

ФЕРМЕНТЫ – БЕЛКИ С ОСОБОЙ ФУНКЦИЕЙ КАТАЛИЗА

2. Механизмы действия ферментов

3. Применение ферментов

Наталья Львовна Клячко

Профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
кафедра химической энзимологии

klyachko@enzyme.chem.msu.ru

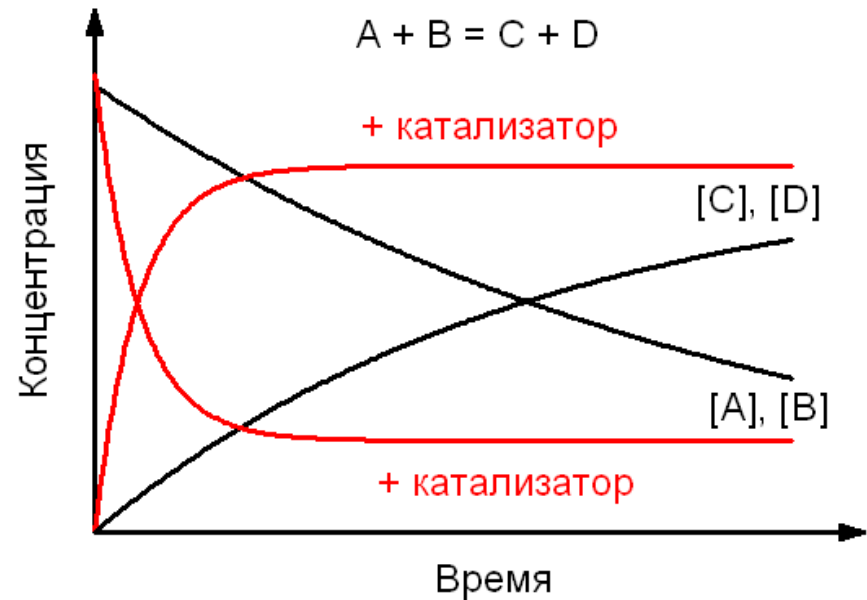
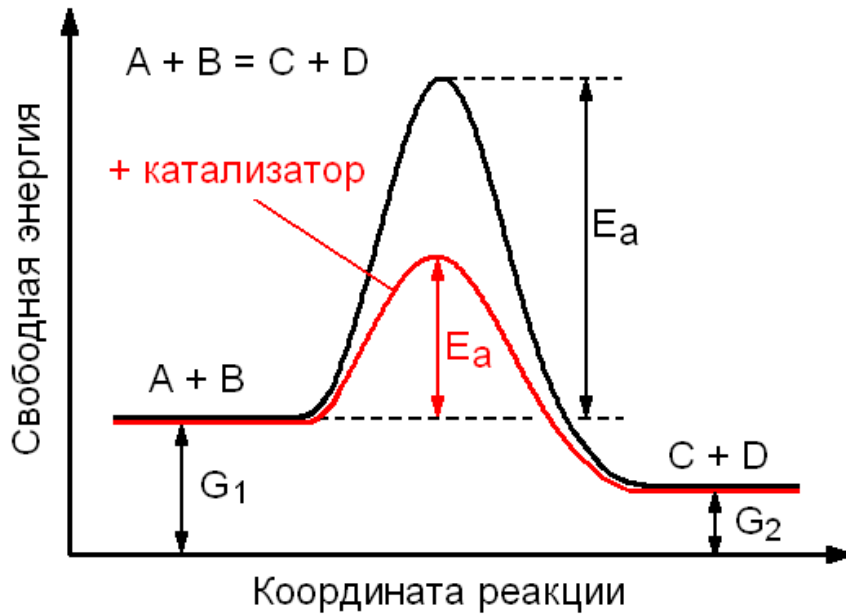
nlklyachko@gmail.com

<https://sdo.chem.msu.ru/>

**В 6х следующих слайдах кратко
напоминание о материале прошлой лекции**

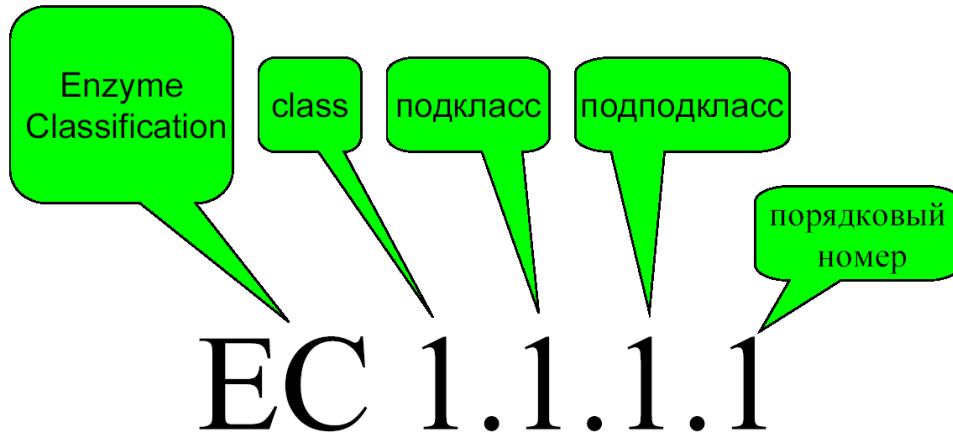


ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ КАТАЛИЗА



- Не всякая термодинамически выгодная химическая реакция будет идти (энергия активации, переходное состояние)
- Катализатор не влияет на константу равновесия (не изменяет $\Delta G = G_2 - G_1$)
- Катализатор понижает энергию активации

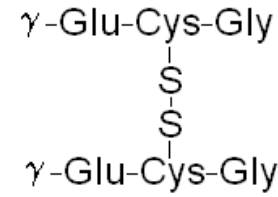
Классификация ферментов – Е.С. (Enzyme Classification)



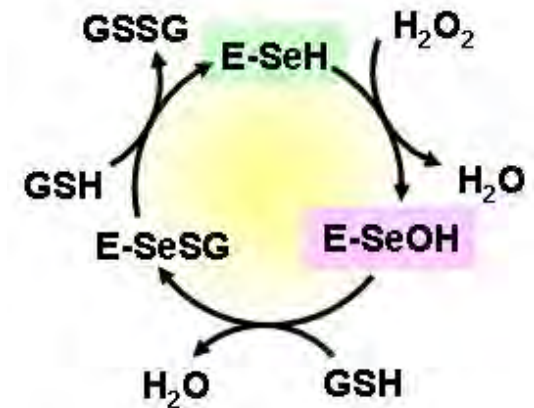
1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы
7. Транслоказы

Неорганические ионы в составе ферментов

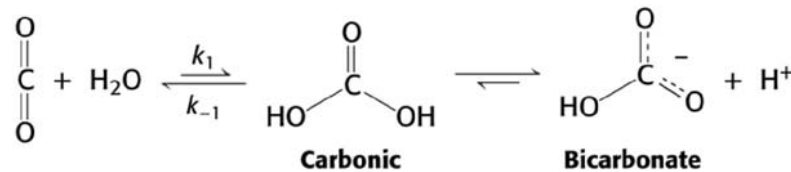
Ион металла	Фермент
Fe ³⁺ , Ca ²⁺	Пероксидаза
Zn ²⁺	Карбоангидраза Алкогольдегидрогеназа
Cu ²⁺ , Cu ¹⁺	Тирозиназа, Лакказа
Mg ²⁺	Гексокиназа Глюкозо-6-фосфатаза
Mn ²⁺	Аргиназа
K ⁺	Пируваткиназа (и Mg ²⁺)
Se ⁻²	Глутатионпероксидаза
Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Супероксиддисмутаза



Cf. GPx cycle



Глутатионпероксидаза



$k_{\text{cat}} = 10^6 \text{ s}^{-1}$

Карбоангидраза

ВИТАМИНЫ

- **Витамины** - биологически активные низкомолекулярные органические вещества, принимающие участие в **биологическом катализе**
- **Витамины** являются незаменимыми факторами питания, не синтезируются в организме человека и поступают с растительной пищей и пищей животного происхождения
- Исключение составляют:
 - 1) Водорастворимый **витамин РР** – синтезируется в **печени** из **триптофана** (незаменимая а/к)
 - 2) жирорастворимый **витамин D₃** – синтезируется в **коже** из **7-дегидрохолестерина** под действием **УФ**
 - 3) жирорастворимый **витамин А (ретинол)** – синтезируется в **печени** из **каротинов**
- Ряд **витаминов** синтезируется **микрофлорой кишечника**:
В₁-тиамин, **В₂**-рибофлавин, **В₆**-пиридоксин, **В₁₂**-кобаламин, **РР**-ниацин, **В₉**-фолиевая кислота, **В₅**-пантотеновая кислота, **К**-нафтохинон, **Н**-биотин

Витамины – предшественники коферментов

Коферменты – небольшие органические молекулы (кофакторы), необходимые для активности многих ферментов

Коферменты и витамины

Витамин	Коферментная форма	Тип катализируемой реакции
Водорастворимые витамины		
Тиамин (В ₁)	Тиаминпирофосфат	Декарбоксилирование <i>α</i> -кетокислот
Рибофлавин (В ₂)	Флавиномононуклеотид, флавинадениндинуклеотид	Окислительно-восстановительные реакции
Никотиновая кислота	Никотинамидадениндинуклеотид, никотинамидадениндинуклеотидфосфат	Окислительно-восстановительные реакции
Пантотеновая кислота	Кофермент (коэнзим) А	Перенос ацильных групп
Пиридоксин (В ₆)	Пиридоксальфосфат	Перенос аминогрупп
Биотин (Н)	Биотицин	Перенос CO ₂
Фолиевая кислота	Тетрагидрофолат	Перенос одноуглеродных групп
Витамин В ₁₂	Дезоксиаденозилкобаламин	Перенос связанного с углеродом атома водорода на соседний атом углерода
Аскорбиновая кислота (С)	Не известна	Реакции гидроксирования

Coenzymes Serving as Transient Carriers of Specific Atoms or Functional Groups

«Антивитамины»

• **воздействие антивитаминов**, которые могут быть:

а). структурными аналогами **витамина**, конкурирующими за активный центр фермента (**окситиамин**, **оксибиотин**, **изониазид** (производное **никотиновой кислоты**), применяется как противотуберкулезный препарат)

б). ферментами, разрушающими **витамин** (например, **тиаминаза**, **аскорбатоксидаза**)

в). белками, связывающими **витамин** и нарушающими его всасывание (**авидин** – белок сырых яиц, связывающий биотин)

г). антагонистами **витамина** (**дикумарол**, **варфарин** – антагонисты **витамина К**, тормозящие тромбообразование)

д). веществами, нарушающими превращение **витамина** в кофермент (**аминазин** – антидепрессант – нарушает превращение **витамина В₂** в кофермент, и др.)

«Антивитамины»

История антивитаминов началась лет пятьдесят назад с одной, поначалу казалось бы, неудачи. **Синтез витамина Вс (фолиевую кислоту)**.

Вс участвует в биосинтезе белка и активизирует процессы кроветворения.

Химический аналог полностью утратил витаминную активность. Но оказалось, что новое соединение тормозит развитие клеток, прежде всего раковых. **Противоопухолевое средство (антагонист Вс)**, лечебное действие обусловлено тем, что, оно нарушает превращение фолиевой кислоты в кофермент.

Соединения, противоборствующие некоторым витаминам, обнаружались и в ряде пищевых продуктов. Специалисты обратили внимание на то, что включение в рацион лисиц **сырого карпа** вызывало у животных развитие типичного состояния **В1-авитаминоза**. Позже было установлено, что в тканях сырого карпа содержится фермент **тиаминаза**, расщепляющий молекулу витамина В1 (тиамина) до неактивных соединений.

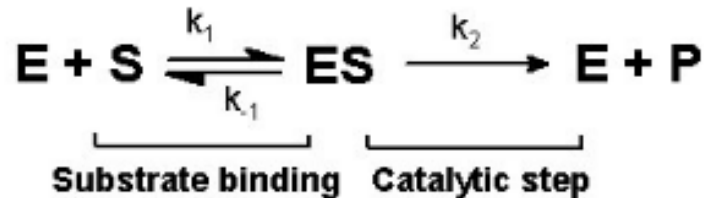
В овощах и фруктах, больше всего в огурцах, кабачках, цветной капусте и тыкве, содержится **аскорбатоксидаза (окисление витамина С** до практически неактивной дикетогулоновой кислоты). Это происходит вне организма (хранение, кулинарная обработка). Например, только за счет действия аскорбатоксидазы смесь сырых размельченных овощей за 6 часов хранения теряет более половины содержащегося в ней витамина С, причем потери его тем выше, чем больше измельчены овощи.

Антивитамин К – дикумарин, лекарственное средство. «Болезнь сладкого клевера» - у сельскохозяйственных животных плохая свертываемость крови. В клеверном сене дикумарин. Витамин К способствует свертыванию крови, а дикумарин нарушает этот процесс.

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ КИНЕТИКА

Уравнение Михаэлиса-Ментен — уравнение наиболее известной модели ферментативной кинетики.

Названо в честь **Леонора Михаэлиса** и **Мод Леоноры Ментен**. Статья в 1913 – провели математический анализ ферментативной кинетики



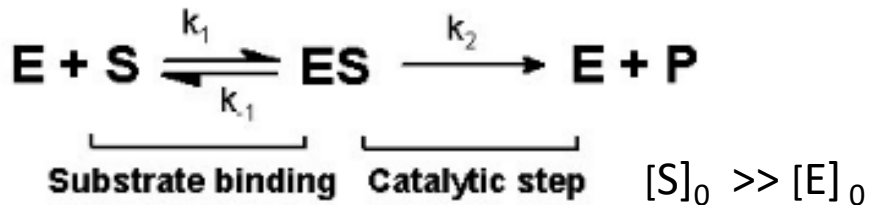
$$v = \frac{V_m S}{S + K_M}$$

Уравнение описывает зависимость скорости реакции, катализируемой ферментом, от концентрации субстрата при определённых общепринятых допущениях

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Вывод уравнения был впервые предложен **Бриггсом и Холдейном** (1925) с применением метода квазистационарности

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ



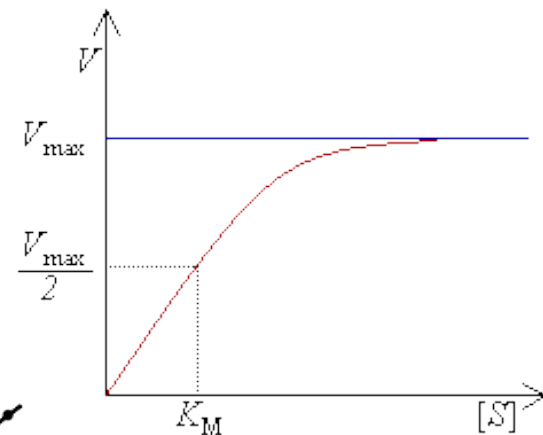
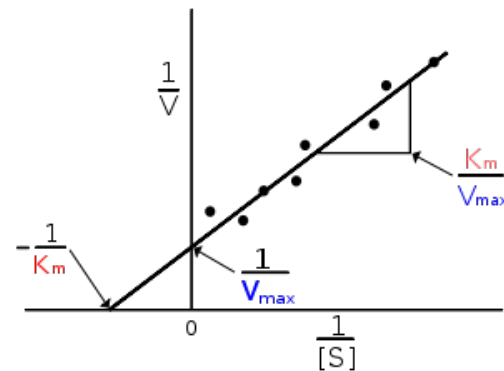
$$v = \frac{V_m S}{S + K_M} \quad v = \frac{k_2 [\text{E}]_0 [\text{S}]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [\text{S}]}$$

где

V_m — максимальная скорость реакции,
равная $k_{cat} E_0$

K_M — константа Михаэлиса, равная
концентрации субстрата, при которой
скорость реакции составляет половину
от максимальной;

S — концентрация субстрата.

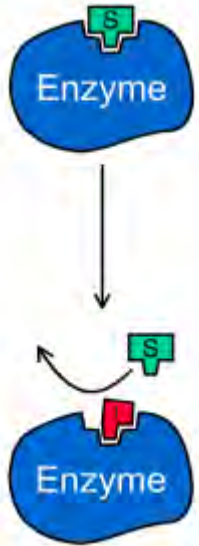


$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

**Число оборотов некоторых
ферментов**

Фермент	Число оборотов в 1 мин при 37° С
Карбоангидраза	36 000 000
<i>b</i> -Амилаза	1 100 000
Фосфоглюкомутаза	1 240

РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ



- **ИНГИБИРОВАНИЕ, АКТИВАЦИЯ**
- **pH – ЗАВИСИМОСТИ**
- **ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ**

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

Бесконкурентные

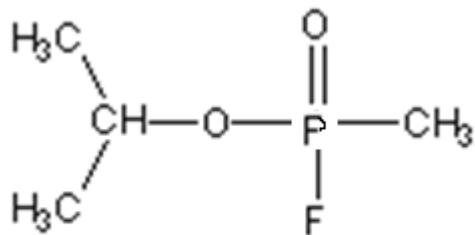
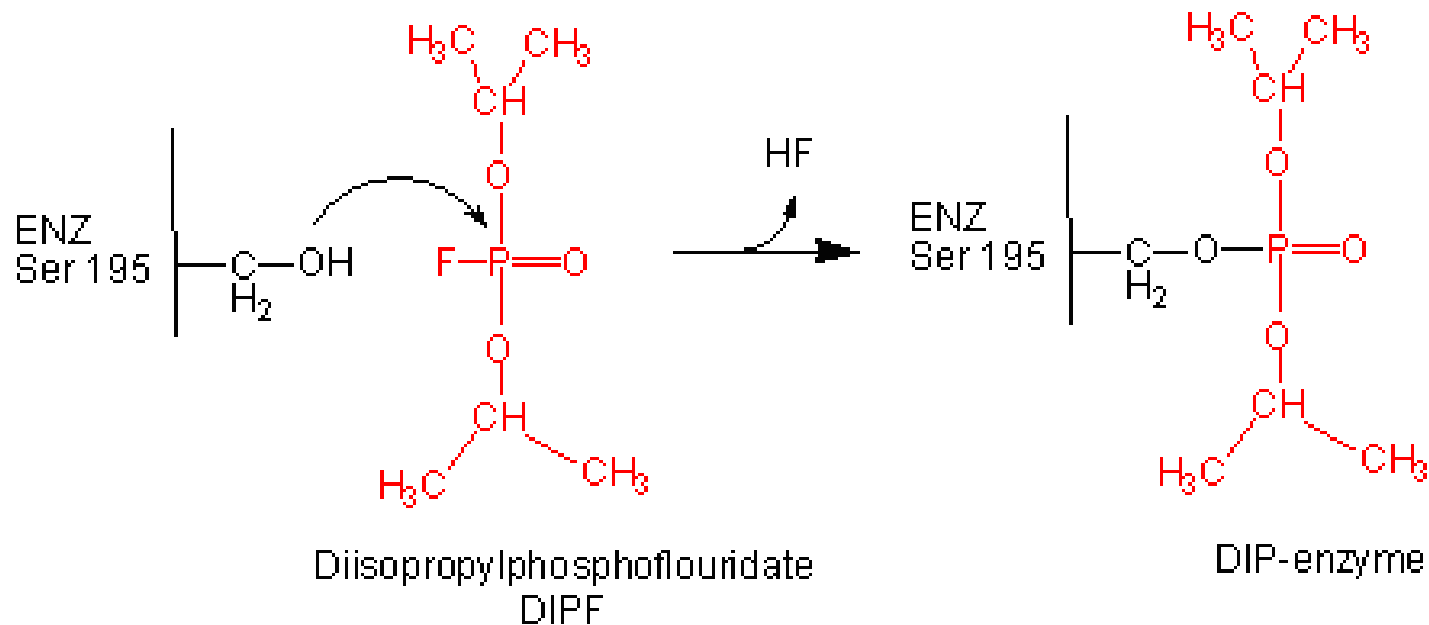
Ингибиторы необратимые

