

ЛЕКЦИЯ № 5

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ КЛЕТКИ И ФЕРМЕНТЫ В БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОМ ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИБИОТИКОВ

Для студентов, обучающихся по направлению подготовки «Биология»
(профиль «Биохимия») при изучении дисциплины «Биотехнология в производстве антибиотиков»

ПЛАН ЛЕКЦИИ

- 1. Понятие об инженерной энзимологии**
- 2. Иммобилизованные ферменты. Методы иммобилизации ферментов**
 - 2.1. Носители для иммобилизации ферментов**
 - 2.2. Методы иммобилизации ферментов**
- 3. Сферы применения иммобилизованных ферментов**
 - 3.1. Получение антибиотиков с применением иммобилизованных ферментов**

Понятие об инженерной

ЭНЗИМОЛОГИИ

- Принципиально новые возможности прикладной энзимологии открылись с разработкой принципов создания иммобилизованных ферментов.
- Иммобилизованные ферментные препараты обладают рядом преимуществ, в сравнении с чистыми препаратами ферментов, при их использовании в промышленных производствах. В частности, гетерогенный (иммобилизованный) биокатализатор можно легко отделить от реакционной среды, что обуславливает:
 - возможность остановки реакции в любой момент процесса;
 - возможность повторного использования биокатализатора;
 - возможность получения целевого продукта, не загрязненного ферментом.

Иммобилизованные ферменты. Методы иммобилизации ферментов

- Начало развития метода иммобилизации ферментов относится 1916 г. В это время Дж. Нельсон и Е. Гриффин осуществили адсорбцию инвертазы на угле и доказали, что в таком виде она сохраняет свою каталитическую активность.
- Иммобилизация – это любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве.
- Иммобилизация ферментов – это их перевод в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Химические методы иммобилизации ферментов

- При использовании химических методов иммобилизации между ферментом и носителем образуются ковалентные связи. При этом различают:
 1. Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические), так и неорганические носители. Причем к первым относятся: целлюлоза, хитин, агароза, декстраны, бумага, ткани, полистирол, нейлон, ионообменные смолы и др., ко вторым – модифицированное пористое стекло, силикагели, силохромы, керамика, металлы и др.
 2. Ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункциональных реагентов.
- Свойства ковалентно-связанных ферментов, их стабильность при изменении значения pH среды, температуры, концентрации субстрата и других условий могут отличаться от свойств нативных ферментов. Причиной таких изменений могут быть природа носителя, способ иммобилизации, место связывания белка и стерическая ориентация фермента на носителе.

Физические методы иммобилизации ферментов

- 1) инкапсулирование фермента в структуру геля или полимера;
- 2) адсорбция фермента на водонерастворимых носителях;
- 3) микрокапсулирование (инкапсулирование раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5–300 мкм);
- 4) использование двухфазных систем.

Свойства иммобилизированных ферментов

- 1. гетерогенный биокатализатор можно легко отделить от реакционной среды, что позволяет:
 - а) остановить в нужный момент реакцию;
 - б) использовать биокатализатор повторно;
 - в) получать конечный продукт, не загрязненный ферментом;
- 2. использование гетерогенных биокатализаторов позволяет осуществлять ферментативный процесс непрерывно (в проточных колоннах), регулировать скорость катализируемой реакции, а также выход целевого продукта путем изменения скорости потока;

Свойства иммобилизированных ферментов

- 3. иммобилизация или модификация фермента способствует целенаправленному изменению свойств биокатализатора, в том числе его специфичности (особенно в отношении к высокомолекулярным субстратам), зависимости каталитической активности от значения pH, ионного состава и других параметров сред, а также его стабильности по отношению к различного рода денатурирующим воздействиям;
- 4. иммобилизация ферментов позволяет регулировать их каталитическую активность путем изменения свойств носителя под действием некоторых физических факторов (свет, звук).

Носители для иммобилизации ферментов

- *Требования, предъявляемые к носителям для иммобилизации ферментов:*
- 1. высокая биологическая и химическая стабильность, т.е. носители не должны изменять своих свойств при воздействии субстратов и продуктов ферментативной реакции, среды реакции и самих ферментов;
- 2. высокая механическая прочность, особенно, по отношению к истиранию;
- 3. высокая проницаемость для ферментов и субстратов, большая удельная поверхность, высокая емкость, пористость;
- 4. возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран, трубок и т.п.);
- 5. легкость переведение в реакционно-способную форму (активация);
- 6. высокая гидрофильность, обеспечивающая возможность проведения реакции связывания фермента с носителем в водной среде;
- 7. невысокая стоимость.

