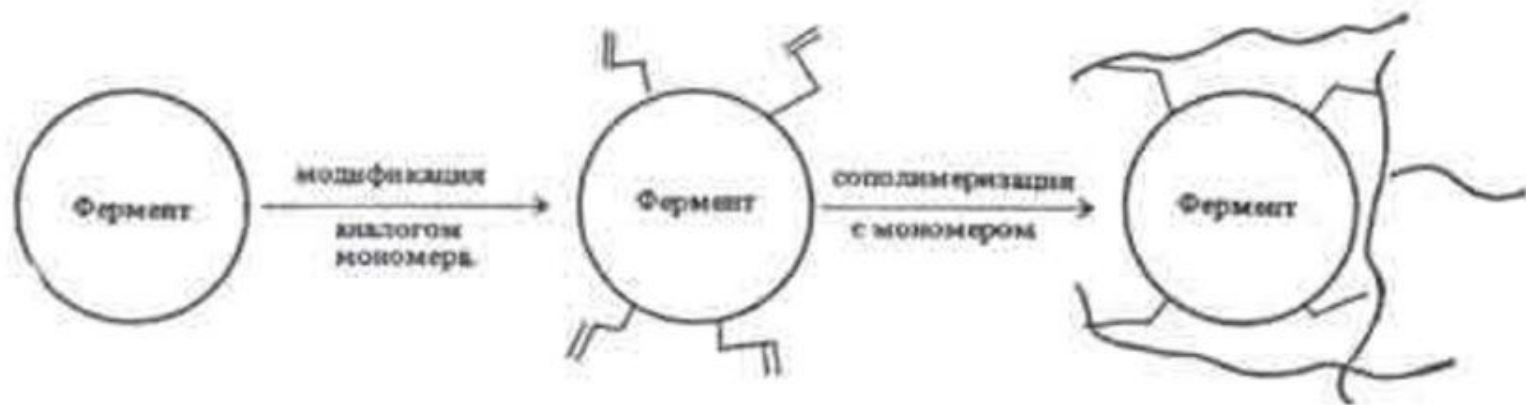
- 1) Высокая прочность конъюгата
- 2) Можно повышать стабильность фермента



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.

Химические методы иммобилизации ферментов



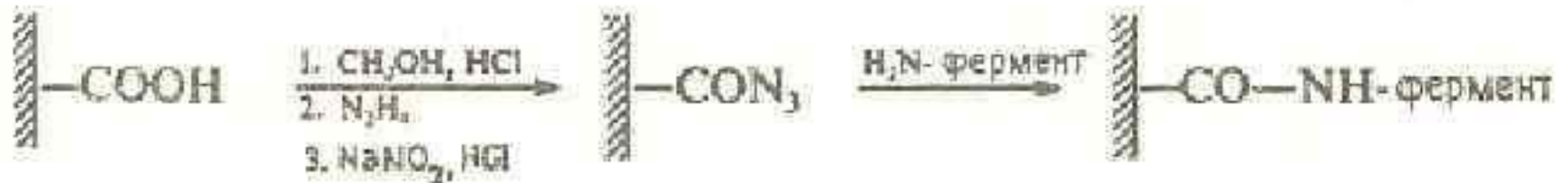
Принципиально важно, чтобы в иммобилизации фермента участвовали функциональные группы, не существенные для его каталитической функции



