

Инженерная энзимология

Преподаватель:

к.б.н

Кузнецова Екатерина Игоревна

Введение.

**Структурно-функциональные
особенности биокатализа**

• ЛИТЕРАТУРА

- *Семак И.В.* Инженерная энзимология: Курс лекций / И.В. Семак. Минск: БГУ, 2006. 126 с
- *Березин И.В.* Инженерная энзимология / И.В. Березин, А.А. Клесов, В.К. Швядас и др. – М.: Высш. шк., 1987.
- Введение в прикладную энзимологию / Под ред. И.В. Березина, К. Мартинека. – М.: МГУ, 1982.
- *Бейли Дж.* Основы биохимической инженерии. В 2-х кн. / Дж. Бейли, Д. Оллис. М.: Мир, 1989.
- *Кулис Ю.Ю.* Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов / Ю.Ю. Кулис. Вильнюс: Мокслал, 1981.
- *Клесов А.А.* Инженерная энзимология на промышленном уровне. Биотехнология. Итоги науки и техники / А.А. Клесов. М.: ВИНТИ, 1989.
- *Сорочинский В.В.* Ферментные электроды // Итоги науки и техники. Биотехнология / В.В. Сорочинский, Б.И. Курганов. М.: Изд-во ВИНТИ.- 1984.- Т.13.- 207 с.
- *Загребельный С.Н.* Биотехнология. Ч.2. Инженерная энзимология. // С.Н. Загребельный Новосибирск, 2001. – 138 с.
- *Глик Б.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. / Б. Глик, Дж. Пастернак. 2002. 592 с.

- **Д о п о л н и т е л ь н а я:**
- *Вольф М.* Лечение ферментами / Вольф М., Рансбергер К. - М.: Мир, 1976.
- *Arnold F.H.* Optimizing industrial enzymes by directed evolution / Advances in biochemical engineering / biotechnology. New enzymes for organic synthesis. (Scheper Th., Ed.). Verlag; Berlin, Heidelberg; New York: Springer, V.58, 1997, 1-14.
- *Ladenstein R., Antranikian G.* Proteins from hypertermophiles: stability and enzymatic catalysis close to the boiling point of water / Advances in biochemical engineering/biotechnology. (Scheper Th., Ed.). Verlag; Berlin, Heidelberg; New York: Springer, V.61, 1998.
- *Rubingh D.N.* Protein engineering from a bioindustrial point of view / Current Opinion in biotechnology, 1997, 8, 417-422.
- *Wodak S.J.* Computer-aided design in protein engineering. Ann N Y Acad Sci 1987; 501: 1-13.
- *Taylor N.R.* The World Wide Web as a graphical user interface to program macros for molecular graphics, molecular modeling, and structure-based drug design / Taylor N.R., Smith R. J. Mol. Graph. 1996 Oct; 14(5): 291-296, 280-282.
- *Lesyng B.* Molecular modeling methods. Basic techniques and challenging problems / B. Lesyng, J.A. McCammon Pharmacol Ther 1993 Nov; 60(2): 149-167.

- *Nixon A.E.* Hybrid enzymes: manipulating enzyme design / Nixon A.E., Ostermeier M., Benkovic S.J. Trends Biotechnol. 1998 Jun; 16(6): 258-264.
- Proteome Research: New frontiers in functional genomics. (Wilkins M.R., Williams K.L., Appel R.D., Hochstrasser D.F., Eds.). Verlag; Berlin, Heidelberg; New York: Springer, 1997.
- *Sasaki S.* The development of microfabricated biocatalytic fuel cells / Sasaki S., Karube I. Trends Biotechnol. 1999 February; 17(2): 50-52.
- *Сорочинский В.В.* Теоретические основы применения потенциометрических ферментных электродов / В.В. Сорочинский, Б.И. Курганов. Прикл. биохим. микробиол.-1997.- Т.33.- №2.- С.138-146.
- <http://isir.ras.ru/> - Интегрированная Система Информационных Ресурсов Российской Академии Наук.
- <http://www.viniti.msk.su/> - Всероссийский Институт Научной и Технической Информации (ВИНИТИ РАН).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - База научных данных в области биомедицинских наук.
- www.chem.qmul.ac.uk/iubmb - Биохимическая классификация и номенклатура ферментов. Свободный доступ на сайте Международного союза биохимии и молекулярной биологии.
- www.molbiol.ru, www.nature.ru - Учебники, научные монографии, обзоры, лабораторные практикумы в свободном доступе на сайтах практической молекулярной биологии.

- **Цель курса –**
- освоение студентами основных принципов и теоретических положений инженерной энзимологии;
- формирование у студентов понимания особенностей биотехнологических процессов с участием ферментов;
- усвоение основ конструирования и последующего использования в биотехнологии биокатализаторов с заданными свойствами.

Задачи курса:

- познакомить студентов с предметом, определить место инженерной энзимологии в ряду приоритетных направлений биотехнологии;
- углубить понимание физико-химических и биохимических закономерностей биокатализа, особенностей его использования в биотехнологии;
- развить видение перспектив практического использования достижений инженерной энзимологии.

- Главный вопрос инженерной энзимологии:
 - Зачем это нужно или где и с какой целью это будет применяться?

- **Инженерная энзимология** – это перспективное научно-техническое направление биотехнологии, в котором удачно сочетаются самые современные достижения биохимии, молекулярной биологии, энзимологии и химической технологии.
- **Инженерная энзимология** – отрасль науки (биотехнологии), разрабатывающая методы создания высокоэффективных ферментов для промышленного использования.
- **Инженерная энзимология** – ваше определение=)

Сложности при работе с ферментами?!

- Ферменты часто неустойчивы при хранении и при их использовании в экстремальных условиях.
- Сложно отделить от конечных продуктов реакции после завершения технологического цикла.
- Получение больших количеств очищенного фермента, сохранившего свою активность, является трудоемким и дорогостоящим процессом
- **КАКИЕ РЕШЕНИЯ ВЫ ПРЕДЛОЖИТЕ?**

Решение

- Ферменты часто неустойчивы при хранении и при их использовании в экстремальных условиях.
- 1. Использование в биотехнологических процессах ферментов из так называемых экстремофилов
- 2. Создание ферментов с заданными свойствами.

Решение

- Сложно отделить от конечных продуктов реакции после завершения технологического цикла.
- Иммобилизация ферментов

Решение

- Получение больших количеств очищенного фермента, сохранившего свою активность - трудоемкий и дорогостоящий процесс
- В качестве биокатализаторов можно использовать целые клетки

Катализатор – это вещество, которое повышает скорость химической реакции, не претерпевая при этом необратимых химических изменений.

Можно выделить два типа катализа – биологический (ферментативный) и неорганический (синтетический).

Ферменты (или энзимы) – это класс веществ белковой природы (за исключением рибозимов), используемый живыми организмами для осуществления с высокой скоростью многих тысяч взаимосвязанных химических реакций.

Сходство ферментов и небиологических катализаторов:

- Катализируют энергетически возможные реакции;
- Не изменяют направление химической реакции, не влияют на величину константы равновесия реакции и изменение свободной энергии;
- Не расходуются в процессе реакции;
- Оказывают свое действие в ничтожно малых концентрациях.

Отличия:

- Скорость ферментативных реакций выше, чем реакций, катализируемых небелковыми катализаторами
(Например, ионы йода ускоряют разложение перекиси водорода на воду и кислород в 800 раз, порошок платины – в 20 тысяч раз, а каталаза – в 300 миллиардов раз);
- Ферменты специфичны;
- Скорость ферментативной реакции можно регулировать различными веществами, которые называются модуляторами или эффекторами..
- Многим ферментам для проявления каталитической активности нужны кофакторы и коферменты
- Ферментативная активность зависит от температуры, рН и других факторов;

Структурная организация белков:

Первичная структура

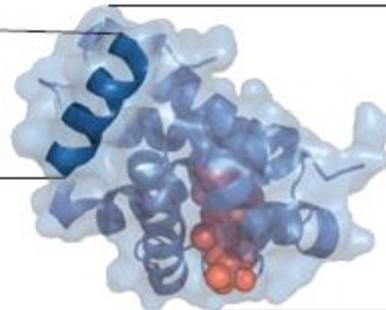
Pro
Ala
Asp
Lys
Thr
Asn
Val
Lys
Ala
Ala
Trp
Gly
Lys
Val

Amino acid residues

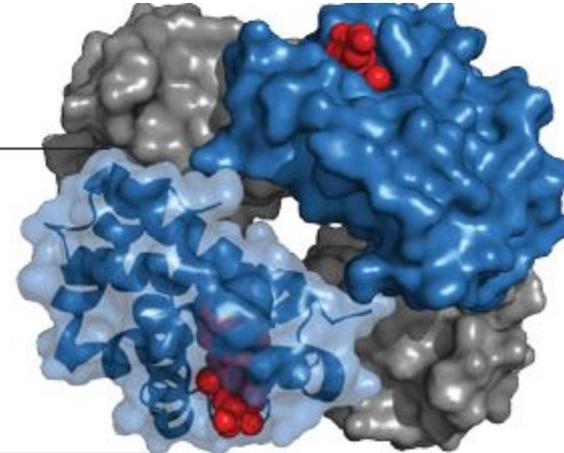
Вторичная структура



Третичная структура



Четвертичная структура



Уровни организации белков:

первичная структура;

вторичная структура;

доменная структура;

третичная структура;

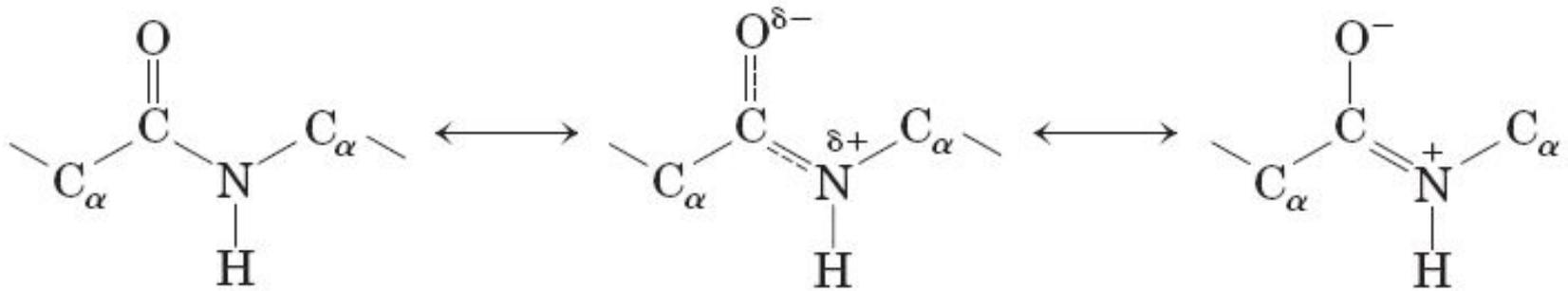
четвертичная структура;

надмолекулярные комплексы.

Первичная структура белка

- **Первичная структура** — это последовательность чередования α -L-аминокислот в полипептидной цепи, соединенных пептидными связями.
- Вращение относительно пептидной связи затруднено, что ограничивает разнообразие конформаций белка.
- Первичная структура белков закодирована в первичной структуре гена.
- В полипептидной цепи могут быть обнаружены разнообразные комбинации аминокислот.
- В первичной структуре полипептидной цепи детерминированы вторичная, третичная и четвертичная структуры белковой молекулы, определяющие ее общую пространственную конформацию.
- Белок характеризуется уникальной последовательностью аминокислот (замены приводит к структурным перестройкам и к изменениям физико-химических свойств и биологических функций)

Пептидная связь



Вторичная структура белка

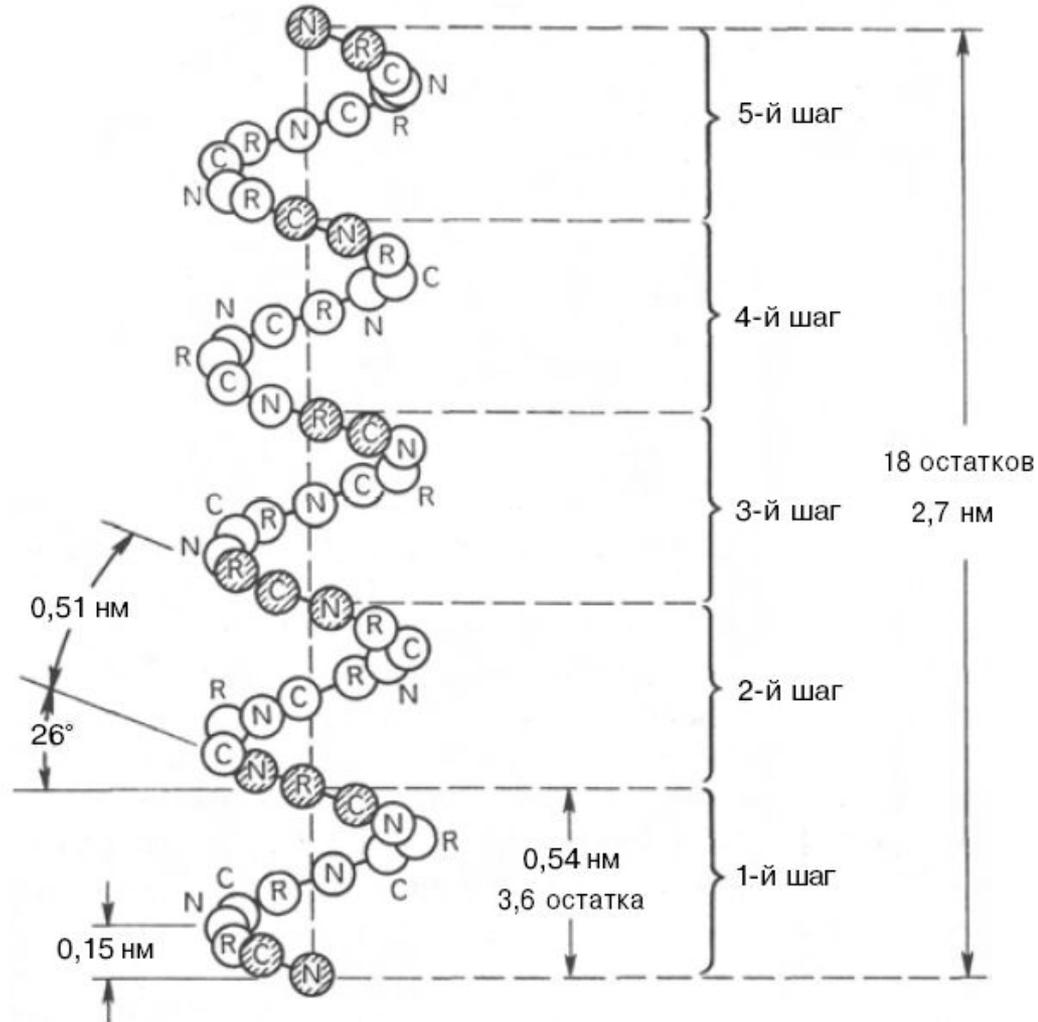
- **Вторичная структура белка** - Это способ расположения полимерной цепи в пространстве, обусловленный главным образом водородными связями между близко расположенными аминокислотными остатками.
- Процесс этот протекает не хаотично, а в соответствии с первичной структурой.

Существуют 2 типа вторичной структуры:

α -спираль (пример: коллаген соединительной ткани);

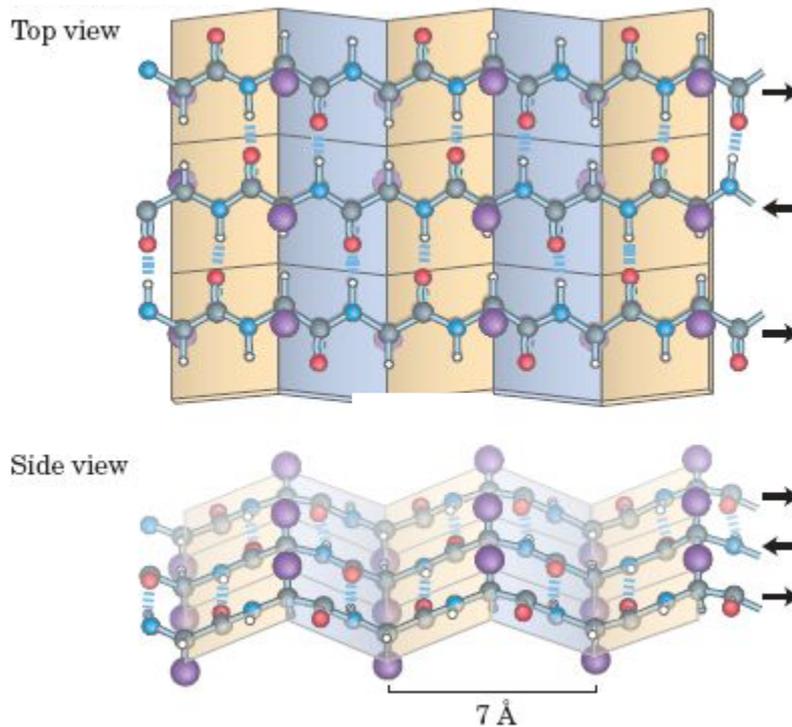
β -структура (пример: кератин волос);

Вторичная структура белка (α –спираль)



Вторичная структура белка (β – складчатый слой)