Модификаторы

Субстратоподобные
(суицидные)

НЕОБРАТИМОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ СЕРИНОВЫХ ГИДРОЛАЗ

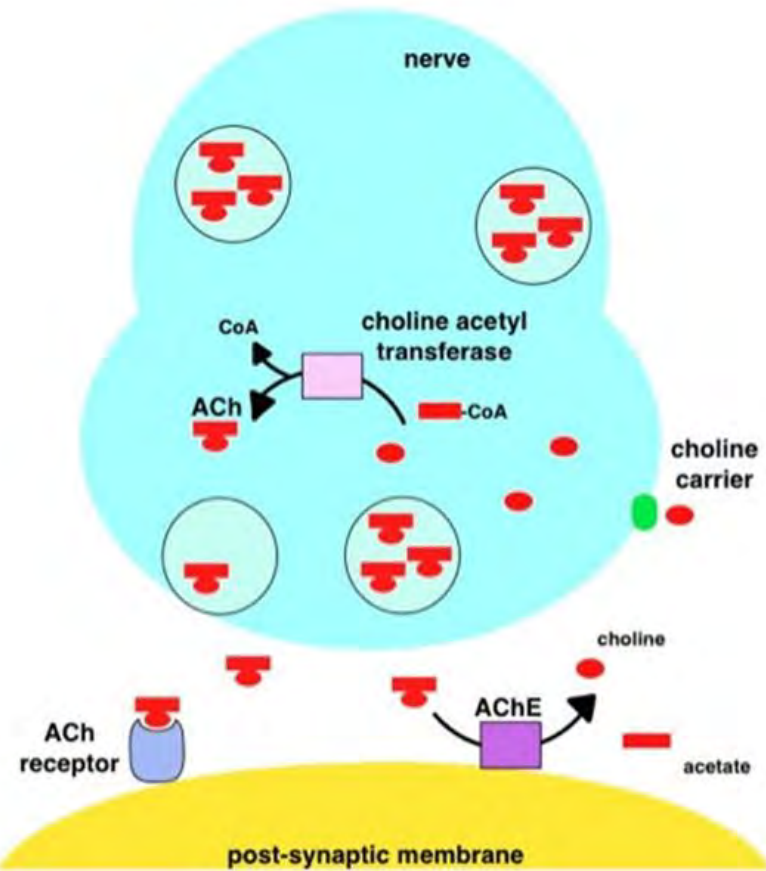
(Химотрипсин, холинэстеразы)



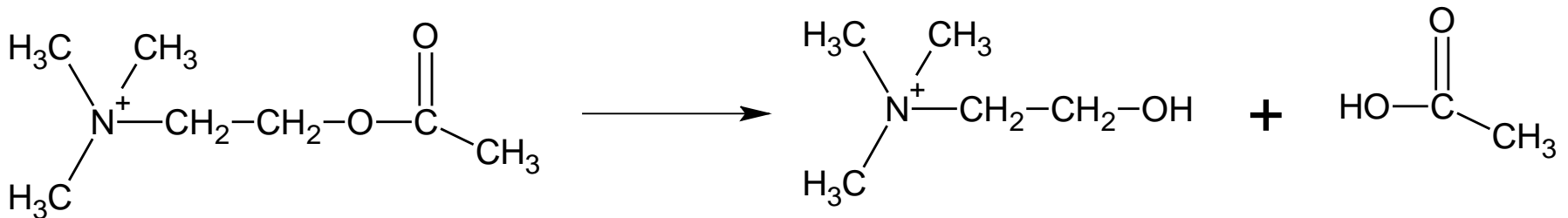
sarin

Органофосфатгидролаза перерабатывает
фосфорорганические соединения

Ацетилхолинэстераза



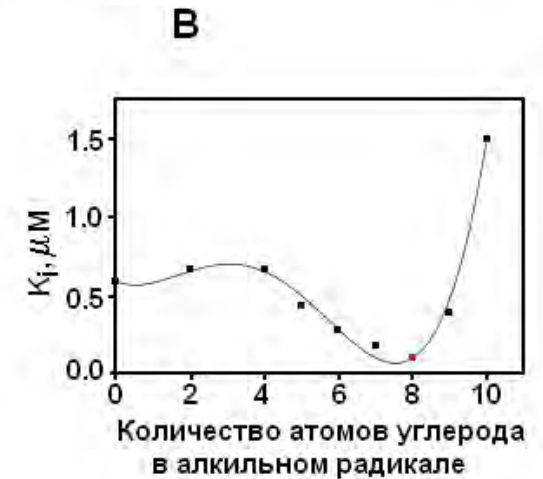
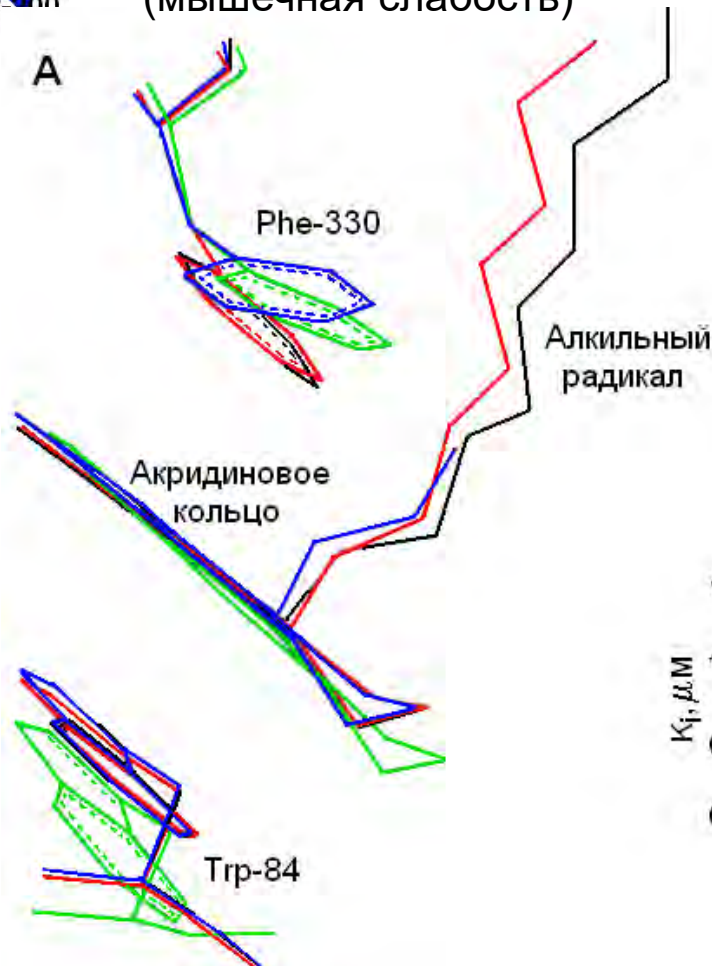
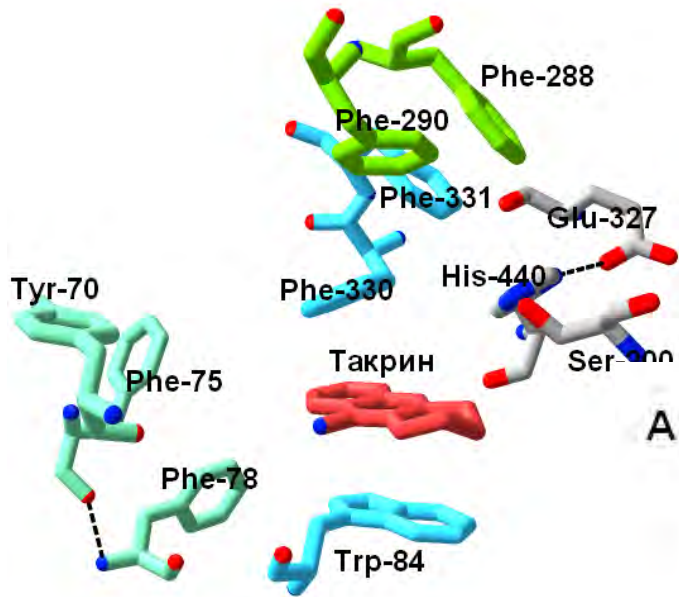
Фермент функционирует в холинэргических синапсах, обеспечивая циркуляцию нейромедиатора – ацетилхолина. $k_{cat} = 1.4 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$, $K_m = 9 \cdot 10^{-5} \text{ М}$



ТАКРИН – обратимый конкурентный ингибитор ацетилхолинэстеразы

Физостигмин – необратимый ингибитор (терапия болезни Альцгеймера)

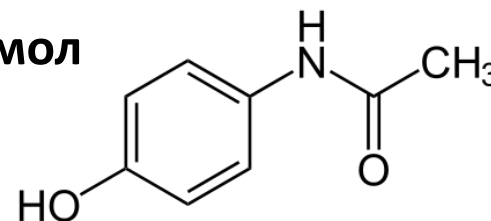
Пиридостигмина бромид – ингибитор в терапии аутоиммунного заболевания *Myasthenia gravis* (мышечная слабость)





Циклооксигеназы

Парацетамол



Парацетамол

Блокирует обе формы фермента циклооксигеназы (ЦОГ1 и ЦОГ2), ингибируя тем самым синтез простагландинов (Pg). ...

В западных странах известен под названием Acetaminophen

Одномоментный приём более 10 г парацетамола у взрослых или более 140 мг/кг у детей – отравление → тяжёлое поражением печени.

Причина — истощение запасов глутатиона и накопление промежуточных продуктов метаболизма парацетамола, обладающих гепатотоксическим действием.

Подобная картина при приёме обычных доз препарата в случае сопутствующего применения индукторов ферментов цитохрома P-450 и у алкоголиков (или употреблении систематически алкоголь (для мужчин — свыше 700 мл пива или 200 мл вина в день, для женщин — дозы в 2 раза меньше)

В периферических тканях клеточные пероксидазы нейтрализуют влияние парацетамола на ЦОГ, что объясняет практически полное отсутствие противовоспалительного эффекта.

Боль — наиболее распространенный ведущий (основной) симптом многих заболеваний и патологических состояний.

Боль – полезный признак, сигнализирующий о неполадках со здоровьем. Однако боль, «перерастающая» в болевой синдром, часто уже нуждается в самостоятельном, отдельном лечении.

В механизме возникновения **болевого синдрома** ведущую роль играет повышение чувствительности свободных нервных окончаний (ноцицепторов) под воздействием веществ, которые в больших количествах начинают вырабатываться при повреждении клеток.

Ноцицэптор (лат. *nocens* «вредный» + рецептор, также **ноцирецептор**) — первичный сенсорный нейрон, который **активируется только болевым раздражителем** (который повреждает или потенциально может повредить ткани организма). Интенсивная стимуляция ноцицепторов обычно вызывает неприятные ощущения и может причинить вред организму.

Медиаторы воспаления: это **гистамин, цитокины, простагландины** и пр. Наиболее значимы в возникновении боли **простагландины — вещества, которые на биохимическом уровне являются непосредственной причиной боли, расширения сосудов и появлению ощущения тепла.** Некоторые из них, например, **простагландин E2** повышает чувствительность рецепторов боли.

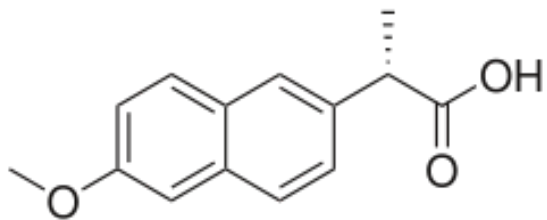


Стероидные препараты

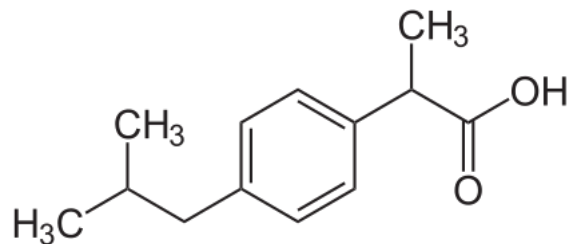
угнетают активность фермента **фосфолипазы** и за счет этого нарушают образование арахидоновой кислоты.

Нестероидные препараты

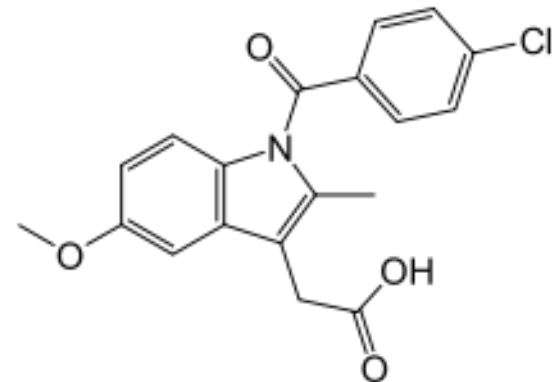
блокируют **циклооксигеназу**, с помощью которой из арахидоновой кислоты образуются простагландины. Таким образом, стероидные и нестероидные противовоспалительные средства **препятствуют образованию простагландинов на разных этапах их синтеза**



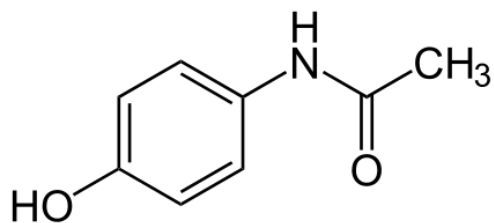
Напроксен



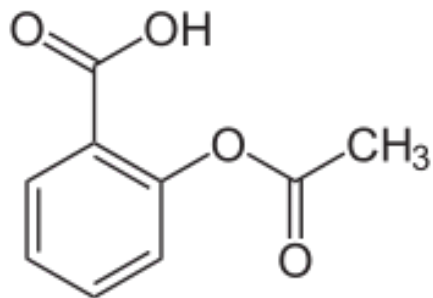
Ибупрофен



Индометацин



Парацетамол

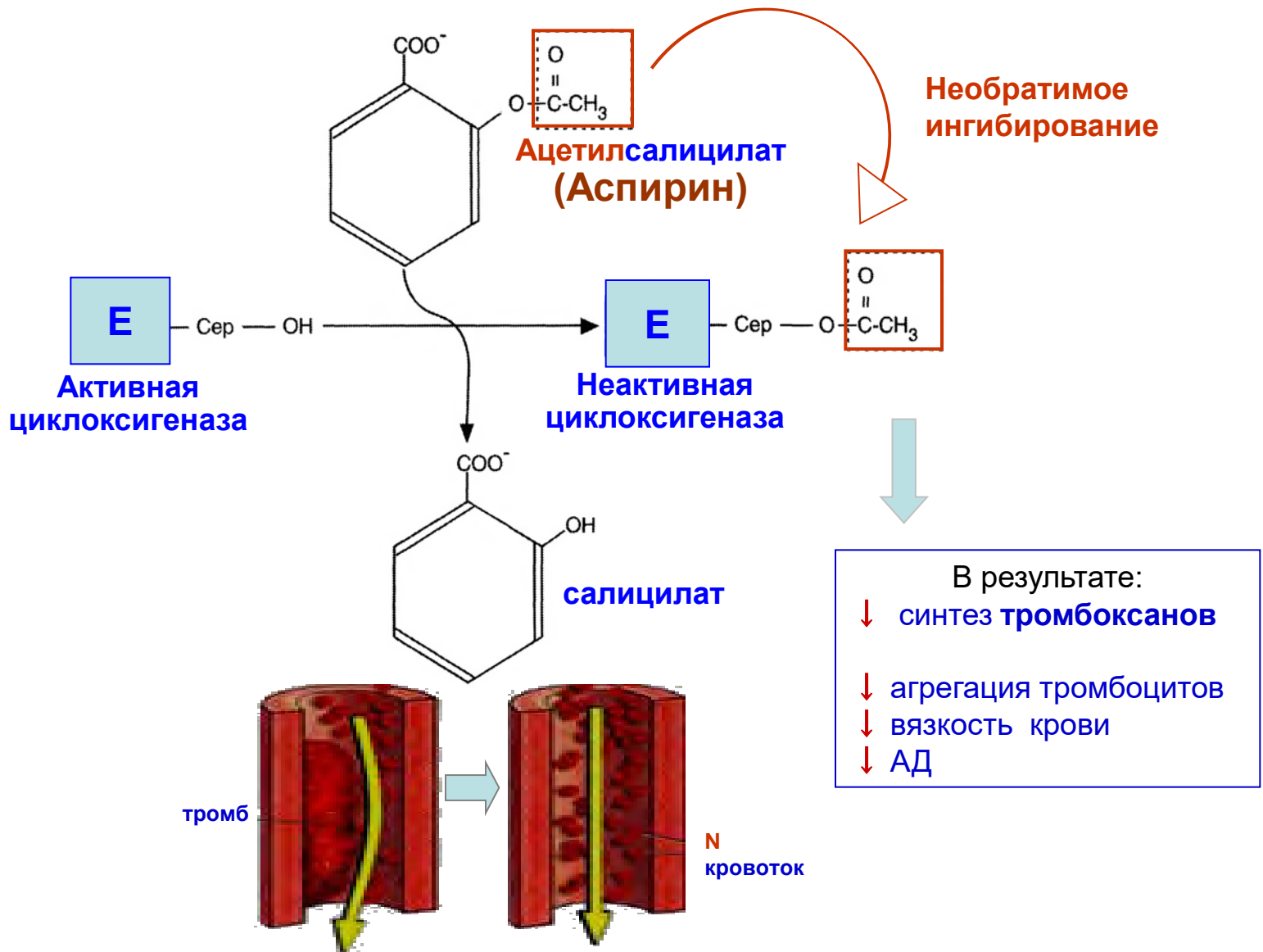


Ацетилсалициловая
кислота (аспирин)

**Нестероидные
противовоспалительные
средства
ИНГИБИТОРЫ СОХ-1 и СОХ-2
Циклооксигеназы**

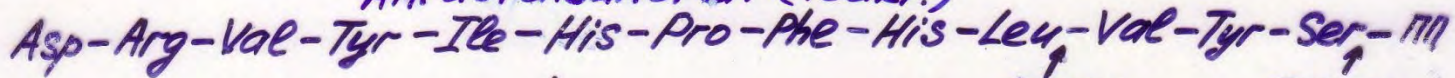


МЕХАНИЗМ ИНАКТИВАЦИИ ЦИКЛОКСИГЕНАЗЫ АСПИРИНОМ



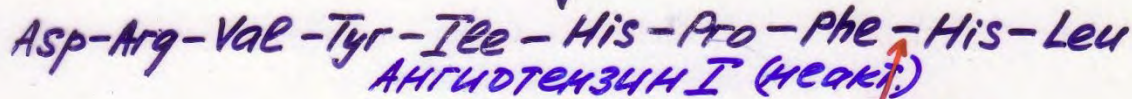
РЕГУЛЯЦИЯ КРОВОЯНОГО ДАВЛЕНИЯ

АНГИОТЕНЗИНОГЕН (неакт.)



