

## Занятие семинарского типа № 8

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Ферменты как биокатализаторы в биотехнологическом производстве антибиотиков

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Характеристика ферментов

Ферменты являются сложными органическими соединениями, присутствующими во всех живых клетках, в которых они функционируют как катализаторы различных биохимических реакций превращений разных химических соединений.

Хотя ферменты образуются только в живых клетках, многие из них могут быть выделены из клеток без потери активности и способны «работать» в условиях *in vitro*.

Ферментная технология включает продукцию, выделение, очистку и практическое применение в растворенной или иммобилизованной форме ферментов.

#### 1.1. Классификация ферментов

Согласно международной классификации все ферменты классифицируют на 6 групп в зависимости от их функционального назначения в биологических средах.

1. Оксиредуктазы (окислительно-восстановительные ферменты) содержатся во всех живых клетках. Их важнейшая функция заключается в обеспечении энергией (в форме АТФ) всех тканей в реакциях окислительного фосфорилирования (цикл Кребса). Процессы окислительного фосфорилирования протекают с участием кислорода, исходным материалом для синтеза АТФ являются преимущественно глюкоза и жирные кислоты. Так, из 1 молекулы глюкозы через ряд превращений в цикле трикарбоновых кислот образуется 38 молекул АТФ, из 1 молекулы жирной кислоты образуется 129 молекул АТФ. Оксиредуктазы участвуют и в другом цикле синтеза АТФ – гликолизе, протекающем в цитоплазме. Гликолиз осуществляется в анаэробных условиях и его дебит АТФ значительно ниже – 2 молекулы АТФ из 1 молекулы глюкозы. Энергия, аккумулированная в АТФ, используется тканями (клетками) практически во всех биохимических реакциях. В эту группу входят более 200 ферментов.

2. Трансферазы осуществляют перенос различных групп атомов от молекулы одного вещества на молекулу другого. С их участием обеспечивается биосинтез белков, нуклеиновых кислот и др. Известно более 450 ферментов трансферазной активности.

3. Гидролазы катализируют реакции гидролиза. Они широко распространены в растительном и животном мире. С их помощью в лизосомах кле-

ток осуществляется гидролиз белков, жиров, сахаров, нуклеиновых кислот. Известно более 200 ферментов этого класса.

4. Лиазы катализируют отщепление определенных групп атомов с образованием двойных связей. Они участвуют в процессах брожения, гликолиза, в цикле трикарбоновых кислот Кребса, в образовании мочевины и т.д. Лиазы широко распространены в природе. Известно около 100 ферментов этого класса.

5. Изомеразы. Природные полимеры обладают способностью вращать ось поляризованного света вправо и влево, что определяется зеркальным пространственным расположением атомов в молекуле. Данное явление известно как энантиометрия или оптическая изомерия. Смесь лево- и правовращающих изомеров называется рацемической. Организмом усваиваются только правовращающие (D-формы) сахара и левовращающие (L-формы) аминокислоты. С помощью изомераз (рацемазы, эпимеразы) осуществляются химическая перестройка молекул и превращение D-форм изомеров в L-формы, и наоборот. Они широко распространены в природе, отличаются высокой специфичностью реакции. Известно более 500 ферментов этого класса.

6. Лигазы (синтетазы) катализируют реакции присоединения друг к другу разных молекул с образованием связей C–O, C–S, C–C, C–N. Эти реакции протекают с участием АТФ и играют важную роль в биосинтезе белков, углеводов, липидов и др. Лигазы широко распространены в природе. Известно более 100 ферментов этого класса.

## **1.2. Свойства ферментов как биологических катализаторов**

Ферменты – это биологические катализаторы, т.е. вещества, ускоряющие реакции. Совокупность биохимических реакций, катализируемых ферментами, составляет сущность обмена веществ, являющегося отличительной чертой всех живых организмов. Через ферментативный аппарат, регуляцию его активности происходит и регуляция скорости метаболических реакций, их направленности.

Ферменты, являясь катализаторами, имеют ряд общих свойств с небиологическими катализаторами:

1. Ферменты не расходуются в процессе катализа.
2. Ферменты не могут ускорить реакции, протекание которых противоречит законам термодинамики.
3. Ферменты не смещают положения равновесия, а лишь ускоряют его достижение.

К специфическим свойствам ферментов как биокатализаторов относятся:

1. Ферменты по своему химическому строению являются белками.
2. Каталитическая активность ферментов намного выше (как правило, на несколько порядков), в сравнении с небиологическими катализаторами.
3. Ферменты обладают узкой специфичностью, избирательностью действия на субстраты, т.е. на вещества, превращение которых они катализируют.

ют. Высокая специфичность ферментов обусловлена конформационной и электростатической комплиментарностью между молекулами субстрата и фермента и уникальной структурой активного центра фермента, обеспечивающими “узнавание”, высокое сродство и избирательность протекания одной определенной реакции из тысячи других химических реакций, осуществляющихся одновременно в живых клетках.

В зависимости от механизма действия различают ферменты с относительной (или групповой) специфичностью и абсолютной специфичностью. В частности, для действия некоторых гидролитических ферментов наибольшее значение имеет тип химической связи в молекуле субстрата. Так, например, пепсин расщепляет белки животного и растительного происхождения, хотя они могут существенно отличаться друг от друга как по химическому строению и аминокислотному составу, так и по физико-химическим свойствам. Однако, пепсин не расщепляет углеводы или жиры. Объясняется это тем, что местом воздействия пепсина является пептидная -СО-NH-связь. Для действия липазы, катализирующей гидролиз жиров на глицерин и жирные кислоты, такой мишенью является сложноэфирная связь. Аналогичной относительной специфичностью обладают и некоторые внутриклеточные ферменты, например, гексокиназа, катализирующая в присутствии АТФ фосфорилирование почти всех гексоз, хотя одновременно в клетках имеются специфические для каждой гексозы ферменты, выполняющие аналогичное фосфорилирование.

Абсолютной специфичностью действия называют способность фермента катализировать превращение единственного субстрата. Любые модификации в структуре субстрата делают его недоступными для воздействия фермента.

