

Занятие семинарского типа №2

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Ферменты как биокатализаторы в биотехнологическом производстве витаминных и белковых препаратов

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 функционировать 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 классифицируются 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 данную 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 клеток осуществляется гидролиз белков, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот. Известно более 200 ферментов данного 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, обладающие 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. Данные 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 неббиологическими 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. Высокая специфичность действия ферментов обусловлена конформационной и электростатической комплементарностью между молекулами субстрата и фермента, а также 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. Это объясняется 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 одного 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, например, 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 CO_2 только от L-аспаргиновой кислоты с ее превращением 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, чувстви-

тельны к изменениям температуры. Однако, вследствие белковой природы фермента термическая денатурация при повышении температуры будет уменьшать эффективную концентрацию фермента с соответствующим снижением скорости реакции. В этой связи, термолабильность является одним из специфических свойств ферментов, отличающих их от неорганических катализаторов. При температуре 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 ряда других ферментов доказано существование прямой зависимости между скоростью инактивации фермента и степенью денатурации белка. На термолабильность 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 узкого диапазона концентраций водородных ионов, соответствующего 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 своем оптимальном диапазоне значений 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, их 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 цеха по получению биохимических препаратов из органов убойных животных.

Из ферментов растительного происхождения наиболее широко используют амилазы и папаин. Папаин – это растительная протеаза, содержащаяся 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). Кроме того, из растительного сырья выделяют 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, однако при этом возникают проблемы с консервированием и хранением данного 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 биосинтеза, 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 БАВ является сложным и длительным процессом.

Использование методов геной и клеточной инженерии открывает новые возможности использования микроорганизмов в качестве продуцентов ферментов.

Усиление признака биосинтеза ферментов микроорганизмами или приобретение способности биосинтеза 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.

Производственная 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 биосинтеза основного фермента;
- ✓ максимально уменьшать время культивирования и доводить до минимума ингибирующее действие метаболитов на активность фермента.

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

По мнению специалистов, количество 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 биосинтеза ряда метаболитов растут на очень бедных по химическому составу питательных средах, например, базидиальные грибы, образующие лигнин-окисляющие ферменты.

Первым этапом при выборе продуцентов ферментов является их выделение 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 являются типичными местами 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. Алкалофильные культуры преобладают в местах, богатых известью и в нейтральных почвах. Однако в некоторых случаях ацидофилы и алкалофилы 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. При этом отбор осуществляется различными методами. Широко применяются селективные среды, одним из компонентов которых является субстрат фермента, продуцент которого селекционируют. Так, например, 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 является важным шагом 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 культуры *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 α -амилазы и протеазы. Причем, если протеазу синтезируют все без исключения варианты, то α -амилазу M-вариант не синтезирует. Морфологический вариант R синтезирует α -амилазу и одну протеазу, P и S – α -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, γ -лучей, быстрых нейтронов), ультрафиолетовых лучей, этиленimina, 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 α -амилаз и протеаз.

Под действием мутагенных факторов, как правило, изменяется скорость ферментообразования, 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.

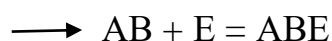
Основная функция любого катализатора, в том числе и фермента, снижение энергетического барьера. Катализатор ускоряет химическую реакцию, находя «обходные пути», позволяющие молекулам преодолевать энергетический (активационный) барьер на более низком энергетическом уровне.

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

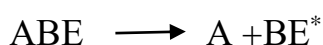
Таким образом, в присутствии биокатализатора (фермента) более значительная часть молекул данной популяции вступает в реакцию в единицу времени.

Условно ферментативный процесс можно подразделить на три стадии:

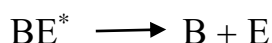
1. Стерическое связывание субстрата с активным центром – образование фермент-субстратного комплекса (на примере реакции $AB \longrightarrow A+B$):



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, фенобар-

битал приводит к значительному (в 3–5 раз) увеличению содержания микросомального фермента цитохрома P-450, играющего важную роль в метаболизме фенobarбитала 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.