Природные полимерные носители

- полисахариды (целлюлоза и ее производные, хитин и хитозан, крахмал и декстраны, агар и агароза и др.),
- белки (чаще всего в качестве таких носителей применяют структурные белки – кератин, фиброин, коллаген, двигательные белки (миозин), а также транспортные белки (сывороточный альбумин));
- некоторые липиды.
- К недостаткам природных полимеров относится их нестабильность к воздействию микроорганизмов и высокая стоимость.
- Часто для иммобилизации ферментов применяют такие полисахариды, как целлюлоза, декстран, агароза и их производные.

Целлюлоза

- Целлюлоза – гидрофильна, содержит большое количество гидроксильных групп, что позволяет ее модифицировать, замещая эти группы. Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются аморфные участки. На их место для сохранения пористости между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированную целлюлозу довольно легко превратить в разные ионообменные производные, такие как диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) и т.д.

Группа декстранов

- «сефадексы» - при высушивании они легко сжимаются, а в водном растворе сильно набухают. В таких носителях размер пор в геле регулируется степенью сшитости.
- Химически модифицированный крахмал сшивается агентами, такими как формальдегид, хлорокись фосфора и другими бифункциональными соединениями. Таким путем был получен губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью в отношении ферментов. Водорастворимые препараты на основе декстрана часто применяют в качестве носителей лекарственных средств в медицинской практике.

Белки

- Преимущества: вместительны, способны к биodeградации, могут применяться в качестве тонкой (толщиной 80 мкм) мембраны.
- Иммобилизацию ферментов на белковых носителях можно проводить как в отсутствие, так и в присутствии сшивающих агентов. К недостаткам белков как носителей относят их высокую иммуногенность (за исключением коллагена и фибрина).
- При этом чаще всего для иммобилизации ферментов используют структурные (кератин, фибрин, коллаген), двигательные (миозин) и транспортные (альбумин) белки.

Синтетические полимерные носители

- Полимеры:
- на основе стирола (амберлит, дауэкс),
- на основе производных акриловой кислоты (полиакриламидный гель (ПААГ) и его производные),
- полиамидные носители (найлон-6, капрон),
- носители на основе поливинилового спирта (ПВС)
- полиуретаны.

Полиамидные носители

- К ним относятся группы различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой $-C(O)-NH-$. Так, полимеры на основе N-винилпирролидона используются для получения иммобилизованных ферментов, способных медленно распадаться в организме. Кроме того, они биологически инертны, что особенно важно при их использовании в медицинских целях.

Органические низкомолекулярные носители

- К ним относятся: природные носители (липиды) и синтетические аналоги липидов (ПАВ).
- Иммобилизация ферментов на природных липидных носителях может рассматриваться в качестве наиболее близкого приближения к условиям функционирования ферментативных систем в живой клетке. Обычно липидные носители применяют в виде моно- или бислоев.

Неорганические материалы

- К данной группе носителей относятся матрицы на основе силикагеля, глины, керамики, а также природные минералы, графитированная сажа, металлы и их оксиды.
- К основным качествам, обуславливающим активное использование неорганических носителей, относятся: легкость их регенерации, возможность придания им любой формы. При этом носители применяются в виде порошков, шариков, гранул, пластинок, монолита.

Методы иммобилизации ферментов

- **Методы физической иммобилизации ферментов** (иммобилизация, при которой фермент не соединен с носителем ковалентными связями) можно классифицировать на четыре группы:
 - адсорбция на нерастворимых носителях;
 - включение в поры геля;
 - пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны);
 - включение фермента в двухфазную среду, где он растворим и может находиться только в одной из фаз.

Физическая адсорбция

- В ее основе лежит физическое или ионное взаимодействие фермента с неорганическим (кремнезем, пористое стекло, природные алюмосикаты, оксиды алюминия или титана и др.) или органическим (полисахариды, коллаген, ионообменные смолы и др.) носителем.
- Адсорбция фермента – очень простая процедура, заключающаяся в контакте водного раствора фермента с носителем и отмывке не адсорбированного фермента.
- К преимуществам адсорбционной иммобилизации относятся:
 - 1. простота методики;
 - 2. доступность и экономичность сорбентов;
 - 3. возможность придания иммобилизованному препарату любой формы.

