

**федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)**

Институт фармации им. А.П. Нелюбина
Кафедра биотехнологии

Методические материалы по дисциплине:

Инженерная энзимология

основная профессиональная образовательная программа высшего
профессионального образования - программа специалитета

06.05.01 Биоинженерия и биоинформатика

ВВЕДЕНИЕ

Целью освоения дисциплины является изучение способов получения ферментов различной природы и использование их в управляемых биотехнологических процессах и медицине.

К задачам изучения дисциплины следует отнести приобретение студентом практических знаний и навыков для управления биотехнологических процессов получения ферментных препаратов, исследования ферментов, проведения процессов биокатализа в различных отраслях и в медицине.

В процессе изучения дисциплины студент должен:

- знать:

- основные классы, номенклатуру, строение, свойства и механизм действия ферментов,
- главные источники для выделения ферментов;
- способы выделения и скрининга продуцентов ферментных препаратов, методы работы с ними;
- основные стадии биотехнологического производства микробных ферментных препаратов;
- закономерности кинетики процессов и образования продуктов биокатализа; модели процессов биокатализа, методы оптимизации биокаталитических процессов;
- методы иммобилизации ферментов и клеток;
- области применения ферментов: в медицине, тонких химических технологиях и пищевой промышленности.

уметь:

- выбирать сырье для проведения биокаталитических процессов;
 - проводить скрининг биологических продуцентов ферментов;
 - выбирать биологические объекты и геномы для получения продуцентов ферментов и при проведении биокатализа, обосновать режим работы и условия технологии ферментных препаратов;
 - принимать квалифицированные решения по конструированию новых продуцентов ферментных препаратов;
 - подбирать методы иммобилизации ферментов.
- владеть:
- методами определения активности ферментов;
 - способами и приемами культивирования микроорганизмов-продуцентов ферментных препаратов,
 - методами получения и очистки ферментных препаратов из растительного и животного сырья;
 - навыками иммобилизации ферментных препаратов;
 - навыками оптимизации процессов биокатализа;
 - навыками использования каталитических функций ферментов (или ферментных систем) или в составе живых клеток для получения соответствующих целевых продуктов:

Лекция №1

Тема: Продуценты ферментных препаратов. Современные методы создания штаммов-продуцентов ферментных препаратов

План

1. Микроорганизмы-продуценты ферментных препаратов.
2. Методы генетического конструирования штаммов.
3. Гибридизация эукариотических микроорганизмов-продуцентов ферментов.

Химический синтез ферментов в промышленных масштабах очень сложен, дорог и экономически не целесообразен.

Микробиологический метод получения ферментов - наиболее перспективен.

Преимущества:

- 1) богатство ассортимента ферментов, синтезируемых микроорганизмами,
- 2) возможность управления ферментативными системами и составом производимых препаратов,
- 3) высокие скорости размножения микроорганизмов и возможность использования различных доступных и недорогих субстратов.

Ферменты в микробных клетках могут иметь как внутриклеточную локализацию, так и выделяться в окружающую среду.

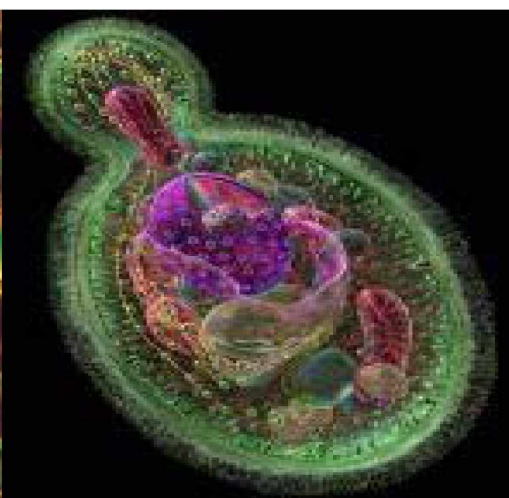
Внеклеточные ферменты более доступны для препаративного получения, поэтому в промышленных масштабах получают главным образом внеклеточные ферменты.