Стереохимическая специфичность ферментов обусловлена существованием оптически изомерных L- и D-форм или геометрических (цис- и транс-) изомеров химических веществ. Так, известны оксидазы L- и D-аминокислот, хотя в природных белках обнаружены только L-аминокислоты. Каждый из видов оксидаз воздействует только на свой специфический стереоизомер. Наглядным примером стереохимической специфичности служит бактериальная аспартатдекарбоксилаза, катализирующая отщепление  $\text{CO}_2$  только от L-аспаргиновой кислоты с превращением ее в L-аланин.

4. Регулируемость ферментов как биокатализаторов. Путем регуляции ферментативного аппарата обеспечивается скоординированность всех метаболических процессов во времени и пространстве, направленная на воспроизведение живой материи, поддержание постоянства внутриклеточной среды, на приспособление к изменяющимся внешним условиям.

5. Термолабильность ферментов. Скорость химических реакций зависит от температуры, поэтому реакции, катализируемые ферментами, чувствительны к изменениям температуры. Однако, вследствие белковой природы фермента термическая денатурация при повышении температуры будет уменьшать эффективную концентрацию фермента с соответствующим снижением скорости реакции. В связи с этим, термолабильность (чувствительность к повышению температуры) является одним из специфических свойств

ферментов, отличающих их от неорганических катализаторов. При 1000 °С почти все ферменты утрачивают свою активность (исключение составляют, очевидно, только один фермент мышечной ткани – миокиназа, выдерживающая нагревание до 1000 °С). При низких температурах (0 °С и ниже) ферменты, как правило, не разрушаются, хотя активность их резко снижается. Во всех случаях важно время воздействия соответствующей температуры. В настоящее время для пепсина, трипсина и др. доказано существование прямой зависимости между скоростью инактивации фермента и степенью денатурации белка. На термоллабильность ферментов определенное влияние оказывают концентрация субстрата, значение рН среды и другие факторы.

6. Зависимость активности ферментов от значения рН среды. Ферменты, как правило, наиболее активны в пределах узкой зоны концентрации водородных ионов, соответствующей для животных тканей в основном выработанным в процессе эволюции физиологическим значением рН среды 6,0–8,0. рН-оптимум действия ферментов находится в пределах физиологических значений. Исключение составляет пепсин, рН-оптимум которого равен 2,0. Это объясняется тем, что пепсин входит в состав желудочного сока, содержащего свободную соляную кислоту, которая создает оптимальную кислую среду для действия данного фермента. С другой стороны, рН-оптимум аргиназы сдвинут в сильно щелочную зону (около 10,0). Такая среда отсутствует в клетках печени, следовательно, *in vivo* аргиназа функционирует, по видимому, не в своей оптимальной зоне рН среды. Влияние изменений значения рН среды на молекулы фермента заключается в воздействии на состояние и степень ионизации кислотных и основных групп (СООН-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина и др.). При разных значениях рН среды активный центр может находиться в частично ионизированной или в неионизированной форме, что сказывается на третичной структуре белка и соответственно формировании активного фермент-субстратного комплекса. Кроме того, имеет значение и состояние ионизации субстратов и кофакторов.

## **2. Источники и этапы получения ферментов**

Поскольку ферменты представляют собой макромолекулы, активность которых зависит от их первичной структуры, т.е. от последовательности аминокислот, крупномасштабный химический синтез не всегда возможен и желателен. В этой связи ферменты экстрагируют из животных и растительных клеток или производят биотехнологическим путем.

Ферменты животного происхождения преимущественно выделяют из органов, в которых протекают интенсивные биохимические процессы. Так, из слизистой желудка свиней и крупного рогатого скота получают пепсин; из поджелудочной железы свиней – смеси трипсина, химотрипсина, липаз и амилаз; из желудка телят – сычужный фермент, используемый в сыроделии. Для нужд медицины и биохимии ферментные препараты выделяют из мышц, в том числе из сердца, печени, селезенки, почек, тонкого кишечника. На

крупных мясокомбинатах целесообразно иметь цехи по получению биохимических препаратов из органов убойных животных.

Из ферментов растительного происхождения наиболее широко используют амилазы и папаин. Папаин – растительная протеаза – содержится в плодах дынного дерева. Ежегодно только в США расходуют около 100 т папаина для обработки (размягчения) мяса. Папаин, протеазы фицин и бромелин, контактируя с мясом, в течение 2 ч при комнатной температуре расщепляют белки соединительной ткани (коллаген и эластин). Из растительного сырья получают также фосфатазы, пероксидазы, уреазы, гемицеллюлазы и др. Условно ферментным препаратом можно назвать и ячменный солод, в котором содержится до 1 % амилаз.

В связи с постоянно увеличивающимися потребностями в ферментных препаратах растительное и животное сырье не удовлетворяют спроса производителей. Содержание ферментов в растениях, как правило, низкое. Кроме того, получение ферментов из растений носит сезонный характер. Органы животных получают на мясокомбинатах, но при этом возникают проблемы с консервированием и хранением этого вида сырья.

Совершенно иная ситуация складывается с получением БАВ, в том числе ферментов, микробиологическим путем. Это подтверждается следующими факторами:

- ✓ современные подходы к селекции микробных культур (первичная селекция, мутация, генная инженерия) и оптимизации условий культивирования позволяют значительно увеличить биосинтез практически любого микробного фермента;

- ✓ штамм-продуцент, используемый в промышленных условиях, должен иметь такую систему регуляции синтеза, которая позволяла бы накапливать фермент в количествах, значительно превосходящих его физиологическую потребность;

- ✓ исключено влияние фактора сезонности на процесс культивирования микроорганизмов;

- ✓ для культур микроорганизмов – представителей разных таксономических групп характерен широкий спектр биосинтеза ферментов. Уникальное многообразие самих микроорганизмов с учетом использования методов геной инженерии создает идеальную возможность отбора ферментов практически для всех конкретных технологий или других целей;

- ✓ возможно получение ферментов с особыми каталитическими свойствами (белковая инженерия), необходимых для медицины, ветеринарии и производства.

Среди микроорганизмов-продуцентов ферментов практический интерес представляют микроскопические грибы родов *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, бактерии рода *Bacillus*, дрожжи рода *Saccharomyces* и др., однако получение промышленных культур продуцентов является сложным и длительным процессом.

Использование методов геной и клеточной инженерии открывает новые возможности использования микроорганизмов как продуцентов ферментов. Усиление признака биосинтеза ферментов микроорганизмами или приобретение способности синтеза ферментов с новыми, уникальными свойствами возможны благодаря клонированию соответствующих генов. С этой целью широко используются такие генетически изученные организмы, как *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaete chrysosporium* и др.