Биосинтез 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 соединяться 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 биосинтеза 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. 2 представлена схема аллостерического ингибирования фермента:

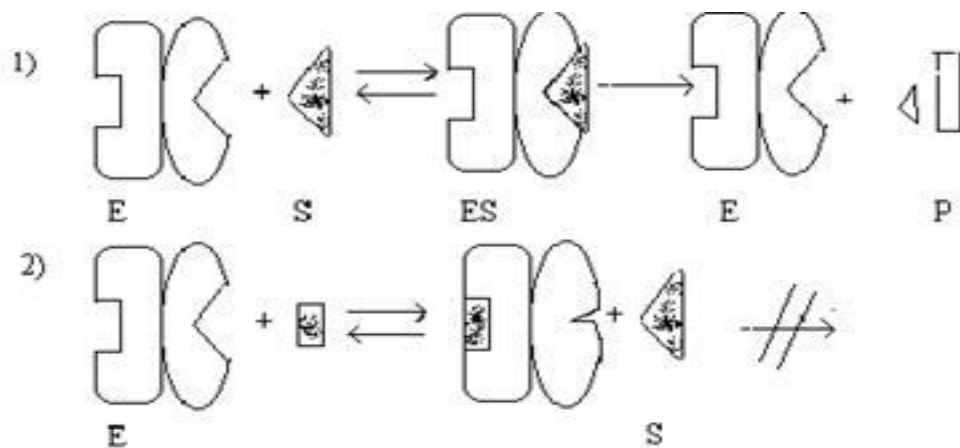
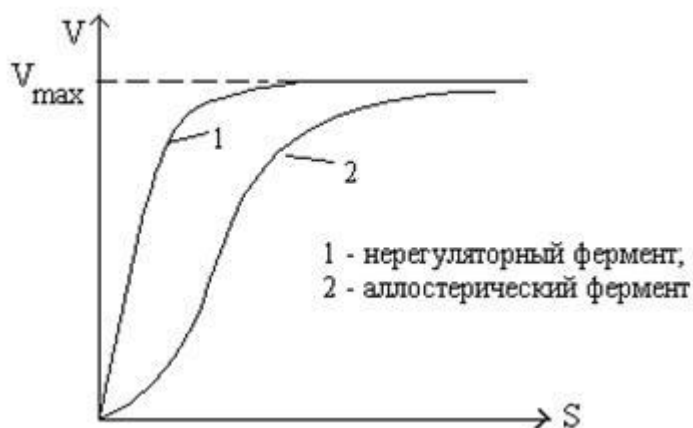


Рис. 2. Схема аллостерического ингибирования фермента

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.

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

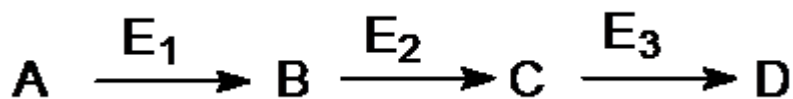


Ингибирование по принципу обратной связи

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_1 , E_2 , E_3 , при высоких концентрациях D обычно наблюдается ингибирование превращения A в B. При этом D действует как отрицательный аллостерический

эффиктор фермента или ингибитор, действующий по принципу обратной связи.



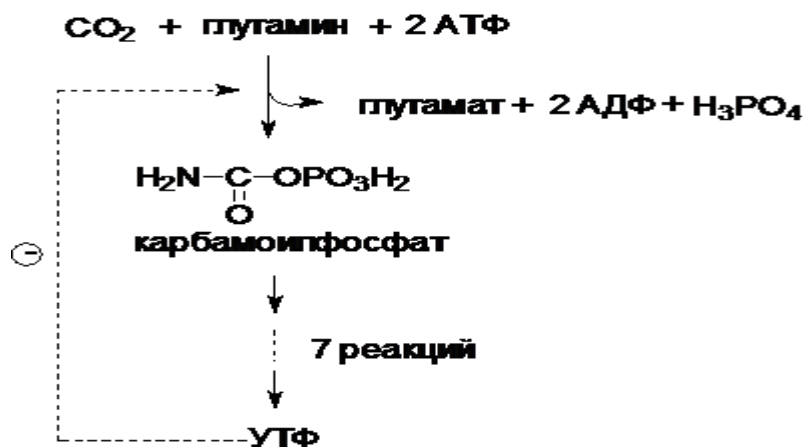
В кинетическом плане ингибирование по принципу обратной связи может быть конкурентным и неконкурентным.

Часто ингибитор, действующий по принципу обратной связи, является последней малой молекулой перед биосинтезом макромолекулы (например, нуклеотид в биосинтезе 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 биосинтеза УТФ (уридинтрифосфата).

Метаболический путь биосинтеза 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 (биосинтез 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 компартиментализация метаболизма.

4. Биотехнология ферментных препаратов

Биотехнологическое производство ферментов реализуется двумя способами – поверхностным и глубинным.