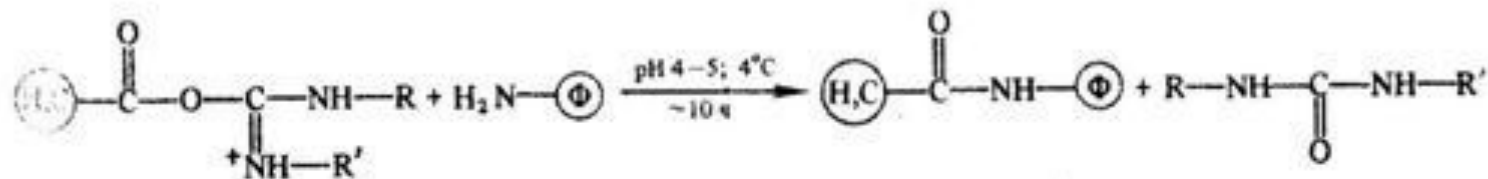
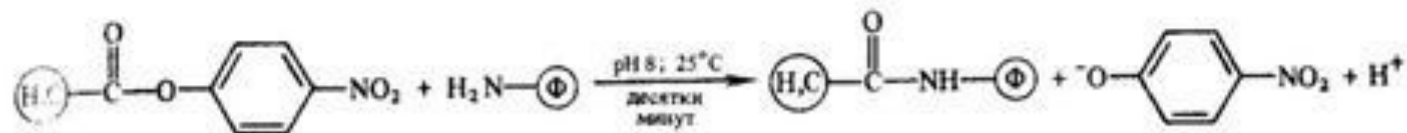
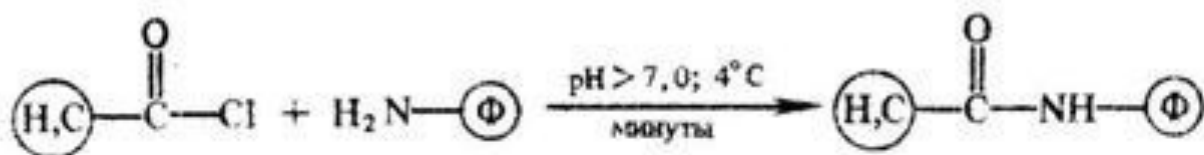
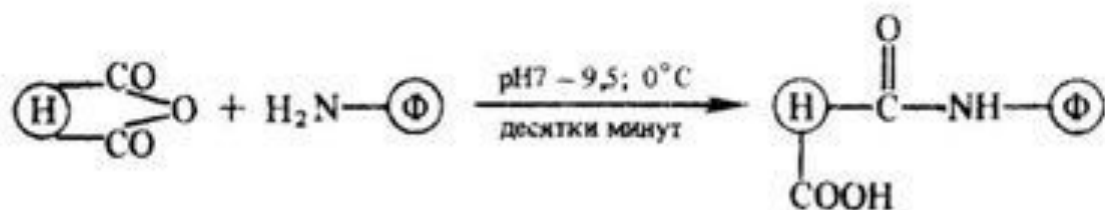
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов

- реакции образования амидной связи
- реакции образования карбамидной связи
- реакции образования оснований Шиффа и вторичных аминов
- реакции азосочетания
- реакции тиол-дисульфидного обмена