Промышленная культура микроорганизма-продуцента ферментов должна соответствовать следующим требованиям:

- ✓ накапливать большое количество фермента (в клетке или культуральной жидкости) на доступной питательной среде в биореакторах большой вместимости;
- ✓ не проявлять токсические и патогенные свойства в промышленных условиях культивирования;
- ✓ характеризоваться стабильностью образуемого фермента или, наоборот, лабильностью, в зависимости от условий его последующего использования;
- ✓ обладать конститутивным механизмом синтеза основного фермента;
- ✓ максимально уменьшать время культивирования и доводить до минимума ингибирующее действие метаболитов на активность фермента.

Перечисленные требования для промышленно важных культур не являются исчерпывающими, поскольку каждый конкретный штамм обладает характерными для него особенностями.

По мнению специалистов, процент качественно различающихся микроорганизмов – представителей разных таксономических групп, известных микробиологам, не превышает 30–40 %, а это значит, что существуют неизвестные им ферменты и метаболические пути. Несомненно, выделение этих культур и их тщательная физиолого-биохимическая характеристика могут существенно обогатить арсенал имеющихся ферментов. С этой точки зрения особенно интересны ферменты микроорганизмов, имеющих оптимум роста и развития в экстремальных для обычных (мезофильных) форм условиях, в частности, термофилы, ацидофилы, алкалофилы, психрофилы, галлофилы и барофилы. К этой же группе микроорганизмов могут быть отнесены и те автотрофные формы, которые для синтеза ряда метаболитов растут на крайне бедных по химическому составу средах, например, базидиальные грибы, образующие лигнин-окисляющие ферменты.

Первый этап при выборе продуцентов ферментов – выделение их из природных источников (образцов почв, воды, разных биологических материалов и др.) и/или скрининг коллекционных штаммов. Вначале ищут микроорганизмы, которые потенциально обладают полезными свойствами. Несомненно, что термофилы преобладают в частях суши, прилегающих к экватору, где в летнее время наблюдается достаточно высокая температура. Горячие источники, самосогревающиеся компосты, почвы пустынь – типичные

места обитания термофилов. Хотя описаны случаи, когда термофилы были выделены из суглинистых и черноземных почв, зерновых культур, фруктов.

Психрофилы в большом количестве встречаются на Севере. Кислые источники (почвы, озера) являются наиболее подходящим объектом для выделения ацидофильных культур. Алкалифильные культуры преобладают в местах, богатых известью и в нейтральных почвах. Однако в некоторых случаях ацидофилов и алкалифилов выделяют из обычных почв и других источников. Засоленные озера и солончаки являются обычным местом обитания галофильных культур. Именно из таких источников наиболее целесообразно брать образцы (почва, вода, зерновые, фрукты, овощи) для выделения культур, растущих в экстремальных условиях.

Ферменты амилазы более активно образуются микроорганизмами, поселяющимися в зерновых культурах; целлюлазы и ксиланазы синтезируют микроорганизмы, встречающиеся в компостах и лесных подстилках; пектиназы наиболее интенсивно продуцируются микроорганизмами, участвующими в разложении плодов и овощей; продуцентами окислительных ферментов (фенолоксидазы, пероксидазы, лакказы, монооксигеназы) являются микроорганизмы, обитающие на живых растениях и овощах.

На втором этапе из выделенных микроорганизмов отбирают те, которые характеризуются достаточным уровнем биосинтеза нужного фермента. Отбор осуществляется разными методами. Широко применяются селективные среды, одним из компонентов которых является субстрат фермента, продуцент которого селекционируют. Так, при выделении продуцентов манназы используют питательные среды с маннаном пекарских дрожжей в качестве единственного источника углерода. Выделение продуцентов целлюлаз проводится на агаризованных средах с целлюлозой, продуцентов амилаз – на средах с крахмалом, уреазы – на средах с мочевиной.



Рис. 1. Последовательность этапов выделения и обработки культуры микроорганизма из природного источника для получения промышленных штаммов продуцентов ферментов

При использовании селективных сред и селективных условий культивирования происходит естественный отбор продуцентов, которые в заданных условиях наиболее жизнеспособны и продуктивны.

В тех случаях, когда требуемый признак не является биологически полезным для микроорганизма и поэтому невозможно создать условия, при которых автоматически отбираются нужные варианты, приходится прибегать к искусственному отбору естественно возникающих форм мутантов.

Изучение спонтанной изменчивости продуцента – важный шаг в отборе активного варианта. Без этого невозможно вести селекционную работу с применением мутагенных факторов и поддерживать культуру длительное время в активном состоянии. В популяции каждого штамма преобладают варианты, типичные для данного вида. Наряду с ними имеются и активные колонии, относящиеся к морфологически измененным типам. Исследование спонтанной изменчивости *Aspergillus niger* 475 позволило выделить среди трех культурально-морфологических вариантов один, характеризующийся



повышенной активностью кислотостабильной амилазы. При культивировании *Staphylococcus saprophyticus L-1* данный организм образует два морфологически различных варианта, один, из которых продуцирует в пять раз больше уреазы, чем исходная популяция. Более интенсивно окрашенные колонии актиномицета *Thermoactinomyces vulgaris PA-11-4a* обладают и более высокой протеолитической активностью. В результате спонтанной изменчивости *Bacillus subtilis* появляются четыре морфологически различные формы, которые обозначают как R-, P-, S- и M-варианты. Морфологические варианты значительно различаются по уровню биосинтеза  $\alpha$ -амилазы и протеазы. Причем, если протеазу синтезируют все без исключения варианты, то  $\alpha$ -амилазу M-вариант не синтезирует. Морфологический вариант R синтезирует  $\alpha$ -амилазу и одну протеазу, P и S –  $\alpha$ -амилазу и по две протеазы. Что касается протеаз, то выявлены ферменты трех типов. Варианты P, R и S синтезируют нейтральную протеазу с мол. м. около  $4,4 \cdot 10^5$ . Вариант M синтезирует протеазу с мол. м.  $2,8 \cdot 10^4$ . В культуральной жидкости морфологических вариантов P и S обнаружены небольшие количества протеазы, имеющей мол. м. более  $3,0 \cdot 10^4$ .