Микроорганизмы - продуценты ферментов

Используются продуценты плесневые грибы, реже — дрожжеподобные организмы и споровые бактерии. Дрожжеподобные и мицелиальные грибы: *Aspergillus*, *Candida*, *Endomycopsis*, *Endomyces* *Trichoderma* и другие.



а



б

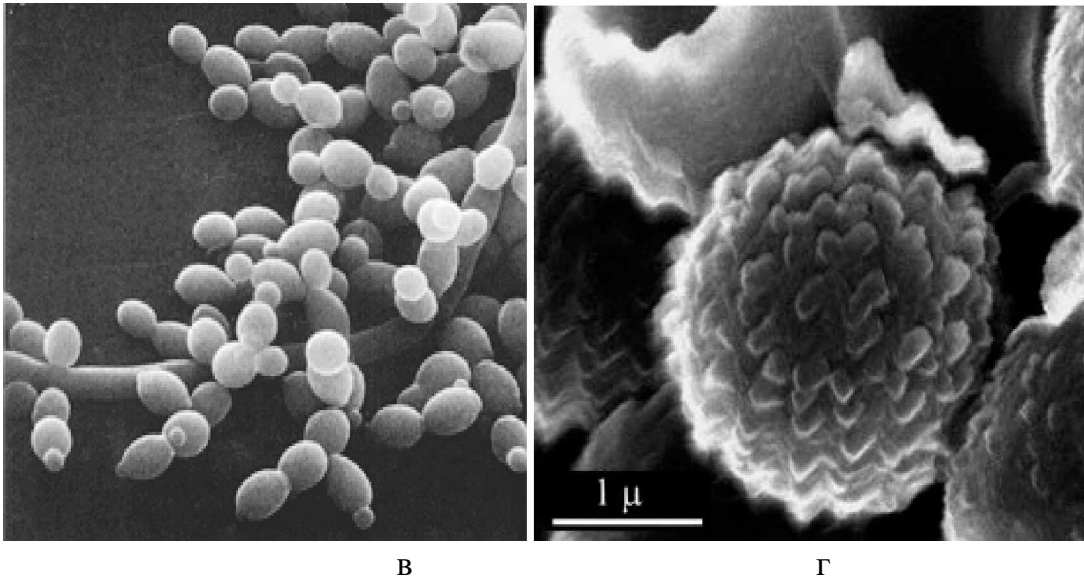


Рисунок 1 - Продуценты ферментных препаратов: *Aspergillus niger* (а), *Saccharomyces cerevisiae* (б), *Candida albicans* (в), *Trichoderma viride* (г)

Выбор продуцента фермента

Технология их производства основана на культивировании специально отобранных штаммов микроорганизмов — активных продуцентов ферментов, с последующим выделением препаратов.

Отбор штаммов сопряжен с проверкой активности огромного количества культур, приводящей к отбору наиболее активного продуцента.

Природные штаммы обычно не синтезируют ферменты в избыточных количествах, так как процесс их синтеза находится под строгим генетическим контролем.

Наиболее важные - активные штаммы-продуценты ферментов (из микробных коллекций или выделенных из природных источников) кроме конститутивных ферментов, продуцируют еще и индуцибельные и репрессибельные ферменты, которые синтезируются клетками в результате изменения условий ферментации или генетического аппарата клетки.

К индуцибельным относятся многие ферменты, имеющие коммерческую ценность.

Процесс ферментации с целью получения индуцибельных ферментов ведут в присутствии субстрата-индуктора.

В результате способности синтезировать фермент индуцированно в ответ на заданный субстрат, возможно использование одной культуры для получения различных ферментов.

Продуктивность штаммов

Выход ферментов можно увеличить с помощью новейших методов биотехнологии.

1. С помощью плазмид или трансдуцирующих фагов можно увеличить

- копийность генов, кодирующих синтез целевых ферментов.
2. Усилением экспрессии генов возможно также в результате включения сильных промоторов в ДНК.
 3. Подбором состава среды и условий культивирования микроорганизмов. Важным является качественный и количественный состав питательных сред.