↑ ренин

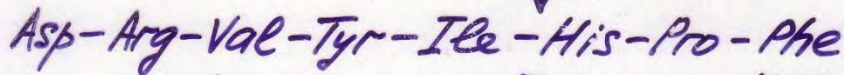
↑ трипсин



АНГИОТЕНЗИН I (неакт.)

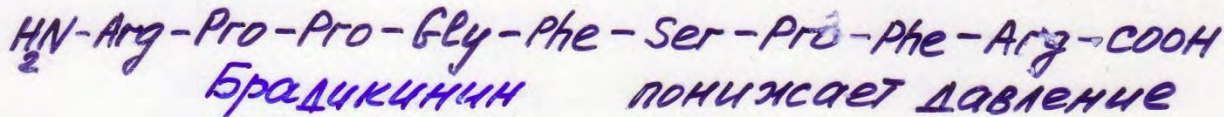
↑ АПФ

↓ АПФ



АНГИОТЕНЗИН II (акт.)

МОЩНЫЙ СТИМУЛЯТОР
КРОВ. ДАВЛЕНИЯ (повышает)



БРАДИКИНИН

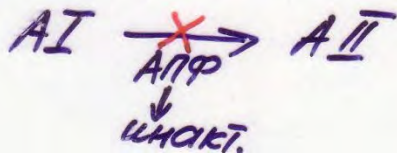
Понижает давление

Ядовитая змея — южно-американская ямкоголовая гадюка парализует жертву.

Яд ⇒ резкое понижение давления.

Выделяет особые пептиды, стимулирующие акт. бр., т.к. блокируют АПФ. и защищают бр от инактив.

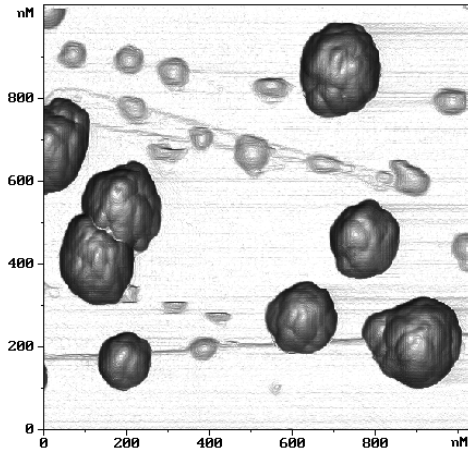
(АПФ обычно контрол. процесс, инактивир. бр.).



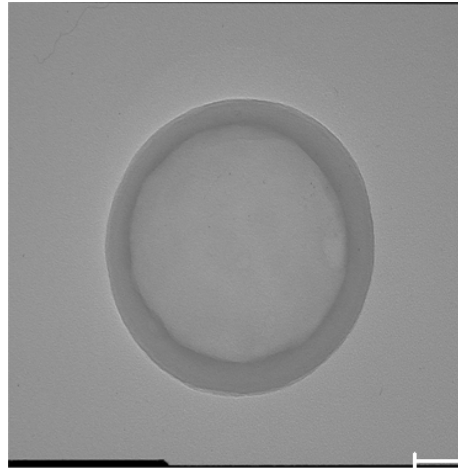
↓ инакт.

Синтезирован ряд пептидов, исп. в мед., напр., каллоприл. Он ингибирует АПФ ⇒ сниж. давл.

Кальций-фосфатные наночастицы для офтальмологии



Атомно-силовая микроскопия



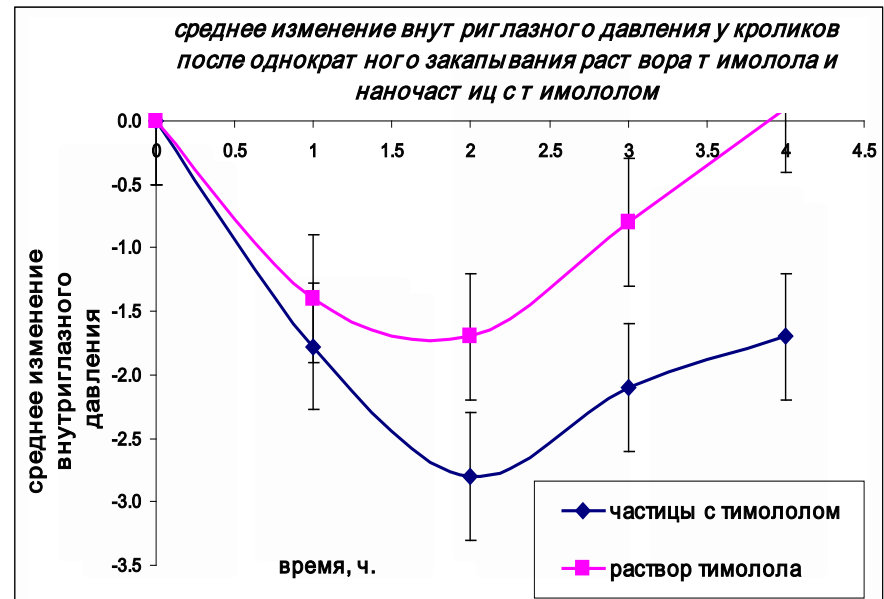
Проникающая электронная микроскопия

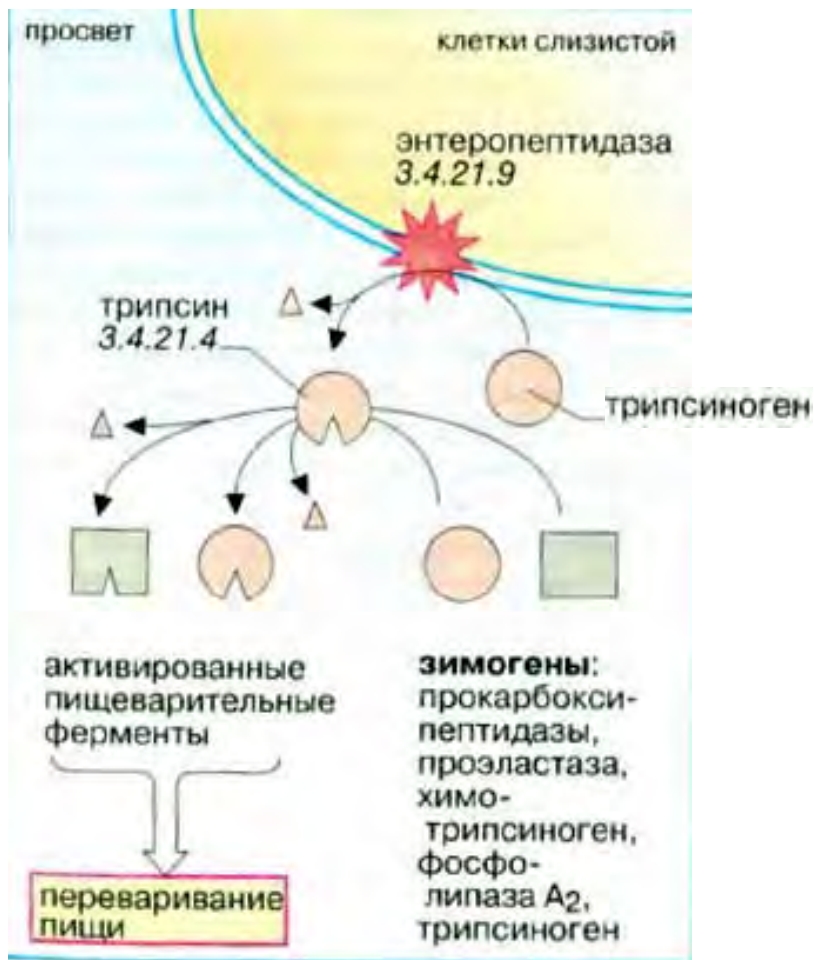


Кальций-фосфатные наночастицы – для офтальмологических лекарственных препаратов.

Полые сферы с размерами от **40** до **600 нм**, которые можно изменять.

Результаты тестирования наночастиц с коммерческим лекарственным препаратом малеатом тимолола на кроликах демонстрируют более **эффективное** и **продолжительное** действие тимолола в **наночастицах** по сравнению с водным раствором препарата.





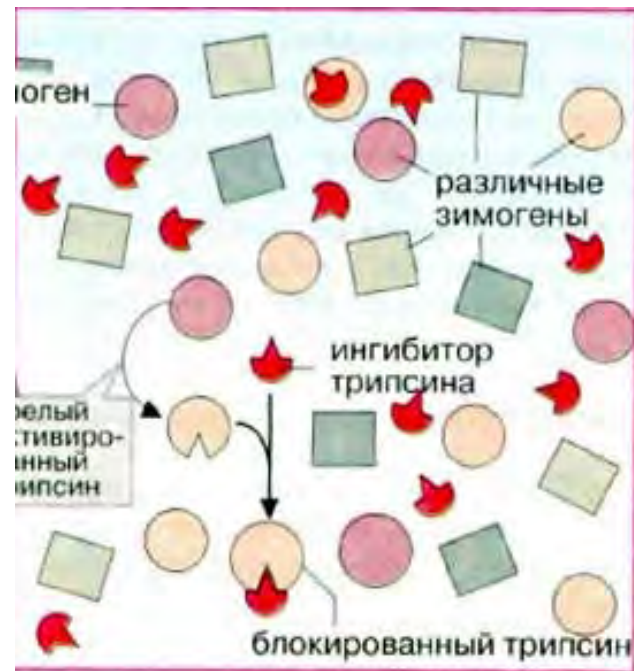
Мезим форте

Пищеварительное ферментное средство, восполняет дефицит ферментов поджелудочной железы, оказывает протеолитическое, амилолитическое и липолитическое действие. Входящие в состав панкреатические ферменты (**липаза, альфа-амилаза, трипсин, химотрипсин**) способствуют расщеплению белков до аминокислот, жиров - до глицерина и жирных кислот, крахмала - до декстринов и моносахаридов. Панкреатические ферменты высвобождаются из лекарственной формы в щелочной среде тонкого кишечника.

Тонкий кишечник

Активация пищеварительных ферментов поджелудочной железы

Секрет поджелудочной железы



РЕГУЛЯЦИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

- ИНГИБИРОВАНИЕ, АКТИВАЦИЯ
- pH – ЗАВИСИМОСТИ
- ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ

Ингибиторы обратимые

Конкурентные

Неконкурентные

Бесконкурентные

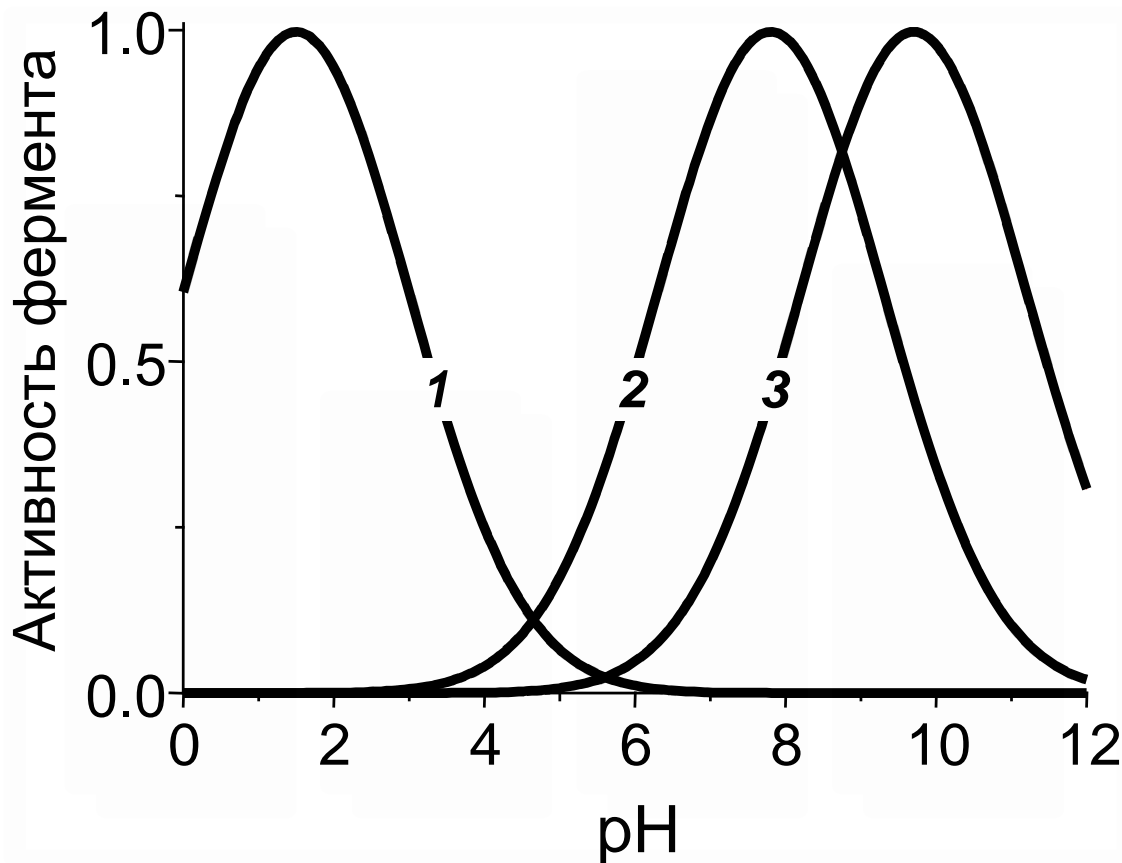
Ингибиторы необратимые

Модификаторы

Субстратоподобные
(суицидные)

Кинетика ферментативных реакций

Зависимость скорости ферментативных реакций от pH



Зависимость активности ферментов (для удобства сравнения приведены активности, нормированные к единице) от pH.

- 1 — Пепсин,
- 2 — рибонуклеаза,
- 3 — аргиназа

Нобелевская премия 2016 (физиология и медицина)

Ёсинори Осуми Yoshinori Ohsumi "for his discoveries of mechanisms for autophagy"

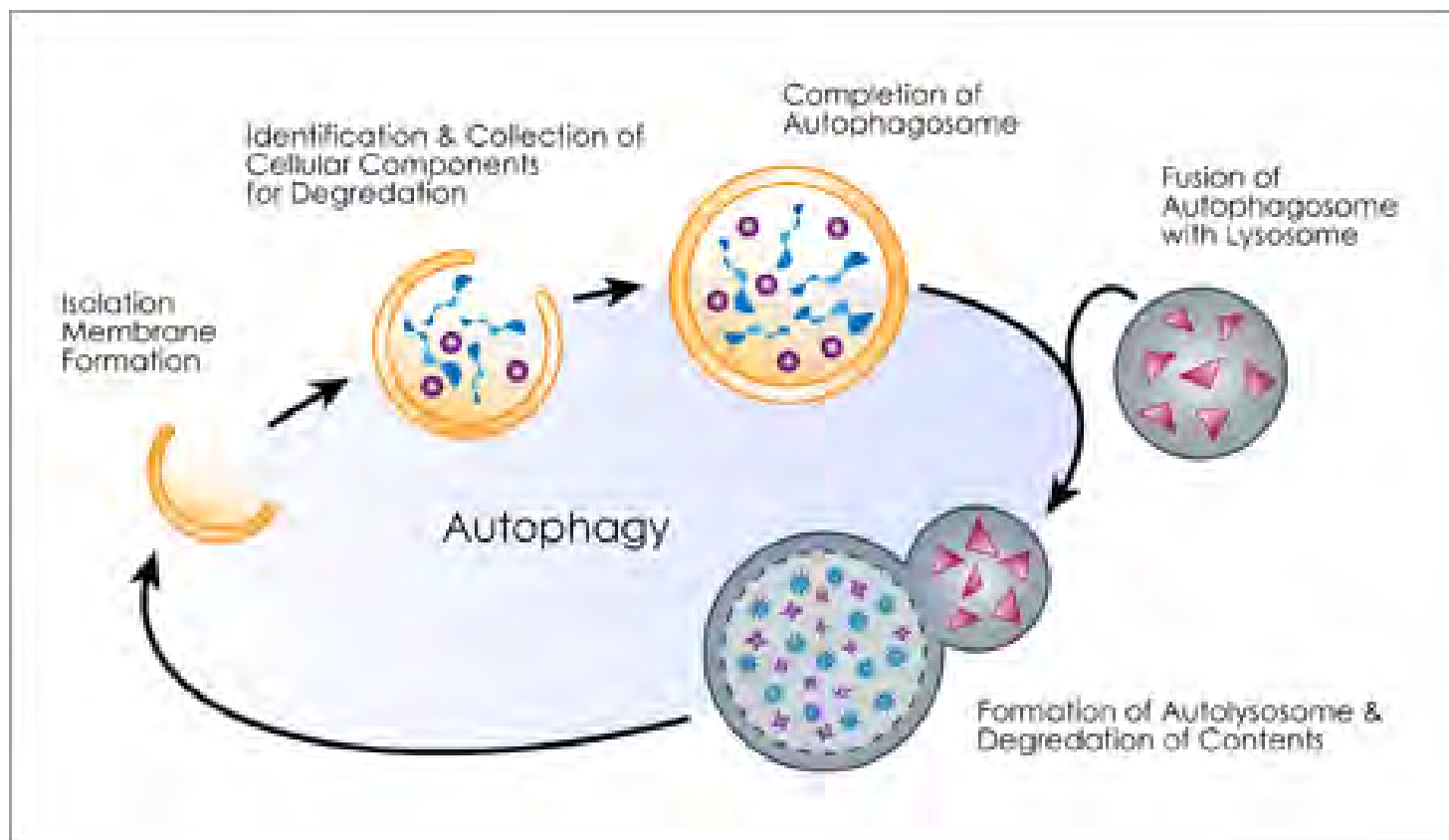
Макроавтофагия – основной путь для уничтожения поврежденных клеточных органелл и ненужных белков.

Образование двойной мембраны – автофагосомы вокруг органеллы.

Движение автофагосомы в цитоплазме клетки к лизосоме.

Слияние с лизосомой.

Лизосомальные ферменты в кислом pH деградируют содержимое автофагосомы.





Лизосомы — это органеллы диаметром 0,2-2,0 мкм, окруженные простой мембраной, способные принимать самые разные формы.