Между морфологией продуцента и уровнем его ферментативной активности имеет место прямая связь, что позволяет легко (по внешнему виду колонии) отбирать более активные варианты продуцентов ферментов.

Селекция продуцентов ферментов, основанная на выделении спонтанных мутантов, которые появляются достаточно редко – трудоемкая и малопродуктивная работа. Частота появления индуцированных мутаций значительно выше, что и обуславливает широкое применение при селекции активных продуцентов ферментов различных мутагенных факторов: ионизирующих излучений (рентгеновских лучей,  $\gamma$ -лучей, быстрых нейтронов), ультрафиолетовых лучей, этиленимина, нитрозосодержащих соединений, перекиси водорода, антибиотиков.

На практике часто применяют метод ступенчатого отбора, при котором отобранный лучший вариант служит объектом для повторного отбора с применением мутагенных факторов. Данный метод с успехом использован в селекции  $\alpha$ -амилаз и протеаз.

Под действием мутагенных факторов, как правило, изменяется скорость ферментобразования, однако не исключено появление фермента с измененными свойствами. При изучении щелочных протеаз (субтилизинов), выделенных из мутантов *Bacillus subtilis*, отмечены сдвиги их удельной активности и термостабильности. Протеазы аспорогенного и спорогенного мутанта *Bacillus subtilis* различаются по способности гидролизовать клеточный белок.

Исследования по отбору и целенаправленной селекции продуцентов играют важную роль в создании технологии получения высокоочищенных ферментов. Получение штамма, синтезирующего в основном целевой продукт, в значительной мере упрощает схему дальнейшего выделения и очистки фермента.

### 3. Ферменты как биологические катализаторы: механизмы регуляции каталитической активности

#### 3.1. Механизм ферментативного катализа

Механизмы химического и ферментативного катализа сходны. Доминирующей концепцией в современной науке является теория переходного состояния. Данная теория рассматривает два состояния реагентов – исходное (основное) и переходную структуру наименее стабильную, которой соответствует максимум энергии. Для вещества, находящегося в переходном состоянии существует равная вероятность того, что достигшие его молекулы вступят в реакцию с образованием продукта реакции или вернуться обратно на уровень не прореагировавших молекул. Скорость любой химической реакции пропорциональна концентрации молекул находящихся в переходном состоянии. Однако, переходного состояния может достичь только та часть молекул исходного вещества, которая обладает достаточной энергией для преодоления энергетического барьера. Количество энергии (в калориях), необходимое для того, чтобы все молекулы 1 моля вещества при определенной температуре достигли переходного состояния, называется энергией активации.

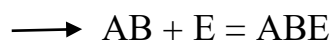
Основная функция любого катализатора, в том числе и фермента, снижение энергетического барьера. Катализатор ускоряет химическую реакцию, находя «обходные пути», позволяющие молекулам преодолевать энергетический (активационный) барьер на более низком энергетическом уровне.

Согласно современным представлениям снижение энергии активации обеспечивается через образование фермент – субстратного комплекса, переходному состоянию которого соответствует более низкая энергия активации.

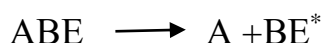
Таким образом, в присутствии биокатализатора (фермента) более значительная часть молекул данной популяции вступает в реакцию в единицу времени.

Условно ферментативный процесс можно подразделить на три стадии:

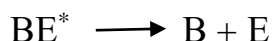
1. Стерическое связывание субстрата с активным центром – образование фермент-субстратного комплекса (на примере реакции  $AB \longrightarrow A+B$ ):



2. Преобразование первичного фермент субстратного комплекса в активированный переходный комплекс:



3. Отделение конечного продукта от фермента:



Вторая стадия более медленная и лимитирует скорость всей химической реакции, она является собственно актом катализа, т.е. разрыва и образования новых связей. На этой стадии и происходит снижение энергии активации.

### **3.2. Регуляция ферментативной активности**

Ферменты сохраняют свои уникальные свойства: высокую каталитическую специфичность действия в условиях *in vitro*, поэтому их широко применяют в качестве биологических катализаторов. Кроме того, следует отметить, что биокатализаторы нетоксичны, действуют в мягких условиях в отличие от большинства катализаторов небиологической природы.

Для нормального функционирования организма необходима точная регуляция потока метаболитов по анаболическим и катаболическим путям. Все биохимические процессы должны быть скоординированы и должны отвечать на изменения во внешней среде (например, на поступление питательных веществ и т.п.), а также на периодически происходящие внутриклеточные события (например, репликацию ДНК). Поток веществ, проходящий через ту или иную реакцию, можно регулировать, изменяя следующие параметры:

- 1) абсолютное количество присутствующего фермента;
- 2) каталитическую эффективность фермента.

Регуляция количества фермента путем регуляции скорости его биосинтеза и распада. Биосинтез и распад ферментов, как и других белков, происходит в организме непрерывно. У взрослого здорового человека в условиях динамического равновесия процессы биосинтеза и распада имеют одинаковую скорость, благодаря чему общее содержание ферментов не изменяется во времени. Однако, для адаптации к изменениям внешней среды или в ответ на внутриклеточные изменения, смещается равновесие между процессами биосинтеза и распада ферментов. У всех живых организмов биосинтез ферментов и их распад (до аминокислот) представляют собой разные процессы, катализирующиеся разными ферментами. В этих условиях легко осуществляется независимая регуляция скорости биосинтеза фермента и скорости его распада.

Клетки способны синтезировать специфические ферменты в ответ на присутствие специфических низкомолекулярных индукторов, т.е. веществ, которые могут влиять на скорость биосинтеза фермента и оказывать существенное воздействие на регуляцию обмена веществ путем соотношения ферментов в организме. Ферменты, концентрация которых всегда постоянна и не зависит от условий процесса, называются конститутивными. Ферменты, концентрация которых может изменяться, называются адаптивными.

В частности, установлено, что введение некоторых лекарственных средств приводит к усилению биосинтеза некоторых ферментов (такие лекарственные средства действуют как индукторы ферментов). Так, фенобарбитал приводит к значительному (в 3–5 раз) увеличению содержания микросомального фермента цитохрома P-450, играющего важную роль в метабо-

лизме фенобарбитала и других лекарственных препаратов (например, варфарина, препятствующего свертыванию крови).

Репрессия – это процесс, в результате которого может быть приостановлен биосинтез фермента. Таким репрессором может быть субстрат.