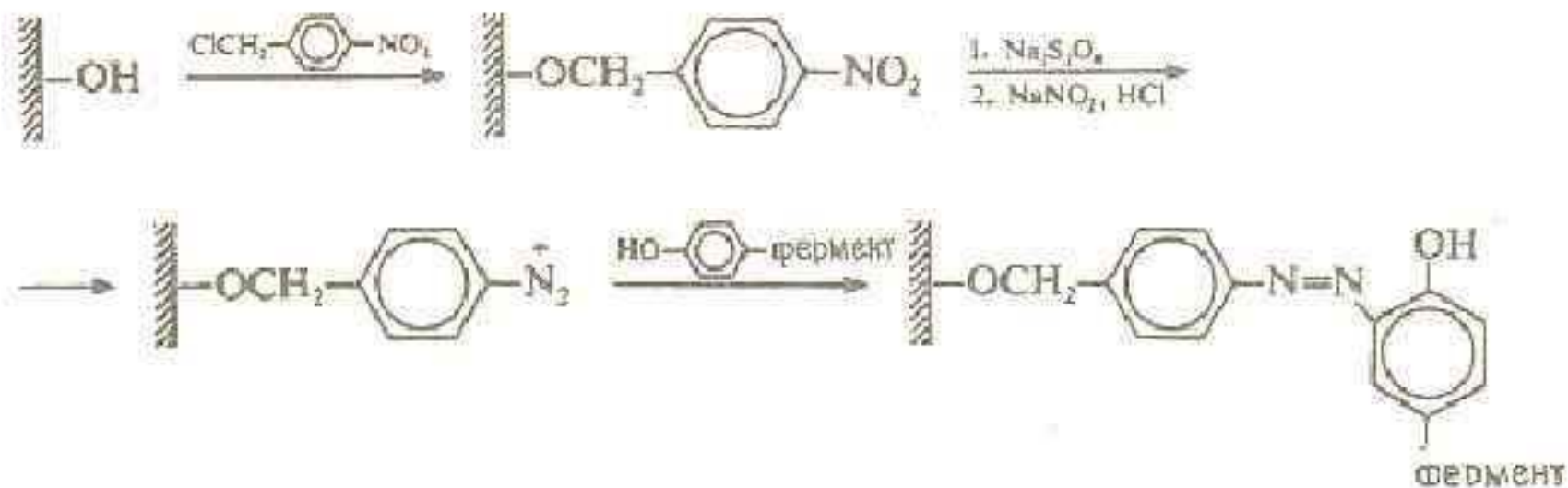
Иммобилизация с помощью амидной связи



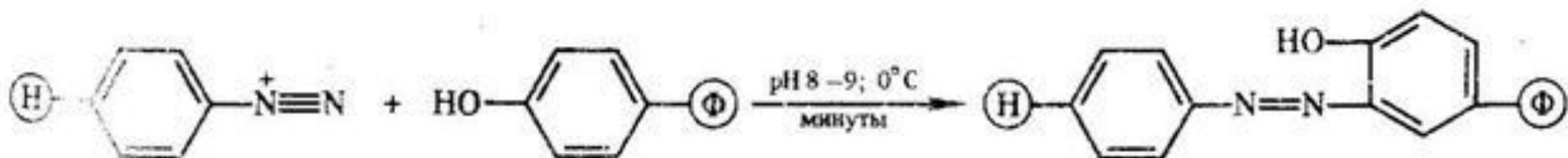
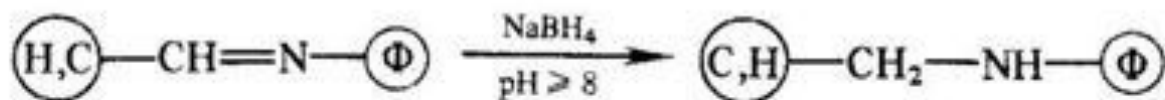
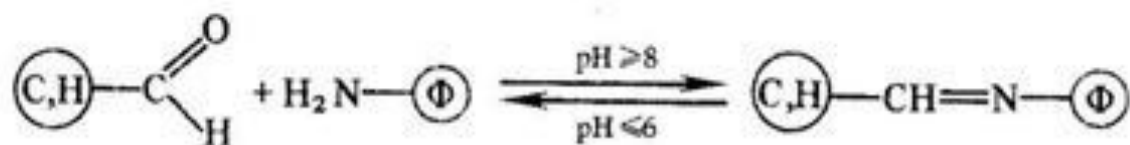
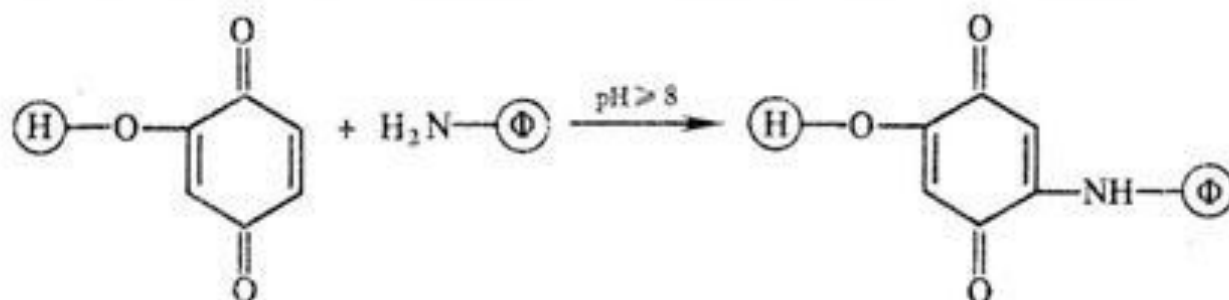
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