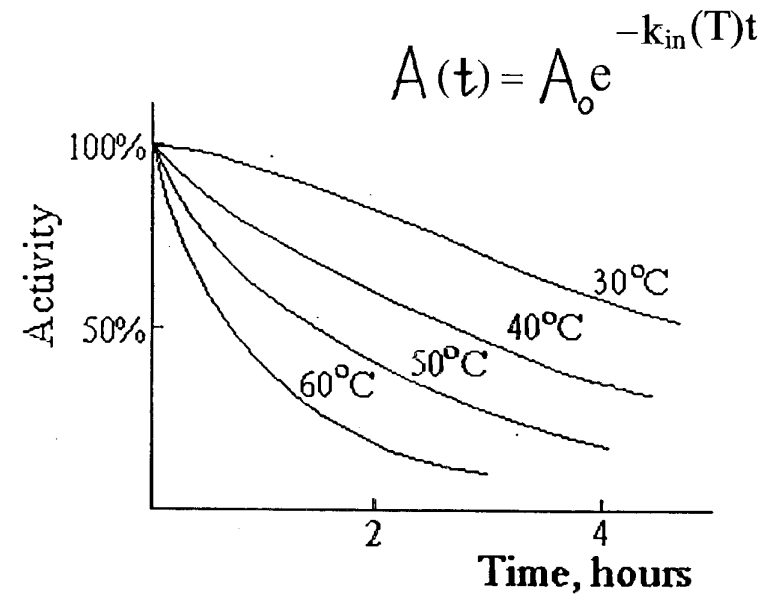
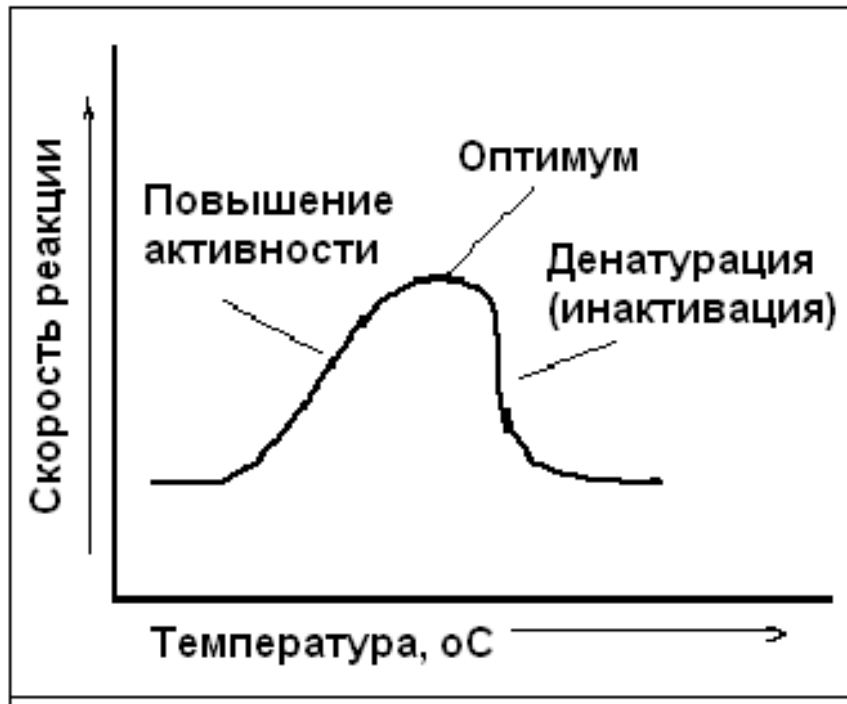
Несколько сотен лизосом на клетку.

Функция - деградация клеточных компонентов.

Около **40 типов различных расщепляющих ферментов** — **гидролаз с оптимумом действия в кислой области** (низкая активность при нейтральных pH – защита клеток от самопереваривания, если лизосомный фермент попадает в цитоплазму). Главный фермент лизосом — *кислая фосфатаза*.

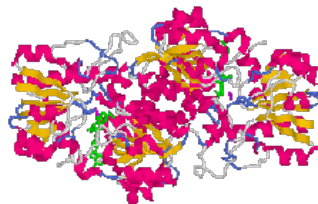
АТФ-зависимые протонные насосы в мембране обогащают лизосомы протонами, pH 4,5-5,0 (в то время как в цитоплазме pH 7,0-7,3).

ТЕМПЕРАТУРА ВЛИЯЕТ НА РАБОТУ ФЕРМЕНТА

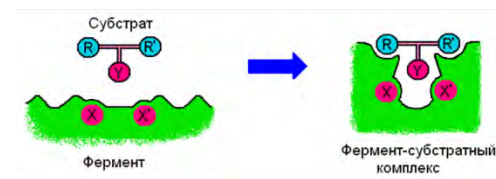


Факторы, определяющие каталитическую эффективность ферментов

- Сближение и ориентация (внутримолекулярный режим реакции)
- Напряжение и деформация; индуцированное соответствие
- Общий кислотно-основной катализ; Ковалентный катализ
- Эффекты микросреды



Ключ – замок (Фишер)



Механизм индуцированного соответствия (Кошланд)



Механизм напряжения («дыбы») (Ламри и Эйринг, Дженкс)

ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗА - СВЯЗЫВАНИЕ С КОФЕРМЕНТОМ ВЫЗЫВАЕТ КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Предпочтительно связывание в переходном состоянии?

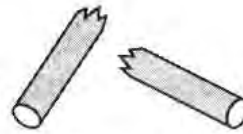
No enzyme



Substrate
(metal stick)



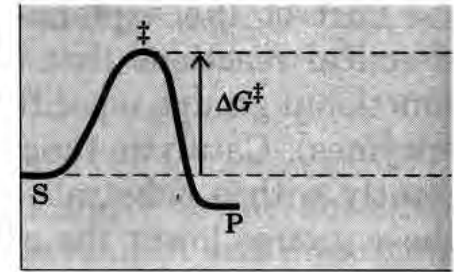
Transition state
(bent stick)



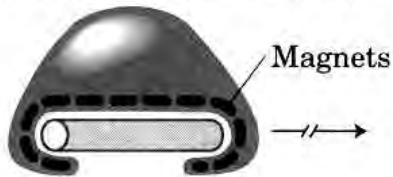
Products
(broken stick)

(a)

Free energy, G

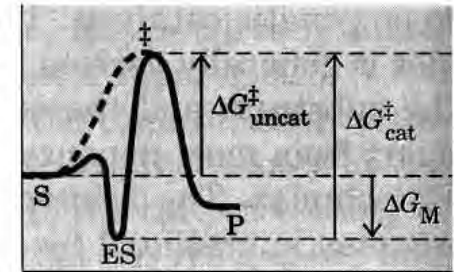


Enzyme complementary to substrate

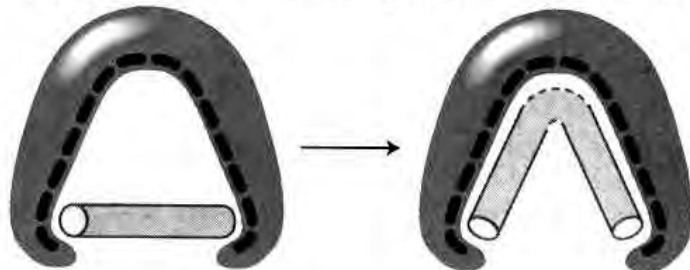


(b)

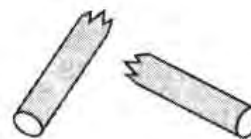
Free energy, G



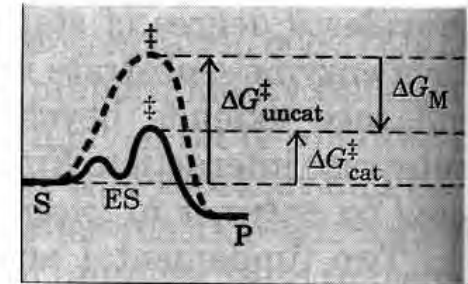
Enzyme complementary to transition state



+

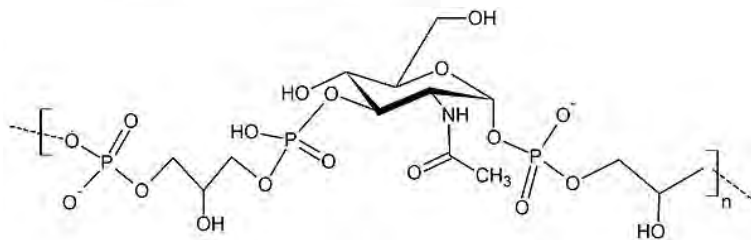
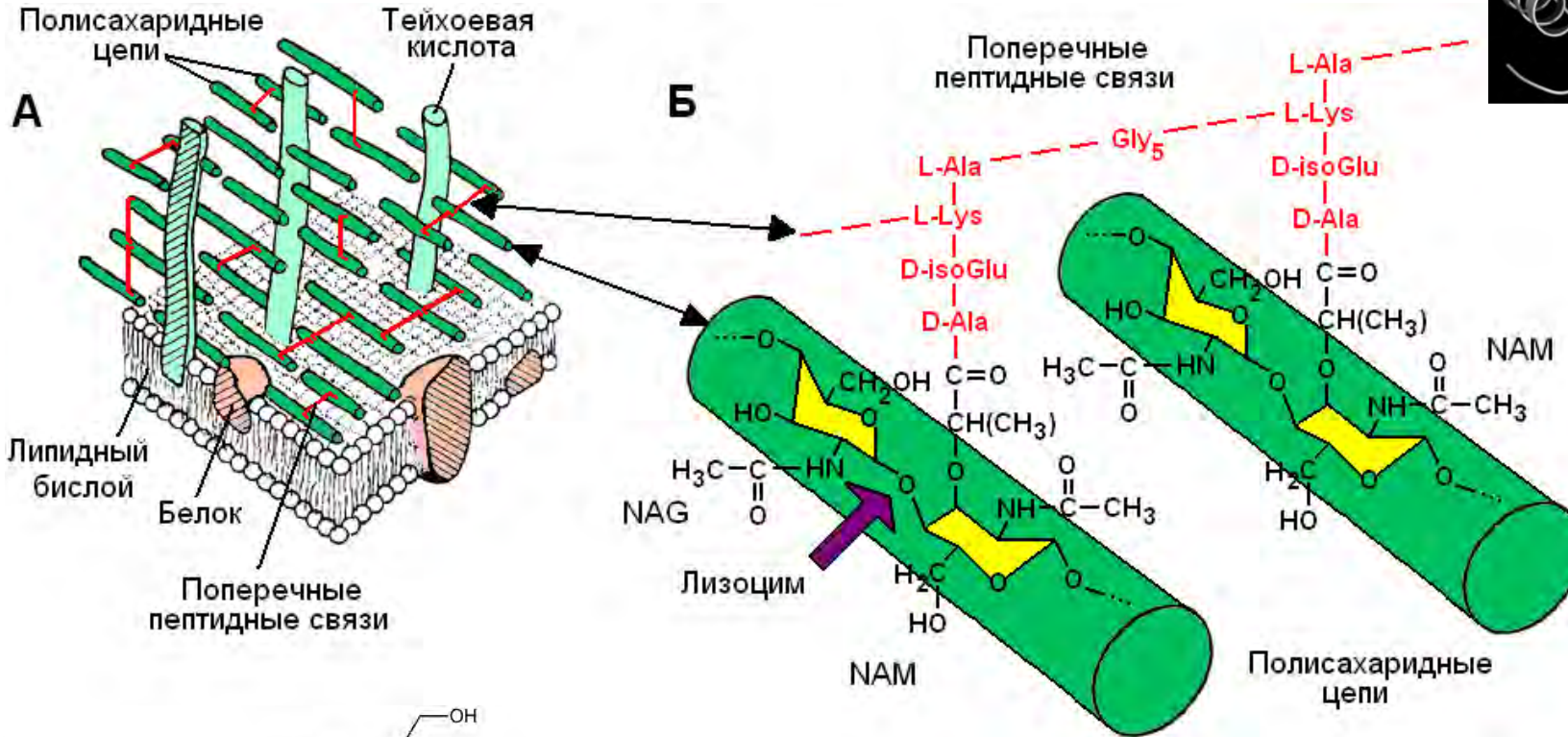
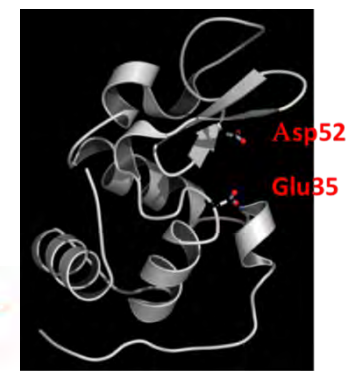


Free energy, G



Reaction coordinate

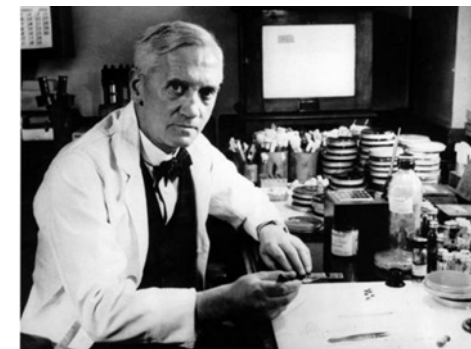
ЛИЗОЦИМ БЕЛКА КУРИНОГО ЯЙЦА – ГИДРОЛИЗ ПОЛИСАХАРИДНОГО ОСТОВА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ

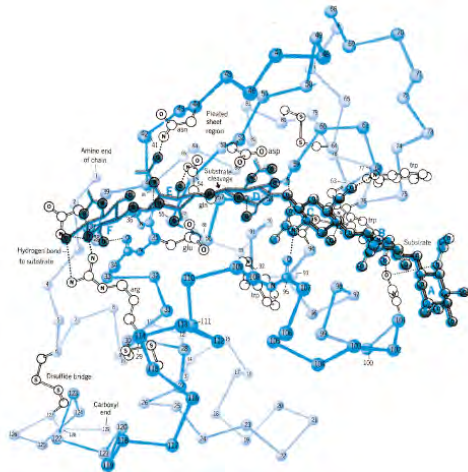


Структура тейхоевой кислоты клеточной стенки [Micrococcaceae](#)

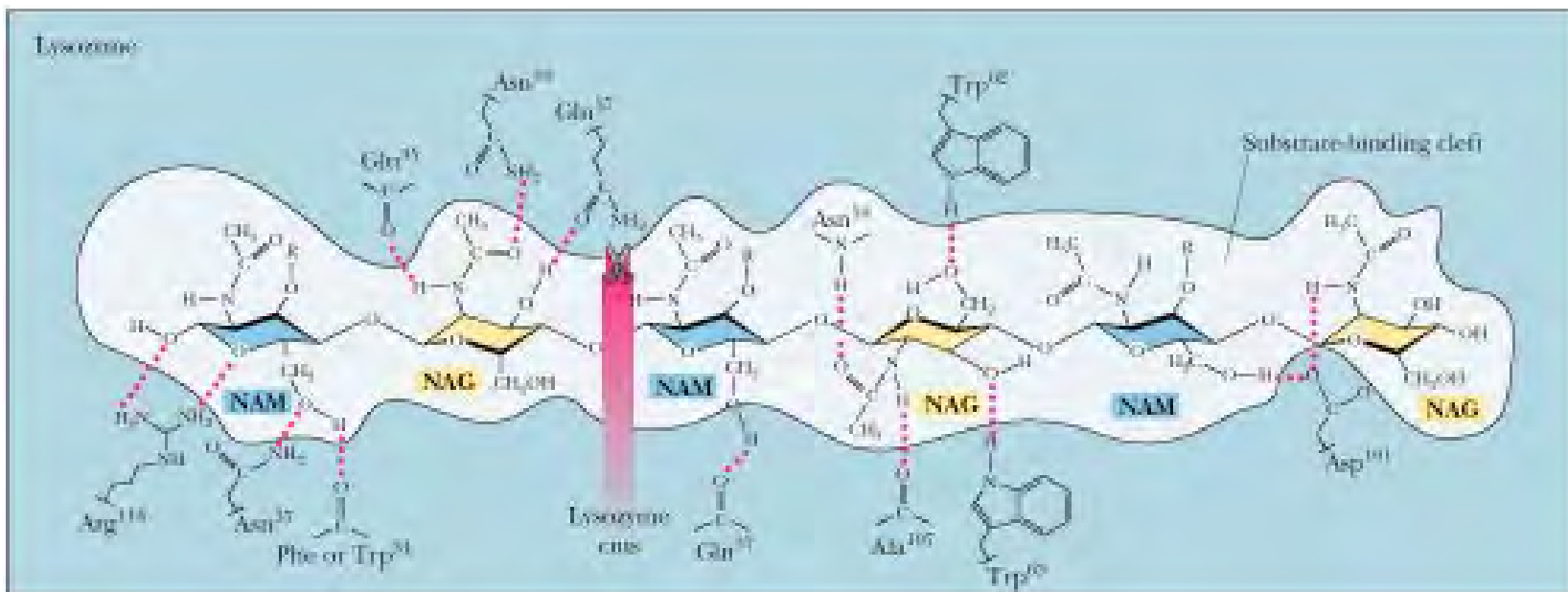
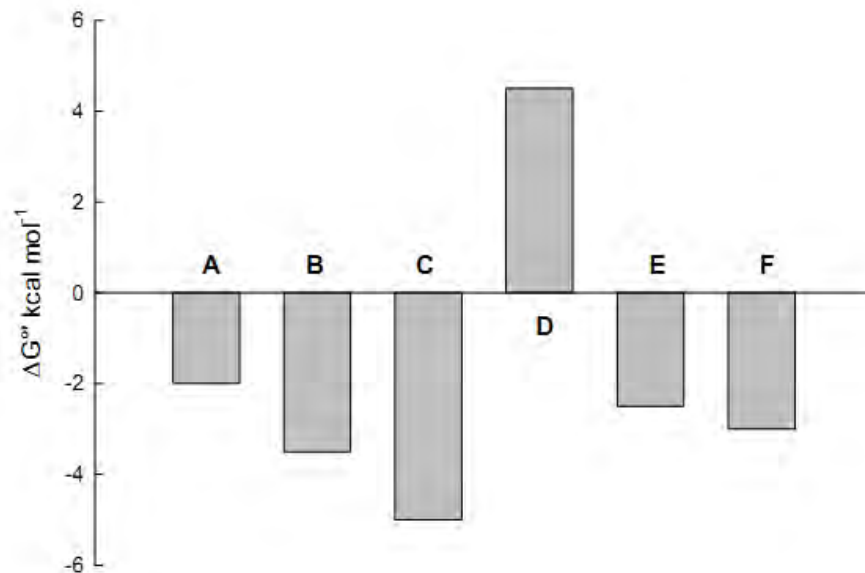
Случайно открыт Флемингом в 1922

1 полипептидная цепь,
14.3кДа, 4 S-S мостика, 1-я
трехмерная структура (1965г)
D. Phillips (x-ray crystallography)

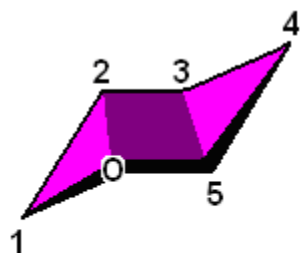




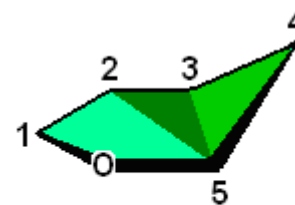
ЛИЗОЦИМ: МНОГОТОЧЕЧНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СУБСТРАТА И ФЕРМЕНТА