Превращение ферментов в активные формы. Ферментативная активность может регулироваться путем превращения неактивного профермента в активную форму. Для того, чтобы перейти в такую форму, профермент должен подвергнуться ограниченному протеолизу, сопровождающемуся конформационными изменениями. При этом происходит или открытие активного центра, или его формирование.



Синтез в форме проферментов характерен для пищеварительных ферментов, а также ферментов системы свертывания крови и системы фибринолиза.

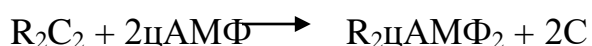
Регуляция активности ферментов путем их ковалентной модификации. Обратимое изменение каталитической активности ферментов может осуществляться путем ковалентного присоединения фосфатной группы (преобладает у млекопитающих) или нуклеотида (преобладает у бактерий). Ферменты, подверженные ковалентной модификации, сопровождающейся изменением их активности, называют обратимо модифицируемыми ферментами.

Обратимо модифицируемые ферменты могут находиться в двух состояниях, одно из которых характеризуется высокой, а другое – низкой каталитической активностью. В зависимости от конкретного случая более активным катализатором может быть или фосфо- или дефосфофермент.

Фосфорилирование протекает соответственно по остаткам серина и тирозина. Фосфорилирование и дефосфорилирование катализируется протеинкиназами и протеинфосфатазами. Активность протеинкиназ регулируется с помощью белковых ингибиторов.

Регуляция белковыми ингибиторами. Одним из важнейших примеров регуляции каталитической активности ферментов белковыми ингибиторами является регуляция протеинкиназ – ферментов, фосфорилирующих белки.

Протеинкиназа в активной форме представляет собой белок, построенный из одной полипептидной цепи (субъединица С). В клетке имеется белок (субъединица R), способный соединиться с белком С. Причем в данном случае образуется тетрамерный комплекс  $R_2C_2$ , не обладающий ферментативной активностью. Активация происходит при участии цАМФ, который связывается с субъединицей R. После связывания изменяется конформация белка, и сродство субъединицы R к субъединице С уменьшается – происходит диссоциация комплекса:



Повышение концентрации цАМФ в клетке приводит к активации протеинкиназ.

Аллостерическая регуляция. Последовательность реакций синтеза сложного природного соединения из простых называется анаболическим путем, а последовательность реакций его распада – катаболическим путем.

Катаболические и анаболические пути одного и того же вещества полностью не совпадают. Биохимические реакции, как правило, различающиеся в катаболическом и анаболическом путях, катализируются ключевыми аллостерическими ферментами, которые называют также регуляторными. Благодаря существованию таких ферментов возможно независимое регулирование процессов биосинтеза и распада.

Аллостерические ферменты помимо активного центра имеют и специфический регуляторный центр (аллостерический центр), с которым могут специфически связываться некоторые соединения, способные активировать или ингибировать ферменты (аллостерические модификаторы или эффекторы).

Аллостерические ферменты, как правило, состоят из двух или более субъединиц. Одна субъединица имеет активный (каталитический) центр, а другая – регуляторный. На рис. 1 представлена схема аллостерического ингибирования фермента:

В отсутствие аллостерического ингибитора субстрат присоединяется к активному центру и происходит реакция. В случае, если в среде присутствует аллостерический ингибитор, то он присоединяется к регуляторному центру, что приводит к изменению конформации регуляторной субъединицы, а затем – каталитической субъединицы. В результате этого активность фермента снижается.

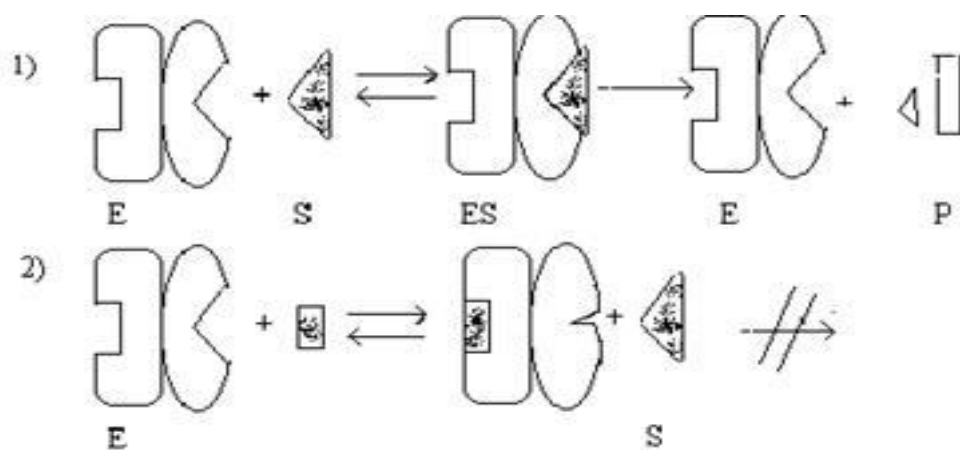
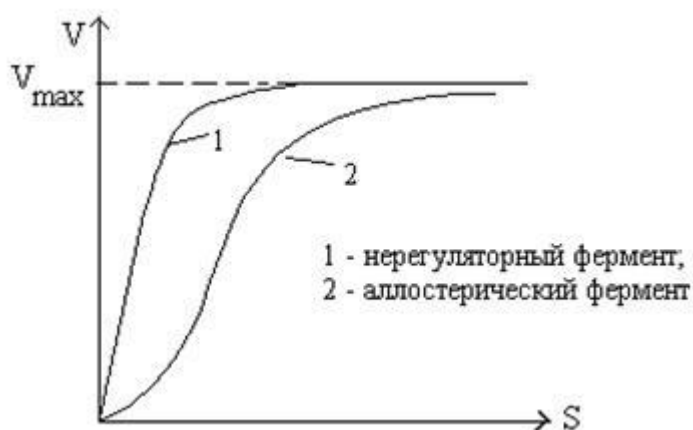
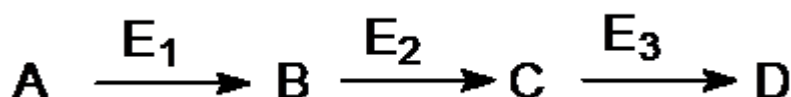


Рис. 1. Схема аллостерического ингибирования фермента

Кинетика аллостерических ферментов не подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата носит сигмоидальный (S-образный) характер.