Методы генетического конструирования

1. Стратегия селекционных работ заключается в поиске полезных штаммов и увеличении их полезных свойств путем регуляции их метаболической активности.
2. Создание продуцентов путем генетического конструирования *in vivo*:
 - а) мутагенеза
 - б) рекомбинациями.
3. Генетическое конструирование *in vitro*: создание гибридных ДНК, выделенных из полезных организмов. Дальнейшее введение гибридных ДНК в клетку.
4. Гибридизация, конъюгация, трансдукция и трансформация эукариот (грибов, клеток животных) и прокариот.

Методы мутагенеза

Мутации - внезапно возникающие изменения генома под действием мутагенных факторов. Выбор мутагена определяется целью мутации и физиологией продуцента. Важное свойство мутанта - реверсия к исходному типу. Такой мутант - *ревертант*. Реверсии могут произойти благодаря супрессорным мутациям.

При внутригенной супрессии вторая мутация возникает в том же гене, а при внегенной супрессии вторая мутация возникает в другом гене (гене-супрессоре). Некоторые супрессорные мутации могут активизировать экспрессию мутантного генома или активизировать альтернативный метаболический путь. Супрессорные мутации могут иметь плейотропный эффект.

___ Отбор мутантов проводят: по морфологическим, биохимическим, серологическим признакам, с использованием тест-культур ауксотрофных мутантов, тест-культур, питательных сред с индикаторами или антибиотиками, метода отпечатков колоний на селективные питательные среды.

У споровых форм долю мутантов можно повысить путем прогревания культур: прототрофы прорастают, а ауксотрофы нет.

У мицелиальных форм грибов используют метод обогащения или фильтрации: мутанты не растут, а исходные «дикие» типы дают мицелий, а неделящиеся клетки вымываются в фильтрат.

Ауксотрофные мутанты представляют большой интерес для получения ферментов и аминокислот.

При использовании мутаций для создания продуцентов используют

ступенчатый отбор. Недостатки мутаций.

1. Непредсказуемость
2. Трудоёмкость
3. Опасность работы с мутагенами.

При создании продуцентов ферментов получают конституитивные мутанты (мутанты с измененными метаболическими конституитивными путями). Для чего их культивируют на средах с содержанием только того субстрата, который утилизирует продуцент.

Гибридизация эукариотических микроорганизмов

Гибридизация - это перераспределение генов или частей генов различных клеток. В результате образуются рекомбинантные или гибридные клетки, сочетающие признаки различных родительских форм.

Гибридизация происходит:

- при половом процессе,
- при парасексуальном процессе,
- при слиянии протопластов.

Для создания продуцентов ферментных препаратов используют ауксотрофные мутанты и устойчивые формы к ингибиторам роста для более легкого выявления полученных гибридных форм.

Образование гибридов у дрожжей, водорослей и мицелиальных грибов происходит в результате слияния клеток - **копуляции**.

Если исходные клетки были гаплоидны, то образуется зигота. Диплоидные клетки могут давать потомство диплоидное. Слиянию могут подвергаться две вегетативные дочерние клетки, материнская клетка и почка (дочерняя клетка). У дрожжевых грибов может происходить мейоз (у *Neurospora crassa*).

Если ядра не сливаются при копуляции, то образуется особи с разными ядрами - гетерокарион.

Слияние протопластов

С помощью слияния протопластов получают генетические рекомбинанты, у которых не было ранее необходимых признаков и которые никогда не скрещиваются.

Трансформация протопластов - универсальный метод введения ДНК в клетки грибов, актиномицетов и бактерий.

Протопласты получают несколькими методами.

- Подавление синтеза клеточной стенки с помощью антибиотиков;
- Выращивание продуцентов на среде с 2-дезоксиглюкозы;
- Ферментативный лизис клеточной стенки (лизозим, лизостафин, протеазы, липазы);
- Выращивание продуцентов в присутствии осмотических растворов солей (KCl, NaCl, CaCl₂, NH₄Cl).

Для лизиса клеточной стенки грибов используют клеточный сок улиток - «геликазу», содержащий несколько ферментов.

Продукты слияния протопластов называют фузантами («fusion» - слияние).

