

Энзиматическая биотехнология

Ферменты

- Биокатализаторы белковой природы.

Особенности:

- Нетоксичны
- Работают в мягких условиях
- Обладают высокой специфичностью и эффективностью действия
- Сохраняют свои свойства вне клетки

Использование ферментных препаратов в промышленности

- Щелочные протеазы – 25 %
- Реннины – 10 %
- Трипсины – 3 %
- Амилазы – 18 %
- Целлюлазы, лактазы – 1 %
- Изомеразы – 6 %
- Пектиназы – 3 %
- Липазы – 3 %
- Мармацея – 10 %
- Другие – 21 %

Амилолитические ферменты

- α -амилаза, β -амилаза, глюкоамилаза
- Основная функция - гидролиз крахмала и гликогена.
- Применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

Протеолитические ферменты (пептидгидролазы)

- Ускорение гидролиза пептидных связей в белках и пептидах.
- Особенность - селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле.

Пример, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин - на связь между аргинином и лизином.

- В промышленности протеазы классифицируют по способности проявлять активность в определенной области pH:

pH 1.5-3.7 - кислые; pH 6.5-7.5 - протеазы; pH > 8.0 - щелочные.

- Применение:

- мясная - для смягчения мяса;
- кожевенная - смягчение шкур;
- кинопроизводство - растворение желатинового слоя при регенерации пленок;
- парфюмерная - добавки в зубную пасту, кремы, лосьоны;
- производство моющих средств - добавки для удаления загрязнений белковой природы;
- медицина - при лечении воспалительных процессов, тромбозов.

Пектолитические ферменты

- Уменьшают молекулярную массу и снижают вязкость пектиновых веществ.
- Делятся на две группы - гидролазы и трансэлиминазы.
- Гидралазы отщепляют метильные остатки или разрывают гликозидные связи.
- Трансэлиминазы ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей.
- Применяются в текстильной промышленности (вымачивание льна перед переработкой), в виноделии - осветление вин, при консервировании фруктовых соков.

Целлюлолитические ферменты

- Очень специфичны.
- Действие - деполимеризации молекул целлюлозы.
- В медицинской промышленности используют для выделения стероидов из растений, в пищевой - для улучшения качества растительных масел, в сельском хозяйстве - как добавки в комбикорма для жвачных животных.

Факторы, влияющие на биосинтез ферментов

- **Генетический. Состав и количество синтезируемых ферментов наследственно детерминированы.**
- **Состав питательной среды. Наличие источников основных питательных веществ и веществ, играющих роль индукторов или репрессоров биосинтеза данного конкретного фермента или их групп:**

факторы роста: аминокислоты, пуриновые основания и их производные, РНК и продукты её гидролиза;

источник углерода - крахмал, кукурузный экстракт, соевая мука, гидролизаты биомассы дрожжей;

минеральные источники азота;

ионы Mg, Mn, Zn, Fe, Cu и др. металлов;

По характеру культивирования все технологические процессы производства ферментных препаратов делятся на две большие группы:
глубинный и поверхностный методы.

Глубинный метод производства ферментов

- Микроорганизмы выращиваются в жидкой питательной среде.
- Легко поддается автоматизации и механизации.
- Концентрация фермента в среде ниже.
- .

Этапы глубинного культивирования

1. Приготовление питательных сред.
Стерилизацию среды проводят путем микрофильтрации с помощью мембран, или при помощи высоких температур. Воздух очищается до и после аэрирования.
2. Получение засевного материала.
Для грибов - мицелиальная вегетативная масса, для бактерий - молодая растущая культура на начальной стадии спорообразования.
Объем посевного материала зависит от физиологических особенностей продуцента.
3. Производственное культивирование.
Биосинтез протекает в течение 2-4 суток при непрерывной подаче воздуха и перемешивании. Температурный оптимум 22-32°C.
4. Выделение.
В мицелии трёхсуточной культуры обычно остается не более 15% ферментов. Остальные выделяются в окружающую клетки жидкую среду. В этом случае препараты ферментов выделяют из фильтратов после отделения биомассы.
5. Получение товарной формы

