

Инженерная энзимология

Преподаватель:

к.б.н

Кузнецова Екатерина Игоревна

Термозимы

Стабильны в условиях высокой температуры, высоких концентраций солей и экстремальных значений pH.

Гипертермофильные микроорганизмы, встречающиеся среди *Archaea* и *Bacteria*, живут при температурах 80–100 °C.

Механизмы ответственны за термоустойчивость ферментов у термозимов:

Между мезофильными и термофильными версиями ферментов - высокая степень гомологии последовательности и структуры.

Так, последовательности термостабильных дегидрогеназ из *Pyrococcus* и *Thermotoga* на 35 и 55% соответственно идентичны последовательности мезофильной дегидрогеназы из *Clostridium*.

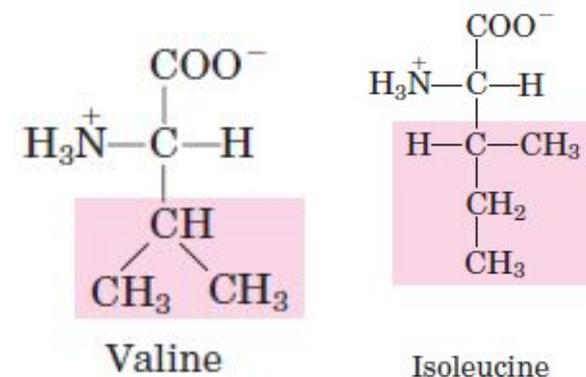
Было обнаружено, что дегидрогеназа из *Pyrococcus furiosus* ($T_m = 105\text{ }^\circ\text{C}$) содержит 35 изолейцинов, в то время как дегидрогеназы из *Thermotoga maritima* ($T_m = 95\text{ }^\circ\text{C}$) и *Clostridium symbiosum* ($T_m = 55\text{ }^\circ\text{C}$) только 21 и 20 изолейцинов соответственно.

Термостабильные ферменты содержат меньше глицина: *Cs* дегидрогеназа содержит 48 остатков глицина, а дегидрогеназы из *Tm* и *Pf* только 39 и 34 глицина соответственно.

Больше изолейцина и меньше глицина.

Взросшая термостабильность коррелирует:

с увеличением жесткости белковой структуры за счет уменьшения содержания остатков глицина,
с улучшением гидрофобных контактов в ядре дегидрогеназы из Pf в результате замены валина изолейцином. (В результате сайт-направленного мутагеза приводящего к замене изолейцина на валин термостабильность мутантов уменьшалась).



Механизмы стабилизации:

- минимизация доступной площади гидрофобной поверхности белка;
- оптимизация упаковки атомов белковой молекулы (минимизация отношения поверхность/объем);
- оптимизация распределения зарядов (достигается благодаря устранению отталкивающих взаимодействий, а также в результате организации взаимодействий между зарядами в своеобразную сеть)
- Уменьшение количества впадин

Применение ферментов из экстремофилов

Современные технологии молекулярной биологии и генной инженерии позволяют:

1) получать достаточные количества ферментов из экстремофилов для их последующего анализа и практического применения.

2) клонирование и экспрессия этих ферментов в мезофильных организмах.

Применение ферментов из экстремофилов:

Крахмал используется для производства сахаров. Сначала процесс ведется при (95–105 °С) и при значениях рН 6–6,5.

На следующем этапе температура снижается до 60°С и рН=4,5.

Использование термостабильных ферментов (α -амилазы, глюкоамилазы, ксилоизомеразы), выделенных из гипертермофилов, позволит:

) проводить процесс в одну стадию и при одних и тех же условиях

) отказаться от дорогостоящих ионообменников

Применение ферментов из экстремофилов:

Наиболее термостабильные α -амилазы были обнаружены у *archaea Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus furiosus*, *Desulfurococcus mucosus*, *Pyrodictium abyssi* и *Staphylothermus marinus*. Гены амилазы из *Pyrococcus sp.* были клонированы и экспрессированы в *E.coli* и *Bacillus subtilis*.

