

## Занятие семинарского типа № 5

**ТЕМА ЗАНЯТИЯ:** Ферменты медицинского назначения. Стадии биотехнологического производства ферментов.

### УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

#### 1. Возможности применения ферментов

В фармацевтической биотехнологии существенное место занимают лекарственные препараты, отличающиеся высокой избирательностью действия. В настоящее время с успехом используют ферментные препараты разного назначения для заместительной терапии, терапии ряда заболеваний, дезинфекции и заживления ран, рассасывания тромбов, при терапии воспалительных процессов и в клинической диагностике. Особое значение ферментативные методы приобретают при диагностике заболеваний сердца, печени и некоторых видов злокачественных новообразований.

#### Сферы применения ферментов

Негидролитические ферменты (оксиредуктазы, лиазы, изомеразы, лигазы) применяются сравнительно редко.

Наиболее широкое применение получили гидролазы микробного происхождения (гликозидазы, протеиназы, липазы), взаимодействующие с пептидами, гликозидами и другими соединениями с участием воды. Гликозидазы катализируют гидролиз гликозидных соединений. Так, крахмал гидролизуют амилазы, продуцентами которых являются разные микроорганизмы (*Bacillus*, *Aspergillus*); декстраназа, взаимодействующая с гликозидными связями декстрана, синтезируется *Penicillium purpurogenium*; пуллоназа, гидролизующая пуллан, гликоген, декстрины, продуцируется бактериями *Klebsiella*; инвертаза синтезируется многими представителями рода *Aspergillus*; целлюлолитические ферменты, являющиеся сложным комплексом активных белков, воздействуют на разные участки молекулы целлюлозы. Фитопатогенные грибы *Fusarium oxysporum* и *Erwinia* образуют пектинолитические ферменты; анаэробные бактерии *Clostridium felsineum* продуцируют полигалактуроназу и пектинэстеразу. Очень разнообразны протеиназы, катализирующие разрыв пептидных связей белков с образованием пептидов и свободных аминокислот. Протеиназы различных микроорганизмов (*Aspergillus*, *Actinomyces*, *Clostridium*, *E. coli*) существенно различаются своими свойствами. Продуцентами липаз, осуществляющих гидролиз триацилглицеролов с образованием жирных кислот и глицерина, являются микроорганизмы родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Candida*. Фосфокиназы, синтезируемые бактериями *Clostridium* и *Bacillus*, расщепляют сложные связи между жирными кислотами, глицерином и фосфатидной кислотой.

История применения ферментов уходит корнями в далекое прошлое. Некоторые ферменты, содержащиеся в природных растительных материалах, издавна использовались человеком для получения пива, спиртных напитков, производства хлеба и кисломолочных продуктов. Практика, основанная на коллективном опыте людей, намного опередила получение знаний и разработку научных основ для создания данных технологических процессов. Промышленное получения ферментных препаратов из природного растительного сырья стало зарождаться только в конце XIX в., а эра современной инженерной энзимологии насчитывает около 30 лет. Тем не менее, ферменты настолько широко вошли в нашу жизнь и настолько широко применяются в разных промышленных отраслях, что представить без них существование сегодня не представляется возможным. Промышленное получение и применение ферментов в разных технологических процессах составляет один из важнейших разделов новейшей биотехнологии.

Основной функцией ферментов является их способность резко повышать скорость химических реакций, осуществляемых каждую секунду во всех живых системах. Кроме того, ферменты являются регуляторами скорости химических реакций, строго контролируя синтез и распад индивидуальных химических компонентов клетки и всего организма в целом. Благодаря этому свойству ферментов, живые системы сохраняют постоянство внутренней среды (гомеостаз). Ферменты выполняют важные защитные функции, обезвреживая экзогенные и эндогенные токсичные вещества, подвергаясь под их действием окислению, восстановлению и, наконец, распаду на продукты, утрачивающим свои токсические свойства. Эта область исследований получила название ксенобиохимия.

Кроме того, ферменты используются в качестве инструментов для осуществления тонкого органического синтеза в легкой, пищевой, микробиологической и фармацевтической промышленности (производство кормового белка, антибиотиков, антибиотиков и др.), а также в генно-инженерных исследованиях.

К настоящему времени получены убедительные доказательства, что современная биотехнология базируется на достижениях энзимологии, а возможности применения ферментов теоретически безграничны. В частности, четко определились три основные направления исследований в области энзимологии: энзимопатология, энзимодиагностика и энзимотерапия.

Область исследований энзимопатологии призвана изучать молекулярные основы развития патологического процесса, основанного на нарушениях механизмов регуляции активности или синтеза индивидуального фермента или группы ферментов.

Другое направление научных исследований в области энзимологии – энзимодиагностика – призвано заниматься разработкой ферментных тестов, основанных на определении активности (уровня) ферментов и изоферментов в биологических жидкостях организма (сыворотка крови, желудочный или дуоденальный сок, моча и др.). Эти исследования развиваются в двух направлениях: 1) по пути поиска органотропных или тканетропных ферментов, специальных для определенного органа, группы органов или целостного организма; 2) по пути совершенствования уже известных методов определения активности ферментов в биосредах. Диагностическая энзимология достигла огромных успехов, помогая врачу не только в постановке правильного диагноза заболевания и выяснения степени тяжести болезни, но и в выборе правильного метода лечения. В настоящее время разработаны количественные методы анализа многих распространенных ферментов, выявляемых в биологических жидкостях при поражении разных органов. Для каждого из этих ферментов определены контрольные величины (уровни) активности и пределы колебания в норме, как в сыворотке крови, так и в органе. Диагностическая ценность ферментов существенно повысилась после внедрения в клиническую практику методов определения изоферментов, различающихся электрофоретической подвижностью, хотя и наделенных одинаковой биологической активностью.

Обладая высокой специфичностью действия, ферменты применяются также в качестве самых тонких и избирательных инструментов в направленном воздействии на течение любой патологии, т.е. в качестве эффективных лекарственных препаратов (энзимотерапия) при инфекционных, неинфекционных и наследственных заболеваниях.

Основные источники ферментов – ткани и органы животных, растения и микроорганизмы. По экономическим и технологическим соображениям получать ферменты микробиологическим путем более выгодно, чем из растительных и животных источников, т.к. микробные клетки содержат или продуцируют более 2000 видов ферментов, катализирующих биохимические реакции, связанные с ростом, дыханием и образованием продуктов. Многие из этих ферментов могут быть легко выделены, и после этого они проявляют свою активность независимо от клетки.

Номенклатура ферментных препаратов, производимых в результате микробиологического синтеза, постоянно расширяется, а масштабы производства микробных ферментов на основе экономичного сырья практически не ограничены.

Высокоочищенные ферменты являются одной из важных групп биохимических реактивов, без которых невозможно проведение научно-исследовательских работ в области молекулярной биологии и генной инженерии. Кроме того, эти препараты входят в различные диагностические наборы, предназначенные для серийных анализов.

В настоящее время крупными производителями ферментов являются США, Япония и Франция. В США ферменты производят более 20 фирм, ежегодно выпускающие свыше 32000 т ферментных препаратов; в Японии – более 56000 т ферментных препаратов 60 наименований (из них 26 % предназначено для целей пищевой промышленности, 23 % – текстильной, 38 % – сельского хозяйства, остальные – для разных потребителей). В России расширяется выпуск ферментов разных наименований, основными сферами применения которых являются пищевая, мясная, текстильная, кожевенная промышленность и сельское хозяйство. Применение ферментных препаратов в указанных отраслях промышленности во много раз ускоряет производственные процессы, обеспечивает более экономичное использование сельскохозяйственного сырья, увеличивает выход продукции высокого качества. При этом достигаются существенное снижение себестоимости продукции и улучшение показателей использования основных и оборотных средств. Так, обработка ферментными препаратами мяса позволяет увеличить выход высших сортов с 13–15 до 25–27 % от его общего веса. Применение ферментов в кожевенной промышленности в 5 раз сокращает длительность процессов очистки, обезвоживания и смягчения кожи, на 25–30 % увеличивает выход шерсти и улучшает ее качество. Введение ферментов в корма для животных в количестве 0,01–0,03 % от сухого вещества рациона увеличивает привесы скота на 5–10 %, птицы – на 10–20 %, при этом затраты кормов на получение единицы привеса снижаются на 6–12 %.