антипараллельный



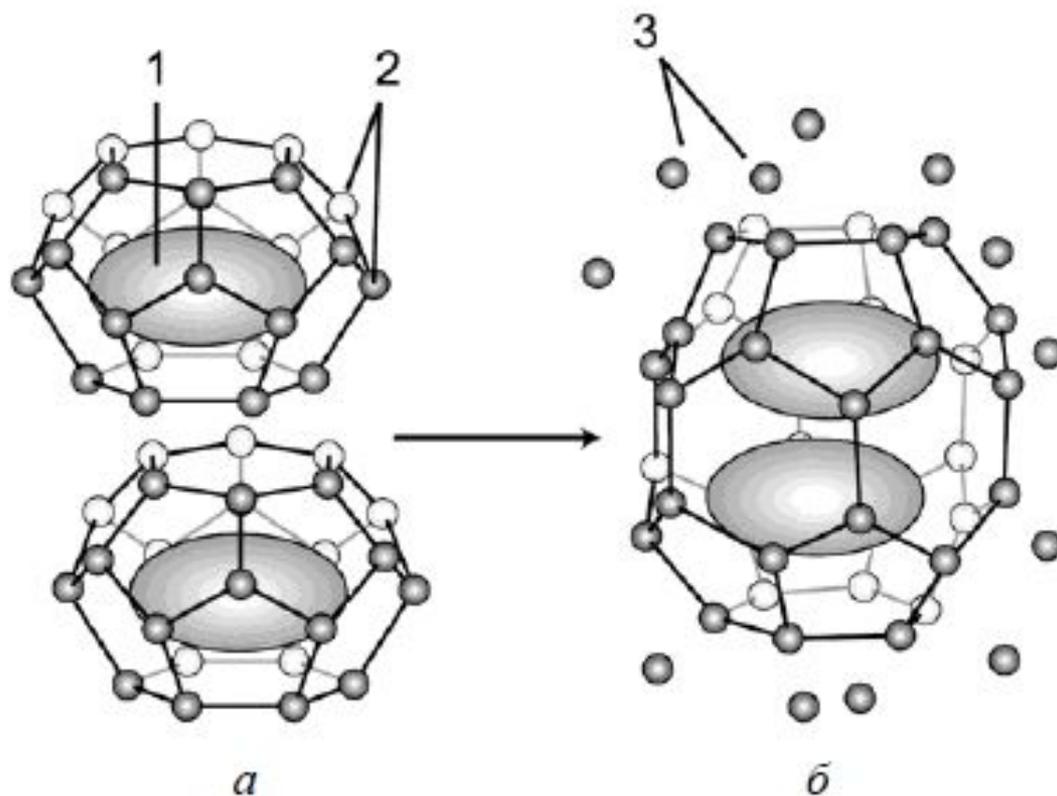
Вторичная структура белка

- Некоторые аминокислоты, например *глутаминовая кислота, аланин и лейцин*, способствуют образованию α -спирали.
- Другие аминокислоты, в частности *метионин, валин и изолейцин*, чаще встречаются в составе β -структуры.
- *Глицин, пролин и аспарагин* обычно расположены в местах изгиба цепи.

Третичная структура белка

- **Третичная структура белка** – это пространственная ориентация полипептидной спирали или способ укладки полипептидной цепи в пространстве.
- Для определения третичной структуры используют высокоразрешающий рентгеноструктурный анализ и компьютерное моделирование .
- Третичная структура белка после завершения его синтеза формируется совершенно самопроизвольно и полностью предопределяется первичной структурой.
- Молекула принимает термодинамически наиболее выгодную стабильную конформацию (*с минимальной свободной энергией*).
- Третичная структура может быть представлена в виде глобул и фибрилл.
- В основном в глобулах гидрофобные радикалы аминокислот погружаются внутрь белковой молекулы, а полярные радикалы оказываются ориентированными в сторону воды.

- Гидрофобный эффект – собирает углеводороды в единую фазу с возможно большим числом освобожденных в раствор мол-л воды.



Гидрофобное взаимодействие: *а* – неагрегированное, энергетически невыгодное состояние, водное окружение более упорядочено, энтропия ниже; *б* – агрегированное, энергетически выгодное состояние, водное окружение менее упорядочено, энтропия выше; 1 – неполярное вещество; 2 – упорядоченные молекулы воды; 3 – молекулы воды, освобожденные в объём раствора

Энергетика свертывания белков

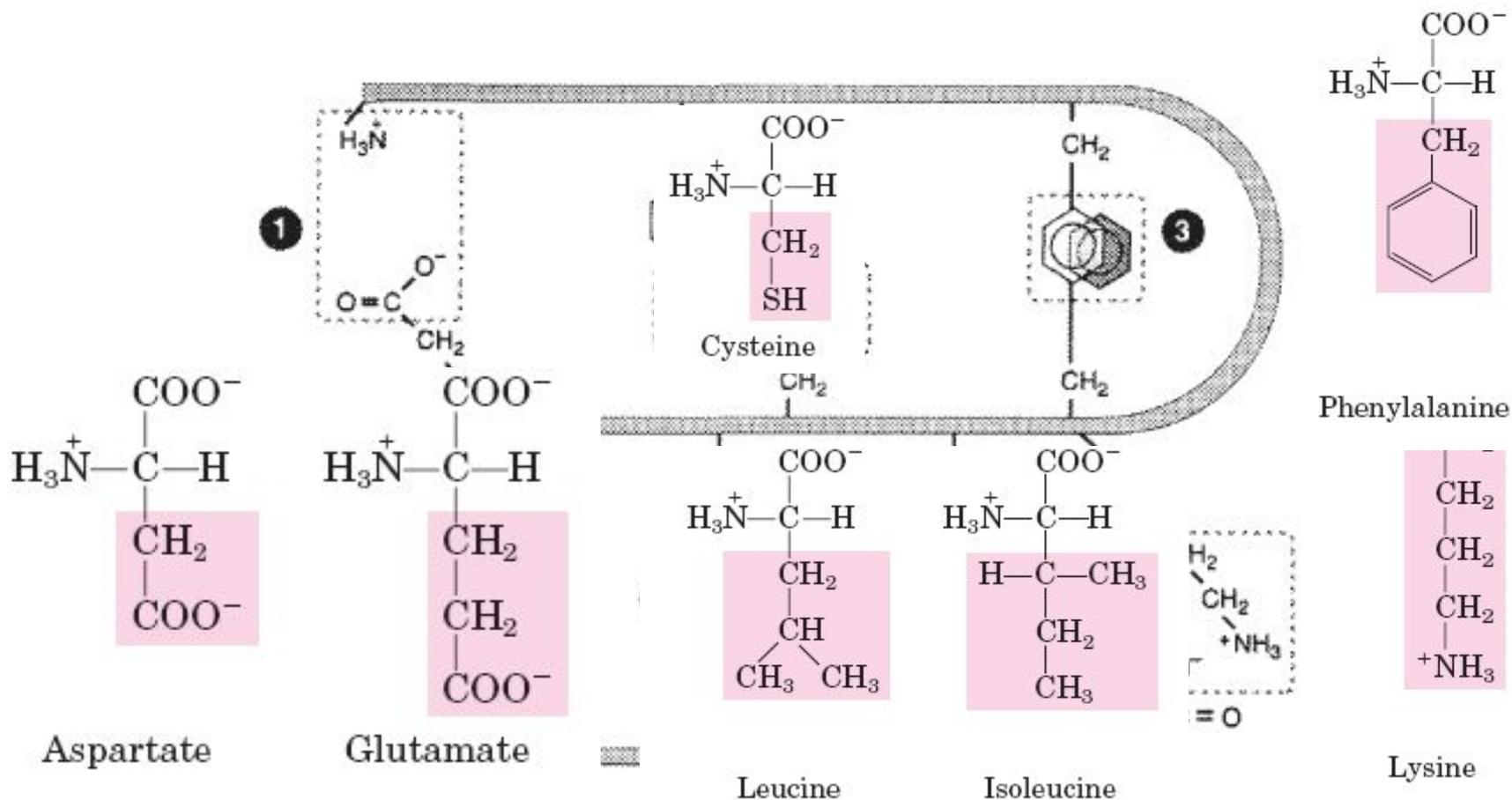
$$\Delta G_{\text{fold}} = \Delta H_{\text{fold}} - T\Delta S_{\text{ap}} - T\Delta S_{\text{conf}}$$

- **ΔG_{fold}** - свободная энергия укладки;
- **ΔH_{fold}** - энтальпия фолдинга (энтальпия - это та энергия, которая доступна для преобразования в теплоту при определенном постоянном давлении)
- **ΔS_{conf}** - конформационная энтропия
- **ΔS_{ap}** – энтропия системы

$$\Delta G_{\text{fold}} = \Delta H_{\text{fold}} - T\Delta S_{\text{ap}} - T\Delta S_{\text{conf}}$$

- ΔG_{fold} - свободная энергия укладки; ΔH_{fold} - энтальпия фолдинга; ΔS_{conf} - конформационная энтропия; ΔS_{ap} – энтропия системы
- Образование упорядоченной структуры белка вызывает уменьшение конформационной энтропии ($\Delta S_{\text{conf}} < 0$).
- Это термодинамически невыгодно, так как увеличивает свободную энергию укладки белка ΔG_{fold} за счет положительного члена $(-T \Delta S_{\text{conf}}) > 0$.
- Однако это увеличение с избытком компенсируется образованием внутримолекулярных ковалентных и нековалентных связей, приводящих к снижению энтальпии фолдинга ΔH_{fold} - энтальпия фолдинга.
- Во время фолдинга степень упорядоченности в объеме воды снижается. В результате этого увеличивается энтропия системы $\Delta S_{\text{ap}} > 0$ и выражение $(-T\Delta S_{\text{ap}})$ становится отрицательным.
- Термодинамически выгодно, тк изменение свободной энергии укладки ΔG_{fold} отрицательно. В этом случае белок будет спонтанно свертываться в глобулу со стабильной конформацией.