Физическая адсорбция

- К недостаткам адсорбции как метода иммобилизации ферментов относятся: десорбция и ее последствия. Это связано с тем, что сорбция обратима, она зависит от значения рН и ионной силы раствора, температуры, удельной поверхности и пористости носителя, концентрации субстрата и других факторов.
- Для снижения степени десорбции иммобилизацию проводят:
- а) на носителе, модифицированном обработкой ионами металлов, различными функциональными группами, ковалентной пришивкой молекул, являющихся специфическими лигандами для иммобилизуемых ферментов;
- б) с ферментом, до иммобилизации модифицированным введением ионогенных или гидрофобных групп;
- в) с использованием бифункциональных агентов, нейлоновых сеток и других материалов.

Иммобилизация ферментов в структуру геля

- Методически такая процедура выполняется разными способами:
- фермент вносят в раствор мономеров до проведения их полимеризации;
- фермент вносят в раствор готового полимера до его перехода в гель;
- готовый полимерный гель пропитывают раствором фермента. В связи с тем, что этот способ требует много времени, а полученный препарат обладает низкой удельной активностью, его применяют очень редко.

Для иммобилизации ферментов применяют:

- а) несшитые полимерные гели, образуемые полисахаридами (крахмалом, агар-агаром, альгинатом, каррагинаном и др.), при охлаждении их горячих растворов. В данном случае водный раствор фермента вносят в реакционную смесь перед началом гелеобразования. Для повышения механической прочности биокатализатора и снижения вероятности выхода фермента из полимерной матрицы вводят различные сшивки (например, бифункциональные агенты) или электростатические модификаторы (в случае альгината – при помощи ионов кальция, каррагинана – ионов натрия);
- б) сшитые полимерные гели, образуемые ПВС или поливинилпирролидоном (ПВП), в которых при воздействии ультрафиолетового (УФ) света, γ -излучения или потока электронов возникают свободные радикалы, при взаимодействии которых образуются ковалентные сшивки между цепями.

- К преимуществам ферментов, включенных в матрицу геля, относятся:
 - 1. фермент практически ни к чему не прикреплен и потому никаких стерических помех не испытывает;
 - 2. активный центр фермента не блокирован;
 - 3. фермент надежно защищен от действия бактерий.
- К недостаткам ферментов, иммобилизованных в структуре геля, относятся:
 - 1. фермент может вымываться из геля;
 - 2. полимерная матрица может в какой-то степени препятствовать проникновению субстрата в гель, снижая активность фермента;
 - 3. метод неприемлем, когда субстратом является высокомолекулярное соединение (ВМС).

Иммобилизация ферментов с использованием полупроницаемых оболочек

- водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой мембраной, которая легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но представляет непреодолимый барьер для молекул фермента. Существующие модификации этого метода отличаются лишь методами получения полупроницаемой мембраны и ее природой.

Микрокапсулирование

- Из капель органического раствора полимера образуется водная эмульсия, содержащая еще более мелкие капли водного раствора фермента. При затвердевании органического раствора образуются полимерные сферические частицы, внутри которых заключены молекулы ферментов.

Включение в волокна

- водный раствор фермента, эмульгированный в органическом растворе волокнообразующего полимера (полихлорвинила или триацетата целлюлозы), продавливают через фильтры в жидкость, вызывающую коагуляцию полимера (толуол и др.). Образующиеся при этом полимерные, волокнистые, пористые нити содержат капли водного раствора фермента. Такие иммобилизованные структуры отличаются механической прочностью и могут применяться для изготовления тканей, обладающих ферментативной активностью. Такие ткани могут использоваться при лечении ожогов, раневых поверхностей и др.

Включение в липосомы

- В 1975 г. Дж. Сесса и Дж. Вайсман впервые использовали метод включения ферментов в структуру липосом.
- Липосомы – это концентрические сферы из двойных фосфолипидных слоев. Липосомы с включенными в них лекарственными препаратами используют в медицинской практике, а также в фундаментальных исследованиях в качестве системы, имитирующей клетки.

Двойное эмульгирование

- В данном случае сначала готовят эмульсию водного раствора фермента в органическом растворе полимера. Полученную эмульсию вновь диспергируют в воде. В результате после затвердевания полимера образуются сферические частицы полимера с заключенными в них сферическими частицами ферментного раствора.
- К преимуществам данного метода относятся:
 - 1. простота и универсальность;
 - 2. возможность включения не только индивидуальных ферментов, но и полиферментных систем, клеток и фрагментов клеток и т.п.;
 - 3. данные системы позволяют получать препараты с высоким содержанием фермента;
 - 4. фермент в таких системах не только сохраняет каталитическую активность, но и зачастую имеет повышенную стабильность;
 - 5. благодаря тонкой мембране удастся избежать диффузионных ограничений.