Ингибирование по принципу обратной связи. Ингибирование фермента, катализирующего одну из реакций в цепи, конечным продуктом этой цепи называют ингибированием по принципу обратной связи. В цепи реакций биосинтеза D из A, катализируемой ферментами E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, при высоких концентрациях D обычно наблюдается ингибирование превращения A в B. При этом D действует как отрицательный аллостерический эффектор фермента или ингибитор, действующий по принципу обратной связи.



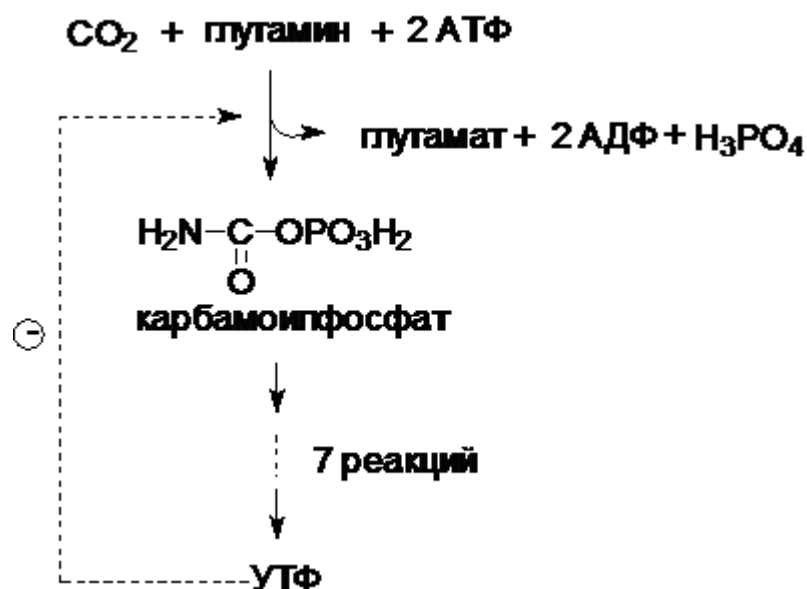
В кинетическом плане ингибирование по принципу обратной связи может быть конкурентным и неконкурентным.

Часто ингибитор, действующий по принципу обратной связи, является последней малой молекулой перед синтезом макромолекулы (например, нуклеотид в синтезе нуклеиновых кислот). Регуляция по принципу обратной связи происходит на первой функционально необратимой стадии, уникальной для данной цепи реакций биосинтеза.

Такое ингибирование позволяет экономить метаболиты и энергию, прекращая биосинтез продукта уже на первых стадиях.

Примером ингибирования по принципу обратной связи может быть регуляция синтеза УТФ (уридинтрифосфата).

Метаболический путь синтеза УТФ включает 8 реакций. Первая катализируется реакцией карбамоилфосфатсинтетазой II. Это аллостерический фермент: конечный продукт метаболического пути – УТФ – является его аллостерическим ингибитором.



Ферменты обнаруживаются почти во всех клетках организма. Это ферменты, которые участвуют в процессах жизнеобеспечения самой клетки (синтез нуклеиновых кислот, белков, энергетический обмен и т.д.). С другой стороны, дифференцированные клетки, выполняющие специфические функции, отличаются по ферментному составу.

Внутри клеток ферменты также распределены неравномерно. Разные органеллы имеют специфический набор ферментов, а, следовательно, различаются по метаболизму, т.е. наблюдается компартментализация метаболизма.

#### 4. Ферменты трансформации β-лактамных антибиотиков

##### Пенициллиназы (β-лактамазы)

Пенициллиназы – ферменты, катализирующие расщепление β-лактамного кольца пенициллинов и цефалоспоринов.

Данные ферменты синтезируются грамположительными (бациллами, клостридии, стафилококки и др.) и некоторыми грамотрицательными (протей) бактериями.

Гены, кодирующие синтез  $\beta$ -лактамаз, находятся в бактериальной хромосоме или R-плазмиде и могут передаваться другим особям с помощью трансдукции или трансформации.

Продуценты пенициллиназ устойчивы к большинству препаратов пенициллинового и цефалоспоринового рядов.

$\beta$ -лактамазы расширенного спектра являются плазмидными ферментами, их продукция является общей для семейства *Enterobacteriaceae*, особенно для *Klebsiella pneumoniae*.

Ферментативное расщепление (гидролиз)  $\beta$ -лактамного кольца приводит к полной инактивации  $\beta$ -лактамного антибиотика. Это было показано на примере бензилпенициллинов еще в 40-х гг. XX в. Э. Чейном, впервые получившим очищенную форму пенициллина. Продукт ферментативного расщепления бензилпенициллина – пенициллоиновая кислота полностью не активна. Это легко объяснимо, т.к. механизм действия  $\beta$ -лактамных антибиотиков связан именно с расщеплением  $\beta$ -лактамной структуры и ацилированием гидроксильной группы серина в активном центре ферментов-мишеней.

В случае пенициллиназ  $\beta$ -лактамное кольцо также расщепляется, и антибиотик быстро освобождается из активного центра этих ферментов с присоединением атома водорода и гидроксильной группы.

В настоящее время пенициллиназы составляют обширную группу одинаковых по механизму действия, но отличающихся по субстратной специфичности ферментов, объединенных под общим названием « $\beta$ -лактамазы».

Чаще всего лекарственная устойчивость связана со способностью микроорганизмов вырабатывать ферменты, инактивирующие антибактериальные препараты.

Характерным примером такой устойчивости является способность  $\beta$ -лактамаз (пенициллиназ) бактерий гидролизовать  $\beta$ -лактамные структуры пенициллинов и цефалоспоринов. В результате разрыва  $\beta$ -лактамной связи антибиотика утрачивают свою специфическую активность в отношении микроорганизмов.

$\beta$ -лактамазы бывают широкого спектра действия, расщепляющие пенициллины и цефалоспорины, и узкого – активные в отношении только одной группы этих антибиотиков. Пенициллиназы грамположительных микроорганизмов служат индуцируемыми ферментами, поэтому их биосинтез начинается только в момент контакта бактерии с  $\beta$ -лактамами. При этом пенициллиназа высвобождается из бактериальных клеток и инактивирует антибиотик в межклеточном пространстве.