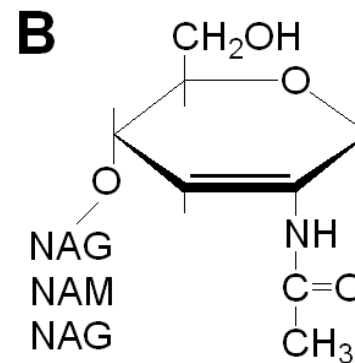
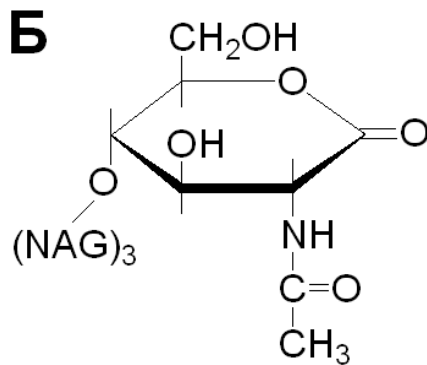
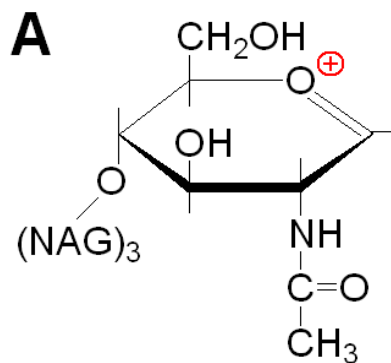
АНАЛОГИ ПЕРЕХОДНОГО СОСТОЯНИЯ СВЯЗЫВАЮТСЯ С ФЕРМЕНТОМ ЛУЧШЕ



Конформация кресла

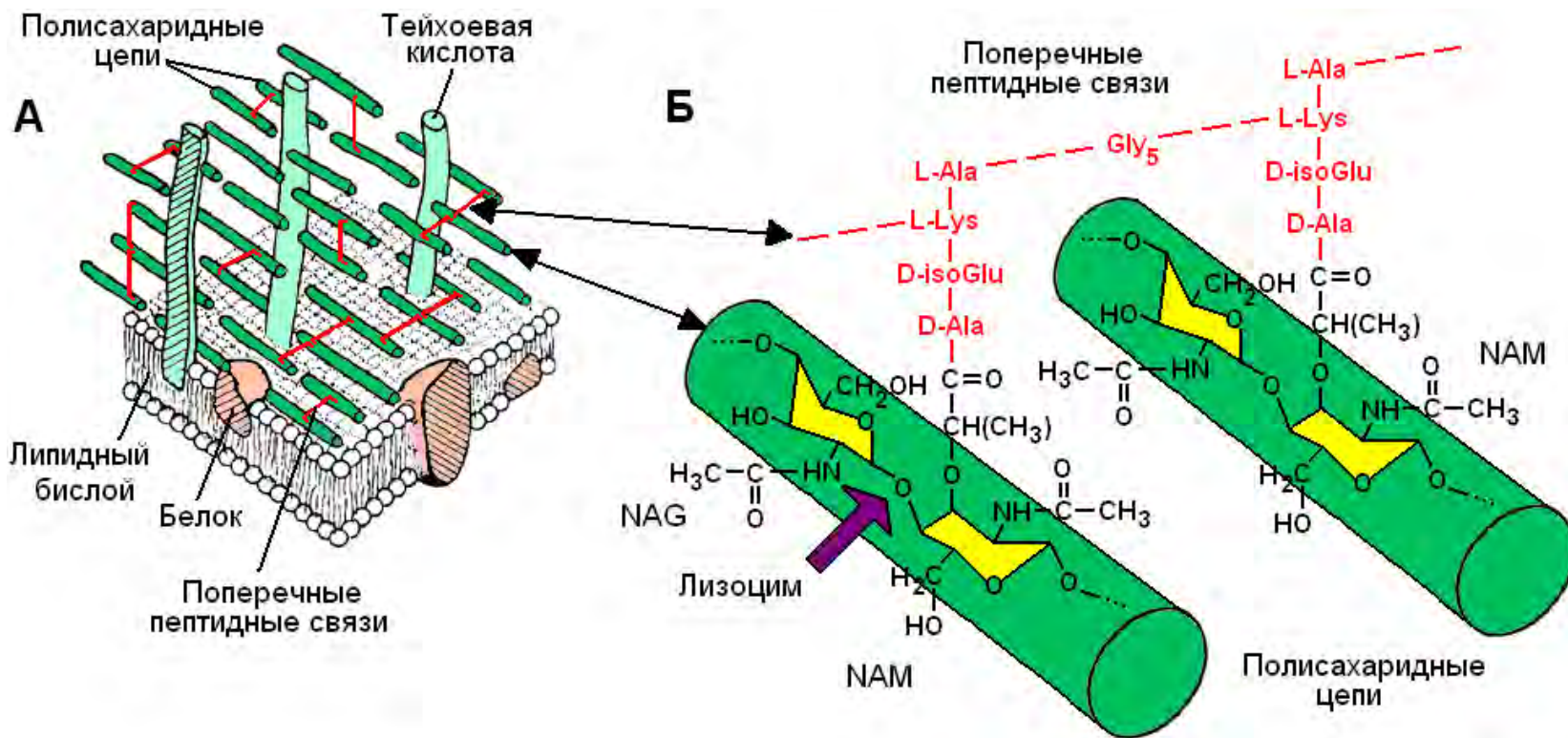


Конформация полукресла



Связывается в 3600 раз лучше в активном центре, чем NAG4

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА БАКТЕРИЙ



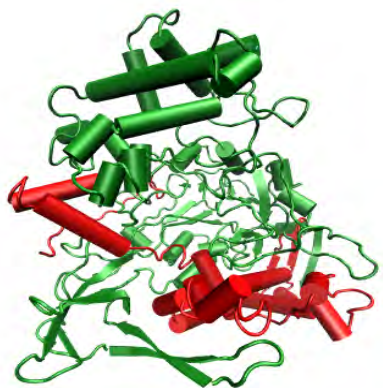
Флеминг (1928) открыл химиотерапевтическую активность пенициллина (роль в борьбе с инфекцией во время второй мировой войны).

В **1945** году Флемингу, Флори и Чейну была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине «за открытие пенициллина и его целебного воздействия при различных инфекционных болезнях».

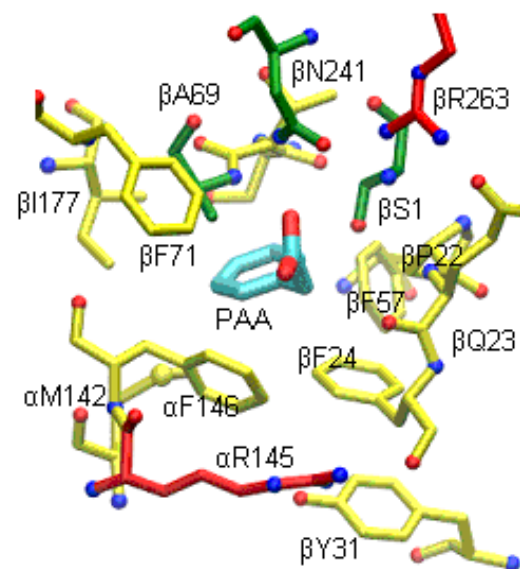
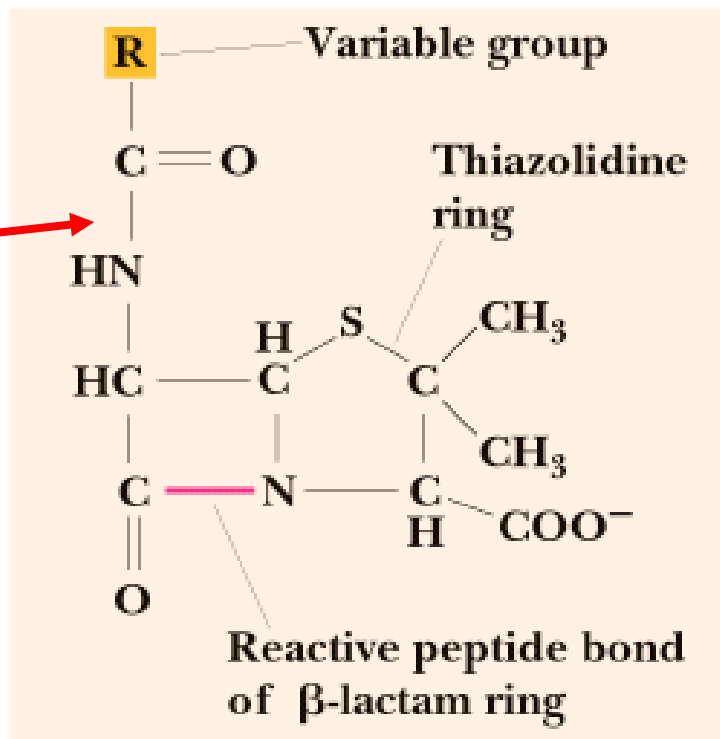
Антибиотики нарушают один из метаболических путей (процессов) в жизни бактериальной клетки.

Пенициллины, в частности, нарушают процесс образования клеточной стенки бактерий.

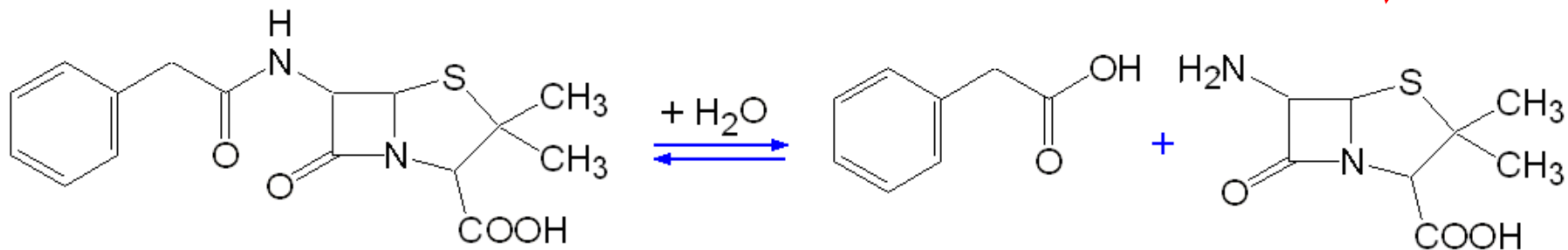
ПЕНИЦИЛЛИНАЦИЛАЗА

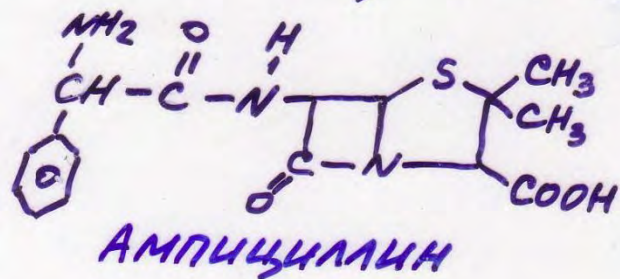
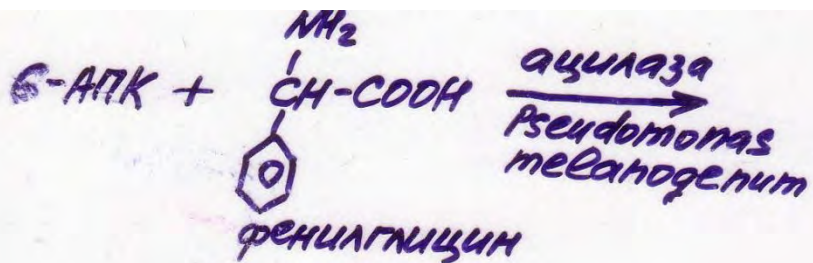


Пенициллинацилаза



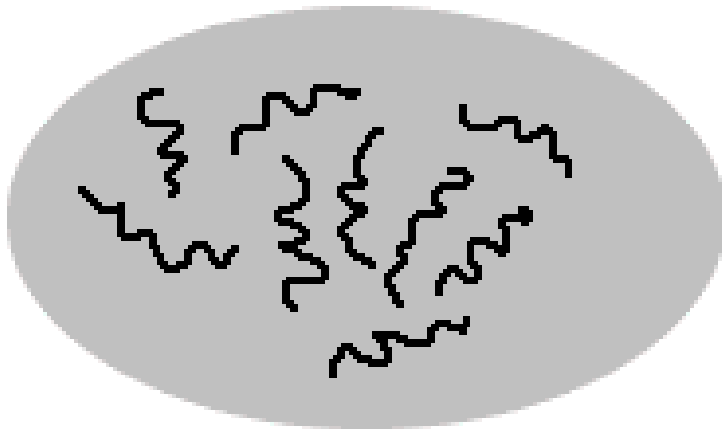
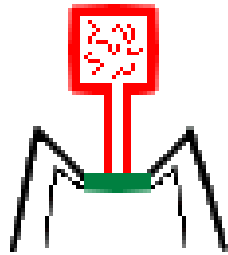
6-АПК – полупродукт в синтезе антибиотиков



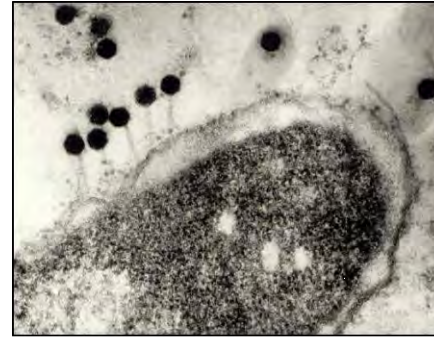


Бактериофаги (фаги) - вирусы,
способные инфицировать бактерии

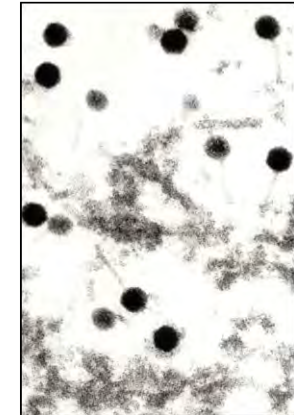
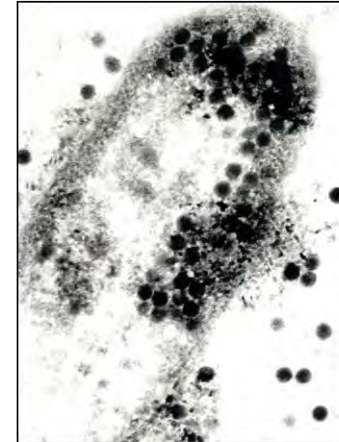
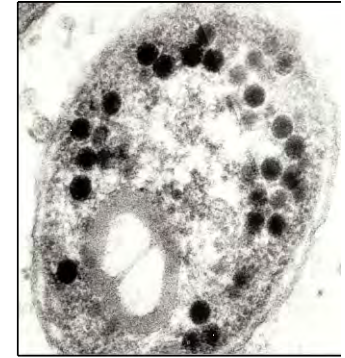
Отличаются от вирусов животных и
растений



20 min



30 min



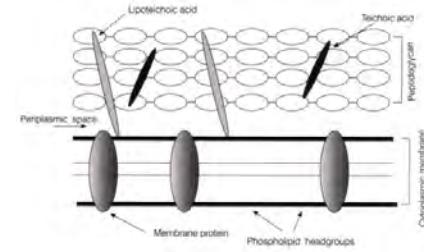
60 min

120 min

Клетки *S. typhimurium* остаются морфологически неизменными в течение 20 и 30 мин после инфицирования (лизис не идет), но генетический материал доставлен и фаги размножаются внутри;

Лизис начинается через 60 мин и практически заканчивается через 120 мин.

ФАГ-АССОЦИИРОВАННЫЙ ФЕРМЕНТ (PAL, PlyC), ОТВЕЧАЮЩИЙ ЗА ЛИЗИС ГРАМ-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ: *STREPTOCOCCUS PYOGENES*



S. pyogenes (стрептококк группы A) могут вызывать инфекции верхних дыхательных путей (тонзиллиты, фарингиты и т.д.), кожи (импетиго (пиодермия)), ревматизм и т.д.



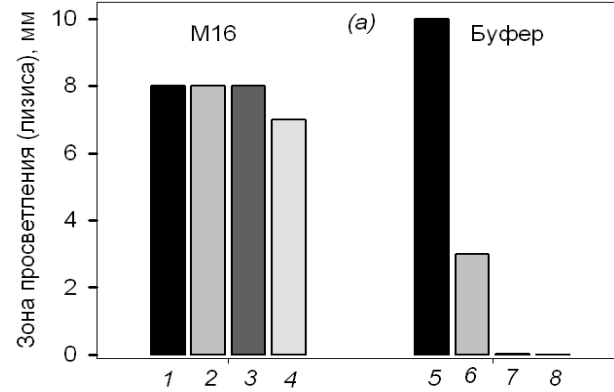
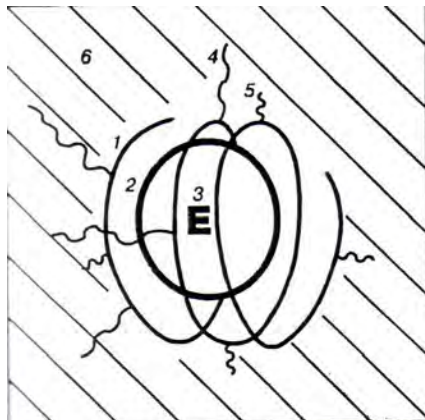
Зона лизиса под действием PlyC на газоне стрептококков

Недостатки:

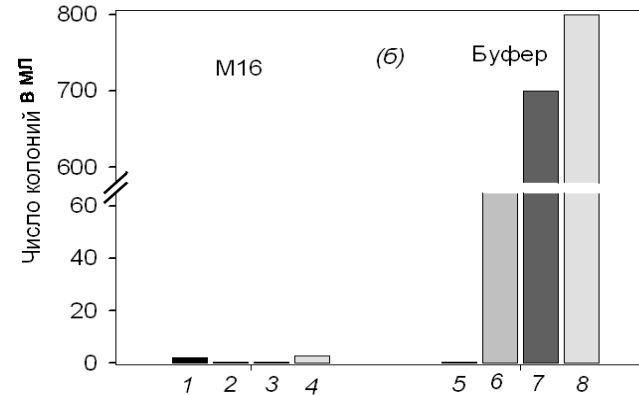
Чувствительность к T очень высока (низкая стабильность):

- 4°C - месяцы
- 20°C - часы
- 37°C - минуты

Мицеллярно-полимерная композиция защищает фермент



Снижение эффективности



Рост колоний

PlyC в мицеллярно-полиэлектролитной композиции M16 эффективно работает против стрептококка и через 2 дня (2), 2 недели (3), 2 месяца (4). Фермент без композиции теряет эффективность уже через 2 дня (6), наблюдается рост числа новых колоний патогена (6, 7, 8).