Связи стабилизирующие третичную структуру:



Типы связей, возникающих между радикалами аминокислот при формировании третичной структуры белка. 1 — ионные связи; 2 — водородные связи; 3 — гидрофобные связи; 4 — дисульфидные связи.

Надвторичные структуры (доменные структуры)

- Это промежуточный тип организации между вторичной и третичной структурой белков.
- Домен-это структурно обособленный участок полипептидной цепи или область в третичной структуре белка, которой свойственна определенная автономия структурной организации.
- Домены могут выполнять разные функции и подвергаться складыванию (свертыванию) в независимые компактные глобулярные структурные единицы, соединенные между собой гибкими участками внутри белковой молекулы.

Надвторичные структуры (доменные структуры)

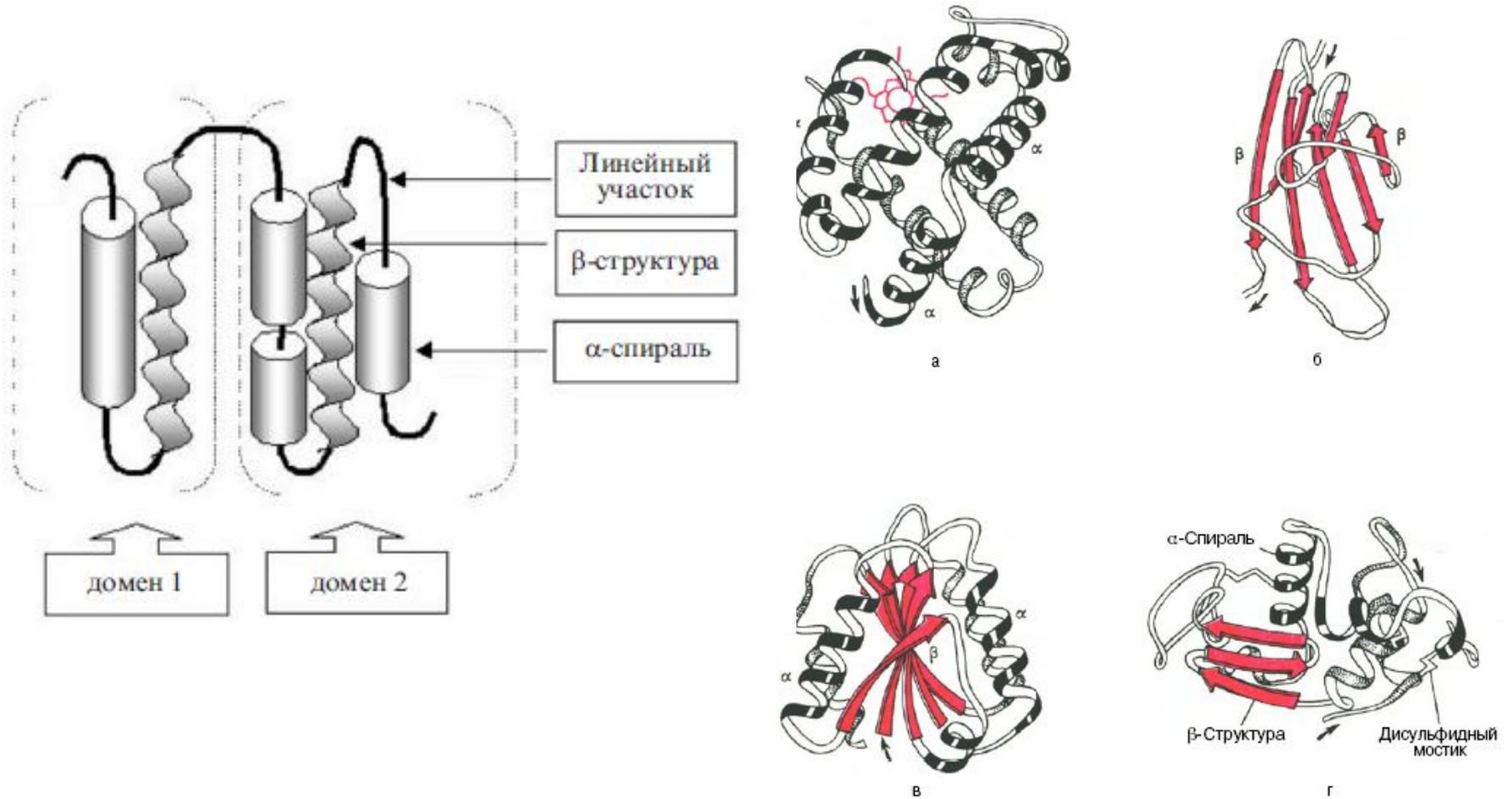
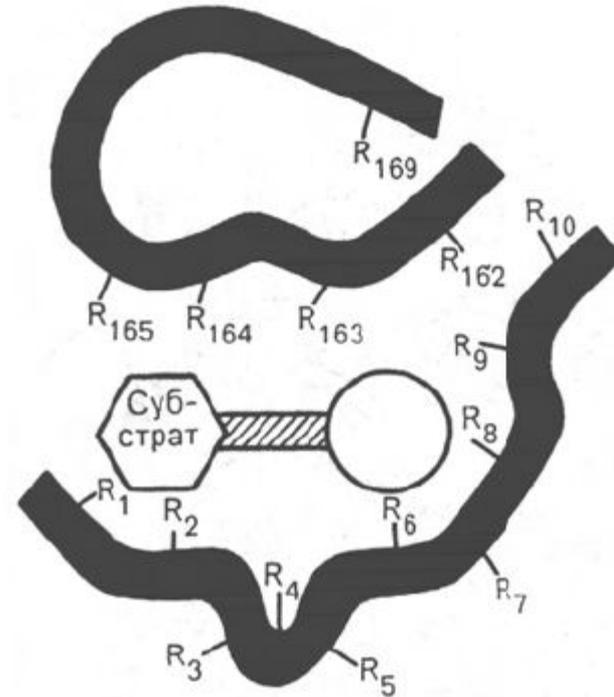


Рис. 1.19. Доменное строение глобулярных белков (по А. А. Болдыреву).
а- β-субъединица гемоглобина; б- константный домен иммуноглобулина; в- флаводоксин;
г- лизоцим куриного яйца.

Надвторичные структуры (доменные структуры)

- Между доменами, соединенными непрерывной полипептидной цепью, устанавливается ряд гидрофобных контактов. Во впадине, разделяющей домены, формируется каталитический (активный) центр, причем образующие его функциональные группы размещены в обоих доменах.
- В состав активных центров ферментов входят боковые цепи остатков Asp, Cys, Glu, His, Lys, Met, Ser, Thr, а также концевые аминные и карбоксильные группы.

Структурная организация ферментов



- **Активный центр**- это уникальная комбинация аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающая непосредственное связывание ее с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа.

Четвертичная структура белка

- Это способ укладки в пространстве нескольких полипептидных цепей, обладающих третичной структурой и связанных между собой.
- Связи между субъединицами либо ковалентные (дисульфидные мостики) либо нековалентные.
- Молекулярная масса может достигать сотен тысяч и даже миллионов Да.
- Белки с четвертичной структурой – субъединичные белки.
- Причем каждая из субъединиц может иметь свой независимый активный центр.
- Олигомеризация может обеспечивать субъединицам повышенную термостабильность и устойчивость к действию протеиназ.

Структурная организация ферментов

Ферменты

```
graph TD; A[Ферменты] --> B[Простые (однокомпонентные)]; A --> C[Сложные (двухкомпонентные)]; B --> D[Примеры: пепсин, трипсин, уреаза, лизоцим, рибонуклеаза, фосфатаза]; C --> E[Белковый компонент (апофермент) + Небелковый компонент (кофактор)];
```

Простые
(однокомпонентные)

Примеры:
пепсин, трипсин,
уреаза, лизоцим,
рибонуклеаза,
фосфатаза

Сложные
(двухкомпонентные)

Белковый компонент
(апофермент)
+
Небелковый компонент
(кофактор)

Структурная организация ферментов

Небелковый компонент (кофактор)

- любой фактор, абсолютно необходимый для выполнения белком его каталитической или любой другой биологической роли.

Простетическая группа

- кофактор, прочно связанный с полипептидной цепью и не отделяемый от нее при выделении и очистке (ФАД, ФМН, биотин, липоевая кислота, геммы).