Поверхностное культивирование продуцентов

- Культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды.
- Среда должна быть рыхлой, а слой культуры-продуцента небольшим.
- Выращивание производственной культуры происходит в асептических условиях.
- Преимущества поверхностной культуры: значительно более высокая конечная концентрация фермента на единицу массу среды, легко высушивается, легко переводится в товарную форму.
- Посевной материал может быть трёх видов: культура, выросшая на твердой питательной среде; споровый материал; мицелиальная культура, выращенная глубинным способом.
- Основу питательной среды составляют пшеничные отруби. Для повышения активности ферментов можно добавлять свекловичный жом, соевый шрот, крахмал, растительные отходы.
- Стерилизуют среду паром при помешивании (температура - 105-140 С, время 60-90 минут). После этого среду засевают и раскладывают ровным слоем в стерильных кюветах в растительных камерах. Культивируют в течение 36-48 часов.

- Схема очистки сводится к следующему:
 - освобождение от нерастворимых веществ;
 - освобождение от сопутствующих растворимых веществ;
 - фракционирование (как правило, хроматографическими методами).
- Для выделения фермента из поверхностной культуры необходима экстракция. Как правило, экстрагент - вода.
- Стадию выделения и очистки завершает сушка. После сушки препарат должен содержать не более 6-8% влаги, тогда он может в герметичной упаковке храниться до года без потери активности.
- Стандартизация ферментного препарата - доводка активности фермента до стандартной, соответствующей требованиям ГОСТ. Для этого используются различные нейтральные наполнители - крахмал, лактоза и др.

Недостатки чистых ферментативных препаратов

- Высокая стоимость
- Нестабильны
- Необходимы специальные условия хранения
- Однократное использование
- Трудная очистка от субстратов и продуктов реакций

Инженерная энзимология

- 1916 – Нельсон Дж., Гриффин Е. – сахараза на угле
- 1939 – первый патент – протеазы на опилках для обработки шкур
- 1960-е – появление науки
- 1971 - термин «иммобилизованные ферменты»

Иммобилизация — технология, согласно которой фермент закрепляют на носителе.

Иммобилизованные ферменты – ферменты, выделенные из клетки, искусственно закрепленные на носителе и сохраняющие свойственную им каталитическую активность.