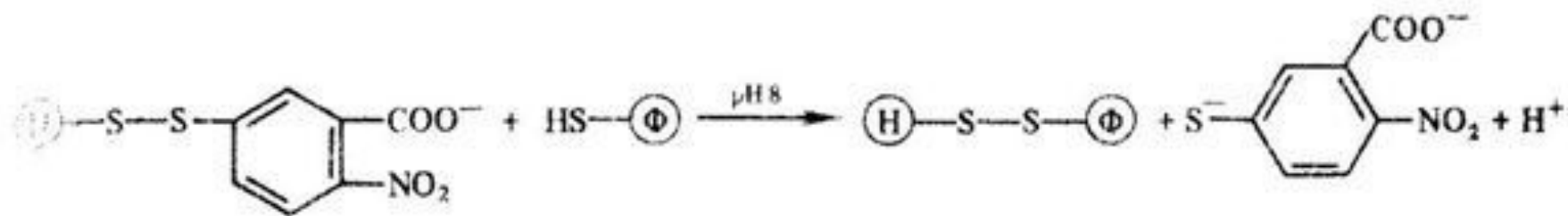
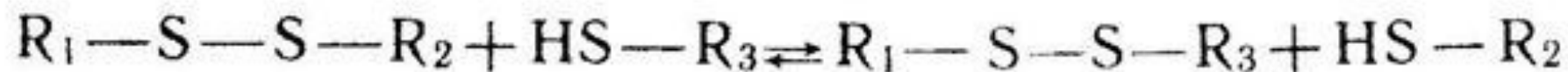
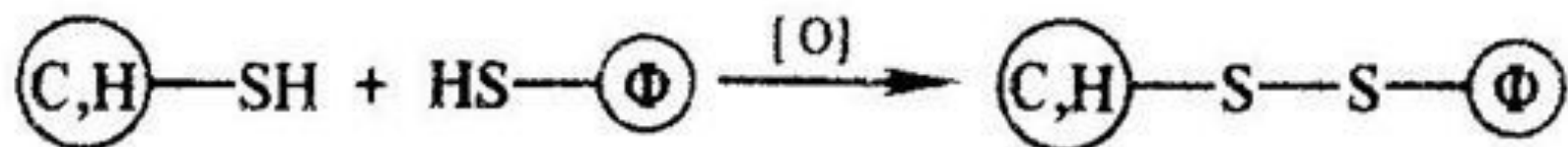
Иммобилизация через диазосоединения



Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



Примеры применения иммобилизации ферментов

- тампоны и бинты с иммобилизованными на них протеазами для ускорения заживления ран и ожогов и предотвращения гнойных осложнений,
- плёнки из ацетата целлюлозы, в которые вводят трипсин, накладываются на поверхность гнойной раны,
- для удаления из крови мочевины может быть использована колонна с включённой в волокна ацетата целлюлозы микрокапсулированной уреазой.

Весьма перспективным является использование в качестве биокатализаторов иммобилизованных клеток.

Т.к. можно избежать:

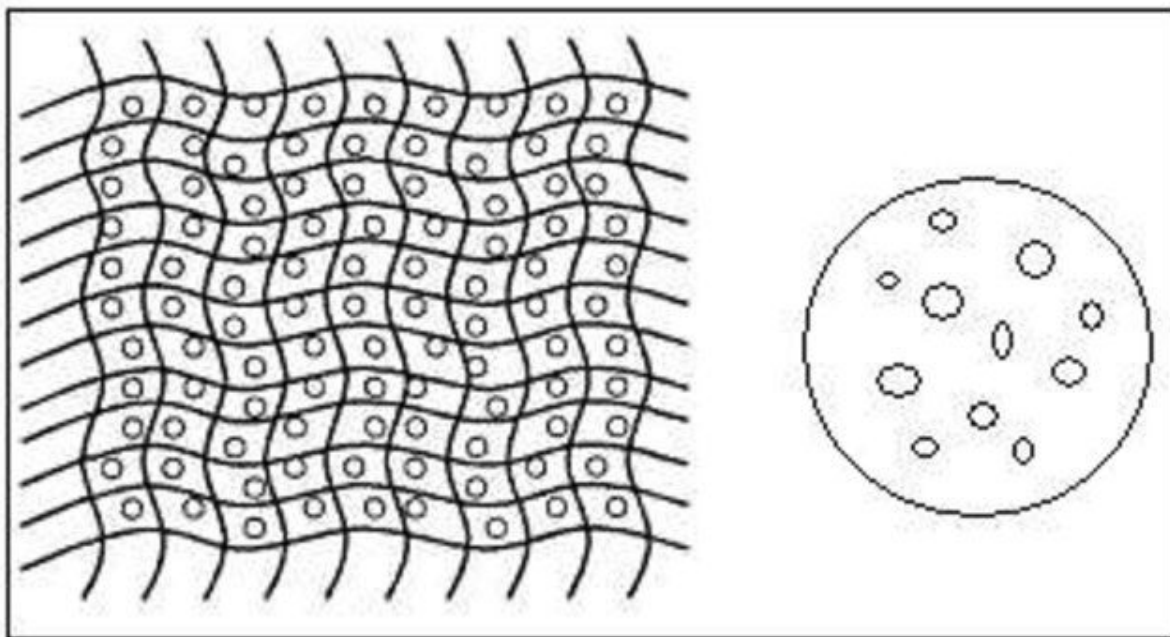
1) дорогостоящие стадии выделения и очистки ферментов