В то же время  $\beta$ -лактамазы грамотрицательных бактерий детоксицируют антибиотик в периплазматическом пространстве. Таким путем они инактивируют проникшие через наружную мембрану  $\beta$ -лактамы еще до того, как антибиотик связался с ферментами, участвующими в синтезе клеточной стенки.



Пенициллиназы резистентных грамотрицательных микроорганизмов синтезируются конститутивно и постоянно находятся в периплазматическом пространстве.

Известно, что  $\beta$ -лактамазы произошли от транспептидаз и D,D-карбоксипептидаз пептидогликана, т.е. из ферментов-мишеней в бактериальной клетке, необратимо инактивируемых  $\beta$ -лактамами.

Гены  $\beta$ -лактамаз, локализуются как в бактериальной хромосоме, так и в плазмидах, которые не находятся под строгим регуляторным контролем в клетке, как хромосомный генетический материал, и могут существовать во многих копиях, что повышает количество генов  $\beta$ -лактамаз и уровень самих ферментов в клетке. Между хромосомами и плазмидами нередко происходит обмен генами, в частности  $\beta$ -лактамаз.

Важно, что гены  $\beta$ -лактамаз, локализованные в плазмиде, могут передаваться при конъюгации вместе с плазмидой в другую клетку. Это означает, что плазмидные гены быстро распространяются по клеточной популяции, для чего не нужно даже деления клеток.

Кроме того, возможен и межвидовой перенос плазмидных генов  $\beta$ -лактамаз, например, из клетки кишечной палочки в клетку сальмонеллы и т.п.

Классификация, свойства и механизм действия пенициллиназ.  $\beta$ -лактамазы могут быть как конститутивными (у одних штаммов бактерий), так и индуцибельными (у других штаммов). В некоторых случаях в одной клетке могут оказаться две разных  $\beta$ -лактамазы. Причем одна из них образуется постоянно, т.е. конститутивно, тогда как другая обнаруживается, когда клетка попадает в среду с  $\beta$ -лактаманым антибиотиком.

Способность к индукции  $\beta$ -лактамаз является отрицательным свойством  $\beta$ -лактаманых антибиотиков с позиций медицинской практики, поэтому новые  $\beta$ -лактаманые структуры оцениваются при изучении их свойств не только на устойчивость к ферментативной инактивации, но и на способность индуцировать  $\beta$ -лактамазы. Причем последняя зависит от того, с какой мишенью, т.е. с каким из RVPs связывается  $\beta$ -лактаманый антибиотик, т.к. именно RVPs являются «сенсорами», запускающими сложный механизм индукции  $\beta$ -лактамаз.

Схематически этот механизм выглядит следующим образом:  $\beta$ -лактаманый антибиотик, находящийся в среде, реагирует с одним из белков, принадлежащих к RVPs. Его взаимодействие с белком приводит к изменению конформации этого белка, изменяются биофизические параметры белка, сигнал об этом передается на специальный трансмембранный белок, молекула которого пересекает цитоплазматическую мембрану и выходит на ее внешнюю поверхность.

Затем сигнал последовательно передается на первый и второй цитоплазматические белки, включенные в систему индукции ферментов и, наконец, на белок-репрессор, уже непосредственно регулирующий экспрессию именно гена  $\beta$ -лактамазы.

В результате репрессор перестает подавлять экспрессию данного гена, соответственно, начинаются его экспрессия и синтез молекул информационной РНК (иРНК), которая далее поступает в рибосомную систему, где на ней как на матрице синтезируются молекулы  $\beta$ -лактамазы.

Система индукции  $\beta$ -лактамаз специфична: на своем начальном участке РВРs являются первичными сенсорами в отличие от других белков мембраны, а на конечном участке – белок репрессор специфичен только для гена  $\beta$ -лактамазы.

Ингибиторы  $\beta$ -лактамаз. Среди  $\beta$ -лактамных антибиотиков обнаружены активные и малоактивные индукторы  $\beta$ -лактамаз, которые применяют для использования в клинической практике.

Перспективными методами в борьбе с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами служит использование соединений, подавляющих определенные механизмы резистентности в бактериальной клетке. Наиболее значимые успехи в данном направлении достигнуты в результате применения неконкурентных ингибиторов  $\beta$ -лактамаз, например, клавулановой кислоты. Она обладает слабой антибактериальной активностью, поэтому как антибактериальный препарат ее не используют. Основным ее свойством является способность необратимо ингибировать пенициллиназы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Эта кислота проявляет синергизм в отношении  $\beta$ -лактамазообразующих возбудителей в комбинации с ампициллином, амоксициллином, тикарциллином, цефалексином и другими  $\beta$ -лактамными антибиотиками. В настоящее время разработаны и применяются в клинической практике комплексные препараты на основе амоксициллина и клавулановой кислоты.

Производные пенициллановой кислоты также можно использовать в качестве ингибиторов  $\beta$ -лактамаз. К другим эффективным ингибиторам пенициллиназ относят оливановые кислоты и тиенамицины, которые, помимо защиты антибиотика от воздействия ферментов, обладают широким антимикробным спектром действия.

Ввиду несомненного сходства многих  $\beta$ -лактамаз с их ферментами-мишенями, был предпринят поиск специфических ингибиторов  $\beta$ -лактамаз.

Среди природных  $\beta$ -лактамов и продуктов их химической трансформации были отобраны ингибиторы  $\beta$ -лактамаз, воздействующие на  $\beta$ -лактамазы и на транспептидазы пептидогликана, т.е. обладающие антибактериальной активностью.

Практическая ценность ингибиторов  $\beta$ -лактамаз обусловлена тем, что их применяют совместно с  $\beta$ -лактамными антибиотиками, чувствительным к  $\beta$ -лактамазам. При этом ингибиторы  $\beta$ -лактамаз защищают данные антибиотики от ферментативной инактивации.

Однако, следует учитывать, что любой конкретный ингибитор не может воздействовать на все многочисленные типы  $\beta$ -лактамаз. Спектр действия каждого ингибитора ограничен  $\beta$ -лактамазами нескольких типов, распространенных среди бактерий.

За рубежом выпускаются смесь полусинтетического пенициллина (ампициллина) с сульбактамом в соотношении 2:1 под фирменным названием «уназин», а также препарат сультамициллин – химическое соединение ампициллина с сульбактамом.

Кром того, получил практическое применение и препарат аугментин, представляющий собой смесь амоксициллина (полусинтетического пенициллина) с клавулановой кислотой.