Твердофазная поверхностная ферментация заключается в выращивании продуцента на поверхности тонкого слоя твердой сыпучей среды.

Глубинная ферментация в жидкой среде может быть реализована как в условиях периодического процесса, так и с применением проточных систем.

При поверхностной ферментации для получения инокулята споровый материал размножают поверхностным способом или выращивают музейную культуру в условиях глубинной жидкой культуры. Далее посевной материал направляют на стадию ферментации, которая осуществляется на поверхности сыпучей среды в металлических лотках или вертикальных перфорированных с обеих сторон кюветах.

Культура развивается на поверхности твердой рыхлой среды, основу которой составляют пшеничные отруби, зерновая шелуха, являющиеся источником ростовых веществ. Для разрыхления среды в отруби добавляют древесные опилки (5–10%), овсяную шелуху.

Смесь перед автоклавированием увлажняют до 20–40% влажности и подкисляют для улучшения условий стерилизации. Прогрев сыпучей среды осуществляют острым паром в специальных стерилизаторах при непрерывном перемешивании среды; длительность процесса – 60–90 минут при 105–140 °С.

В охлажденную до температуры 30 °С среду вносят стерильные термолабильные компоненты, инокулят (0,02–0,1% от массы среды), быстро перемешивают ручным способом и раскладывают в лотки слоем 2–3 см, которые устанавливают в герметичные аэрируемые камеры, предварительно простерилизованные.

Исходная влажность среды – 58–60%, температура культивирования – 28–32 °С, длительность ферментации около 36–48 ч.

В течение первых 10–12 ч происходит прорастание конидий при температуре 28 °С. В последующие 14–18 ч реализуется быстрый рост мицелия, в этот период потребляется основное количество питательных веществ из питательной среды при максимальном термогенезе. Аэрация становится максимальной (до 60 объемов стерильного воздуха на объем камеры/ч).

Для предотвращения высыхания конидий в результате повышения температуры влажность воздуха повышают практически до 100%.

Вследствие больших расходов воздуха принята его рециркуляция. Циркулирующий воздух проходит через систему охлаждения и используется повторно; отработанная часть после очистки на волокнистых фильтрах выбрасывается в атмосферу. В этот период скорость образования фермента достигает максимальных значений. В последующие 12–18 ч процессы метаболизма ослабевают, но биосинтез ферментов еще продолжается. Мицелий обволакивает и прочно скрепляет твердые частицы культуральной среды, поэтому для

нормального транспорта и окисления веществ среда должна быть достаточно рыхлой и влажной.

Эффективный транспорт кислорода из газовой фазы и растворение в среде происходит при условии хорошей аэрируемости довольно тонкого слоя твердой сыпучей среды. Это приводит к необходимости использования больших объемов производственных площадей.

Поверхностный метод ферментации является экстенсивным методом с большой долей ручного труда. При этом, однако, он не энергоемок и обеспечивает более высокий выход целевого продукта на единицу массы питательной среды, в сравнении с глубинной ферментацией.

Поверхностная ферментация с использованием вместо лотков кювет более совершенна. Такая конструкция обеспечивает более эффективную аэрацию и позволяет частично механизировать процесс. Следует отметить, что применяемые в промышленности колонные аппараты объемной аэрации еще более улучшают процесс твердофазной ферментации. Такой аппарат разделен на секции перфорированными пластинами, закрепленными на поворотных осях. Среда в ходе ферментации разрыхляется с помощью вращающихся перемешивающих устройств. Это позволяет увеличить высоту слоя до 30 см. Режим перегрузки среды на тарелках задается автоматически. Производительность аппарата достигает 1 т культуры в сутки.

После завершения стадии ферментации выросшая культура представляет собой корж (пек) из набухших частиц среды, плотно связанных разросшимся мицелием. Данную массу измельчают с помощью дробилок различного типа (барабанно-зубчатых, шнековых, молотковых) до частиц размером 5–6 мм. Для предотвращения инактивации ферментов массу подсушивают до остаточной влажности около 10–12%.

Технические препараты ферментов, используемые в текстильной, кожевенной промышленности, упаковывают в бумажные многослойные крафт-мешки и отправляют потребителю.

Процедура получения очищенных активных препаратов ферментов сложна и многоэтапна.

Важнейшим нормируемым показателем выпускаемых ферментных препаратов является активность, которая выражается в микромолях субстрата, прореагировавшего под действием 1 мл ферментного раствора или 1 г препарата в оптимальных для протекания ферментативной реакции условиях за 1 минуту.