Предприятия РФ выпускают ряд технических ферментных препаратов: амилосубтилин и протосубтилин (*Bacillus subtilis*), пектофоетидин (*Aspergillus foetidus*), мальтаваморин (*Aspergillus awamori*), амилоризин (*Aspergillus oryzae*), глюконигрин (*Aspergillus niger*), протолихенин (*Bacillus licheniformis*), представляющие собой комплексные ферментные препараты, из которых можно выделить в высокоочищенном состоянии основной фермент, а иногда и 1–2 сопутствующих. Однако количество ферментов, полученных таким путем, не превышает 10 (нейтральная и щелочная протеазы,  $\alpha$ -амилаза, глюкоамилаза, пектиназа, целлюлаза и др.). Эти ферменты относятся к внеклеточным. Для получения высокоочищенных внутриклеточных ферментов такой способ непригоден. Возможен только направленный биосинтез целевого фермента отобранным штаммом-продуцентом с последующим целенаправленным его выделением различными методами.

О степени концентрирования и очистки ферментного препарата свидетельствует цифра и его наименование, стоящая перед индексом «х». Индекс «2х» означает, что препараты ферментов получены в виде концентрированных сиропов, освобожденных от нерастворимых веществ. Сухие ферментные препараты имеют в наименовании индекс «3х». Ферментные препараты с индексами «2х» и «3х» относятся к техническим. Препараты ферментов, очищенные разными методами, обозначаются индексом «10х», а фракционированные – «15х». Высокоочищенные, но не кристаллические ферментные препараты, содержащие до 25 % балластных веществ и полученные методом концентрирования на ультрафильтрационных установках с последующей сушкой в распылительных сушилках, в зависимости от степени очистки обозначаются индексами «20х» и «30х». Так, например, название препарата «протосубтилин Г20х» означает, что он содержит протеолитические ферменты, полученные при глубинном культивировании *Bacillus subtilis*, очищен, сконцентрирован ультрафильтрацией и высушен в распылительной сушилке.

## 2. Свойства и классификация ферментов

Ферментами (энзимами) называют белки с каталитическими свойствами, или, более точно, специфические белки, которые находятся во всех клетках и тканях организма и выполняют роль биологических катализаторов. Вещества, подвергающиеся под действием ферментов разнообразным химическим превращениям, называются субстратами.

Характерной особенностью ферментов, отличающей их от других катализаторов, является чрезвычайно высокая активность. Ферменты проявляют исключительно высокую ферментную активность, подчас превосходящую активность катализаторов небиологического происхождения в  $10^{10}$ – $10^{15}$  раз. Так, одна молекула каталазы (фермент, катализирующий разложение пероксида водорода на воду и атомарный кислород) способна расщепить в одну минуту до пяти миллионов молекул перекиси водорода. При сравнении каталитических способностей каталазы и иона железа в этой реакции установлено, что 1 мг каталазы эквивалентен по действию 2 г железа.

Ферменты обладают высокой специфичностью, т.е. действие каждого фермента строго ограничено одним субстратом или несколькими, родственными по структуре. Благодаря этому они ускоряют определенные реакции, не влияя на скорость других.

В отличие от других катализаторов, ферменты «работают» в мягких условиях: при низкой (близкой к комнатной) температуре и атмосферном давлении, в почти нейтральных водных растворах.

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

I. 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.

II. 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.

III. Гидролазы катализируют реакции гидролиза. Они широко распространены в растительном и животном мире. С их помощью в лизосомах клеток осуществляется гидролиз белков, жиров, сахаров, нуклеиновых кислот. Известно более 200 ферментов этого класса.

IV. 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.

V. Изомеразы. Природные полимеры обладают способностью вращать ось поляризованного света вправо и влево, что определяется зеркальным пространственным расположением атомов в молекуле. Данное явление известно как энантиметрия 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.

VI. 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.

### **3. Источники 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 генной инженерии создает идеальную возможность отбора ферментов практически для всех конкретных технологии или других целей;

- ✓ возможно получение ферментов с особенными 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*, *Phanerochaetu chrisosporium* 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. Алкалофильные культуры преобладают в местах, богатых известью и в нейтральных почвах. Однако в некоторых случаях ацидофилов и алкалофилов 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.



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

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.

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.



#### 4. Биотехнологическое получение ферментативных препаратов

Биотехнологическое получение ферментов включает большую подготовительную работу: очистку и стерилизацию технологического воздуха, посуды, аппаратов и оборудования; подготовку и стерилизацию питательной среды; выращивание посевного материала. Засев производственной питательной среды и выращивание микроорганизмов-продуцентов ферментов производят в ферментере. Культивирование микроорганизмов осуществляют в основном глубинным способом в жидкой питательной среде при строго определенном значении рН среды, времени и температуры.

#### Стадии биотехнологического процесса получения ферментов

##### 4.1. Приготовление и стерилизация питательной среды

Для приготовления питательных сред в микробиологической промышленности используют сырье минерального, животного и растительного происхождения, а также синтезированное химическим путем. Вещества, входящие в состав питательной среды, обеспечивающие развитие культуры и биосинтез целевых продуктов, не должны содержать вредных примесей.

При выборе сырья для приготовления питательной среды необходимо учитывать его себестоимость, т.к. в микробиологическом синтезе БАВ важное значение имеет стоимость исходных веществ и материалов.

Кроме того, очень важен качественный и количественный состав питательных сред. Так, большинство видов плесневых грибов *Aspergillus* хорошо растут на простой синтетической среде Чапека с сахарозой и нитратом, а для синтеза амилазы сахарозу следует заменить крахмалом и увеличить концентрацию углерода и азота в среде. При этом активность фермента возрастает в 3 раза. Добавление аминокислот в виде экстракта солодовых ростков повышает выход фермента в 4–5 раз. Оптимизируя состав питательной среды, можно повысить активность амилазы более чем в 500 раз (табл. 1).

Таблица 1

Влияние состава питательной среды на синтез  $\alpha$ -амилазы в глубинной культуре *Aspergillus oryzae*

Состав питательной среды	Активность, ед./100 мл
Среда Чапека с 3 % сахарозы и 0,05 % азота	20
Среда Чапека с 6 % крахмала и 0,15 % азота	60
То же + 10 мл экстракта солодовых ростков	250–300
То же + 40 мл экстракта солодовых ростков	500–550
Концентрация компонентов (С, N, S, P) в 1,5 раза при оптимальной аэрации	1000–1100

При подборе состава питательной среды учитывают все факторы: вид и концентрацию источника углерода и энергии, факторы роста, минеральные элементы, индуцирующие субстраты. В качестве источников углерода и азота чаще всего применяют различное природное органическое сырье: крахмал, кукурузный экстракт, соевую муку, гидролизаты дрожжевых биомасс. Кроме источников углерода, азота и факторов роста, большое влияние на синтез ферментов оказывают минеральные соли магния, марганца, кальция, железа, цинка, меди и др., многие, из которых входят в состав ферментов.

Питательные среды готовят в сырьевом или рецептурном цехе по периодическому или непрерывному методу в специальных реакторах, снабженных мешалками. В отдельных случаях их приготовление и стерилизацию осуществляют непосредственно в ферментере.

На современных предприятиях применяют, как правило, непрерывный метод приготовления питательных сред. С этой целью используют два резервуара: в один вводят исходные вещества, из другого жидкость поступает в смеситель непрерывного действия, а затем при помощи насоса подается в колонну для стерилизации, наряду с которой используются паровые инжекторы или теплообменник труба в трубе.

При работе с вертикально установленной стерилизационной колонной питательную среду подводят снизу в пространство между трубами. В верхнюю часть колонны вводят пар под давлением 0,3–0,4 МПа.

Если для стерилизации питательных сред применяют высокую температуру (135 °С и более) и объем выдерживания не превышает нескольких десятков литров, то при этом вместо резервуаров используют систему вертикально закрепленных труб.

Теплообменники пластинчатого типа используют для нагрева и охлаждения среды, процесс стерилизации в них легко автоматизируется.