При выборе комбинаций ингибиторов  $\beta$ -лактамаз с  $\beta$ -лактамными антибиотиками следует иметь в виду и соблюдать следующее условие: фармакокинетика ингибитора и антибиотика должна быть сходной, т.е. их распределение по органам и тканям организма, пути выведения (например, преимущественно с мочой или с желчью), время их циркуляции в организме должны быть близкими.

Ингибитор не сможет осуществлять свою защитную функцию, когда его концентрация в местах локализаций антибиотика окажется низкой или, если он будет выводиться из организма значительно быстрее, чем антибиотик.

### **Пенициллинацилаза (пенициллинамидаза)**

В настоящее время большое практическое значение имеет полусинтетический способ получения аналогов природного пенициллина. В данном случае исходным продуктом служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК).

6-АПК получают в результате биосинтеза в результате развития *Penicillium chrysogenum* при отсутствии предшественника в среде или путем ферментативного дезацилирования бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина при участии пенициллинацилазы (пенициллинамидазы).

Второй способ получения 6-АПК является более перспективным. В данном случае используется иммобилизованная пенициллинацилаза, которая гидролизует бензилпенициллин с образованием 6-АПК и фенилуксусной кислоты.

Сама по себе 6-АПК обладает очень низкой антибиотической активностью. В этой связи, ее подвергают химическому ацилированию и получают аналоги пенициллина с улучшенными или новыми свойствами (оксациллин, ампициллин, метициллин, амоксициллин и др.). Всего в настоящее время используется около 40 таких лекарственных препаратов.

Пенициллинацилаза образуется различными группами микроорганизмов, в том числе и всеми микроскопическими грибами, продуцирующими пенициллин. В настоящее время предложен способ получения иммобилизованных клеток *E. coli* с высокой пенициллинацилазной активностью, пригодных для многократного использования в технологическом процессе.

Пенициллинацилаза была открыта, как катализатор гидролиза амидной связи в антибиотиках пенициллинового ряда. Данный фермент относится к классу гидролаз, подклассу амидогидролаз и является представителем семейства N-концевых нуклеофильных гидролаз.

Пенициллинацилаза была обнаружена в бактериях, дрожжах и низших грибах.

Физиологическая роль этого фермента до конца не ясна. По-видимому, он служит для утилизации гетероциклических соединений в качестве источника углерода.

Изучение пенициллинацилазы осуществляется более 40 лет.

По типу гидролизуемого субстрата пенициллинацилазы классифицируются на 3 класса. Ферменты класса I осуществляют предпочтительный гидролиз пенициллина V, а ферменты классов II и III – пенициллина G и ампициллина, соответственно. Ферменты класса II, в свою очередь, подразделяются на два подкласса: IIa и IIb. Относящиеся к ним пенициллинацилазы гидролизуют ароматические и алифатические амиды, соответственно. Для двух пенициллинацилаз G (класс IIa) известны трехмерные структуры, в том числе и для фермента из *E. coli* (EcIIA).

На практике данный фермент нашел широкое применение в производстве 6-АПК – основного сиитона для получения  $\beta$ -лактамных антибиотиков. Кроме того, пенициллинацилаза применяется непосредственно для биосинтеза различных полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда. Такие свойства пенициллинацилазы, как широкая субстратная специфичность, высокие регио-, хемо- и стереоселективность позволяют ее использовать для получения оптически-чистых соединений (они все больше используются в фармацевтическом производстве), а также для защиты гидроксильных и аминок групп в пептидном и тонком органическом синтезе.

Наиболее широко на практике применяется пенициллинацилаза, выделенная из *E. coli*. Среди других пенициллинацилаз этот фермент изучен наиболее полно. Однако, эффективность катализируемого EcIIA ацильного переноса на  $\beta$ -лактамные ядра недостаточна для того, чтобы полностью вытеснить устаревшие методы химического синтеза антибиотиков данного класса.

Помимо этого, в настоящее время очень остро стоит проблема распространения антибиотикорезистентности у патогенных штаммов микроорганизмов, в связи с чем возникает задача получения новых антибиотиков из неприродных субстратов. В этой связи, задача получения новых мутантных форм данного фермента с улучшенными синтетическими характеристиками по отношению к неприродным субстратам имеет большое практическое и фундаментальное значение. Другой, не менее важной и актуальной задачей является повышение стереоселективности пенициллинацилазы в реакциях ацилирования аминок спиртов или гидролиза их N-ацильных производных, т.к. значение стереоселективности для аминок спиртов на порядок ниже, чем для аминокислот, что недостаточно для практических целей.

Для решения указанных задач могут быть использованы различные подходы, например, изменение свойств ферментов методами неупорядоченного (направленная эволюция, геновая мозаика и т.п.) или направленного мутагенеза. В настоящее время все более широкое применение находит последний подход. Однако, он требует наличия трехмерной структуры фермента, кото-

рая может быть получена экспериментально (рентгеноструктурный анализ, ЯМР) или с помощью компьютерного моделирования. Другой подход состоит в поиске аналогичных ферментов с необходимыми свойствами. При этом наилучшие результаты обеспечивает комбинация обоих подходов для решения одной и той же задачи.

Другим перспективным ферментом этого же класса является пенициллинацилаза, выделенная из грамотрицательных бактерий *Alcaligenes faecalis*. Данный фермент является одним из самых термостабильных из всех известных бактериальных пенициллинацилаз. При этом он обладает более широким рН-оптимумом активности, смещенным в щелочную область. Кроме того, для данного фермента характерны некоторые отличия в спектре субстратной специфичности. Из всех известных пенициллинацилаз G он обладает самой высокой специфичностью по отношению к бензилпенициллину, а его специфичность по отношению к амиду D-фенилглицина на порядок выше, чем у фермента, выделенного из *E. coli*.

Получены данные, что пенициллинацилаза, выделенная из *A. faecalis*, обладает более высокими каталитическими характеристиками при кинетическом разрешении рацемических смесей ряда оптических изомеров. Однако, систематических исследований по изучению механизма действия, структуры, стабильности данного фермента и его белковой инженерии не проводилось.

Кроме того, очень актуальной проблемой является создание отечественного штамма – продуцента рекомбинантной пенициллинацилазы из *A. faecalis*, поскольку все три известные на настоящее время нуклеотидные и аминокислотные последовательности этого фермента запатентованы.