Методы иммобилизации БАВ

Физические

Химические

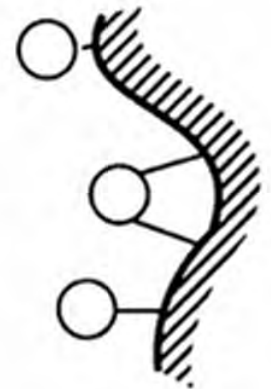
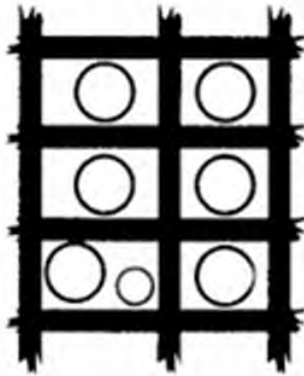
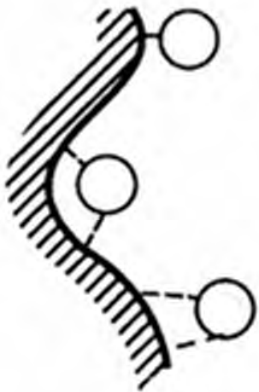
Адсорбция

Включение
в гель

Инкапсули-
рование

Включение
в липосомы

Ковалентное
связывание



Инженерная энзимология

- **Тонкий органический синтез (фармацевтическое производство)**
- **Ферменты в пищевой промышленности**
 - пищевые добавки
 - производство продуктов питания
 - кормовые добавки
- **Ферменты в медицине**
 - Лекарственные препараты на основе ферментов
 - диагностические наборы и устройства
- **Аналитические системы и устройства. Биосенсоры.**
- **Ферменты в бытовой химии, в стиральных и моющих средствах**
- **Ферменты в конверсии вещества и энергии**
- **Мониторинг окружающей среды и биоремедиация**

Источники ферментов для технологии:

Животные

Rennet (Abomasum) – производство сыра

Химотрипсин, трипсин – выделка кожи

Растения

Амилазы (Malted barley) – сбраживание

Папаин (Papain latex) – мясо

Микроорганизмы

α -амилаза (Bacillus) – крахмал

Глюкозоизомераза (Bacillus) – фруктовые сиропы

Протеаза (Bacillus) – стиральные порошки

Грибы

Глюкоамилаза (Aspergillus) – крахмал

Пектиназа (Aspergillus) – соки, вина

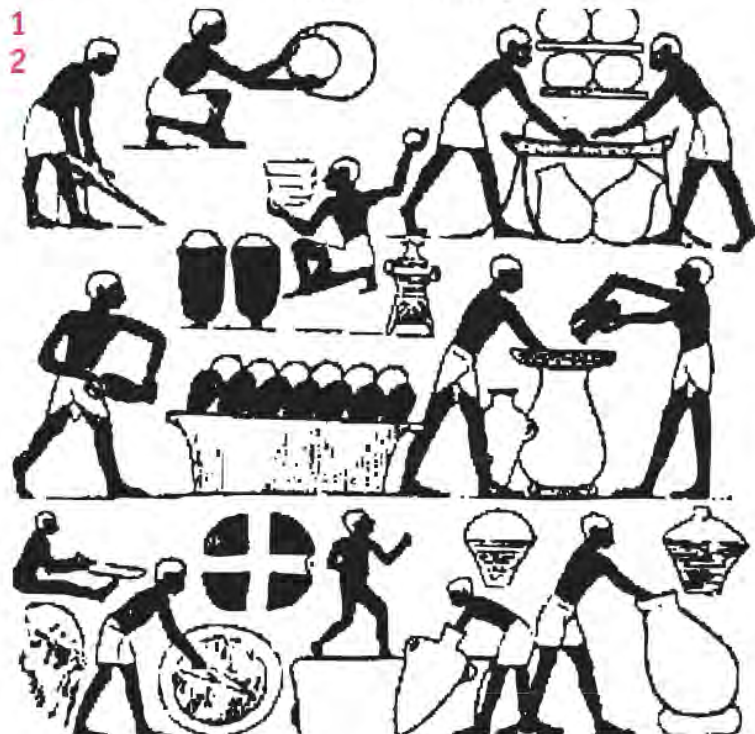
Лактаза (Aspergillus) – молочные продукты

Rennet (Mucor miehei) - сыр

Дрожжи

Инвертаза (Saccharomyces) – кондитерские изделия

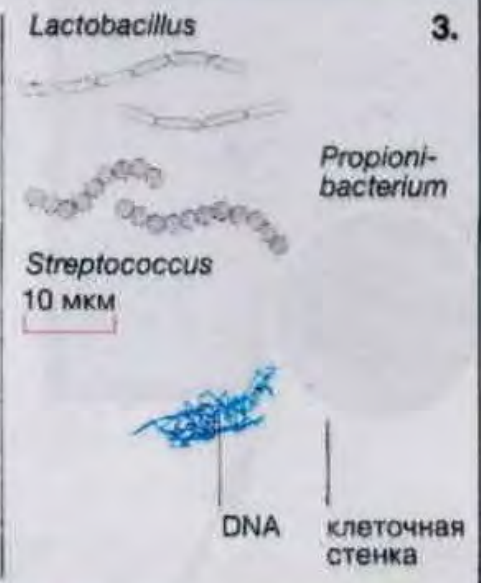
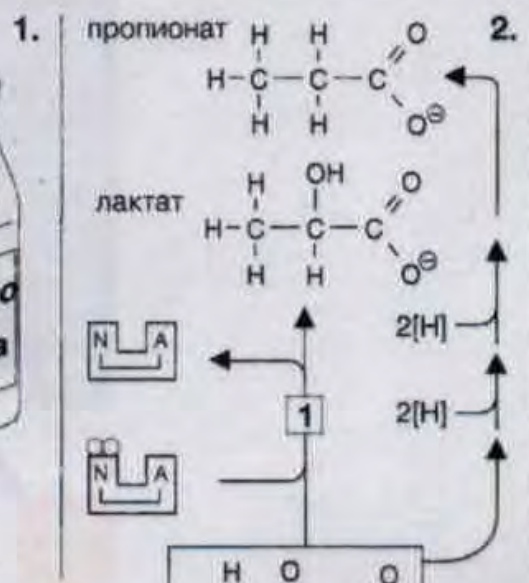
– Биотехнология – древняя наука



- 1 Пивоварение
- 2 Хлебопечение
- 3 Выделка кожи



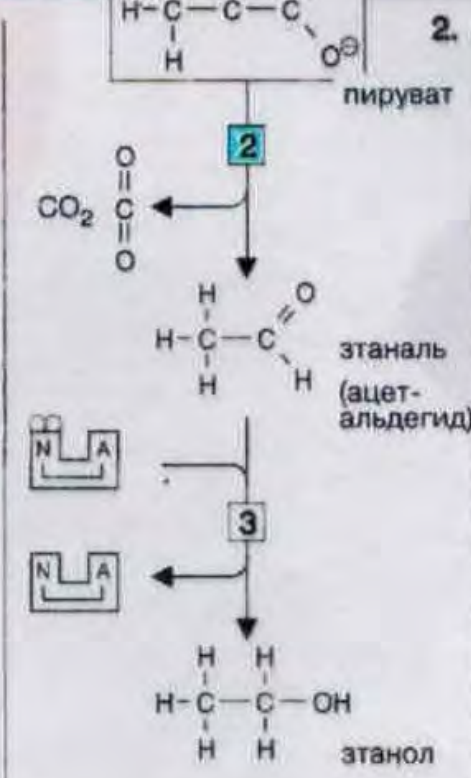
А. Молочнокислое и пропионовокислое брожение



1. лактатдегидрогеназа
1.1.1.27
2. пируватдекарбоксилаза
[TPP] 4.1.1.1
3. алкогольдегидрогеназа
[Zn²⁺] 1.1.1.1



Б. Спиртовое брожение



Древность	Сбраживание соков с получением этанола
	Получение кисломолочных продуктов и дрожжевого теста
	Выделка кожи с использованием экскрементов собак
1650	«Орлеанский» способ получения уксусной кислоты
Ок. 1680	Антоний Левенгук впервые наблюдал бактериальные клетки в оптический (световой) микроскоп
1867	Луи Пастер разделил культуры пивных дрожжей и уксуснокислых бактерий
Ок. 1890	Луи Пастер и Роберт Кох разработали первые вакцины
1900	Йокише Такаmine использовал α -амилазу в технологических целях
1908	Отто Рём применил животные протеиназы для получения стирального порошка
1916	Хаим Вейцман разработал ферментативный метод получения бутанола и ацетона
С 1920	Получение лимонной кислоты путем ферментативного процесса с помощью <i>Aspergillus niger</i>
1928/29	Александр Флеминг открыл антибактериальное действие пенициллина
1943	Зельман Ваксман выделил стрептомицин
С 1949	Микробная трансформация стероидов в промышленных масштабах
С 1957	Получение глутаминовой кислоты ферментацией с <i>Corynebacterium glutamicum</i>
С 1960	Микробные протеиназы добавляют в стиральные порошки
С 1965	Применение микробного реннина в сыроварении
С 1970	Полученный ферментативными методами «сироп с повышенным содержанием фруктозы» заменяет сахар в производстве безалкогольных напитков
1972/73	Стэнли Коэн и Герберт Бойер разработали стратегию переноса генов с помощью плазмидных векторов
1975	Цезарь Мильштейн и Георг Келлер получили моноклональные антитела с использованием гибрида
С 1977	Производство рекомбинантных белков в бактериальных клетках
1982	Получены первые трансгенные растения, устойчивые к гербицидам, и трансгенные животные (нокаутные линии мышей)
1985	Кэри Муллис разработал метод быстрой амплификации ДНК – метод ПЦР
С 1990	Начало реализации проекта «Геном человека»
1995	Трансгенные томаты разрешены к свободной продаже в США и Великобритании
С 1995	Попытки генной терапии на человеке
1996	Установлена нуклеотидная последовательность генома пекарских дрожжей
1996	Родилась овечка Долли – первое клонированное млекопитающее
1998	В базах данных содержится информация о последовательностях различных ДНК общим размером 2 млрд п.н.
1999	Геном дрозофилы размером 1,6 млрд п.н. полностью прочитан за четыре месяца
1999	Получена культура клеток человека
1999	Годовой объем мирового рынка рекомбинантных белков для фармакологии превысил 10 млрд долл. США
2001	Опубликована расшифрованная последовательность генома человека длиной более 3 млрд п.н.

Применение ферментов в промышленных технологиях

Область применения	Фермент(ы)	Источник (некоторые), из которого выделен фермент	Доля на рынке ферментов, %	Назначение фермента
Производство стиральных порошков	Протеазы Липазы Целлюлазы	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Trichoderma reesei</i>	40	1
Расщепление крахмала	α -Амилаза	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5	3, 4
Изомеризация глюкозы	Глюкозоизомераза	<i>Streptomyces venezuelae</i>	7	1, 3
Пивоварение*	Амилазы	<i>Bacillus subtilis</i>	5	3, 4
Переработка овощей и фруктов, виноделие	Целлюлазы Гемицеллюлазы Пектиназы	<i>Aspergillus niger</i>	7	3, 4, 5, 6
Хлебопечение	α -Амилаза Протеазы	<i>Aspergillus oryzae</i>	10	1, 3
Производство сыров	Протеазы Химозин Липазы	Сычужный фермент, <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12	2
Силосование и производство кормов	Целлюлазы	<i>Aspergillus niger</i>	2	3
Производство бумаги и текстильная промышленность	α -Амилаза	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	4
Кожевенная промышленность	Протеазы	<i>Aspergillus oryzae</i>	10	1, 7

* В Германии не используется

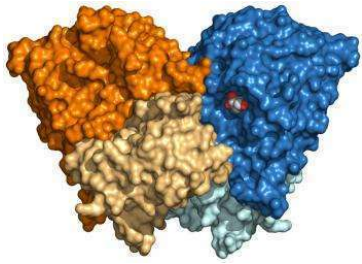
ЦЕЛЛЮЛАЗЫ И ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗЫ применяются при получении крахмала из кукурузы, экстракции кофе и чая, а также для переработки овощей и фруктов.

В пивоварении добавление глюканаз бактерий или грибов повышает эффективность затирания солода.

В Германии, однако, использование ферментов, так же как и любых других добавок при производстве пива, запрещено.

С какой целью применяют ферменты?

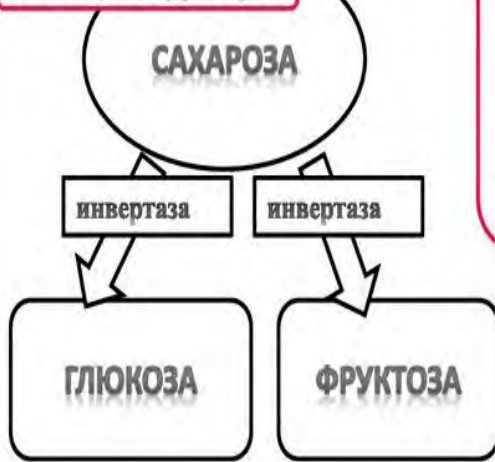
- 1 Повышение выхода продукта
- 2 Улучшение вкусовых качеств
- 3 Более продуктивная переработка
- 4 Снижение затрат на производство
- 5 Улучшение фильтруемости
- 6 Консервирование продукта
- 7 Снижение количества экологически вредных отходов



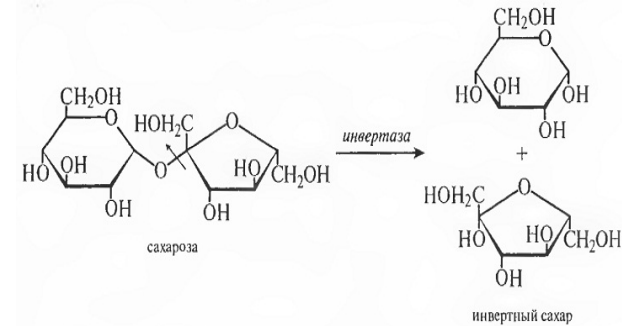
ИНВЕРТАЗА

Дёберейнер и Мичерлих в 1830 получили из культуры дрожжей;
 В 1860 Бертоло выделил инвертазу в чистом виде и дал название

Основная функция



Инвертаза – представляет собой гликопротеин с оптимальным рН 4,5 и стабильность при 50°С. Он широко распространен в биосфере, особенно в растениях и микроорганизмах.





ИНВЕРТАЗА

ФЕРМЕНТ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИНВЕРТНОГО СИРОПА



Фермент расщепляет сахарозу на составляющие: моносахара глюкозу и фруктозу, в удобную для усвоения пчёлами форму. Применяется для приготовления инвертного сиропа, который не кристаллизуется в сотах.



**Пищевая
добавка E1103**

Ее можно встретить в составе:

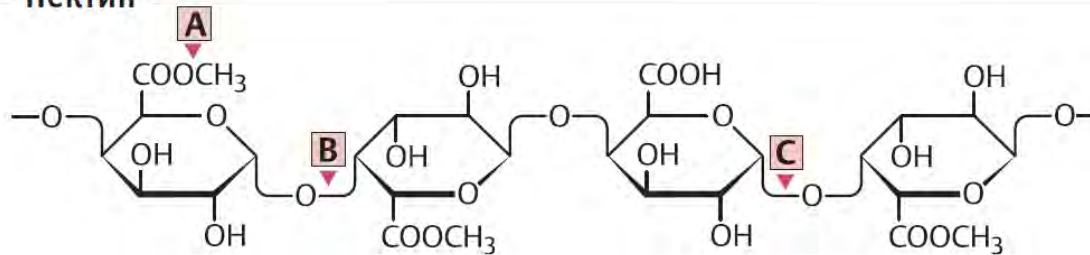
- ❏ мороженого;
- ❏ мармелада;
- ❏ марципановых и помадных масс;
- ❏ начинок для **конфет**: например, в белковом батончике Elite Gourmet инвертаза является компонентом зефирной прослойки;
- ❏ **шоколада** (Ritter Sport и другие: вещество обозначено как стабилизатор влажности);
- ❏ сушеных овощей.

(067)
(095) **582-33-22**



 ferment.enzim.biz
 ENZIM Group

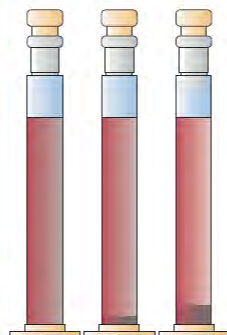
Пектин



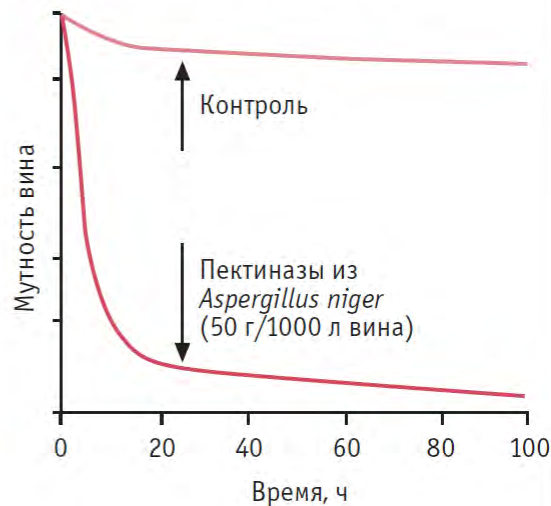
- A** Пектинэстераза
- B** Пектинлиаза*
- C** Пектатлиаза*/поли-
галактуроназа

* Образуется
сахароангидрид

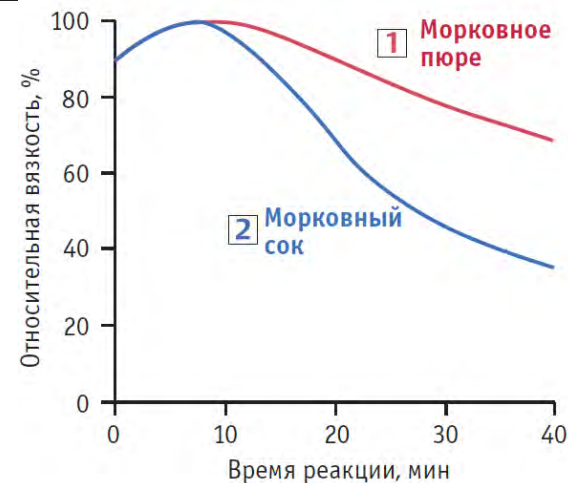
Производство соков (например, виноградного, черносмородинового или яблочного)



Пектиназы из *Aspergillus niger*



Переработка моркови



Основные области применения пектиназ:



а) размягчение овощей и фруктов;

б) переработка плодово-ягодной мезги в соки (яблочный, ягодный) или изготовление вин; пектиназы в этом случае используются для снижения вязкости соков;

в) обработка плодов цитрусовых – для предотвращения желирования;

г) обработка вина для повышения прозрачности и стабильности.



Пример практического использования пектиназ – производство фруктовых и овощных пюре для детского питания и соков с мякотью. За счет добавления пектиназ удается на 5–10% повысить выход сока и значительно облегчить фильтрацию. Под действием пектиназы пектиновые вещества переходят в пектиновую кислоту и при отстаивании образуют осадок.

Производство вин

Пектиназа способствует:

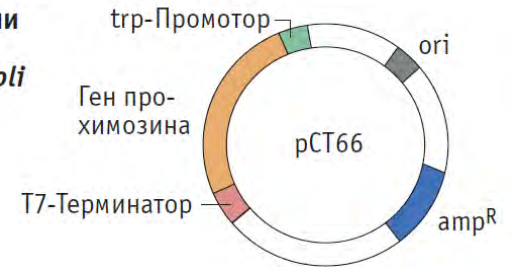
- полному и быстрому высвобождению красящих веществ;
- более эффективному высвобождению танинов и их соединений с антоцианами и обеспечению длительной стабильности виноматериала;
- подчеркиванию особенностей сортовой ароматики.