Выбор аппаратуры, технологии приготовления и стерилизации питательной среды зависит от количества и вида компонентов, которые предварительно растворяют в подогретой или горячей воде. Если по степени растворимости и стерилизации это возможно, то все компоненты растворяют в одном растворе в определенной последовательности. В противном случае их растворяют по группам исходных веществ, исходя из их физико-химических свойств, стерилизуют и соединяют в смесителе. Если питательную среду стерилизуют в небольших количествах, весь объем среды доводят до 120 °С непосредственно в ферментере или специальных котлах-стерилизаторах, выдерживают 30–60 мин. (в зависимости от объема среды и ее состава) при 120 °С, а затем охлаждают до 27–30 °С.

#### **4.2. Приготовление посевного материала**

Штаммы-продуценты ферментов биотехнологические предприятия получают из академий и университетов в пробирках на скошенном агаре или в ампулах. Каждая культура снабжена паспортом с подробным описанием морфологии, характеристики среды для культивирования и хранения.

Перед началом технологического процесса культуру продуцента размножают в стерильных условиях на оптимизированной по составу питательной среде при соблюдении режима выращивания (рН среды, температура, продолжительность). С поверхности скошенного агара её стерильно переносят в колбу объемом 100–200 мл и инкубируют в термостате. Длительность каждой стадии выращивания составляет 24 ч. Дальнейшее размножение посевного материала проводят в 2 этапа: в цехе чистой культуры и в отделе инокуляции. Аппараты первого этапа выращивания обычно называют инокуляторами, а второго – посевными ферментерами.

Промышленные формы микроорганизмов-продуцентов ферментов чаще всего представляют собой мутантные формы, фузанты или трансформанты, поэтому большое число их генераций в процессе выращивания может привести к снижению продуктивности за счет преимущественного развития генетически нестабильных клеток.

Ввиду отсутствия универсальных рекомендаций (каждая промышленная культура имеет свои особенности), схема подготовки инокулята обычно включает следующие этапы:

- ✓ культуру из пробирок, чашек Петри или в лиофилизированной форме высеивают в колбы емкостью от 150 мл до 1 л, содержащие питательную среду, чаще всего аналогичную той, которая используется на всех последующих этапах культивирования, в том числе и в терминальном ферментере;

- ✓ после достижения культурой экспоненциальной фазы роста ее пересеивают в небольшие ферментеры (30–500 л);

✓ после достижения стационарной фазы роста (для прокариот – 8–20 ч, для эукариот – 20–50 ч), культуру переносят в другие, более крупные, ферментеры (1–5 м<sup>3</sup>), а затем в терминальный (производственный) ферментер емкостью 25–100 м<sup>3</sup>.

Обычно в производственных условиях объем инокулята составляет 5–10 %, реже – 15 % от объема производственного ферментера.

Процесс переноса инокулята для терминальной ферментации требует особого внимания. На каждом этапе необходим тщательный контроль культуры. Еще одна серьезная опасность заключается в инфицировании культуры специфическим бактериофагом. Фаголизис проявляется в резком замедлении роста культуры и понижении продуктивности.

### 4.3. Ферментация

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 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 и 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 ее перемешивании; продолжительность процесса – 60–90 мин. при температуре 105–140 °С. В охлажденную до 30 °С среду вносят стерильные термолabile 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 камеры, предварительно простерилизованные. Исходная влажность среды – 58–60 %, температура культивирования – 28–32 °С, продолжительность ферментации – около 36–48 ч.

В течение первых 10–12 ч происходит прорастание конидий при 28 °С. В последующие 14–18 ч осуществляется быстрый рост мицелия, в этот период потребляется основное количество питательных веществ из среды при максимальном термогенезе. Уровень аэрации становится максимальным (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 регуляция. 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 синтез ферментов еще продолжается. Мицелий обволакивает и прочно скрепляет твердые частицы среды, поэтому для нормального транспорта и окисления веществ среда должна быть достаточно рыхлой и влажной. Эффективный транспорт кислорода из газовой фазы и его растворение в среде происходит при условии хорошей аэрируемости тонкого слоя твердой сыпучей среды, что приводит к необходимости использования больших объемов производственных площадей. Другая проблема при

данном способе ферментации – отвод тепла и поддержание постоянной температуры во всей среде. Поверхностный метод ферментации является экстенсивным методом с большой долей ручного труда. Однако он не энергоемок и обеспечивает более высокий выход продукта на единицу массы среды по сравнению с глубинным способом.

Поверхностная ферментация с использованием вместо лотков кювет более совершенна. Данная конструкция обеспечивает более эффективную аэрацию и позволяет частично механизировать процесс. Применяемые 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, что 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 разного 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 и кожевенной промышленности, упаковывают в бумажные крафт-мешки и отправляют потребителю. Процедура получения очищенных препаратов ферментов сложна и многоэтапна.

Глубинный способ микробиологического получения ферментов имеет ряд преимуществ по сравнению с поверхностным, т.к. проходит в контролируемых условиях, исключает ручной труд и позволяет автоматизировать процесс.

Питательная среда для ферментации готовится, исходя из физиологических потребностей используемой культуры, а также из типа целевого фермента. Основным углеродным сырьем служат разные сорта крахмала (кукурузный, пшеничный, картофельный), кукурузный экстракт, свекловичный жом, а также глюкоза, мальтоза, декстрины. В качестве источника азота применяют органические соединения (гидролизаты казеина) и минеральные соли ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

На предферментационной стадии технологическое оборудование и питательная среда подвергаются стерилизации. После охлаждения среды до 30 °С в нее вносят выращенный инокулят (2–5 % от объема производственной культуры). Процесс проводят в цилиндрических аппаратах вместимостью до 100 м<sup>3</sup>. Синтез фермента в глубинной культуре протекает в течение 3–4 сут. при непрерывной подаче стерильного воздуха, стабилизации рН и температуры среды на строго определенных уровнях. Незначительные изменения значений этих параметров могут привести к многократному снижению ферментативной активности.

В течение первого периода (24–30 ч) мицелий бурно развивается и происходит быстрое потребление легкоусвояемого субстрата. Далее в среду вносят в индуктор. Затем начинается интенсивный синтез целевого фермента. Периодически в среду вносят стерильный пеногаситель, добавку углеродного субстрата, раствор для коррекции и стабилизации величины рН среды.

Процесс накопления биомассы продуцента не совпадает во времени с максимумом продукции фермента, при этом условия для образования фермента могут существенно отличаться от условий для оптимального режима накопления биомассы. В этой связи условия среды в ходе ферментации контролируются и изменяются. Известны процессы, реализуемые в двух последовательных аппаратах: в первом создают условия для развития мицелия; во втором – для биосинтеза и накопления фермента. На промышленном уровне реализованы проточные режимы, например, для получения глюкоизомеразы с помощью бактериальной культуры *Bacillus coagulans*. Ферментацию проводят при дефиците глюкозы и кислорода в среде (глюкоизомераза ингибируется кислородом); максимальная продуктивность сохраняется длительное время до 200 ч.

Ферментацию прекращают, когда в среде накапливается максимальное количество целевого продукта.

#### **4.4. Выделение и очистка целевого продукта**

##### **Предварительная обработка культуральной жидкости**

После окончания ферментации культуральную жидкость охлаждают до 3–5 °С с целью обеспечения стабильности продукта и предотвращения развития посторонней микрофлоры. Затем культуральную среду перекачивают в резервуары, из которых она подается на дальнейшую переработку. После отделения мицелия культуральную среду освобождают от грубых взвешенных частиц и концентрируют под вакуумом или подвергают более глубокой очистке.

Для отделения биомассы от культуральной жидкости обычно используют сепараторы, центрифуги, фильтр-прессы, вакуум-барабанные фильтры, ротационно-вакуумные фильтры, отстойники и т.п. Выбор оборудования для проведения данной стадии зависит от масштаба ферментации, типа клеток, свойств культуральной жидкости и места локализации ферментов.

Стадия предварительной обработки культуральной жидкости в некоторых производствах ферментов включает стадию разрушения клеток и клеточных стенок с помощью гомогенизаторов высокого давления, ультразвука, химической и ферментационной обработкой.