Применение ферментов из экстремофилов:

Протеолитические ферменты

Сериновые щелочные протеиназы широко используются в качестве добавок к моющим средствам.

Протеиназы из экстремофилов сохраняют нативность при высоких температурах, в присутствии высоких концентраций детергентов и других денатурирующих агентов. *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Staphylothermus*, *Desulfurococcus* и *Sulfolobus*. Максимальную активность эти ферменты проявляют при температурах

Применение ферментов из экстремофилов:

ДНК-полимеразы

Термостабильные ДНК-полимеразы используются в ПЦР и играют важную роль в генной инженерии. Термостабильные полимеразы были обнаружены у гипертермофилов *Pyrococcus furiosus* и *Pyrococcus litoralis*, а также у термофилов *Thermus aquaticus*.

**ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ
РЕАКЦИИ В СИСТЕМАХ
С ОРГАНИЧЕСКИМИ
РАСТВОРИТЕЛЯМИ**

- Среда, в которой функционируют ферменты *in vivo*, по своим физико-химическим параметрам (диэлектрическая проницаемость, полярность, вязкость и т.д.) существенно отличается от используемой *in vitro*.
- Ферменты в живой клетке часто или адсорбированы на биологических мембранах, или встроены во внутреннюю часть мембраны, или же локализованы внутри замкнутых везикул.
- Цитоплазматические ферменты способны ассоциировать с внутриклеточными компонентами.

- Ферментативные реакции в живой клетке фактически протекают на поверхности раздела фаз.
- Свойства самой воды вблизи поверхности раздела фаз значительно отличаются от воды внутри объема.
- Использование чисто водных растворов в биокатализе не всегда оправданно и часто создает дополнительные проблемы (плохой растворимостью S или P)
- Решение: в состав помимо воды вводят органический растворитель.

Органический растворитель влияет на:

- образования фермент-субстратного комплекса за счет изменения растворимости субстрата и его распределения в системе.
- гидрофильные субстраты концентрируются у поверхности фермента
- гидрофобные в основном локализуются в объеме растворителя.
- органические растворители могут влиять на эффективность непосредственного контакта S с E

- При небольших концентрациях полярных растворителей активность E сохраняется
- При дальнейшем повышении концентрации E полностью или практически полностью теряют каталитическую активность.



- Две причины:
- 1) обратимую денатурацию
- 2) необратимую инактивацию биокатализатора.

В основе механизма денатурации лежит:

- разрушение системы водородных связей и нативных гидрофобных взаимодействий



- гидрофобные остатки из внутренней области “выходят” на поверхность белка



- агрегации молекул денатурированного белка

Добавки органических растворителей, смешивающихся с водой, позволяют решить проблему растворимости субстратов.

Увеличение содержания в водно-органических смесях неводного компонента может приводить к некоторому сдвигу равновесия обратимых реакций гидролиза-синтеза в сторону синтеза (изменением константы диссоциации ионногенных групп)

Пример: в реакции прямого ферментативного синтеза пептидов в растворе, содержащей 85 % 1,4-бутандиола, константа равновесия возрастает в 80 раз.

Гетерогенные биокаталитические системы:

- ***макрогетерогенные системы*** (суспензии биокатализаторов в неполярных и полярных органических растворителях, а также системы типа жидкость—жидкость)
- ***микрогетерогенные системы*** (мицеллярные (микроэмульсионные) системы).

Суспензии ферментов в практически безводных органических средах

- Е сохраняют высокую селективность, стерео- и энантиоспецифичность. по сравнению с водными растворами.
- Активности суспендированных Е на несколько порядков ниже.
- На эффективность влияют:
 - 1) содержание воды в системе,
 - 2) органического растворителя
 - 3) способ получения системы.

•Содержание воды в системе

•При полном отсутствии воды – *E* практически не активен .

•Повышение содержания воды в системе приводит к восстановлению ферментативной активности благодаря гидратации фермента и увеличению подвижности групп активного центра.

•Дальнейший рост концентрации воды снижает каталитическую активность *E*.