Существует понятие активности условного ферментного препарата. Данная единица рассчитывается по активности основного фермента в стандартном условном препарате. За активность условного стандартного препарата принимают его среднюю устойчивую активность, достигаемую в производственных условиях.

Глубинный способ микробиологического получения ферментов отличается рядом преимуществ, в сравнении с поверхностным способом ферментации, так как проходит в контролируемых условиях ферментации, исключает ручной труд, позволяет автоматизировать процесс.

Питательная среда для ферментации готовится, исходя из физиологических потребностей используемой микробной культуры, а также из типа целевого фермента. Основным углеродным сырьем служат различные сорта крахмала (кукурузный, пшеничный, картофельный), кукурузный экстракт, свекловичный жом, а также глюкоза, мальтоза, декстрины.

В качестве источника азота применяют органические соединения (гидролизаты казеина или микробных биомасс), а также минеральные соли (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Для биосинтеза целлюлолитических ферментов источником углерода служит хлопок, солома, целлюлоза; липолитических – липиды.

На предферментационной стадии технологическое оборудование и питательная среда подвергаются стерилизации. После охлаждения среды до температуры 30 °С в нее вносят выращенный инокулят (2–5% от объема производственной культуры).

Процесс проводят в цилиндрических аппаратах объемом до 100 м³. Биосинтез фермента в глубинной культуре протекает в течение 3–4 суток при непрерывной подаче стерильного воздуха, стабилизации значения рН и температуры среды на строго определенных уровнях. Незначительные изменения значений данных параметров могут вызвать многократное снижение ферментативной активности.

Динамика образования биомассы и выхода фермента α -амилазы на основе культуры *Aspergillus*: в течение первого периода (24–30 ч) мицелий бурно развивается и идет быстрое потребление легкоусвояемого субстрата. Далее в питательную среду вносят индуктор. После этого начинается интенсивный биосинтез целевого фермента. Периодически в питательную среду вносят стерильный пеногаситель, добавку углеродного субстрата, раствор для коррекции и стабилизации значения рН.

Процесс образования биомассы продуцента не совпадает во времени с максимумом продукции фермента, при этом условия для образования фермента могут существенно отличаться от условий для оптимального режима биосинтеза биомассы. В этой связи, условия среды в ходе протекания процесса ферментации контролируются и изменяются.

Известны стадийные процессы в двух последовательных аппаратах. В первом создают условия для развития мицелия; во втором – для биосинтеза и накопления фермента.

Кроме того, на промышленном уровне реализованы проточные режимы, например, для получения глюкозоизомеразы с использованием бактериальной культуры *Bacillus coagulans*. Ферментацию проводят при дефиците глюкозы и кислорода в среде (глюкозоизомераза ингибируется кислородом); максимальная продуктивность сохраняется длительное время, до 200 ч.

После завершения ферментации для предотвращения инактивации ферментов культуральную жидкость охлаждают до температуры 3–5 °С и направляют на обработку. После отделения мицелия культуральную среду освобождают от грубых взвешенных частиц и концентрируют под вакуумом или подвергают ультрафильтрации.

В связи с термолабильностью многих ферментов процессы обработки ведут при контролируемых, часто пониженных температурах. Глубокая очистка ферментов приводит к существенной потере активности препаратов и также очень дорогостояща. Более того, высокоочищенные белки менее стабильны в сравнении с неочищенными. В этой связи, при использовании растворимых ферментов редко пользуются полной очисткой. Тем более что в зависимости от сферы применения требования к чистоте ферментных препаратов различны.

Так, ряд ферментных препаратов, получаемых при поверхностной ферментации, выпускают в виде высушенных отрубей с остатками мицелия, а также высушенных осадков белков или высушенных растворов.

Товарные формы таких препаратов известны в виде сухих препаратов или растворов ферментов. Последние хранят при отрицательных температурах, с применением стабилизаторов (соли кальция или магния, а также хлорид натрия, сорбит, бензоат и др.).

Для получения очищенных препаратов ферментов применяют различные методы (осаждение солями или органическими растворителями, высаливание, сорбционную и хроматографическую очистку с использованием высокоселективных ионитов). Процесс завершается стадией высушивания на распылительных или вакуумных аппаратах в щадящем температурном режиме, не допускающем больших потерь активности ферментов. После стандартизации продукт направляется потребителю.