##### **Выделение и очистка фермента**

В связи с термолабильностью многих ферментов процессы обработки осуществляют при строго определенных, контролируемых, часто пониженных температурах. Глубокая очистка ферментов приводит к существенной потере их активности и, как правило, очень дорогостояща. Кроме того, высокоочищенные белки менее стабильны по сравнению 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. Их товарные формы известны в виде сухих препаратов или растворов ферментов. При этом последние хранят при отрицательных температурах с применением стабилизаторов (соли кальция или магния, натрия хлорид, сорбит и др.). Для получения очищенных препаратов ферментов применяют разные 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 целевой продукт направляется потребителю.

Стадия выделения и очистки включает ряд процессов: от обработки нативного раствора до сушки готового продукта. После центрифугирования биомассу получают в виде густой жидкости или пасты. Клеточную массу промывают, фильтруют, сушат, гидролизуют и экстрагируют из нее фермент. Если фермент находится в растворе, биомассу после отделения применяют как побочный продукт, а нужное вещество выделяют из раствора осаждением, фильтрацией, экстракцией и т.п.

Для получения высокоочищенного фермента применяют высаливание, диализ, электродиализ, мембранную фильтрацию, гель-фильтрацию, ионообменную и аффинную хроматографию, а также сорбционные методы.

Концентрирование растворов, содержащих ферменты, осуществляют лиофилизацией, вакуум-выпариванием, вымораживанием.

## Методы очистки ферментных препаратов

Сорбция на неорганических гелях. В качестве сорбентов применяются гели фосфатов кальция, гидроксида алюминия, реже – древесный уголь или гель гидроксида цинка. Сорбцию на гелях осуществляют в слабокислых растворах (рН 5,0–6,0) при низкой ионной силе (концентрация солей 0,01–0,05 М). При более высоких концентрациях солей сорбция менее эффективна, поэтому необходимо увеличивать количество геля. Белковый раствор диализуется или обессоливается методом гель-фильтрации. Процесс сорбции заканчивается быстро, после перемешивания суспензии геля с раствором белка. Важно подобрать оптимальные соотношения между количеством геля и белкового раствора. Нередки случаи, когда при использовании малого количества геля фермент не сорбируется, а при его увеличении сорбция появляется. По-видимому, в первом случае все активные сорбционные центры занимают белки, наиболее активно взаимодействующие с гелем. При этом из раствора удаляется часть неактивных белков. На последующей порции геля сорбируется и выделяемый фермент. В каждом конкретном случае экспериментально подбирают оптимальные соотношения геля и ферментного раствора.

Гель, содержащий сорбированный фермент, отделяют от раствора, в котором остались неактивные белки, путем центрифугирования. Плотность неорганических гелей значительно превышает плотность водородных ионов, поэтому они легко оседают и часть надосадочного раствора можно удалить сифонированием. Это значительно уменьшает количество центрифугируемой жидкости.

Центрифугирование осуществляется при небольших ускорениях (1000–2000 g) в течение 10–15 мин. Слой геля отмывается от включенных, но несорбированных белков, путем его 2–3-кратного суспендирования в исходном буферном растворе.

С целью десорбции фермента из отмытого геля, последний суспендируется в небольшом объеме буферного раствора повышенной ионной силы (концентрация солей 0,1–0,3 М) и с более высоким значением рН (7,5–8,5). Суспензия выдерживается в течение 1 ч, после чего осадок отделяется центрифугированием. Элюацию повторяют 3–4 раза, и после проверки удельной активности наиболее активные экстракты объединяют. Осадив неорганические гели на инертные крупнопористые носители (целлюлозу), процессы сорбции – элюации можно осуществить в колоночном режиме. Сорбция при этом идет быстрее и выпадает стадия центрифугирования.

Ультрафильтрация. Сущность метода заключается в том, что на раствор, помещенный на полупроницаемой мембране, действует давление, превышающее осмотическое, и молекулы растворителя из раствора начинают переходить в растворитель. Основным элементом ультрафильтрационной системы – полупроницаемая мембрана.

В качестве материала для мембран используют ацетатцеллюлозу, полиуретан, поливиниловый спирт и др. Толщина мембраны обычно достигает 100–200 мкм, диаметр пор варьирует в широком диапазоне – от 2,5 до 1000 нм.

Выбор ультрафильтра зависит от размеров молекул концентрируемого вещества. В практике концентрирования ферментных растворов чаще всего используют мембраны «Millipore» (США). В России ацетатцеллюлозные мембраны «Владипор» изготавливает ВНИИ синтетических смол (г. Владимир).

Скорость и селективность процесса ультрафильтрации зависят от наружного давления и гидродинамических условий в аппарате ультрафильтрации, температуры, состава фракционируемой смеси и ее концентрации.

При прохождении растворителя через ультрафильтр, у его поверхности возрастает концентрация растворенных веществ. Это концентрационная поляризация, уменьшающая эффективность ультрафильтрации из-за локального увеличения осмотического давления. Если происходит превышение точки растворимости, образующийся осадок может забить поры ультрафильтра и сделать невозможным дальнейшее осуществление процесса.

Концентрационную поляризацию уменьшают, постоянно перемешивая концентрируемый раствор или создавая его поток у поверхности мембран.

При использовании мембран соответствующей пористости быстро и с большим выходом целевого продукта концентрируются разные растворы ферментов. Вследствие того, что для ферментов применяют крупнопористые мембраны, то вместе с водой через мембрану проходят и растворившиеся соли. В связи с этим концентрация солей в концентратах не увеличивается. При правильном подборе ультрафильтров можно избавиться от низкомолекулярных белков и в значительной степени повысить чистоту концентрируемых ферментных препаратов.

Преимущества данного метода заключаются в: исключении денатурации белка, т.к. процесс не сопровождается фазовыми превращениями при различных температурах; возможности одновременного концентрирования и очистки от минеральных и низкомолекулярных органических веществ; незначительных затратах энергии; простоте устройства и эксплуатации ультрафильтрационных установок.

Недостатком ультрафильтрации является эмпирический подход к подбору мембран.

#### Виды ультрафильтрационных установок:

1) Плоскокамерные многосекционные аппараты типа фильтр-пресс: в них разделительный мембранный элемент состоит из двух плоских мембран, между которыми расположен пористый дренажный материал. Элементы располагаются на небольшом расстоянии друг от друга, в результате между ними образуются межмембранные каналы, по которым разделяемая смесь циркулирует и после концентрирования выводится из аппарата. Фильтрат, прошедший через мембрану, отводится по дренажному материалу в коллектор. Для турбулизации потока раствора между элементами устанавливаются сетку-сепаратор.

2) Ультрафильтрационная установка с трубчатыми фильтрующими элементами состоит из набора пористых дренажных трубок диаметром 5–20 мм, на внутренней или наружной поверхности которых расположены мембраны. В этой связи исходный поток направляют в трубное или межтрубное пространство.

3) Ультрафильтрационная установка с рулонной укладкой мембран: в них мембранный элемент имеет вид пакета; три его кромки герметизированы, а четвертая прикреплена к перфорированной трубке для отвода пермеата, на которую накручивается пакет вместе с сеткой-сепаратором. Разделяемый поток движется в осевом направлении по межмембранным каналам, а пермеат – спиралеобразно по дренажному материалу и поступает в отводящую трубку. Аппараты данного типа отличаются высокой плотностью упаковки мембран (300–800 м<sup>2</sup>/м<sup>3</sup>), но сложнее плоскокамерных в изготовлении. Они используются в установках средней и большой производительности.

1) Ультрафильтрационные аппараты с мембранами в виде полых волокон: в них рабочий элемент обычно представляет собой цилиндр, в который помещен пучок полых волокон с наружным диаметром 80–100 мкм и толщиной стенки 15–30 мкм. Разделяемый раствор, как правило, омывает наружную поверхность волокна, а по внутреннему каналу выводится пермеат. Благодаря высокой плотности упаковки мембран (до 20000 м<sup>2</sup>/м<sup>3</sup>), эти аппараты отличаются высокой производительностью (десятки тыс. м<sup>3</sup>/сут).