Содержание органического растворителя

из-за высокого сродства к белкам *полярные растворители* в большей степени *снижают субстратную специфичность* суспендированных ферментов и ингибируют их.

Способ получения системы

В органическом растворителе суспендируют лиофилизированный из водного раствора ферментный препарат.



В систему добавляют необходимое количество воды.

- Суспендированные в органических растворителях ферменты характеризуются исключительно высокой термостабильностью, из-за повышения “жесткости” белковой молекулы в неводных средах.

Системы типа жидкость–жидкость

- Двухфазная система вода–органический растворитель, не смешивающийся с водой (хлороформ, эфир, жирные алифатические спирты, углеводороды и т.д.)
- Микроокружение E лишь незначительно отличается от такового в водных растворах, так как E благодаря локализации в водной фазе прямо не контактирует с органическим растворителем.

Системы типа жидкость–жидкость

Использование системы позволяет целенаправленно сдвигать равновесие реакции, т.к. идет удаления конечных продуктов из реакционной среды.

Фермент локализован в водной фазе системы.



Растворенные в органической фазе субстраты способны свободно диффундировать из нее в воду.



Образовавшиеся продукты диффундируют обратно в органическую фазу.

Системы типа жидкость–жидкость

Пример:

этанол + N-ацетил-L-триптофана →
этиловый эфир N-ацетил-L-триптофана

E: иммобилизованный химотрипсин

Используется двухфазная система хлороформ–
вода (1 % по объему).

Системы типа жидкость–жидкость

Из-за недостаточно развитой поверхности раздела фаз скорость ферментативного процесса в системах типа жидкость–жидкость часто лимитируется скоростью массопереноса.

Ускорить можно переведя систему в эмульсию при интенсивном перемешивании.

Системы типа жидкость–жидкость

НО! возрастает вероятность контакта фермента с поверхностью раздела и его инактивации поверхностным натяжением на границе раздела фаз.

Решение :

переход от макроэмульсий к микроэмульсиям, в которых поверхность раздела стабилизирована ПАВ.

Микрогетерогенные системы

- Гидратированные обращенные мицеллы

ПАВ в неполярных органических растворителях.

Внутренняя поверхность ассоциатов образована полярными (ионными) головами ПАВ, а внешний слой – углеводородными хвостами.

- В своем ядре содержат некоторое количество гидратационной воды, благодаря которой обеспечивается микросреда для функционирования фермента

Микрогетерогенные системы

- *Гидрофильные* Е могут локализоваться в водном ядре гидратированной обращенной мицеллы, избегая непосредственного контакта как с органическим растворителем, так и с полярной поверхностью внутренней полости мицеллы.
- *Поверхностно-активные* Е, например липазы, напротив, могут взаимодействовать с поверхностным слоем обращенной мицеллы.
- *Мембранные* Е, если это термодинамически выгодно, могут контактировать с органическим растворителем.

Микрогетерогенные системы

Применяют для ферментативного превращения водонерастворимых соединений.

Ферментативное окисление спиртов, восстановление альдегидов алифатического ряда, расщепления жиров и при синтезе стероидов

Увеличение выхода продуктов ферментативной реакции

Равновесие процесса в сторону образования целевого продукта можно сдвигать:

.в результате изменения условий протекания химической реакции.

.выведение продуктов из сферы реакции.

В ряде случаев сдвиг равновесия обеспечивается за счет включения одного из продуктов реакции в последующее термодинамически выгодное превращение.

Увеличение выхода продуктов ферментативной реакции

глюкоза + фруктоза \leftrightarrow сахароза + H₂O + 5 ккал

АТФ + H₂O \rightarrow АДФ + Рнеорг ($\Delta G = -12$ ккал)

**глюкоза + АТФ \rightarrow глюкозо-1-фосфат + АДФ
(-7 ккал)**

**глюкозо-1-фосфат + фруктоза \leftrightarrow сахароза + Рн
(0 ккал)**

**глюкоза + АТФ + фруктоза \rightarrow сахароза + АДФ + Рнеорг
(-7 ккал)**

• Благодарю за внимание!