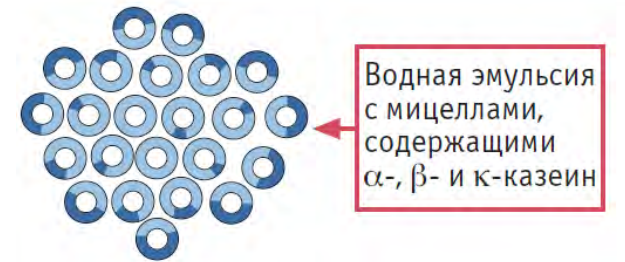
Состав молока

	Молоко, %	Сыворотка, %
Вода	~88	~94
Жиры	~3-4	~0,5
Белки	~3,3	~1
Казеины	~2,6	-
Лактоза	~3	~4,8

Плазмида для экспрессии прохимозина в клетках *E. coli*

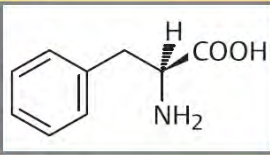


Переработка молока



Отщепление полярных участков к-казеина с помощью химозина (сычужного фермента) приводит к разрушению мицелл и выпадению белка в осадок (створаживание молока также происходит в присутствии Ca^{2+})

L-Фенилаланин



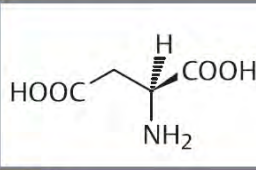
$C_9H_{11}NO_2$

M_R 165,19

$T_{пл}$ 310–312 °C

Код CAS 63-91-2

L-Аспарагиновая кислота

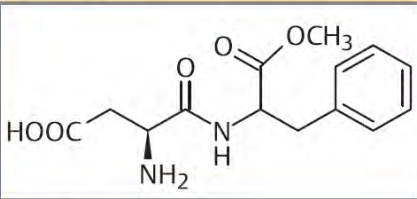


$C_4H_7NO_4$

M_R 133,10

Код CAS 56-84-8

α-Аспартам



$C_{14}H_{18}N_2O_5$

M_R 294,31

Максимальная суточная доза 40 мг/кг

Код CAS 22389-47-0

Получение L-фенилаланина

Наиболее распространенный метод – ферментация

Штаммы-суперпродукты: коринебактерии или *E. coli*

Источник С: глюкоза
Очистка: использование мембран, ионообменная хроматография, перекристаллизация

Более 40 г/л через 60 ч роста

Другой метод – ферментативный реактор

Добавление аммиака к транс-коричной кислоте

Иммобилизованный фермент L-фенилаланин-аммиаклаза из *Rhodotorula glutinis*

Около 50 г/л при 83% конверсии сырья

Получение L-аспарагиновой кислоты

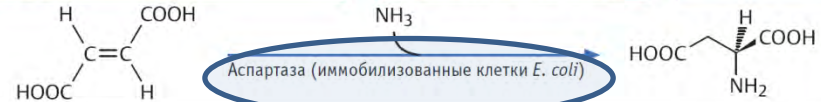
Многоступенчатая реакция в биореакторе

Иммобилизованные клетки *E. coli*; 1,2 М фумаровая кислота, аммиак, pH 8,5, 37°C

Очистка

Добавление H_2SO_4 при 15 °C (pH 2,8) приводит к выпадению аспарагиновой кислоты в осадок

Выход 90–95%, срок службы клеток *E. coli* 2 года



Получение α-аспартама

L-Z-аспарагиновая кислота + D,L-фенилаланин-OMe

иммобилизованный термолизин (60 °C, 2 ч)

рацемизация

D-фенилаланин-OMe

L-Z-α-аспартил-L-фенилаланин-OMe

гидрирование → ZH

L-α-аспартил-L-фенилаланин-OMe
α-Аспартам

→ ферментативный катализ
→ химические реакции
Z = бензилоксикарбонил

Аспартам вреден для больных фенилкетонурией — при этом заболевании аминокислота фенилаланин не выводится из организма и накапливается в нем до опасных значений. Особенно он **опасен** в этих случаях при беременности, чрезвычайно токсично влияя на развитие плода

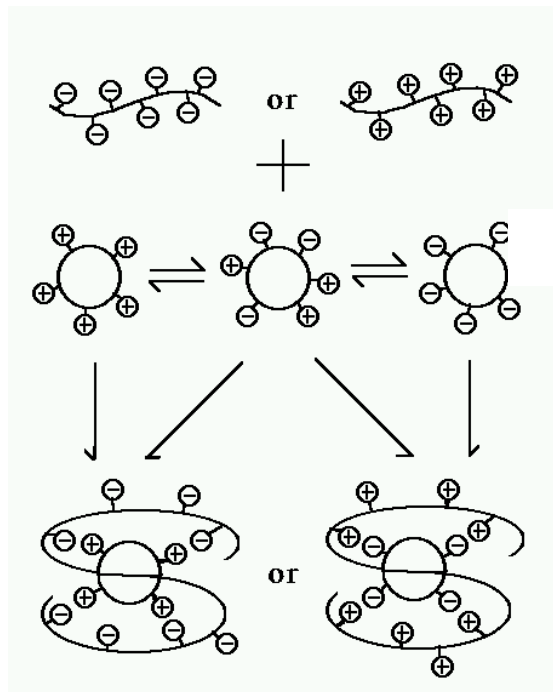
Преимущества иммобилизованных ферментов

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

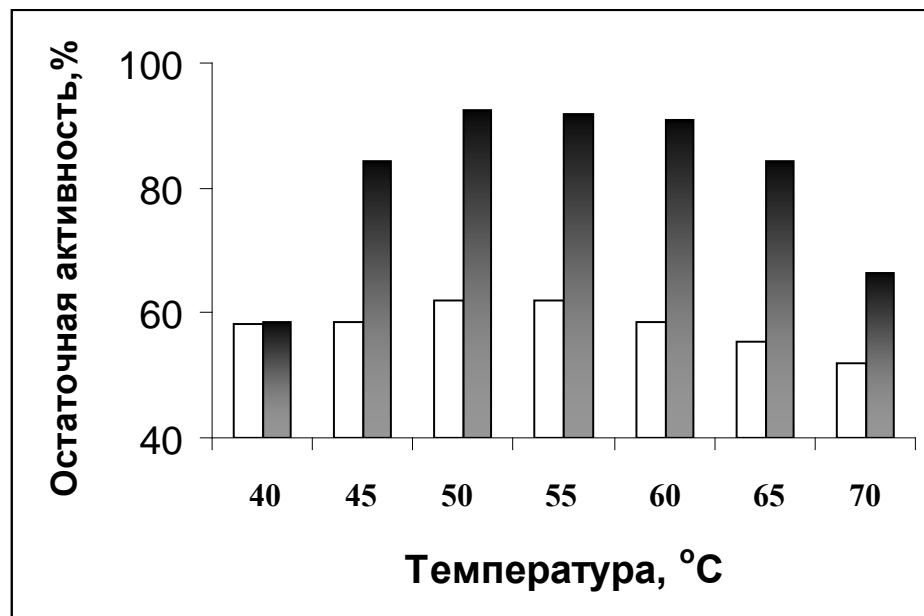
Недостатки иммобилизованных ферментов

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

Образование фермент-ПЭ комплексов (регуляция свойств ферментов в различных средах)



Целлюлаза-Хитозан
при стирке



Преимущества метода:

1. Методически несложный
2. Универсальность
3. Эффективность

Увеличение остаточной акт при выс темп: 50-60%

Снижение количества ферментов (ЩП и Ц) в 2 раза

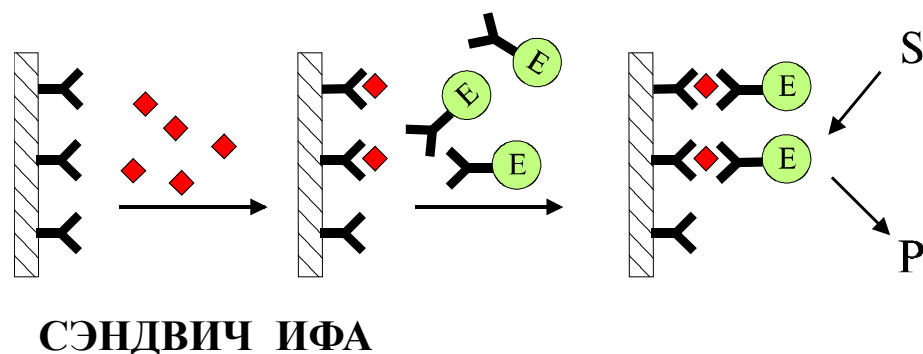
Безопасность использования фермент – содержащих СМС

ФЕРМЕНТЫ В АНАЛИЗЕ

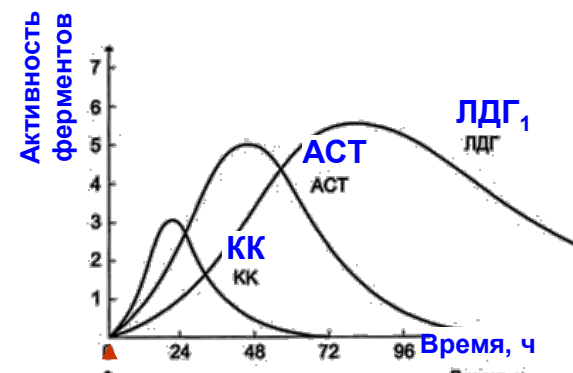
- Высокая чувствительность
- Высокая селективность

Примеры

1. Иммуноферментный анализ (конкурентный и неконкурентный, прямой и непрямой)
2. Билюминесцентный анализ (определение АТФ)
3. Биосенсоры, биочипы
4. Ферменты как маркеры заболеваний (креатинкиназа, лактатдегидрогеназа,)



АСТ (AST) аспаратаминотрансфераза

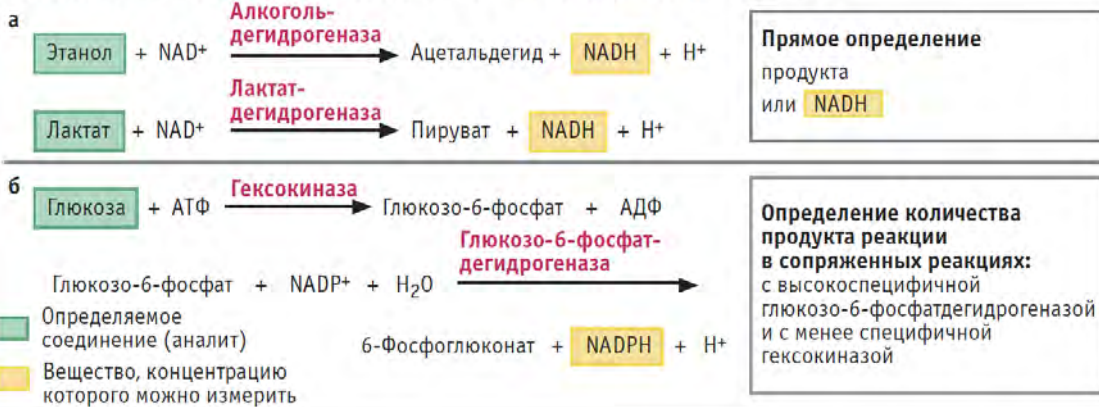


Инфаркт миокарда

Ферменты, применяемые при проведении лабораторных клинических анализов

Фермент	ЕС-номер	Анализируемое вещество	Детектируемое вещество
Алкогольдегидрогеназа	1.1.1.1.	Этанол, другие спирты, альдегиды	NADH
Глюкозооксидаза	1.1.3.4.	Глюкоза	Окраска
Пируваткиназа	2.7.1.40	Фосфоенолпируват, АДФ	
Креатинкиназа	3.5.3.3.	Креатинин	
Цитратлиаза	4.1.2.6.	Лимонная кислота	NAD+
Маннозо-6-фосфатизомераза	5.3.1.8.	Манноза	
Сукцинил-КоА-синтетаза	6.2.1.4.	Сукцинат	

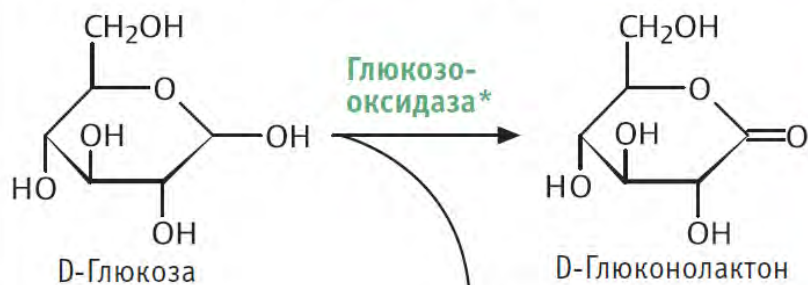
Определение концентрации субстрата по количеству продукта реакции



Определение концентрации NADH

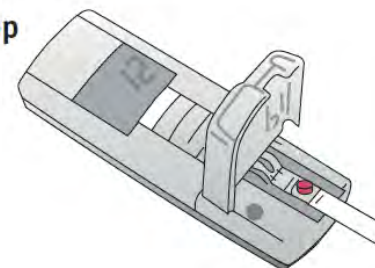


Тест-полоски (тест на глюкозу крови)

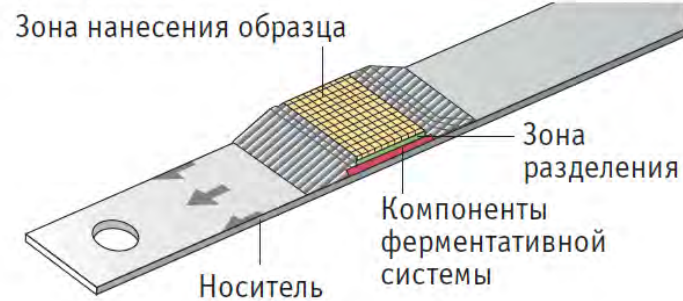


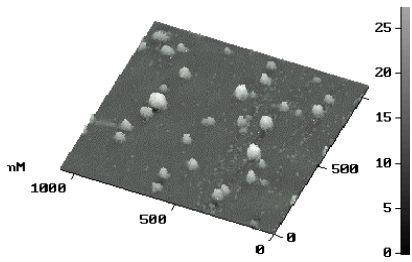
* Глюкозооксидаза *Aspergillus niger*
 ** Пероксидаза хрена

Портативный прибор для определения уровня глюкозы крови

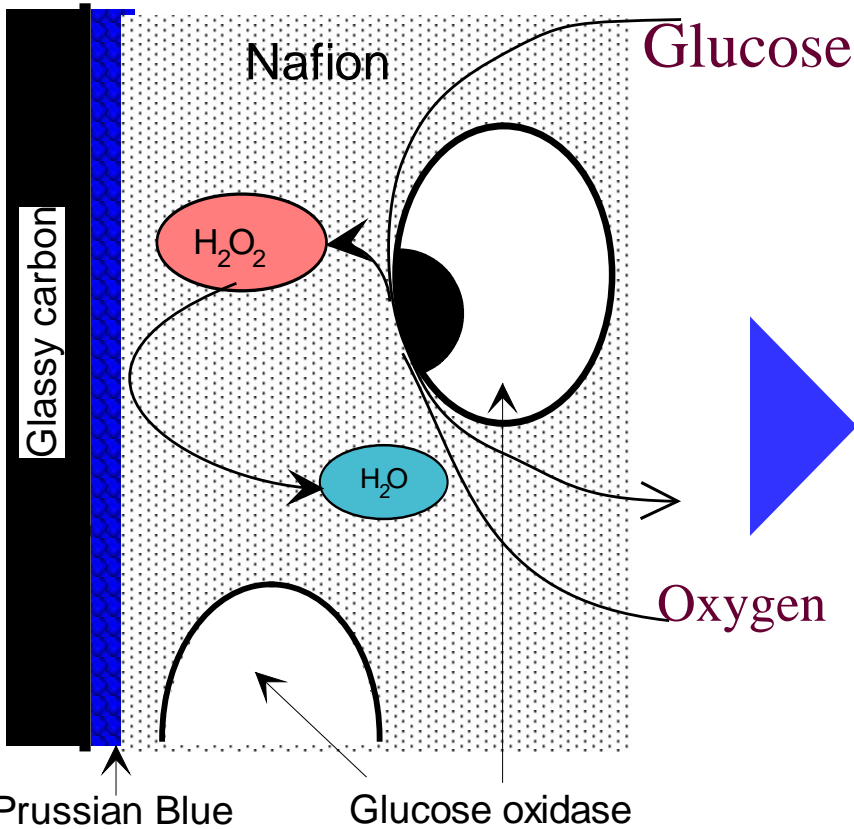
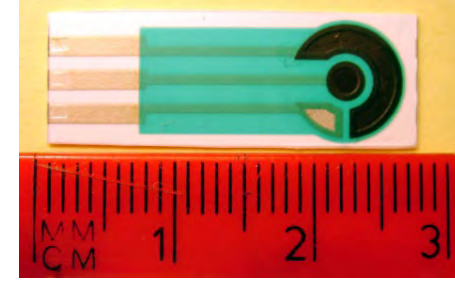


Тест-полоска





Биосенсоры, основанные на электрокатализе (наноструктурированные поверхности)