Фракционирование белковых растворов нейтральными солями. Растворимость белков зависит от величины молекул белка, степени их гидратации и ионной силы солевых растворов. Растворяясь, соль связывает воду, и, таким образом, изменяет степень гидратации молекул белка, чем обусловлена их агрегация и образование осадка. При этом, если величина рН фракционируемого раствора равна изоэлектрической точке осаждаемого фермента, то его молекулы агрегируют наиболее легко, т.к. между ними отсутствует электростатическое отталкивание. При этом температура, как правило, поддерживается минимальной.

Серноокислый аммоний – соль, часто используемая для фракционирования растворов белка, что объясняется рядом ее свойств: хорошей растворимостью, легкой

кристаллизуемостью, стабилизирующим эффектом по отношению ко многим ферментам. Обычно выход ферментов при фракционировании данной солью составляет 100 %.

Фракционирование можно проводить несколькими способами. Сухая соль добавляется непосредственно в раствор белка. Количество добавленной соли выражается степенью насыщения. Принято считать, что 100 % насыщение составляет 715 г сернокислого аммония в 1 л раствора. Если в растворе содержится меньшее количество соли, то, соответственно, будет меньшее насыщение, выражаемое в % или долях от 100 % насыщения. Фракционируя ферменты сухим сернокислым аммонием, нужное количество соли находят по таблицам, номограммам или расчетным путем.

Белковые растворы можно функционировать, применяя насыщенный раствор сернокислого аммония. При этом отпадает стадия растворения соли, поэтому растворы быстро перемешиваются. Подачу раствора можно автоматизировать. Однако при использовании насыщенного раствора соли возрастает объем фракционируемой жидкости. Особенно значительно увеличение объема в случае, когда нужно достигнуть высокой степени насыщения.

Интересен способ ступенчатого растворения осадка белка. Осадок суспендируется в растворах с постепенно уменьшающейся концентрацией соли, и при определенном насыщении выделяемый фермент переходит в раствор.

Фракционирование белка органическими растворителями. При смешивании органических растворителей с водой уменьшается диэлектрическая константа последней, изменяется степень гидратации белковых молекул, вплоть до замены молекул воды молекулами органического растворителя. Все это облегчает взаимодействие между отдельными молекулами белка и ускоряет образование нерастворимых агрегатов.

Обычно для фракционирования растворов ферментов применяется этиловый спирт и ацетон – вещества, хорошо смешивающиеся с водой. При повышенной температуре (выше 4 °С) в водно-органических смесях ферменты денатурируют, в связи с чем работы с органическими растворителями обычно проводятся при низких температурах. Органический растворитель охлаждается до -30 – -40 °С при помощи сухого льда или жидкого азота. Температура смеси с помощью охлаждающих веществ поддерживается на уровне -10 – -15 °С. Постоянная подача органического растворителя осуществляется через несложную систему, состоящую из сообщающихся сосудов. После введения нужного количества органического растворителя смесь в течение нескольких часов выдерживается при температуре -15 – -20 °С, чтобы образовавшийся осадок укрепился. Осадок отделяется центрифугированием при 15000–20000 g, затем растворяется в небольшом объеме буферного раствора, и по возможности быстро удаляются следы органических растворителей путем диализа или ультрафильтрации через гель. Эффективность фракционирования органическими растворителями зависит от концентрации солей и белков, рН раствора и др. Если во фракционируемом растворе много солей, рекомендуется удалить их диализом.

Хроматографическое фракционирование ферментов. Для хроматографического фракционирования в препаративном или лабораторном масштабе необходим набор оборудования, состоящий из хроматографических колонок, емкостей для хранения и сбора жидкостей, соединительных шлангов, насосов, коллекторов фракций, измерительных и регистрирующих приборов. Для выделения большого количества фермента применяются более крупные колонки и более мощные насосы. Кроме того, необходимы емкости для приготовления и регенерации сорбентов. В лабораторной практике используются колонки с внутренним объемом от нескольких мл до нескольких л. Данные хроматографии регистрируют на самописце. Для фракционирования большого количества белков имеются колонки объемом от десятков до нескольких сот литров. Маленькие колонки, в которых помещается несколько мл сорбента, требуют небольших элюирующих и коллекторных емкостей. При препаративном выделении ферментов в лабораторных условиях применяются колонки, вмещающие 100–1000 мл сорбента.



Эксплуатация таких колонок требует десятков литров промывающих и элюирующих буферов. При этом очищенных (гомогенных) ферментов удается получить до 10 мг. Для выделения значительного количества высокоочищенных ферментов необходимы колонки, вмещающие десятки или сотни литров сорбента. Оперирование большим количеством сорбентов и растворов способствовало решению вопроса о механизации и автоматизации процесса.

Другой важный аспект создания хроматографических процессов – подбор наиболее пригодного способа фракционирования и материалов. В лабораторной практике фракционирования белковых смесей при получении высокоочищенных ферментов наиболее часто используется ионообменная и аффинная хроматография, а также гель-фильтрация.

Ионообменная хроматография. Данный метод основан на обмене ионами между твердой фазой сорбента и раствором. Следует отметить, что ранее синтетические иониты не получили широкого применения в очистке ферментов из-за малой пористости и сорбционной емкости, гидрофобности матриц, приводившей к необратимой сорбции и денатурации фракционируемых белков. Лишь в последнее десятилетие снова возник интерес к таким ионитам, т.к. удалось увеличить их пористость, а также регулировать гидрофобность матрицы и использовать гидрофобный эффект для увеличения фракционирующей способности сорбента. В качестве таких сорбентов применяются полиакрилаты фирмы «Bio-Rad Laboratories» (США) и сфероны фирмы «Lachema» (Чехия). В нашей стране созданы сорбенты на основе сополимеров метакриловой кислоты с разными гидрофобными мономерами, которые оказались эффективными при очистке ряда ферментов. В последние годы при хроматографическом фракционировании учитываются как ионные (электростатические), так и гидрофобные эффекты, в связи с чем синтетические иониты стали называть ионогидрофобными или сорбентами комбинированного действия. Они характеризуются высокой пористостью, большой емкостью, хорошими гидродинамическими и механическими свойствами. До сих пор в препаративной энзимологии используются иониты, созданные на основе натуральных или полусинтетических полисахаридных матриц. Это ионообменные целлюлозы, введенные в практику очистки ферментов в 1955 г. Среди множества производных целлюлозы наиболее часто применяются: ДЕАЕ-, ТЕАЕ-, КМ-фосфоцеллюлозы. Первые две – аниониты, последние – катиониты. С технологической точки зрения особенно привлекательна гранулированная целлюлоза, гидродинамические свойства которой позволяют проводить хроматографический процесс с большой скоростью.

Работа с ионитами требует их тщательной отмывки кислотами, щелочами и стартовым буфером. Ионогенные группы заряжаются нужным противоионом, что обычно осуществляется многократным отмыванием сорбента в подходящих емкостях. Только после перевода сорбента в нужную форму его загружают в колонку и уравнивают стартовым буфером.

Фракционируемая смесь белка должна быть подготовлена так же тщательно. Для этого проводятся диализ, ультрафильтрация или гель-хроматография. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки. Диализ, осуществляемый в целлофановых мешочках, длится 36–46 ч. В течение этого времени возможна инактивация выделяемого фермента. Ультрафильтрация через полупроницаемые мембраны с применением внешнего давления требует наличия специальных ячеек и частой замены растворителя. Гель-фильтрация – наиболее быстрый метод, однако не всегда применим из-за возможной денатурации части белков смеси при изменении ионной силы или рН, в результате чего выводится из строя гель-фильтр.

Фракционируемый раствор белков наносится на ионит, где распределяется на 2 фракции. Белки, заряд которых не позволяет им в избранных условиях образовывать стабильную связь с сорбентом, остаются в движущейся жидкости и удаляются из колонки при ее промывании стартовым буфером. Для того, чтобы правильно подобрать условия

сорбции, необходимо знать рН белков фракционированной смеси и выделяемого фермента. После полного удаления из колонки несорбированных белков начинается элюация сорбированных ферментов путем ступенчатого или градиентного изменения ионной силы или рН элюирующего раствора. Ступенчатая элюация проводится с помощью набора элюирующих растворов, которые различаются концентрацией солей или рН и подаются в колонку один за другим. Градиент элюирующего раствора создается системой из двух или более сообщающихся сосудов. Профиль градиента можно изменять, специально подбирая геометрию сосудов и их количество. После вымывания из колонки функционально активных белков элюация прекращается. Последний этап хроматографического цикла – регенерация сорбента. Задача состоит в том, чтобы полностью удалить из сорбента неактивные белки, пигменты и другие сорбированные вещества. Для этого ионит промывается щелочами, водой очищенной, кислотами и опять водой. Иногда для полного удаления пигментов требуется промывка органическими растворителями и детергентами. После полного удаления этих веществ колонка уравнивается стартовым буфером и готова к следующему циклу хроматографического фракционирования. Ионитная колонка может служить долго, если после каждого хроматографического цикла осуществляется полная регенерация.