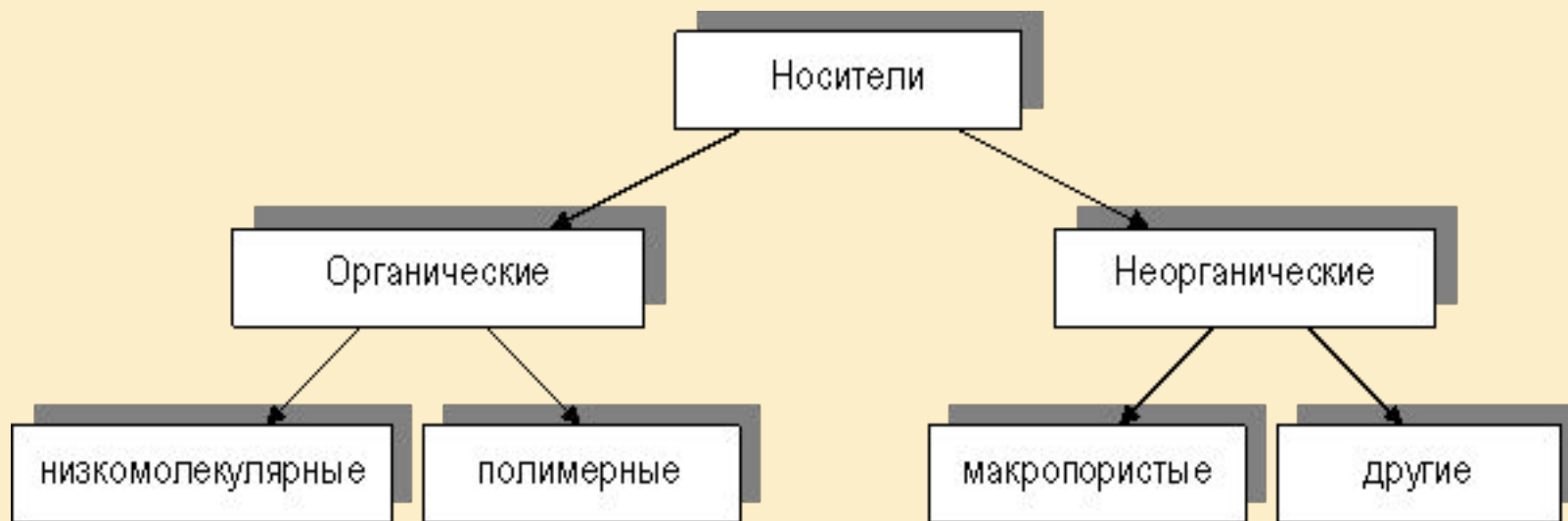
Преимущества

- Высокая стабильность и долговечность
- Легко отделяются от реакционной среды
- Многократное использование
- Технологичны
- Подбирая носители и методы иммобилизации можно изменять свойства ферментов

Требования к носителям (Дж.Порат, 1974):

- высокая химическая и биологическая стойкость;
- высокая химическая прочность;
- достаточная проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность;
- возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран);
- легкая активация;
- высокая гидрофильность;
- невысокая стоимость.

Носители для иммобилизации



- Природные полимерные – белковые (кератин, фиброин, коллаген, желатин), полисахаридные (целлюлоза, декстран, агароза, альгинаты; хитин, хитозан), липидные.
- Синтетические полимерные – полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные.