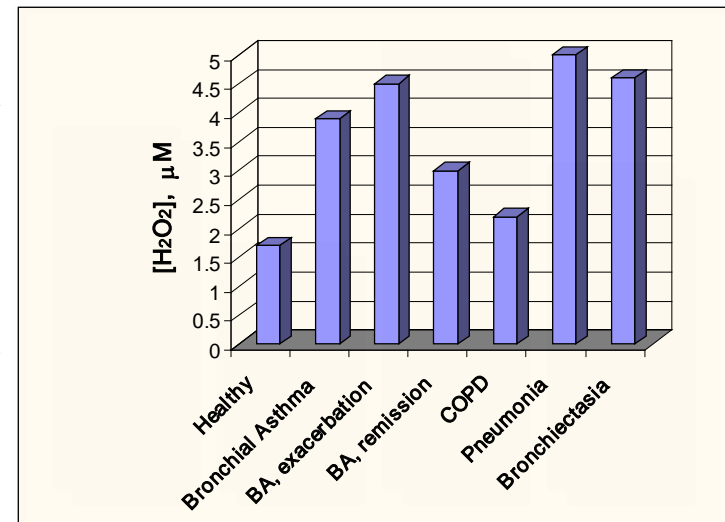


D
i
a
g
h
o
s
t
i
c
s
c
i
v
e

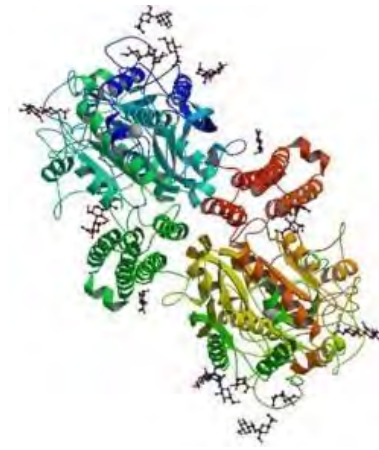
Lactate in sweat



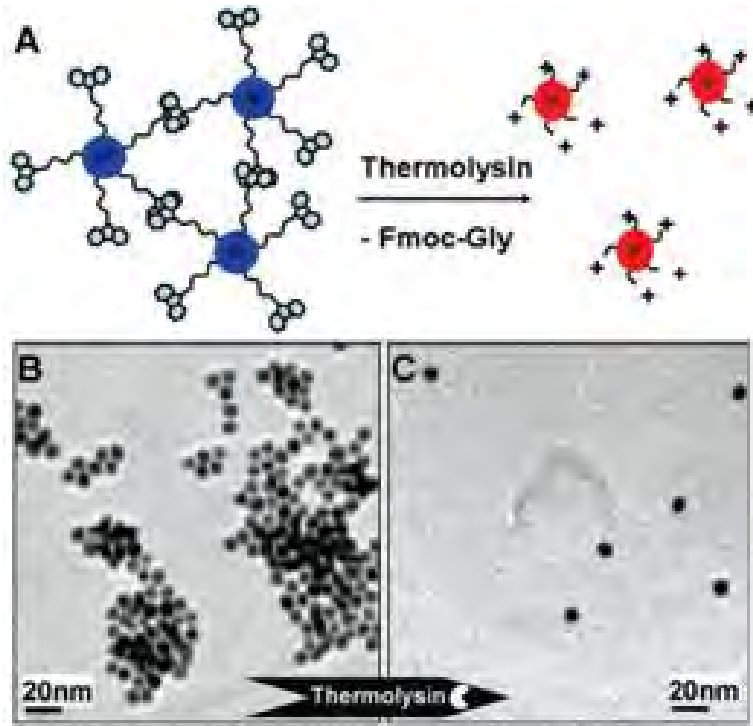
Hydrogen peroxide in EBC



НАНОЧАСТИЦЫ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ



Alpha 1-
antichymotrypsin-PSA
(ACT-PSA)



Наночастицы золота (10нм)

Короткие спец пептиды на поверхности

Пептиды связывают частицы друг с другом с помощью спец линкеров

Связанные наночастицы – голубая окраска

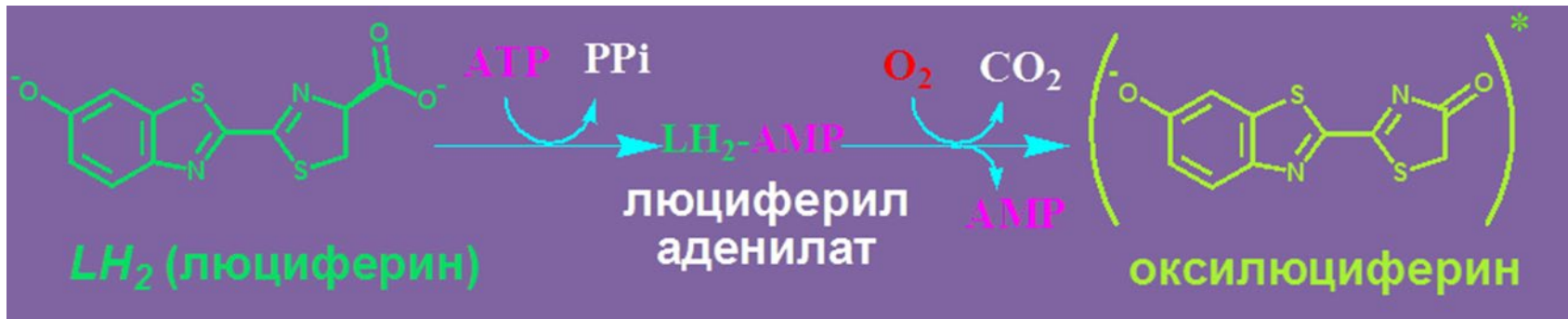
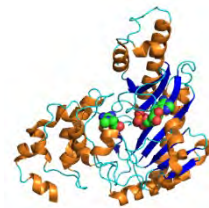
Присутствие спец фермента **nACT-PSA** при раке простаты – «разрываются» пептидные связи между частицами – **красная окраска**

non-alpha1-antichymotrypsin-complexed
prostate-specific antigen

*Laromaine, A. et al J. Am. Chem. Soc. 129,
4156-4157 (2007)*



Биолюминесцентная реакция, катализируемая люциферазами светляков



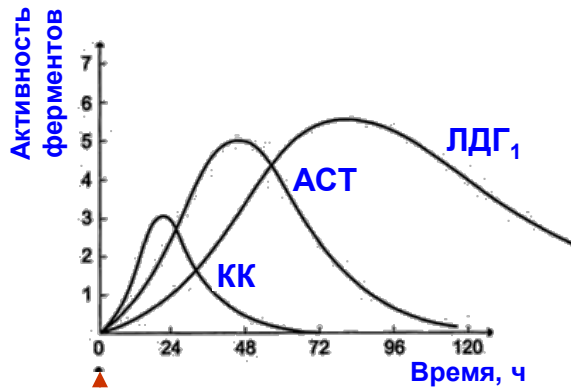
Определение АТФ – области применения

- Контроль за скоростью ферментации
пищевая и фарм. пром, производство напитков
- Обнаружение микробного заражения
Контроль качества продуктов в производстве
пищи, лекарств, косметики и т.д.
- Измерение биомассы в воде
Контроль за процессами обработки сточных вод
- Детекция наличия жизни
Космические исследования
- Определение креатинфосфокиназы в сыворотке крови
(КФК синтез АТФ, люцифераза использует АТФ)
Медицина. Повышение конц КФК - инфаркт

$\lambda_{max} = 540-570 \text{ нм}$

Высокая специфичность к АТФ,
Высокий квантовый выход
Высокочувствительный
анализ АТФ
(до 10^{-15} моль/образец)

ДИАГНОСТИКА ИНФАРКТА МИОКАРДА



Инфаркт миокарда



АСТ (AST)
аспартатаминотрансфераза



Лауреаты нобелевской премии по химии 2018 года.

Слева направо: Фрэнсис Арнольд (Frances H. Arnold), Джордж Смит (George P. Smith) и Грег Уинтер (Sir Gregory P. Winter)

Половина премии досталась американской исследовательнице **Фрэнсис Арнольд «за направленную эволюцию ферментов»**, вторую половину поровну поделили американец **Джордж Смит** и **Грег Уинтер** из Великобритании — **«за фаговый дисплей пептидов и антител»**.

Все авторы связаны с разработкой методов для получения полезных для человека белков и пептидов, основанных на имитации естественного «метода» биологической эволюции, а именно — на сочетании случайной изменчивости и неслучайного отбора.

Фрэнсис Арнольд получила свой первый «неестественный» (non-natural) фермент в 1993 году (K. Chen, F. H. Arnold, 1993. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide). Тогда был получен новый **вариант фермента субтилизина E**, который катализирует расщепление и образование пептидных связей (соединений между аминокислотами в пептидных цепочках), причем, благодаря методу направленной эволюции и внесению в исходно взятый природный белок **10 аминокислотных замен**, удалось заставить фермент **работать в органическом растворителе (60% диметилформамиде)** и **повысить термостабильность на 18 градусов**.

Белки – настраиваемые «кирпичики»

Мутантные белки

- Эволюция оптимизирует свойства белков под нужды организма
- Приемы генной инженерии для получения белков с заданными свойствами

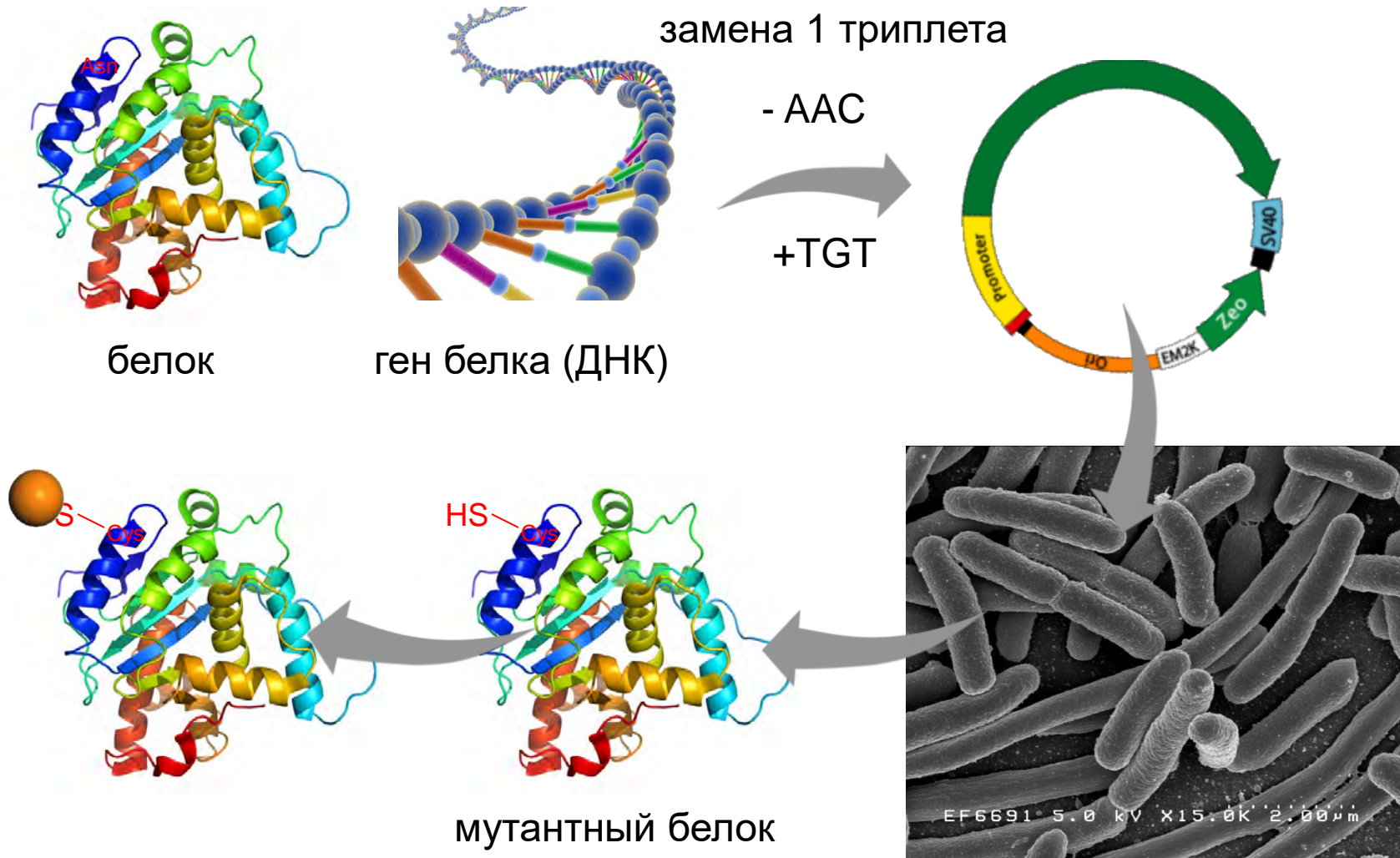
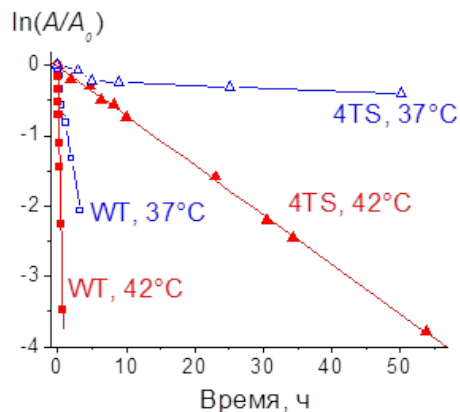
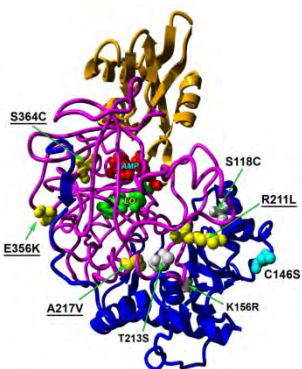
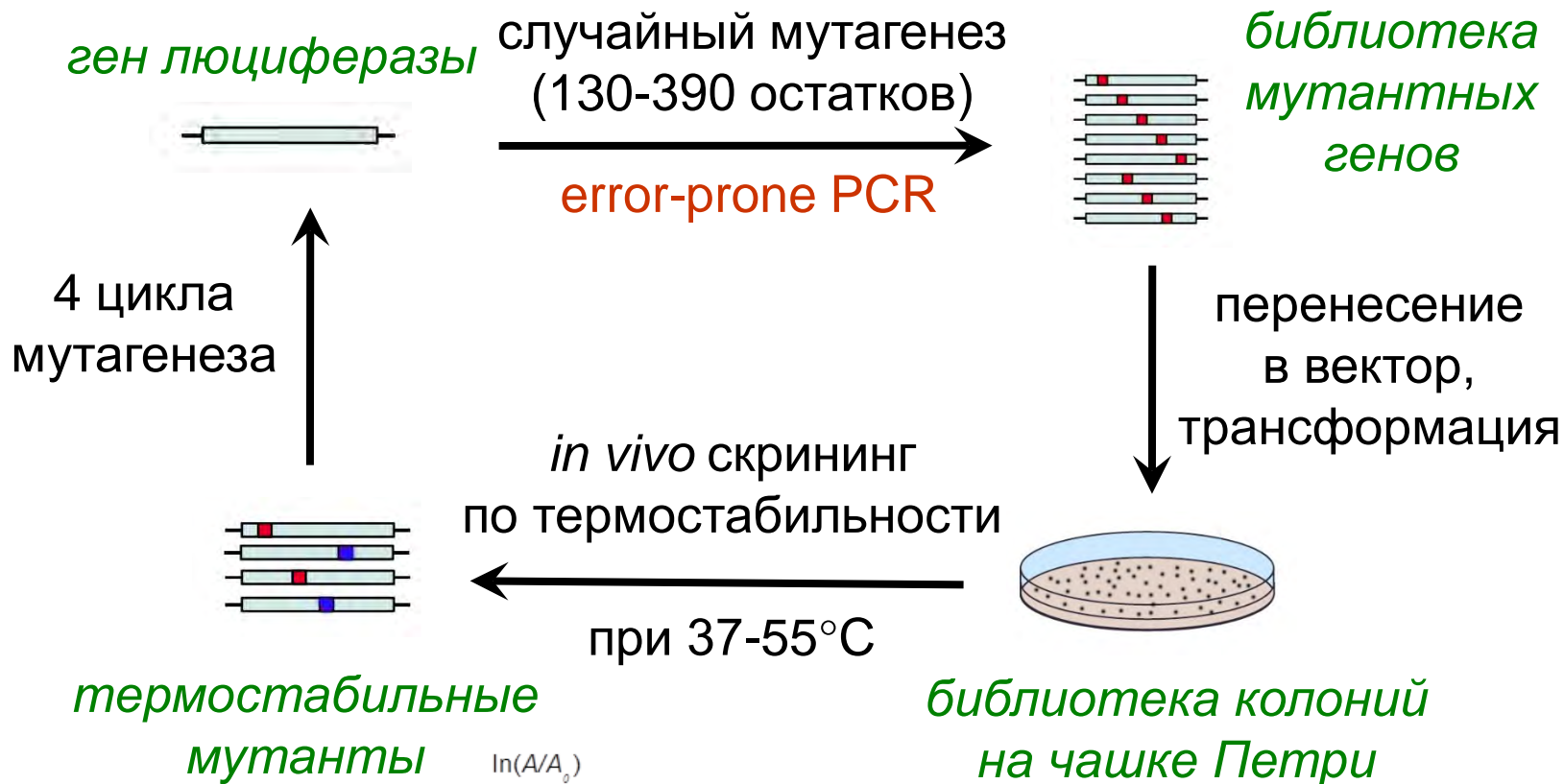


Схема повышения термостабильности люциферазы методом случайного мутагенеза



R211L (Arg211Leu), A217V (Ala217Val), E366K (Glu366Lys), S364C (Ser364Cys)

Ферменты в медицине

- **Энзимотерапия** – использование в лечебных целях **ферментов** и лекарственных веществ, влияющих на их активность
- В лечебных целях применяют **ферменты**, **коферменты** (витамины, микроэлементы), **активаторы** (например, гормоны) и **ингибиторы ферментов** (лекарственные вещества, (например, сульфаниламиды, аспирин)); **антибиотики** – ингибирующие синтез **фермента**

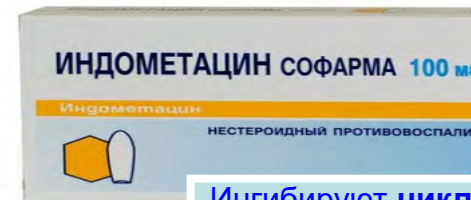
- **Ингибиторы и активаторы** ферментов как лекарственные препараты
- **Ферменты** как лекарственные препараты
- Медицинская **диагностика**



Содержат комплекс ферментов поджелудочной железы: **липаза, амилаза, протеазы**

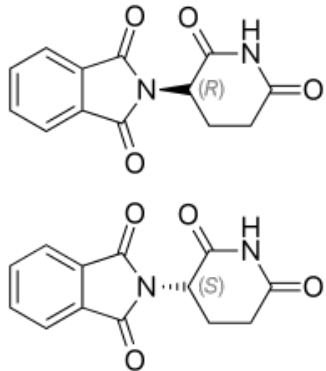


Сульфаметаксозол – конкурентно ингибирует биосинтез **фолиевой кислоты** и образование ТГФК, оказывая бактерицидное действие

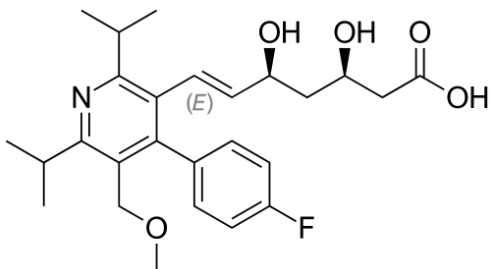


Ингибируют **циклоксигеназу**, снижая синтез простагландинов, обуславливающих в очаге воспаления развитие боли, $\uparrow t^0$, \uparrow тканевой проницаемости





Thalidomide На рынок вышел в 1957 (Immunoprin, Contergan). Chemie Grunenthal (Германия). Иммуностимулирующее средство. Беременные принимали, т.к. против тошноты. Более 10000 случаев. В 1961 Withdrawn Germany
 Withdrawn because of risk of teratogenicity; returned to market for use in leprosy and multiple myeloma under FDA orphan drug rules



Lipobay (Cerivastatin) На рынок вышел в 1997 как препарат, снижающий холестерин (статины). (Байер, Германия). В 2001 приостановлено продвижение на рынок. 52 чел умерли только в США, у 1000 тяжелое поражение мышц.
 Риск развития миопатии/рабдомиолиза. Разрастание мышечного белка, несет кровь. Почки не справляются, закупорка почечных структур

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