- Иммобилизация ферментов с использованием систем двухфазного типа. Отличительная черта данного способа иммобилизации состоит в том, что ограничение подвижности фермента достигается не за счет его взаимодействия с жестким носителем, а вследствие его способности растворяться только в одной из фаз двухфазной системы. При этом природа фаз подбирается так, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует.
- Микроэмульсии.
- Спонтанное образование мицелл происходит в различных органических растворителях (углеводороды (октан или бензол), высшие спирты, хлороформ и др.), а также в их смесях. В качестве мицеллообразующего материала пригодны детергенты (додецилсульфат натрия, алкилированные полиэтиленгликоли (бридж, твин или тритон)) или природные фосфолипиды.
- Недостатком данного метода является трудность отделения ПАВ. Этот недостаток можно устранить при использовании бездетергентных микроэмульсий.

Химические методы иммобилизации ферментов

- Ковалентные связи образуются за счет того, что ферменты, являясь веществами белковой природы, содержат на поверхности молекулы разные функциональные группы: гидроксильные, карбоксильные, тиоловые, амино-, имидазольные, гуанидиновые и т.д.
- К наиболее реакционноспособными относятся SH-группы, принимающие участие в реакциях окисления, ацилирования, алкилирования и др. Данные группы играют значительную роль в стабилизации белка – фермента при помощи дисульфидных мостиков. В связи с тем, что сульфгидрильные группы входят в активный центр многих ферментов, их не используют для иммобилизации, а, напротив, защищают. В качестве группы – мишени при химической иммобилизации чаще всего используют высокореакционные аминокислотные группы белка.

«Сшивка»

- В случае, если тесное взаимодействие фермента с носителем нежелательно, т.к. это ограничивает стерические и диффузионные процессы, то его можно предотвратить при помощи сшивающих молекул различной длины («сшивка»).
- К преимуществам данного метода относятся:
- 1. путем подбора длины сшивающего агента можно изменять каталитические характеристики иммобилизованного фермента;
- 2. можно специально сконструировать «сшивку» так, чтобы она содержала связь, лабильную в особых условиях или специфически расщепляемую определенными реагентами.

«Вшивка»

- «Вшивка» или ретикуляция ферментов в разные типы сеток, осуществляется при помощи сшивающих агентов, от природы и количества которых зависит растворимость образующихся сетчатых структур, узлами в которых служат молекулы ферментов. Фактически, в данном случае фермент сам является носителем.
- Виды «вшивки»:
- 1. При введении в раствор фермента бифункционального агента отдельные молекулы фермента сшиваются друг с другом образуя сетчатые структуры.
- 2. Сополимеризация в однородном растворе. В этом случае при сополимеризации белковой молекулы с низкомолекулярными мономерами образуются сетчатые полимерные структуры в отдельных узлах, которых находятся молекулы фермента. В данном случае фермент, как правило, предварительно модифицируют.
- 3. Химическое задубливание слоя фермента. В этом случае слой фермента, предварительно адсорбированного на носителе, обрабатывают сшивающим агентом и, после удаления слоя носителя, получают ферментную пленку (в некоторых случаях носитель не удаляют).
- 4. Введение в молекулу фермента химических скобок. В данном случае молекула фермента стабилизируется путем введения новых внутренних сшивок – связей закрепляющих структуру фермента.

- К основным достоинствам методов химической иммобилизации относятся:
- 1. ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность образующегося конъюгата, в этом случае десорбция фермента даже при изменении условий реакции маловероятна;
- 2. химическая модификация может привести к существенным изменениям свойств фермента: специфичности, активности, стабильности.
- К недостаткам химической иммобилизации относятся:
- 1. в данном случае на характеристику и свойства иммобилизованного препарата оказывает сильное влияние степень очистки фермента;
- 2. метод сложен и дорогостоящ;
- 3. результаты часто зависят от квалификации и навыков экспериментатора.