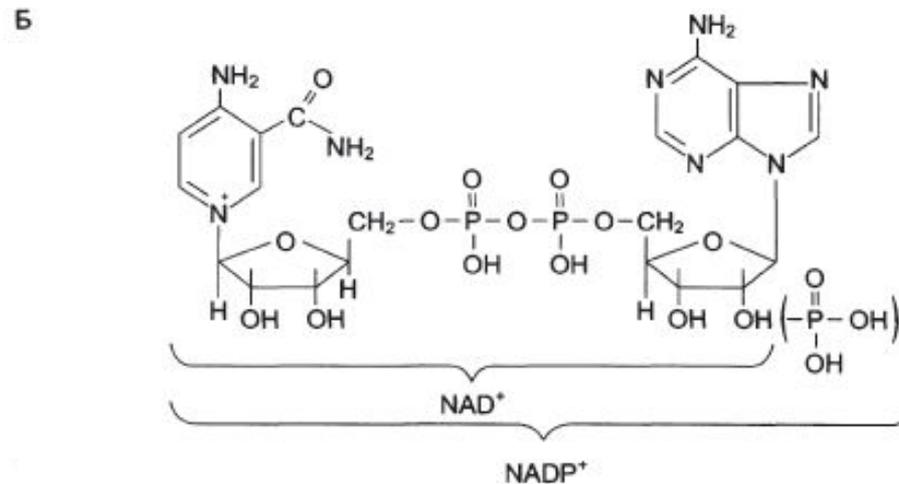
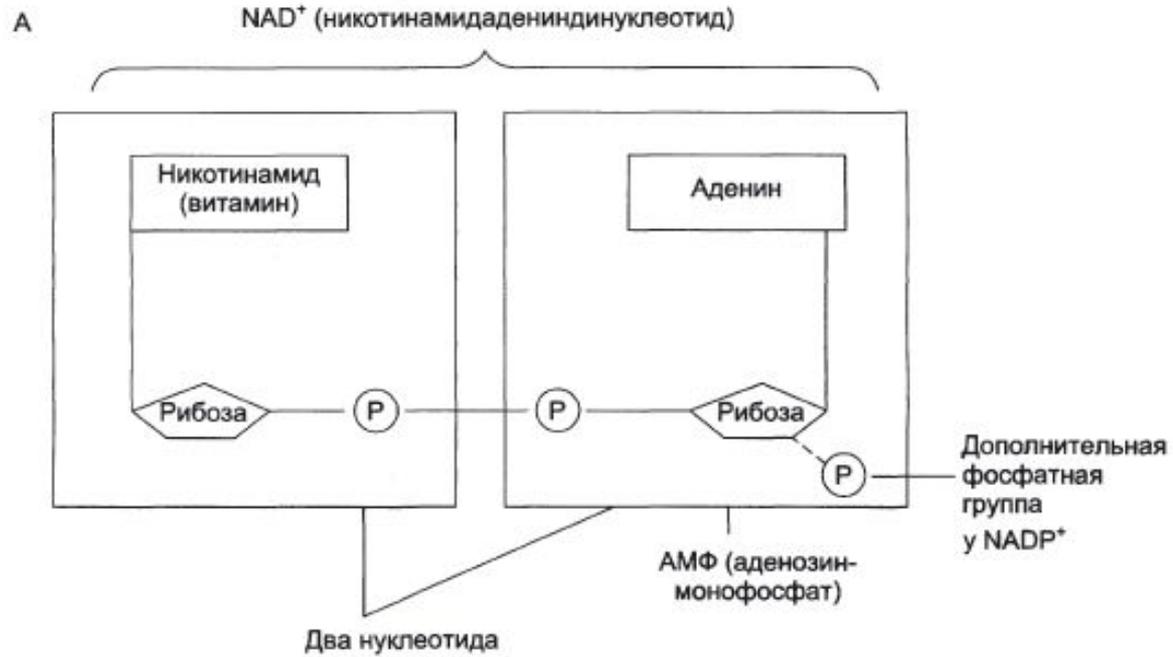
Фермент содержащий простетическую группу – **холофермент.**

Кофермент

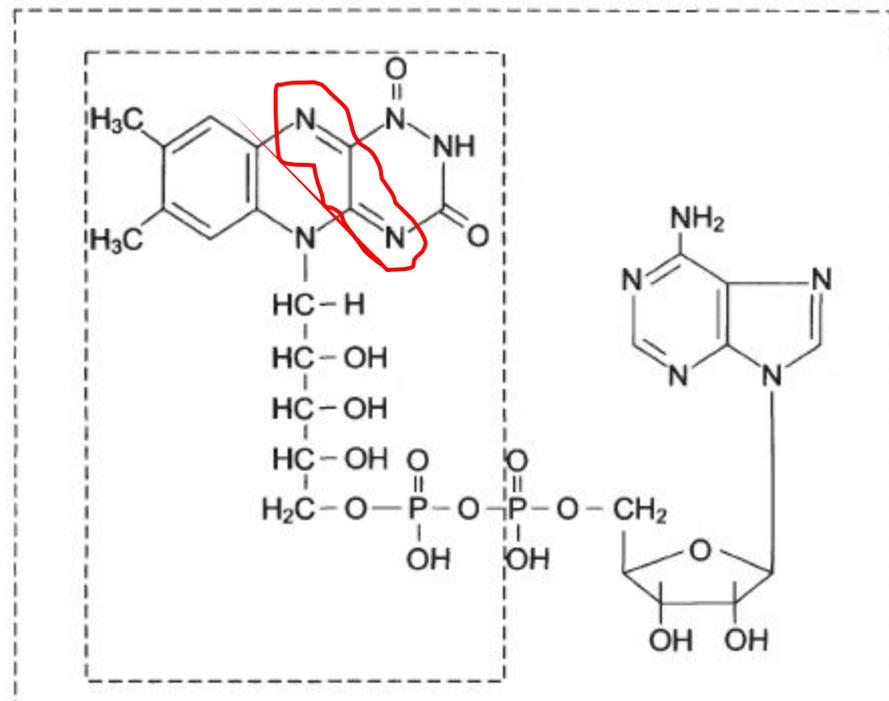
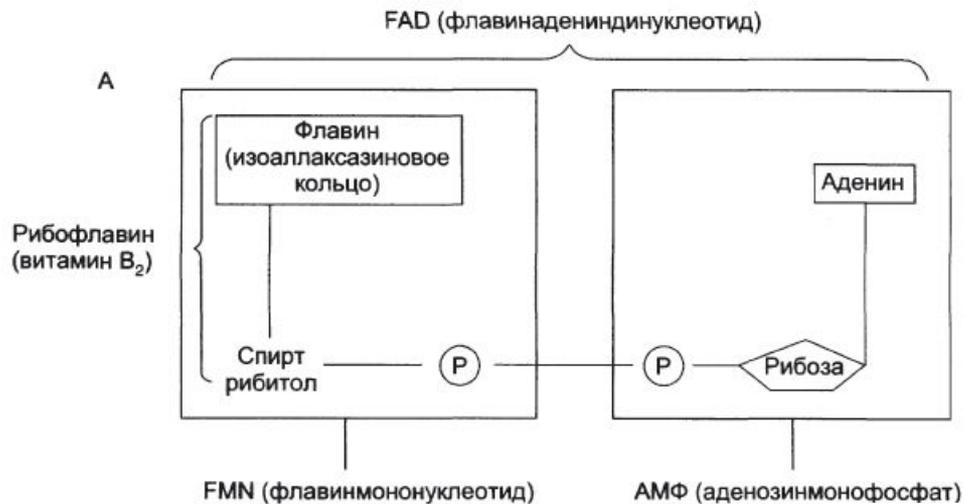
- небелковый фактор, легко отделяемый от белкового компонента при диссоциации и непосредственно вовлеченный в реакцию энзиматического катализа (НАД⁺, НАДФ⁺).