- Неорганической природы – глина, стекло, керамика, силикагель, графитовая сажа, оксиды металлов.

Методы иммобилизации ферментов

- **Физическая иммобилизация.**

Включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема.

При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями.

Типа связывания ферментов

- адсорбция на нерастворимых носителях (электростатические, гидрофобные, дисперсионные взаимодействия или водородные связи);
- включение в поры геля (равномерное распределение фермента в носителе; для водорастворимых субстратов);
- пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой мембраны (в медицине и науке);
- включение в двухфазную среду, где фермент растворим и может находиться только в одной из фаз.

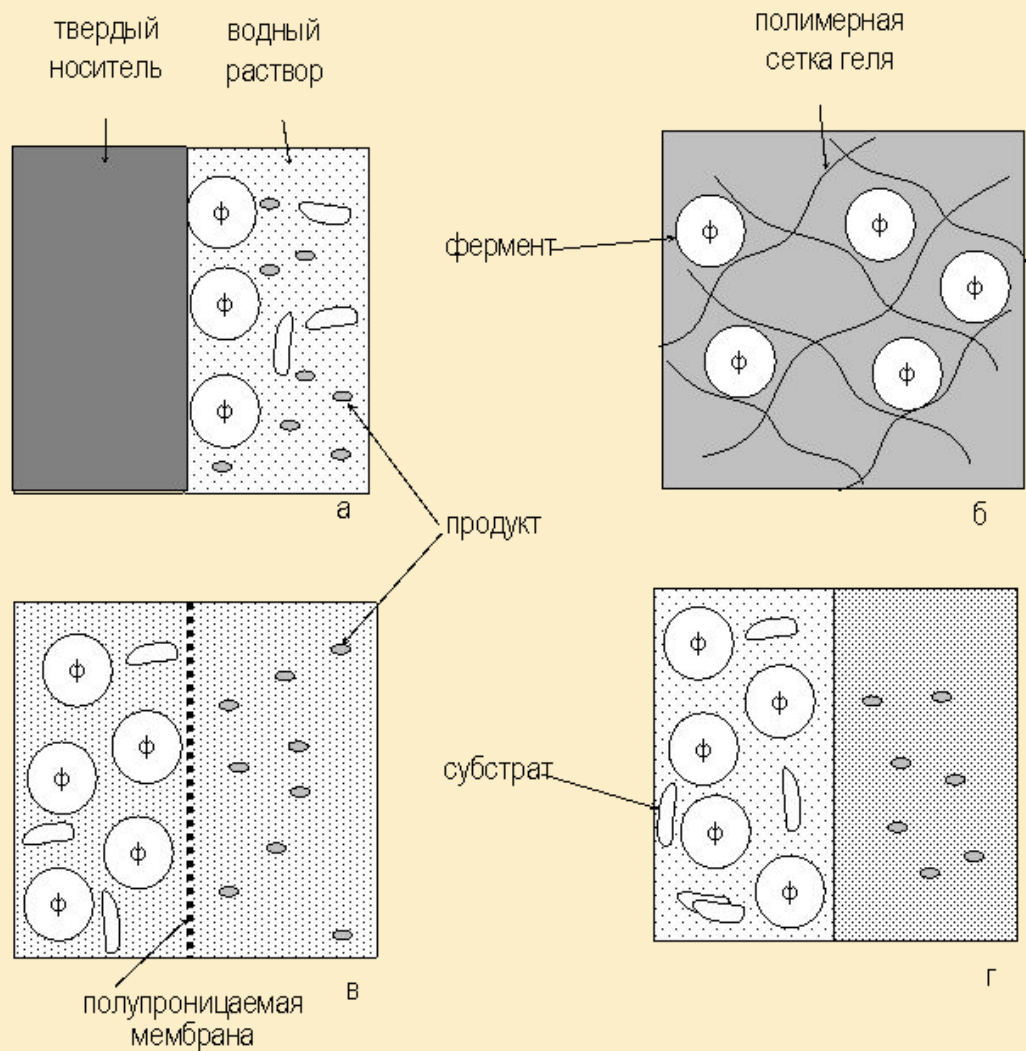
Способы иммобилизации ферментов:

а - адсорбция на нерастворимых носителях,

б – включение в поры геля,

в – отделение фермента с помощью полупроницаемой мембраны,

г – использование двухфазной реакционной среды



Химическая иммобилизация

- путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности между белком и носителем.
- Достоинства препаратов:
 - высокую прочность образуемого конъюгата;
 - химическая модификация способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких как субстратная специфичность, каталитическая активность и стабильность.

Методы химической иммобилизации

- На носителях с гидроксогруппами (бромциановый метод)
- На носителях с аминогруппами (аминогруппы превращаются в соли диазония)
- На носителях с сульфгидрильными группами (образование дисульфидных связей на воздухе)

Применение иммобилизованных ферментов

- Медицина - лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью. Направленный транспорт лекарств в организме.
- Фотолиз воды и в биоэлектродкатализ.
- Переработка лигноцеллюлозного сырья.
- Усилители слабых сигналов. На этой основе были созданы механо- и звукочувствительные датчики и открыт путь к бессеребряной фотографии.
- Пищевая промышленность - получение глюкозо-фруктовых сиропов, глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L- аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др.
- Перфузионная очистка биологических жидкостей.
- Стиральные и моющие средства, в дубильных процессах.

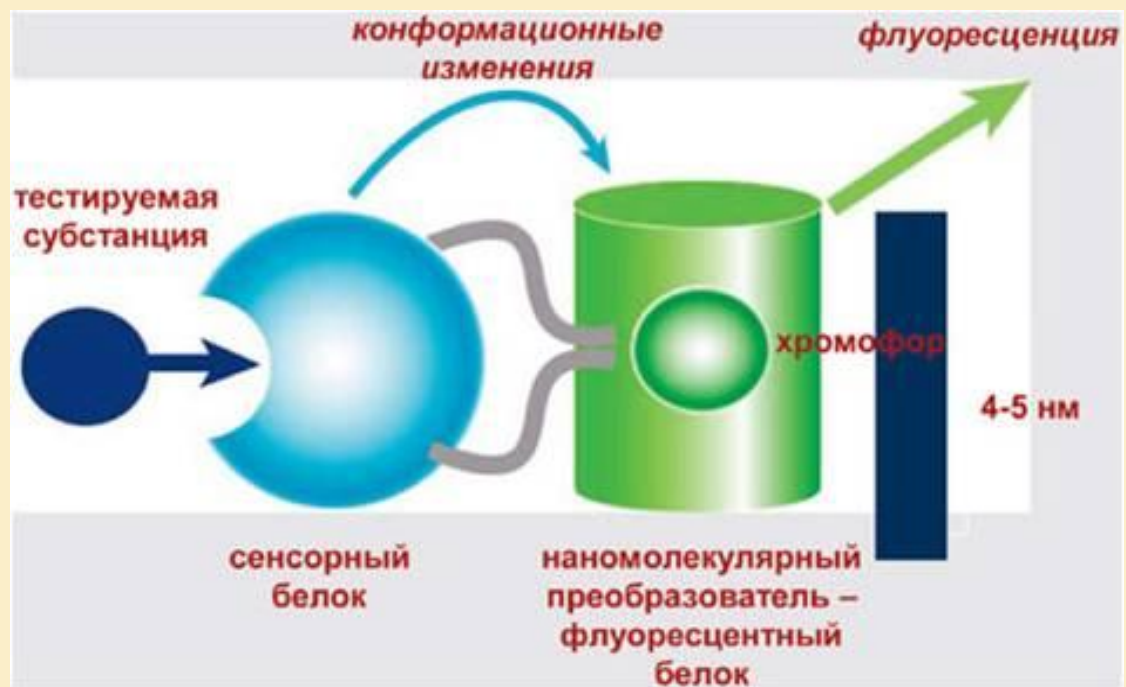
Биосенсоры

- Аналитические устройства, в которых чувствительный слой, содержащий биологический материал, реагирует на присутствие определяемого компонента и генерирует электрический сигнал, функционально связанный с наличием и концентрацией этого вещества.
- Биоматериал – ферменты, бактерии, ткани, дрожжи, антитела, антигены, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК.
- 1967 – Кларк Л. – использование ферментного электрода, Лионе К.

Конструирование биосенсора

- Биохимический преобразователь (биотрансдюсер, биоселектор) – биоэлемент распознавания, преобразует информацию о химсвязях в физический или химический сигнал.
- Физический преобразователь (трансдюсер) – преобразует сигнал в электрический с помощью спецаппаратуры.
Виды: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические, оптические, гравитационные, резонансные.

- **Ферментные биосенсоры** – ферментные электроды (электрод с нанесенным природным полимером, содержащим иммобилизованные ферменты), микрокалориметрические датчики (из 2 колонок, заполненных имм. ферментом и термисторов – регистрация теплового эффекта хим.реакции в 1-й колонке), биодатчики на основе биолюминесценции (колодка и светоприемное устройство).
- Использование - определение сахара в крови, содержания пенициллина в среде, оценка глубины инфаркта миокарда.
- **Клеточные биосенсоры** – включение клеток микроорганизмов в носители.
- Использование – генодиагностика.



Использование биосенсоров

- измерение пищевой ценности, свежести, безопасности продуктов питания;
- экспресс-анализ крови;
- обнаружение и измерение;
- степени загрязнения окружающей среды;
- детекция и определение количества взрывчатых веществ, токсинов и биологического оружия;
- извлечение металлов из сточных вод;
- изготовление водородных солнечных элементов;
- Очистка природных и сточных вод.

Биочипы

- 1975 – саузерн-блотт Саузерна Э. (меченая НК для определения последовательности фрагментов ДНК).
- 1980-е – Россия- начало исследований.
- Биочип – устройство, объединяющее сенсор, трансдюсер, аналогово-цифровой преобразователь и микропроцессор.
- Виды: матричные (ДНК), микрофлюидные (капиллярные), с использованием микросфер с цветовой кодировкой.
- Размер ячейки – 50-200микрон, число ячеек – 1000-100000, анализируемые концентрации – 10 мкМ, размер – 1 см.

Применение биочипов

- Поиск и установление функций генов,
- Диагностика заболеваний,
- Проверка действия лекарств,
- Диагностика отторжения при трансплантации,
- Контроль за патогенными организмами,
- Обнаружение жизни во Вселенной.
- Днк-микрочипы: идентификация мутаций, наблюдение за активностью генов, диагностика инфекционных заболеваний, скрининг микроорганизмов,
- Белковые биочипы: оценки эффективности лекарственных препаратов, изучение взаимодействия белков.

Технология

- Носитель – пластинка из стекла, пластика, полупроводника, металла.
- Биоматериал – ДНК, белки, фермента.
- Молекула образца соединяется с микрозондом, закрепленным в ячейке биочипа.
- Люминесцентное свечение биочипа.
- Анализ прореагировавших чипов проводится с помощью чип-детектора (микроскоп с видеофиксацией).