Сферы применения иммобилизованных ферментов

- Значимый вклад иммобилизованные ферменты внесли в пищевую и фармацевтическую промышленность, в тонкий органический синтез, в аналитическую практику, в медицину, в процессы конверсии энергии.
- В медицине иммобилизованные ферменты открыли путь к созданию лекарственных препаратов пролонгированного и направленного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью.
- Помимо этого, широкие перспективы открывает использование иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Сферы применения иммобилизованных ферментов

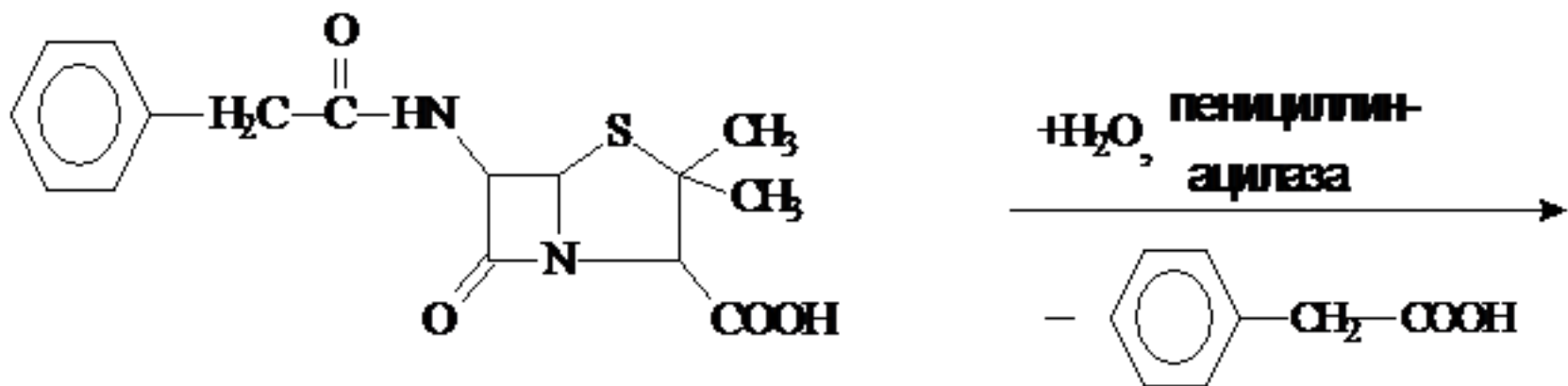
- Имобилизованные клетки имеют ряд преимуществ, как перед иммобилизованными ферментами, так и перед свободными клетками:
- отсутствие затрат на выделение и очистку ферментов;
- снижение затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- высокая активность и стабильность;
- возможность создания непрерывных и полунепрерывных автоматизированных технологических процессов;
- способность к длительному функционированию полиферментных систем без экзогенных кофакторов.

Сферы применения иммобилизованных ферментов

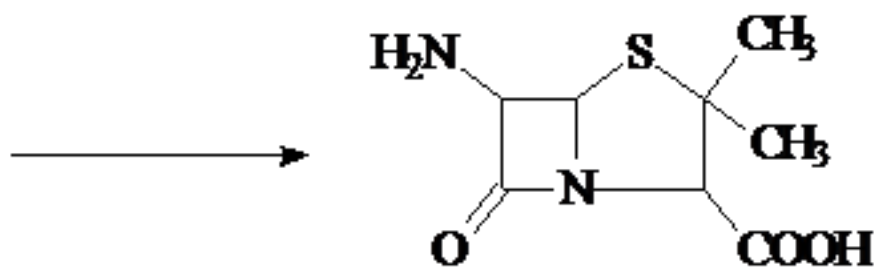
- В настоящее время биокаталитическая активность целых иммобилизованных клеток может быть использована в разных отраслях науки и техники:
- при биосинтезе и трансформации таких соединений, как аминокислоты, органические кислоты, антибиотики, стероиды, углеводы, углеводороды, нуклеотиды и нуклеозиды;
- в пивоварении и виноделии;
- при очистке сточных и природных вод;
- при извлечении металлов из сточных вод;
- при ассимиляции солнечной энергии;
- при изготовлении водородных солнечных элементов;
- в азотфиксации;
- в аналитических целях при изготовлении электродов.

Получение антибиотиков с применением иммобилизованных ферментов

- Ключевым полупродуктом для получения полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда является 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК).
- Получение 6-АПК промышленным путем в результате химического гидролиза бензилпенициллина сопряжено с большими проблемами и трудностями, в связи с крайней лабильностью β -лактамного цикла его молекулы. В частности, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1 %.
- Продуктивность данного процесса удалось значительно увеличить, благодаря применению для гидролиза иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинацилазу. Данный фермент расщепляет именно ту амидную связь, которая необходима для образования 6-АПК.



Бензилпенициллин



6 - Аминопенициллиановая кислота (6-АПК)