Коферменты

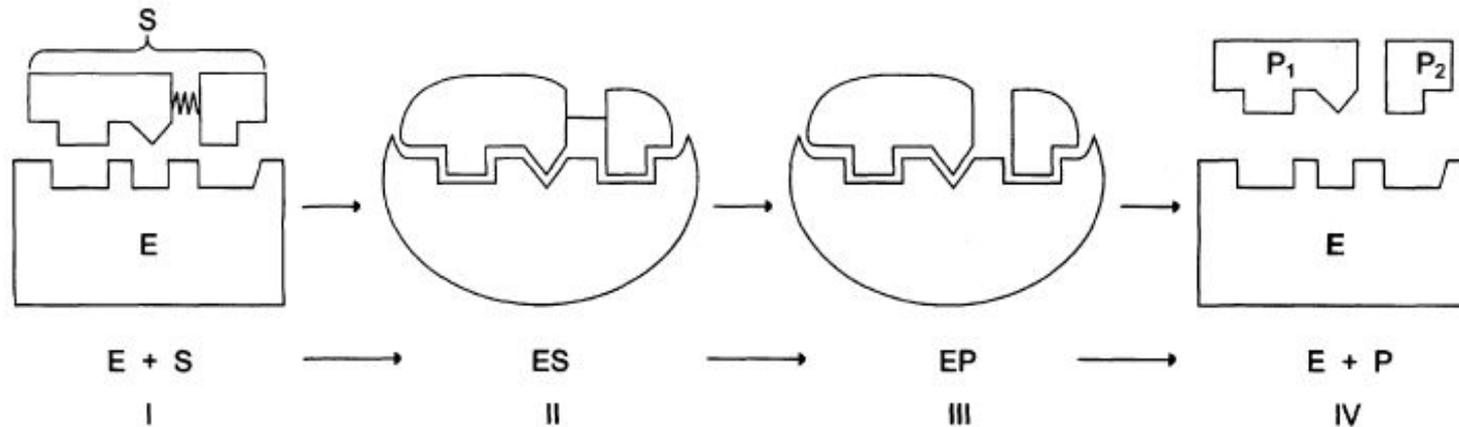
- НАД⁺, НАДФ⁺



• ФАД, ФМН



Этапы ферментативного катализа



- **I** – этап сближения и ориентации субстрата относительно активного центра фермента;
- **II** – образование фермент-субстратного комплекса (ES) (модель Э. Фишера «ключ-замок» и модель Д. Кошленда «индуцированного соответствия»);
- **III** – преобразование субстрата и образование неустойчивого комплекса фермент-продукт (EP);
- **IV** – распад комплекса (EP) с высвобождением продуктов из активного центра фермента и освобождением фермента.

Этапы ферментативного катализа

- Связывание субстрата в активном центре фермента обеспечивается слабыми нековалентными взаимодействиями (водородными связями, электростатическими взаимодействиями, вандерваальсовыми взаимодействиями и гидрофобными связями) и сопровождается уменьшением свободной энергии системы ($\Delta G_{\text{связ}} = -RT \ln K_{\text{равн}}$).

Действия ферментов с энергетической точки зрения

Энергетический механизм ферментативной и неферментативной химических реакций.

S - исходный субстрат; P - продукт; $\Delta E_{\text{нф}}$ - энергия активации неферментативной реакции; $\Delta E_{\text{ф}}$ - энергия активации ферментативной реакции; ΔG - стандартное изменение свободной энергии.



- **Энергия активации** – дополнительное кол-во кинетической E, необходимое молекулам в-ва, чтобы они вступили в реакцию.
 - Чем больше мол-л обладают E, выше ΔE , тем выше скорость химической реакции.
 - Ферменты не меняют равновесие реакции.
- Скорость реакции находится в обратной зависимости от величины энергии активации.

• Почему ферменты увеличивают скорость реакций?

- 1. Эффект сближения и эффект ориентации.
- 2. Эффект исключения воды.
- 3. Эффект стабилизации переходного состояния вследствие взаимодействия между субстратом и аминокислотными остатками фермента.
- 4. Фермент индуцирует напряжение (**конформационное изменение**) в молекуле субстрата, приводящее к ослаблению специфических связей (**эффект индуцированного контакта**).
- 5. Определенная ориентация кислотных и основных групп активного центра фермента делает возможным перенос протонов в субстрате (**эффект кислотно-основного катализа**).
- 6. Определенные (чаще всего нуклеофильные) группы активного центра могут образовывать ковалентные связи с субстратом, приводя к образованию более реакционноспособных по сравнению с субстратом структур (**эффект ковалентного катализа**).

Специфичность

Субстратная

-способность фермента взаимодействовать лишь с одним или несколькими определенными субстратами

- Абсолютная (уреаза)
- Относительная (групповая)
- Стереоспецифичность

Каталитическая

- способность фермента катализировать превращение субстрата лишь по одному из возможных путей его превращения.

Пример:

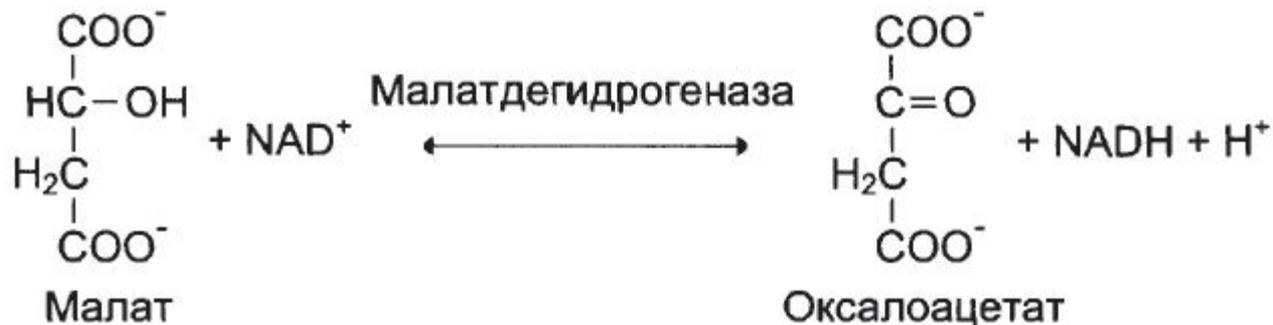
Глюкозо-6-фосфат в гепатоцитах является субстратом 4 различных ферментов: фосфоглюкомутазы, фосфоглюкоизомеразы, глюкозо-6-фосфатфосфатазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Классификация и номенклатура ферментов

№	Класс	Тип катализируемой реакции
1	Оксидоредуктазы	Перенос электронов и протонов
2	Трансферазы	Перенос групп атомов, отличных от атомов водорода
3	Гидролазы	Гидролиз различных связей (с участием молекулы воды)
4	Лиазы	Образование двойных связей за счет удаления групп или добавление групп за счет разрыва двойных связей
5	Изомеразы	Внутримолекулярный перенос групп с образованием изомерных форм
6	Лигаза (синтетазы)	Соединение двух молекул и образование связей C—C, C—O, C—S и C—N, сопряженных с разрывом пирофосфатной связи АТФ

1. Оксидоредуктазы

- Катализируют различные окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов (перенос электронов или атомов водорода с одного субстрата на другой).
- Систематическое название составляют по формуле: **“донор: акцептор-оксидоредуктаза”** (лактат: НАД⁺-оксидоредуктаза).



2. Трансферазы

- Катализируют перенос функциональных групп от одного соединения к другому. Подразделяется на подклассы в зависимости от строения переносимой группы (метилтрансферазы, ацетилтрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы (киназы) и др.)
- Систематическое название составляют по формуле:

“донор: акцептор-транспортируемая группа”



3. Гидролазы

- Катализируют реакции гидролиза (расщепления ковалентной связи с присоединением молекул воды по месту разрыва).
- Разделяют на подклассы в зависимости от расщепляемой связи (гликозидазы -ускоряющие разрыв гликозидных связей).
- Систематическое название составляют по формуле:

“субстрат-гидролаза”

или добавлением к названию субстрата суффикса “аза”

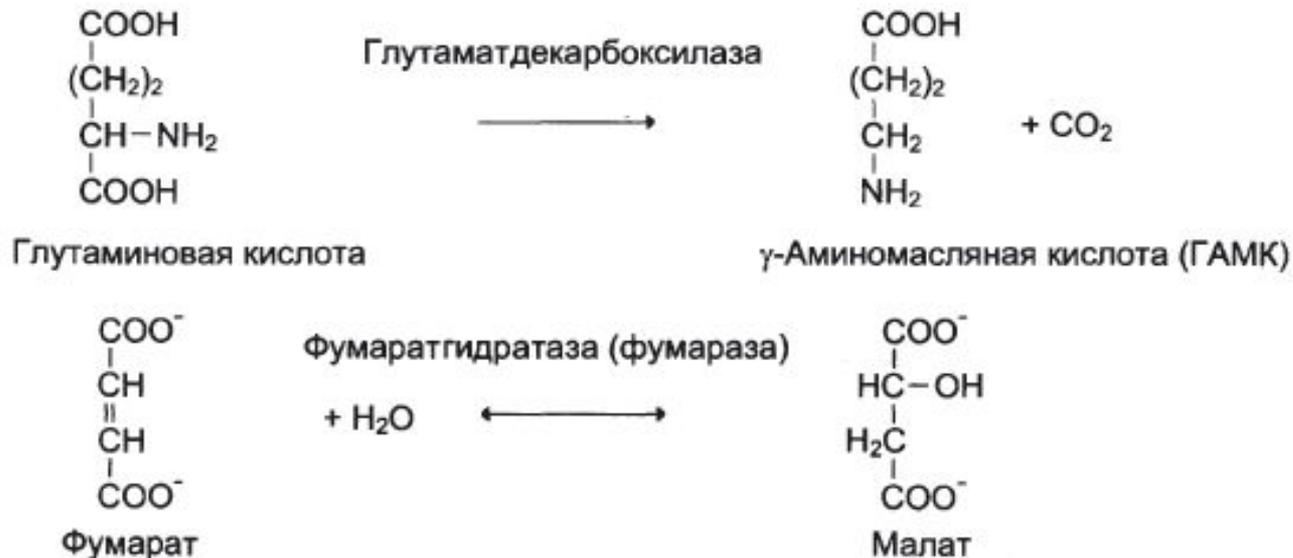
(протеаза, липаза)