Гель-хроматография – метод фракционирования смесей ферментов, имеющих различный размер молекул. В основе метода лежит неравномерное распределение веществ в водных растворах, разделенных полупроницаемой мембраной. Часть воды окружена такой мембраной со всех сторон, в результате чего она неподвижна. Вода, находящаяся по другую сторону мембраны, движется относительно неподвижной мембраны. Проницаемость мембраны для каждого из веществ смеси определяется величиной молекулы. В связи с этим гель-хроматографию иногда называют молекулярным просеиванием.

Для фракционирования крупномолекулярных смесей применяются сефадексы (модифицированное производное линейного полисахарида полидекстрана, синтезируемого *Leuconostoc mesenteroides*), агароза, декстраны, поперечноштитые акриламиды. Гранулы агарозы создаются путем охлаждения ее растворов. Под действием мочевины, органических растворителей и др., водородные связи агарозы в гранулах разрушаются. В настоящее время начали производить агарозу в поперечноштитом состоянии (сефарозы CL 2В, 4В и 6В). В результате этого гель стал механически и химически устойчивым. Поперечноштитые акриламиды агарозы под названием ультрагелей производит фирма LKB (Швеция). В поперечноштитых агарозах хроматографический процесс можно осуществлять в широком интервале рН и температуры, использовать буферные растворы, содержащие органические растворители, соли, мочевины, гуанидингидрохлорид. Аналогичными свойствами характеризуются декстраны, поперечноштитые акриламидом сефакрилы. На них можно фракционировать смеси белков с молекулярной массой  $10^5 - 10^7$ .

Наряду с натуральными и полусинтетическими полисахаридными матрицами для гель-хроматографии используются синтетические полиакриламидные гели (ПААГ). Большое количество аминогрупп придает полимеру гидрофобные свойства, в связи с чем он хорошо набухает в воде, образуя пористую структуру геля. Величину пор регулируют, изменяя концентрацию мономера и бифункционального агента. Гранулы формируются путем продавливания набухшего полимера через сито соответствующего димера. Коммерческие препараты ПААГ (биогель Р, акрилекс) выпускаются фирмой «Bio Rad Laboratories» (США). К синтетическим гелям относятся оксиакрилметакрилатные гели-сфероны. Некоторое применение для очистки ферментов получили жесткие, несжимающиеся неорганические гели: пористые силикагели и пористое стекло. Однако их широкому использованию мешает наличие неспецифической сорбции.

Сухой поперечноштитый гель набухает при комнатной температуре или в кипящем буфере. Время набухания зависит от пористости геля и температуры, при которой

проводится процесс. Чем меньше поперечная сшивка геля, тем дольше он набухает. Особенно долго гели набухают при комнатной температуре, причем в конце процесса необходимо удалить пузырьки газов при пониженном давлении. Набухание в кипящем буферном растворе заканчивается быстрее и одновременно удаляются пузыри воздуха.

Заполнение колонки хорошо подготовленным гелем – один из важнейших этапов гель-хроматографии, от правильности проведения которого зависит эффективность фракционирования. Столб сорбента обязательно должен быть вертикальным. После помещения всего набухшего геля в колонку следует создать горизонтальную поверхность, нанося тонкий слой крупногранульного геля или накладывая крупнопористый стеклянный фильтр. Качество загрузки колонки рекомендуется проверять, хроматографируя цветные белки или голубой декстран. О правильном заполнении колонки свидетельствует узкая полоса хроматографируемого вещества во время его прохождения через весь столб сорбента.

Большое влияние на эффективность хроматографического разделения оказывает скорость протекания элюента. Для множества гель-хроматографических материалов с увеличением давления пропорционально возрастает скорость потока. При работе с сефадексом G-200 скорость протекания начинает уменьшаться, если давление превышает 10 см столба воды, что необходимо учитывать уже при заполнении колонки сорбентом.

Эффективность фракционирования смесей белков зависит от геометрии колонки. Соотношение высоты и диаметра колонки обычно равно 50:1 – 20:1, хотя известны случаи, когда это соотношение достигало 100:1 или более. Для того, чтобы снизить столб сорбента, создается система из ряда последовательно расположенных колонок или образец пропускают через одну колонку несколько раз (рециркулярная хроматография). Гель-хроматографию от других методов хроматографического фракционирования смесей белков отличает то, что не требуется специально обессоливать пробу, корректировать pH и не нужны специальные элюирующие буферы. Смесь белков, продвигаясь по сорбенту, освобождается от солей и распределяется в порядке уменьшения молекулярных масс. Белки и другие компоненты смеси с сорбентом не взаимодействуют. Из колонки сначала выходят самые крупные молекулы, потом с меньшими молекулярными массами и, наконец, соли. В большинстве случаев после того, как из сорбента вышли белки и все низкомолекулярные компоненты, колонка пригодна для применения в следующем хроматографическом цикле.

Аффинная (биоспецифическая) хроматография. Начало применения данного метода для фракционирования ферментов положено в 1969 г., когда карбоксипептидаза А была эффективно очищена на агарозе, содержащей связанный тирозин-В-триптофан – аналог субстрата. Впервые было использовано свойство фермента специфически взаимодействовать со своим субстратом.

Сущность метода биоспецифической хроматографии состоит в том, что между одним или ограниченным числом белков, из множества имеющихся во фракционируемой смеси, и полимерным сорбентом образуется довольно стабильная связь, в результате чего эти белки из раствора переходят на нерастворимый сорбент. Чем меньше белков связывает сорбент, тем выше его селективность. Идеальным случаем селективности является связывание одного фермента. Высокая селективность биоспецифических сорбентов обеспечивается тем, что в качестве лигандов используются вещества, специфически взаимодействующие с активным центром выделяемого фермента.

Проблема биоспецифической хроматографии для очистки ферментов заключается в создании сорбентов, селективно связывающих выделяемый фермент. Центром связывания служат присоединительные к полимерным матрицам субстраты, их аналоги, обратимые ингибиторы, коферменты, антитела и др., называемые лигандами.

Основным критерием при подборе лигандов является константа диссоциации комплекса фермент-лиганд ( $K_d$ ), отражающая специфичность взаимодействия. Лигандом не должны быть вещества с  $K_d > 10^4$ , если их концентрация в сорбенте не более  $10^{-3}$  М.

Для создания высокоэффективных сорбентов необходимо использовать лиганды с  $K_d = 10^{-5}$ – $10^{-9}$  М. Этим требованиям обычно соответствуют коферменты, аналоги субстратов и коферментов.

Вторым компонентом биоспецифического сорбента является полимерная матрица, к которой присоединяется лиганд. Матрицей может быть любой полимер, удовлетворяющий следующим требованиям:

- ✓ крупнопористость гелевой структуры, позволяющая крупным молекулам ферментов проникать внутрь структуры и взаимодействовать с расположенными там центрами связывания;

- ✓ гидрофильность структуры, обеспечивающая ее хорошее взаимодействие с водой и отсутствие неспецифического связывания белков по гидрофобным центрам;

- ✓ отсутствие в структуре заряженных групп, исключающее образование неспецифических электростатических связей;

- ✓ способность полимера легко активироваться определенными химическими агентами, позволяющая путем несложных процессов присоединить большое количество лиганда;

- ✓ достаточная химическая, механическая и микробиологическая стабильность, обеспечивающая стабильность во время работы сорбентов.