2) необходимости их последующей стабилизации

Иммобилизация клеток

- Преимущество – нет необходимости выделения и очистки ферментных препаратов, создается возможность получения полиферментных систем, осуществляющих многостадийные непрерывно действующие процессы.
 - Иммобилизованные клетки микроорганизмов применяют для биотрансформации органических соединений, разделения рацемических смесей, инверсии сахарозы и синтезе стероидов.
-

Иммобилизация клеток



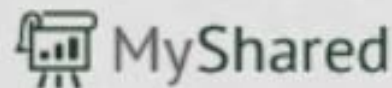
1. Процесс обходится значительно дешевле;
2. Ферменты в клетках намного стабильнее, чем в выделенном состоянии.

К недостаткам применения клеток относится очень низкая проницаемость клеточных оболочек для субстратов.

ПРОМЫШЛЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

- В настоящее время в мире разработаны следующие крупномасштабные производства с использованием иммобилизованных ферментов и клеток:
- 1. Получение глюкозофруктозных сиропов.
- 2. Получение оптически активных L-аминокислот из их рацемических смесей.
- 3. Синтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония.
- 4. Синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты.
- 5. Синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты.
- 6. Получение безлактозного молока.
- 7. Получение **Сахаров** из молочной сыворотки.
- 8. Получение 6-аминопенициллановой кислоты.

<https://zen.yandex.ru/video/watch/602c8a1e2ca49f59481a6792> - химозин, пр-во сыра



ТЕРМОФИЛЫ



Гидротермальные
источники



Серный вулкан Даллол
(Эфиопия)



Staphylothermus marinus

Имеет энзим STABLE, позволяющий выживать при 135 °С
(гидротермальные источники, серные вулканы, вода с t 98 °С)

- **Термофильные и гипертермофильные микроорганизмы** продуцируют ферменты, которые называются **термозимы** (Zeikus et al 1998).
- Они имеют ряд биотехнологических преимуществ перед мезофильными аналогами.
 1. Работа с более высокими концентрациями субстрата из-за снижения вязкости раствора и увеличения коэффициентов диффузии.
 2. Снижение риска побочных процессов.
 3. Устойчивость к денатурирующим агентам, например, растворителям.
 4. Простота очистки термозимов методом термообработки.

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*.

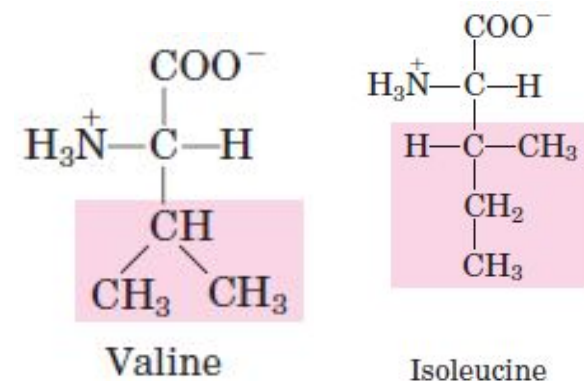
Было обнаружено, что дегидрогеназа из *Pyrococcus furiosus* ($T_m = 105\text{ }^\circ\text{C}$) содержит 35 изолейцинов, в то время как дегидрогеназы из *Thermotoga maritima* ($T_m = 95\text{ }^\circ\text{C}$) и *Clostridium symbiosum* ($T_m = 55\text{ }^\circ\text{C}$) только 21 и 20 изолейцинов соответственно.

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 мутагеза приводящего к замене изолейцина на валин термостабильность мутантов уменьшалась).



Стабилизация третичной структуры белка



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 (α -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 α -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*.

ФЕРМЕНТЕР

- Ферментер - это специальный резервуар, внутри которого создаются идеальные условия для культивирования полезных микроорганизмов в питательной среде.
- Через среду пропускают насыщенный кислородом воздух, и в ходе перемешивания масса становится однородной.
- Типовые ферментеры представляют собой вертикальные ёмкости различной вместимости (малые от 1 до 10 л, многотоннажные более 1000 л)
- <https://www.youtube.com/watch?v=epWDByKHGEU>

БИОРЕАКТОР-ФЕРМЕНТЕР – основная производственная установка в биотехнологии, работает по принципу ультрастата.



Емкость ферментера может составлять от нескольких десятков литров для экспериментальных установок до десятков тонн для промышленного производства