4. Лиазы

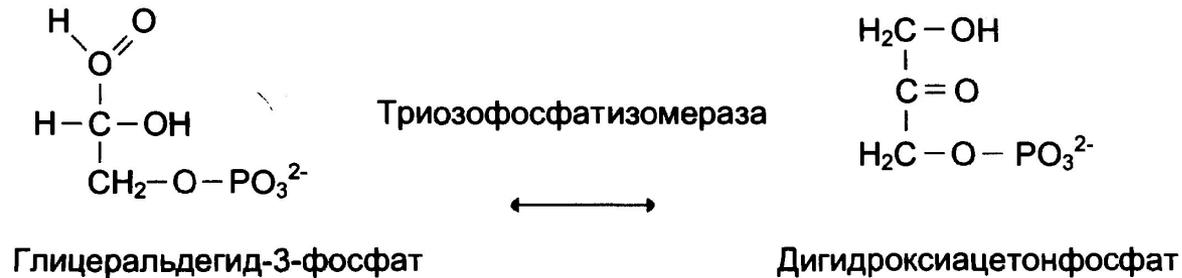
- Ферменты, катализирующие разрыв связей C—O, C—C, C—N и других, а также обратимые реакции отщепления различных групп (CO₂, NH₂, H₂O и др.) от субстратов **не** гидролитическим путем.
- Эти реакции сопровождаются образованием двойной связи или присоединением групп к двойной связи.
- Систематическое название составляют по формуле:

“субстрат - отщепляемая или присоединяемая группа”

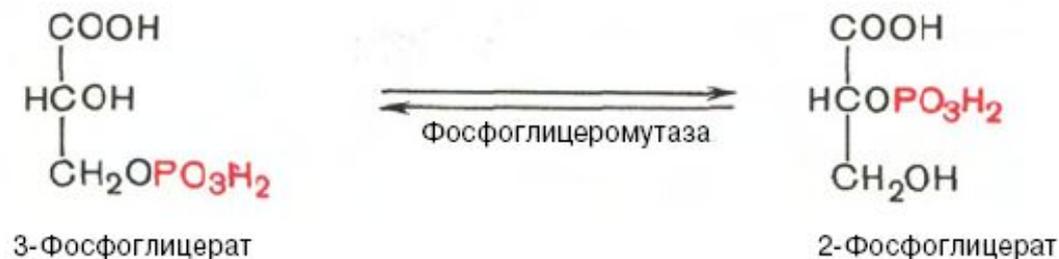


5. Изомеразы

- Катализируют различные внутримолекулярные превращения.
- Могут катализировать внутримолекулярные окислительно-восстановительные реакции, осуществляя взаимопревращения альдоз и кетоз, перемещение двойных связей внутри молекулы:



- Если изомеризация включает внутримолекулярный перенос группы, фермент получает название “мутаза”:



Ферменты в экстремальных условиях

Трехмерная структура белков стабилизируется за счет слабых взаимодействий.

“Плюсы”:

молекулярная подвижность белков, необходимая для каталитической активности ферментов.

“Минусы”:

Молекула белка может принимать несколько альтернативных конформаций, которые биологически будут менее активны.

Во внутренней гидрофобной области белковой молекулы присутствуют группы, участвующих в образовании водородных связей



Доноров электронов больше, чем доступных атомов водорода



Конкуренция электроотрицательных центров за протоны



Предпосылки для инициации конформационных изменений

Денатурация - нарушение уникальной пространственной структуры

нативного белка, приводящее к частичной или полной потере характерных для него свойств.

- Белок переходит в разупорядоченное состояние.
- Амидные группы пептидной цепи образуют с окружающими их молекулами воды водородные связи, которых больше, чем внутримолекулярных.
- Специфическая каталитическая активность фермента теряется.

Различие в энергии между нативной конформацией
и конформацией
неупорядоченного клубка небольшое около
20–60 кДж/моль.

Стабильность нативной структуры белков крайне
низка и денатурация фермента может быть вызвана
множеством физических и химических факторов.

*Это необходимо учитывать при
создании новых биокатализаторов.*

Денатурирующие факторы:

- **Физические** (нагревание, переохлаждение, облучение, ультразвук, сорбция на границах раздела фаз).
- **Механические** (гидравлические силы).
- **Химические** (щелочи и кислоты, ПАВ, органические растворители, окислители, восстановители)
- **Биологические** (протеазы, протеинкиназы)

Обратимая денатурация (обратимое конформационное изменение).

Хар-на ренатурация (восстановление нативной конформации и свойств).

Пример: нагревание и *постепенное* охлаждение.

Необратимая денатурация.

Фермент после прекращения действия фактора инактивации не возвращается в нативную каталитически активную конформацию.

Пример: нагревание и *резкое* охлаждение.

Нековалентные взаимодействия, стабилизирующие нативную структуру белка, разрушаются.



Образуются нековалентные взаимодействия, термодинамически выгодные при повышенной температуре.



При резком охлаждении образовавшиеся “неправильные” взаимодействия сохраняются, так молекулярная подвижность фермента снижена.



Фермент не способен самопроизвольно ренатурировать.

Механизмы инактивации ферментов

•1. *Изменение первичной структуры:*

•1.1. *Разрыв полипептидной цепи:*

Жесткие условия (длительное кипячение в HCl) – гидролиз до отдельных ам-т.

При нагревании до 100 °С (рН 7-8), гидролиз пептидных связей незначителен.

Наиболее чувствительными к высокотемпературному гидролизу являются пептидные связи, образованные остатками *аспарагиновой кислоты*.

Протеазы (бактериальное загрязнение, автолиз).

Решение:

В литературе практически отсутствуют примеры удачной реактивации подобным образом инактивированных ферментов.

•1.2. Окисление функциональных групп фермента

•SH-группы цистеина и индольные фрагменты триптофана, при повышенной температуре, могут окисляться (сульфокси- соединения цистеина (SOH, SO₂H) и образовываться продукты раскрытия индольного кольца триптофана.

Решение:

• Реактивировать с помощью восстанавливающих агентов, в частности низкомолекулярных тиолов (например, цистеин или дитиотрейтол) .

• 1.3. *Расщепление дисульфидных связей*

Вызывают : Тиолы и другие восстановленные соединений серы, например Na_2SO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Продуктом восстановления дисульфидной связи (S-S) является:

- 1) тиольная форма (белок-SH)
- 2) смешанный дисульфид тиольной формы белка с восстанавливающим реагентом, например белок-S-SO₃).

• 1.3. Расщепление дисульфидных связей

- Щелочной гидролиз цистеина → дегидроаланин →
Благодаря нуклеофильным свойствам взаимодействует с NH_2 -группами лизина и SH - цистеина → лизиноаланин и лантионин.
- Для полной деструкции всех S–S связей требуются достаточно жесткие условия (0,1–1М щелочь, 100 °С).
- Однако деструкция наиболее реакционноспособных S–S связей может проходить в достаточно мягких условиях – например, при температурах 60–80 °С и слабощелочных значениях pH.
- Следует учитывать при использовании ферментов в качестве добавок к моющим средствам.

Решение:

- Добавление в среду тиолов приведет к расщеплению смешанного дисульфида и последующему образованию правильной S–S связи

1.4. Химическая модификация каталитических SH-групп.

Катионы тяжелых металлов (Hg, Pb и Cu) связываются с SH-групп активного центра фермента



Образование соответствующих меркаптидов



Фермент инактивируется

1.5. Фосфорилирование белков in vivo.

Под действием фосфоорилазы и фосфатазы, содержащихся в полуочищенных ферментативных препаратах в виде примесей



Фосфорная кислота связывается с ОН-группами серина и треонина.



Конформационные изменения в белковой молекуле



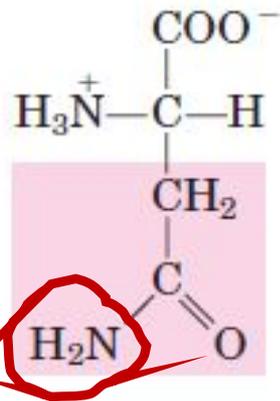
инактивацию фермента.

Решение:

В литературе практически отсутствуют примеры удачной реактивации подобным образом инактивированных ферментов.

1.6. Дезаминирование остатков аспарагина.

При температурах (порядка 100 °С) и рН (порядка 4,0–5,0) происходит дезаминирование остатков аспарагина.



инактивации фермента.