Указанным требованиям наиболее полно отвечают модифицированные агарозы. Недостатками агароз является их нестойкость к воздействию микроорганизмов, малая механическая прочность и высокая стоимость. В некоторых случаях применяются синтетические полимеры (ПАА, полистиролы, сфероны, крупнопористое стекло, силикагели), основным недостатком которых является наличие неспецифической сорбции, снижающей эффективность хроматографической очистки.

Присоединения лигандов к матрицам достигается путем введения активирующих реактивов бромциана, карбодииминов, эпихлоргидринов и др. Простой и эффективный бромциановый метод имеет 2 недостатка. В сорбенте появляются ионогенные центры, которые могут неспецифически взаимодействовать с разными белками, а связь, образованная между матрицей и лигандом, недостаточно стабильна. С целью улучшения взаимодействия между лигандом, связанным с матрицей, и выделяемым ферментом, лиганд зачастую отдалается от поверхности полимера путем введения вставки.

Строгая специфичность аффинного сорбента к выделяемому ферменту значительно улучшает сам хроматографический процесс, который обычно состоит из последовательно сменяющихся этапов сорбции, удаления несорбированных белков и элюации сорбированного фермента. Условия сорбции подбираются так, чтобы выделяемый фермент сорбировался наиболее полно, а сопутствующие белки, по возможности, не задерживались. Это зависит от рН, ионной силы и природы буферных растворов, температуры. После отмывки сорбента от несорбированных белков резко изменяется один или несколько из указанных параметров, в результате разрушается комплекс фермента с сорбентом и фермент высвобождается. Элюацию сорбированного фермента можно осуществить, добавляя в элюирующий раствор специфически взаимодействующие с ним вещества (субстраты, коферменты, растворимые ингибиторы), что, как правило, повышает эффективность очистки, т.к. специфические агенты не разрушают неспецифических комплексов между сорбентом и сопутствующими белками.

Биоспецифическая хроматография характеризуется высоким выходом и степенью очистки выделяемого фермента. В результате этого на несколько порядков увеличивается эффективность процессов очистки фермента, что позволяет значительно снизить их себестоимость.

Разработка новых, более эффективных хроматографических материалов и оборудования – одна из важнейших задач, от решения которой в значительной мере

зависит эффективность технологии получения высокоочищенных ферментов и себестоимость продукта.

#### **4.5. Получение готовой продукции**

После выделения и очистки фермента его необходимо высушить, т.е. удалить из полученного препарата свободную и связанную воду. Поскольку ферменты термолабильны, для их высушивания используют методы, не приводящие к потере биологической активности.

На современном этапе промышленного получения ферментов используют разные методы обезвоживания лекарственных препаратов. Широкое распространение получила лиофильная (сублимационная) сушка, реализуемая при сравнительно низких температурах. Лиофильная сушка предварительно замороженных в вакууме БАВ – один из современных методов консервирования биопрепаратов. Метод осуществляется в два приема: замораживание и высушивание, при этом влага из замороженного состояния в лекарственном препарате испаряют под вакуумом, минуя жидкую фазу. В процессе сублимации влага перемещается в продукте не в виде жидкости, а в виде пара. В результате удается в максимальной степени сохранить специфические свойства белков и свести к минимуму процессы денатурации. Лиофилизированные биопрепараты сохраняют почти все свои первоначальные свойства и объем, легко растворяются в воде, быстро приобретая исходные качества и внешний вид. При работе с большим количеством раствора, содержащим ферменты, используют распылительную сушку.

Одной из важных операций химической очистки ферментов является кристаллизация. В зависимости от химического строения фермента и его физико-химических свойств применяют следующие методы кристаллизации: выпаривание растворителя (изотермический), охлаждение горячего раствора (изогидрический), одновременное охлаждение и выпаривание (комбинированный), добавление в раствор других веществ, снижающих растворимость (высаливание), вымораживание.

После высушивания лекарственный препарат, в случае его низкой стабильности, необходимо смешивать со стабилизатором или с наполнителем (крахмал, декстрины, неорганические нейтральные соединения, тальк и др.).

Вследствие того, что ферменты являются очень лабильными, легко инактивируемыми соединениями, то именно этим и объясняется специфичность методов их выделения и очистки. Все операции по выделению и очистки ферментов проводят в условиях, исключающих возможность денатурации (низкая температура, строгое ограничение продолжительности операций, контроль за рН, отсутствие примесей солей тяжелых металлов и других соединений, которые могут привести к денатурации фермента).

#### **4.6. Оценка качества выделенного и очищенного фермента**

Оценка качества выделенного и очищенного фермента осуществляется путем определения его гомогенности и активности. О гомогенности фермента судят на основании сопоставления данных по фракционированию фермента разными методами (ультрацентрифугирование, хроматография, гель-фильтрация, электрофорез). Гомогенность фермента должна быть подтверждена несколькими методами, основанных на разных принципах, т.к. в некоторых случаях ферменты, ведущие себя как гомогенные белки при центрифугировании, могут быть разделены методом электрофореза на колонках из крахмала на несколько изоферментов.

По мере очистки активность возрастает и достигает определенного максимального значения, характерного для однородного фермента. Постоянство активности при перекристаллизации также является критерием гомогенности фермента.

## **Методы определения активности фермента**

Характеристикой активности фермента является скорость, с которой он катализирует ту или иную реакцию, измеряемая скоростью превращения субстрата или скоростью накопления продуктов реакции. При определении активности ферментов следует измерять начальную скорость превращения, а не количество субстрата, превращенное за определенный отрезок времени. При этом количество субстрата, превращенное ферментом, надо относить к количеству фермента.

Для определения активности ферментов применяются разные методы:

1) Химический метод: количественное определение субстрата или продуктов, образующихся в результате ферментативных реакций с помощью различных химических реагентов.

2) Спектрофотометрический метод: измерение скорости ферментативной реакции по изменению поглощения субстрата или продукта реакции при характеристической длине волны. Данный метод нашел широкое применение для определения активности оксиредуктаз.

3) Манометрический метод (метод Варбурга): определение количества газа, выделившегося в результате ферментативной реакции. Данный метод используется для определения активности оксидаз (по поглощению кислорода), декарбоксилаз (по выделению углекислого газа) и ряда других ферментов.

4) Поляриметрический метод: фиксируется изменение оптического вращения при протекании ферментативной реакции.

5) Хроматографический метод: количественное определение субстрата или продуктов ферментативной реакции с помощью разных видов хроматографии.

При установлении степени очистки ферментного препарата необходимо рассчитать его удельную активность, характеризующую содержание фермента в исследуемом материале. Под удельной активностью понимают число единиц активности на единицу веса сухого препарата; она выражается числом единиц на 1 мг белка. Концентрация фермента в растворе выражается числом единиц активности на 1 мл.

Активность ферментов поддается регулированию в широких пределах направленным изменением условий среды, ее кислотности, добавками веществ, активирующих или подавляющих фермент.

## **5. Номенклатура ферментных препаратов**

Микробиологическим синтезом для медицинских целей получают следующие ферментные препараты:

✓ солизим – гидролизующий жиры липолитический фермент, который применяется при хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта;

✓  $\alpha$ -амилаза – сахаролитический фермент, гидролизующий крахмал, используется в составе лекарственного препарата «Фестал» при недостаточной функции поджелудочной железы;

✓ террилитин – протеолитический фермент, который рекомендуется для лечения гнойных ран, ожогов, трофических язв;

✓ стрептокиназа – фибринолитический фермент, эффективный при лечении тромбозов;

✓ галактозидаза – сахаролитический фермент, хорошо зарекомендовавший себе при лечении лактазной недостаточности.

Лекарственные формы на основе ферментов характеризуются большим разнообразием – таблетки, капсулы, мази, аэрозоли.

В нашей стране и за рубежом первое место по объему выпускаемых ферментных препаратов занимают протеолитические, наиболее полно изученные среди всех известных

ферментов. Протеазы в числе первых белков были получены в высокоочищенном кристаллическом состоянии. Расшифрована первичная структура таких ферментов, как химотрипсин, трипсин, папаин, субтилизин. К настоящему времени известно 4 класса протеаз: сериновые, карбоксильные, цистеиновые и металлопротеазы. Классификация основана на специфическом строении активных центров этих ферментов, представляющих уникальное сочетание определенных аминокислотных остатков, расположенных в разных точках полипептидной цепи. Для идентификации определенных реакционных групп используют специфические ингибиторы.