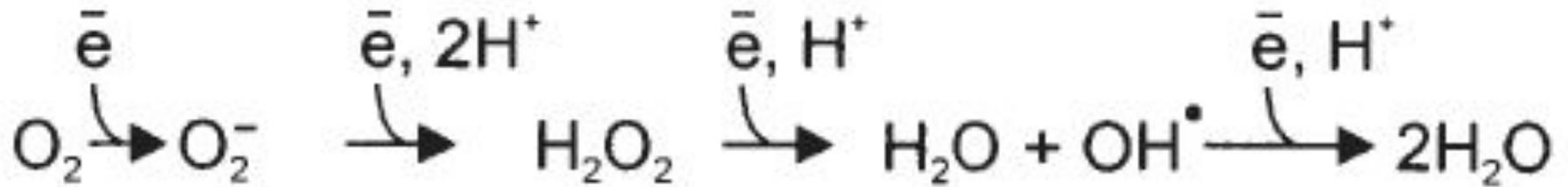
Решение:

В литературе практически отсутствуют примеры удачной реактивации подобным образом инактивированных ферментов.

1.7. Радиационная инактивация ферментов

γ -облучение и УФ-свет

Воздействуют на функциональные группы ферментов, пептидные связи и SH-группы остатков цистеина.



Супероксид \rightarrow пероксид \rightarrow гидроксильный радикал

2. Агрегация

- Наблюдается при повышенной температуре, при экстремальных значениях рН, в присутствии некоторых химических соединений.
- Чем выше концентрация, тем быстрее идет агрегация.
- Гидрофобные взаимодействия и водородные связи, возможно образование дисульфидных мостиков между отдельными белковыми молекулами

Решение:

- Необходимо разрушить межмолекулярные ковалентные и нековалентные контакты с помощью концентрированных растворов мочевины и гуанидинхлорида, экстремальных значений рН.
- Если при агрегации ферментов образовались межмолекулярные S-S -мостики, в среду вносят в относительно невысоких концентрациях (мкмоль/л) тиолсодержащие реагенты (например, цистеин или дитиотрейтол).
- При таких концентрациях внутримолекулярные S-S связи в белке, как правило, не затрагиваются.

3. Инактивация ферментов поверхностным натяжением

- Поверхностное натяжение на границе раздела между воздухом и чистой водой составляет 80 дин/см.
- Пенообразование вызывает денатурацию ферментов, адсорбированных на границе раздела фаз.

Решение:

Добавление ПАВ снижает поверхностное натяжение до 1 дин/см.

- #### *4. Сорбция белка на стенках реакционного сосуда*
- Сорбция за счет нековалентных взаимодействий приводит к уменьшению концентрации фермента в растворе.
 - Необходимо учитывать при работе с разбавленными белковыми растворами (концентрация 10^{-8} – 10^{-10} моль/л).
 - Под влиянием денатурирующих факторов способность белков сорбироваться на стенках реакционного сосуда может возрасти.

Решение:

Десорбция фермента со стенок реакционного сосуда достигается за счет разрушения неспецифических взаимодействий между белком и сорбционными центрами на поверхности сосуда.

Можно использовать экстремальные значения рН, концентрированные растворы мочевины или гуанидинхлорида.

5. Диссоциация олигомерных белков на субъединицы

Вызывают: Мочевина, детергенты, кислоты или же нагревание.

Приводят к:

- конформационным изменениям отдельных субъединиц;
- агрегации субъединиц;
- диссоциации кофакторов из активных центров;
- модификации функциональных групп, которые в олигомерном белке были экранированы от контакта с растворителем.

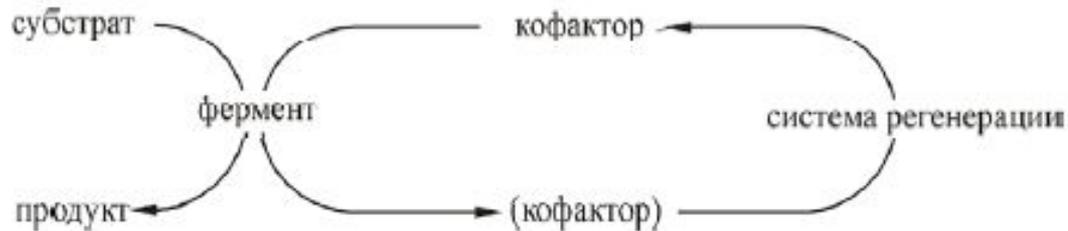
6. Десорбция кофактора из активного центра фермента

Вызывает: нагревание, действие хелаторов, диализ

Если диссоциация кофактора сопровождается значительными конформационными сдвигами или химической модификацией важных функциональных групп → фермент инактивируется необратимо.

Если при этом не произошло существенного изменения белковой конформации, то добавление в среду избытка кофактора приводит к реактивации фермента.

Регенерация кофакторов



Способы регенерации:

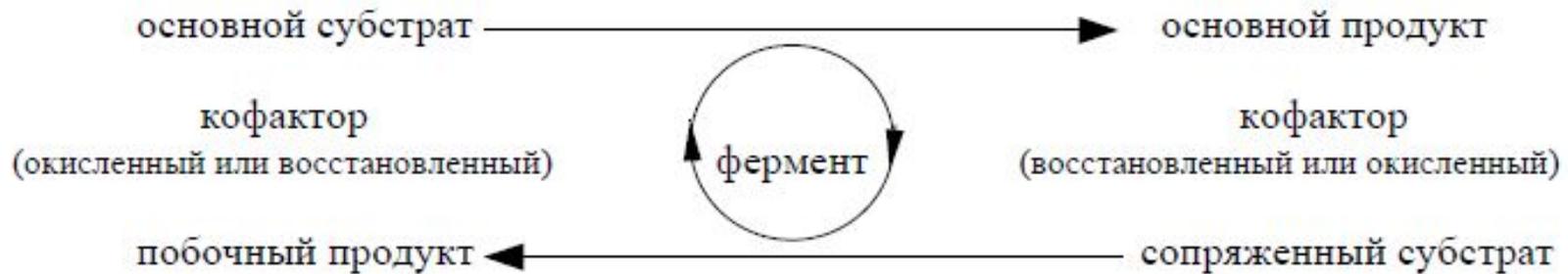
Ферментативный (методы с использованием сопряженных субстратов или ферментов)

Неферментативный (химические и электрохимические подходы)

Ферментативный способ

1. Использование сопряженных субстратов.

В систему вводят избыточное количество сопряженного субстрата того же фермента:



Пример: при работе алкогольдегидрогеназы расходуется НАДН.

Ферментативный способ

1. Использование сопряженных субстратов.

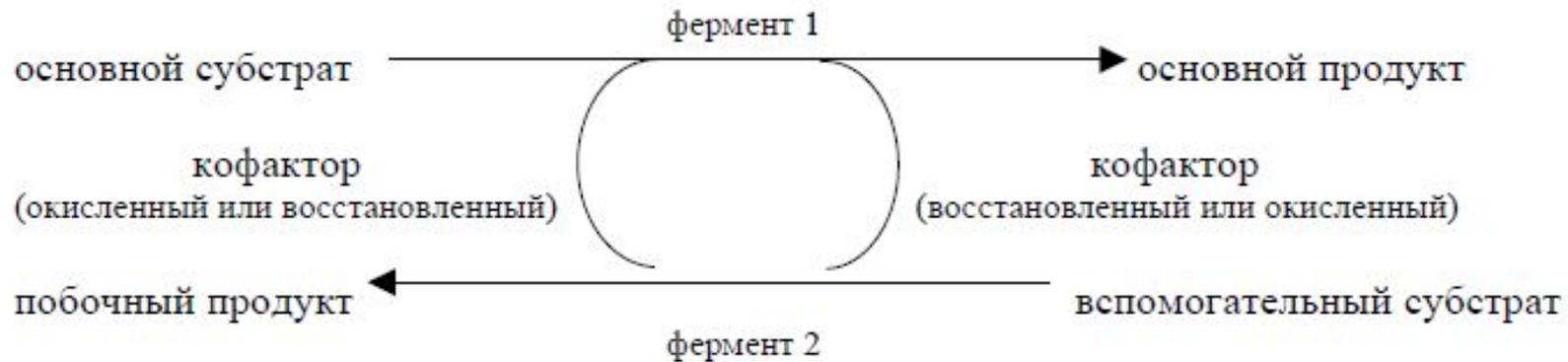
Недостатка:

- используются высокие концентрации сопряженного субстрата, так как равновесие реакции сильно сдвинуто в сторону образования спирта;
- усложняет процедуру выделения основного продукта из реакционной смеси.

Ферментативный способ

2. Использование сопряженных ферментативных реакций

• В систему, дополнительно вводят фермент 2, функционирование которого обеспечивает регенерацию кофермента.



Используемые в системе ферменты должны иметь разную субстратную специфичность

Неферментативные способы

1. Химические методы.

- Используются дитионит натрия и некоторые соли пиридиния:

+ Низкая стоимость.

-могут ингибировать отдельные ферменты.

- Флавиновые коферменты

Неферментативные способы

2. Электрохимические методы.

Прямое электрохимическое восстановление или окисление.

“-” появления в процессе регенерации ферментативно неактивных форм кофермента, например в результате его димеризации.

• Благодарю за внимание!