Класс сериновых или щелочных протеаз объединяет группу протеолитических ферментов, содержащих в активном центре триаду: аспарагин – серин – гистидин. Специфическими ингибиторами этих ферментов, чья максимальная активность проявляется в диапазоне рН 7,5–12,5, являются фенилметилсульфонилфторид и диизопропилфторфосфат. К щелочным протеазам относятся ферменты из животного сырья: трипсин и химотрипсин, широко использующиеся в медицинской практике для местного и парентерального применения. Их применяют и в виде аэрозолей при воспалительных заболеваниях дыхательных путей (трахеитах, пневмонии), а также в виде внутримышечных инъекций при остеомиелитах, тромбозах и разных формах пародонтоза. По отношению к здоровым тканям эти лекарственные препараты неактивны и безопасны в связи с наличием в этих тканях ингибиторов трипсина. Из различных штаммов микроорганизмов *Bacillus subtilis* выделены и детально изучены внеклеточные щелочные протеиназы. Субтилизины – одни из немногих белков, для которых определена трехмерная структура и построена модель молекулы. Благодаря широкой специфичности действия, эти ферменты гидролизуют до 80 связей в белках. Они обладают эстеразной и амидазной видами активности; стабильны в диапазоне рН 5–10, хотя оптимум действия проявляют при рН 9–10. По механизму действия и субстратной специфичности субтилизины близки к трипсину и химотрипсину, несмотря на отсутствие сходства в их структуре. В биотехнологической промышленности бактериальные щелочные протеазы применяют для гидролиза белков при приготовлении питательных сред для нужд клинико-бактериологических лабораторий.

Основными представителями класса карбоксильных или кислых протеаз являются пепсин, химозин и протеазы из грибов. Первичная структура пепсина расшифрована и включает 300 аминокислотных остатков. Пепсин продуцируется клетками слизистой оболочки желудка в виде зимогена – неактивной формы фермента, которая активируется под действием другого фермента-активатора, отщепляющего в молекуле зимогена аминокислоту с N-конца. В активном центре зимогена содержатся 2 карбоксильные группы аспарагиновой кислоты. Специфическим ингибитором протеаз данного класса является природный пепстатин. Для кислых протеаз характерны некоторые общие признаки: стабильны в кислой среде (рН 2,0–5,0); оптимум действия при рН 1,5–5,0 и быстро инактивируются при нейтральном значении рН. Пепсин и химозин не имеют  $\alpha$ -спиралей, но характеризуются наличием антипараллельной  $\beta$ -структуры. Полагают, что устойчивость кислых протеаз при низких значениях рН связана именно с этой особенностью их вторичной структуры.

Тиолзависимые или цистеиновые протеазы в медицинской практике представляют папаин из дынного дерева, фицин из латекса растений, бромелин из плодов ананаса и ряд ферментов из микроорганизмов. Цистеиновые протеазы содержат в активном центре триаду аминокислот: цистеин – гистидин – аспарагиновая кислота. Активность тиоловых протеаз подавляется специфическими блокаторами сульфгидрильных групп (йодацетатом, йодацетамидом, П-хлормеркурибензоатом, ионами тяжелых металлов). Их максимальная активность проявляется при рН 6,0–9,5. Папаин и химиопапаин устойчивы к термическому воздействию. Отличительная особенность этих ферментов – высокая устойчивость к денатурирующим веществам (в 6–8 М или 70 % метиловом спирте их активность не изменяется). При изучении гидролитической активности показано, что эти ферменты

расщепляют белки глубже по сравнению с ферментами животного и бактериального происхождения. Так, папаин способен гидролизовать практически любые пептидные связи. Кроме пептидных связей тиолзависимые ферменты гидролизуют амидные и эфирные связи. Бромелин, папаин и фицин используются в медицине для лизирования нежизнеспособных некротических тканей при терапии гнойно-воспалительных процессов. В результате энзиматического очищения ран сроки лечения сокращаются в 1,5–2 раза. Бромелин, папаин и фицин применяются в заместительной терапии при нарушении пищеварения и в акушерской практике при выявлении и предотвращении резус-конфликтных ситуаций.

Класс нейтральных или металлопротеаз составляют ферменты в основном микробного происхождения. Нейтральные протеазы в активном центре содержат ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$ . Эффективные при нейтральных значениях pH, металлопротеазы проявляют строго эндопептидазную активность и не расщепляют пептидные связи, образованные аминокислотными остатками со свободной  $\text{NH}_2$ - и  $\text{COOH}$ -группами. Нейтральные протеазы гидролизуют казеин, желатин, яичный альбумин и в отличие от субтилизинов не обладают эстеразным действием. В медицинской практике широко используется террилитин из *Aspergillus terricola* для лечения острых гнойных заболеваний и трофических язв. Ингаляциями террилитином лечат воспалительные процессы в легких. Другая нейтральная протеаза микробного происхождения – коллагеназа применяется в глазной хирургии для рассасывания рубцовой ткани.

#### **6. Частная биотехнология. Биотехнология грибной амилазы**

В производстве грибной амилазы главным компонентом питательной среды является смесь пшеничных отрубей и крахмала, иногда к ним добавляют белковые отходы, солодовые ростки, получаемые при производстве пива, соевую муку и т.п.

Для выращивания производственной культуры компоненты питательной среды смешивают, распределяют тонким слоем в кюветах, увлажняют мицеллярным раствором, содержащим небольшое количество хлористоводородной кислоты, стерилизуют под давлением 0,15 МПа в течение 1 ч или острым паром в течение 30 мин., и затем охлаждают.

В питательную среду, охлажденную до 35 °С, вносят суспензию спор *Aspergillus oryzae*. Стерильную питательную среду, засеянную спорами *Aspergillus oryzae*, в кюветах помещают в камеры для выращивания, в которые подают очищенный стерильный воздух. Через 30–36 ч инкубации культуры *Aspergillus oryzae* в кюветах при температуре 30 °С развивается масса спорообразующего мицелия, которую снимают, высушивают и измельчают для получения сырой амилазы или экстрагируют для получения очищенной амилазы.

Технологический процесс поверхностного культивирования культуры *Aspergillus oryzae* состоит из следующих стадий:

1. выведение (получение и поддержание роста) чистой культуры в лабораторных условиях;
2. приготовление посевного материала в отделении чистой культуры;
3. подготовка питательной среды;
4. выращивание производственной культуры;
5. измельчение готовой культуры;
6. сушка;
7. расфасовка и упаковка готовой продукции.

Представленная технологическая схема поверхностного культивирования требует значительных затрат ручного труда.

Более современный вариант, применяемый для крупнотоннажного производства поверхностных культур плесневых грибов, предусматривает использование



механизированных растительных установок с разъемными кассетами и автоматической разгрузкой. При этом создается возможность выращивать в сутки 1,2 т культуры гриба. Приготовленная, простерилизованная и засеянная культурой *Aspergillus oryzae* питательная среда загружается в растительные камеры и по рельсовому пути подается в растительное отделение, через диффузоры к камерам подается кондиционированный воздух. Аэрация культуры осуществляется через вертикальные каналы, имеющиеся между кюветами и через отверстия в стенках кювет. Система аэрации рассчитана на рециркуляцию и очистку воздушного потока, подсос свежего воздуха и поддержание условий, предотвращающих подсыхание выращиваемой культуры. Процесс культивирования осуществляют в течение 42–46 ч. Затем производят разгрузку камер на вибрационном столе, отделив предварительно вертикальную стенку кюветы. Камера, освобожденная от культуры, перемещается по рельсовому пути в моечное отделение, затем в стерилизатор и на вибрационный стол для новой загрузки.

Использование механизированной линии по выращиванию культуры *Aspergillus oryzae* позволяет поддерживать высокий уровень стерильности, что очень важно для целенаправленного синтеза амилазы. При необходимости можно оперативно локализовать и изолировать инфицированный материал.

Выращенную поверхностную культуру *Aspergillus oryzae* передают на стадию экстракции, минуя стадии сушки, измельчения и фасовки, имеющих место при серийном производстве «Амилорозиина–П».