При слиянии протопластов в клетки попадает весь геном от доноров и все содержимое цитоплазмы.

В акте слияния протопластов может участвовать две, три и даже более клеток. В результате образуются рекомбинанты, имеющие признаки двух и более родителей. Образующиеся ди-, три- карионы обычно нестабильны.

При слиянии протопластов грибов получают **межвидовые** грибы.

Таким образом, получение продуцентов ферментных препаратов может проводиться различными способами, в том числе и отбор из природных селекционных популяций, которые наиболее стабильны.

Лекция №2

Тема: Биотехнология микробных ферментных препаратов поверхностным способом

План

1. Характеристика способов получения микробных ферментов.
2. Технология поверхностного способа получения микробных ферментов.
3. Выделение ферментных препаратов.

Биотехнологическое производство ферментных препаратов реализуется двумя способами - поверхностным и глубинным.

Твердофазная поверхностная ферментация заключается в выращивании продуцента на поверхности тонкого слоя твердой сыпучей среды.

Глубинная ферментация в жидкой среде может быть реализована как в условиях периодического процесса, так и с применением проточных систем.

Поверхностная ферментация

Ферментация осуществляется на поверхности сыпучей среды в металлических лотках или вертикальных перфорированных с обеих сторон кюветах.

Культура развивается на поверхности твердой рыхлой среды, основу которой составляют пшеничные отруби, зерновая шелуха, являющиеся источником ростовых веществ. Для разрыхления среды в отруби добавляют древесные опилки (5-10 %), овсяную шелуху.

Поверхностная ферментация с использованием вместо лотков кювет более совершенна. Конструкция обеспечивает более эффективную аэрацию и позволяет частично механизировать процесс.

Выращивание производственной культуры происходит обычно в асептических условиях, но среду и кюветы необходимо простерилизовать.

Перед каждой новой загрузкой также необходима стерилизация оборудования.

Преимущества поверхностной культуры:

- значительно более высокая конечная концентрация фермента на единицу массу среды (при осахаривании крахмала 5 кг поверхностной культуры заменяют 100 кг культуральной жидкости),

- поверхностная культура относительно 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.



а

б

в

Рисунок 2 - Посевной материал для твердофазной ферментации: а - глубинный мицелий, б - посевной материал на скошенном агаре, в - споровая биомасса продуцента.

Основу питательной среды составляют пшеничные отруби, как источник необходимых питательных и ростовых веществ. Кроме того, они создают необходимую структуру среды.

Для повышения активности ферментов к отрубям добавляют свекловичный жом, соевый шрот, крахмал, растительные отходы. Стерилизуют среду острым паром при помешивании (температура - 105-140 С, время 60-90 минут). Среду и раскладывают ровным слоем в стерильных кюветах засевают. Кюветы помещают в растительные камеры. Культивируют в течение 36-48 часов.

Рост делится на три периода, примерно равных по времени.

Сначала происходит набухание конидий и их прорастание (температура не ниже 28о С), затем рост мицелия в виде пушка серовато-белого цвета (необходимо выводить выделяемое тепло) и образование конидий.

Для создания благоприятных условий роста и развития продуцента необходима аэрация и поддержание оптимальной влажности (55-70%).

Выросшая в неподвижном слое при поверхностном культивировании культура представляет корж из набухших частиц среды, плотно связанных сросшимся мицелием.

Применяемые в промышленности колонные аппараты объемной аэрации еще более улучшают процесс твердофазной ферментации. Такой аппарат разделен на секции перфорированными пластинами, закрепленными на поворотных осях.

Дробление и сушка завершают обработку препарата марки ПХ.

Порошок упаковывают в крафт-мешки с полиэтиленовой прокладкой по 15—30 кг, снабжают этикеткой с указанием препарата и его активности и

отправляют потребителю.

В основном ферментные препараты выпускаются в очищенном виде, после соответствующих операций, повышающих удельную активность и потребительские свойства продукта.

Операции очистки мало связаны со способом культивирования продуцента и одинаковы для ферментов, полученных поверхностным и глубинным способом.

Колонный аппарат с объемной аэрацией для выращивания поверхностной культуры

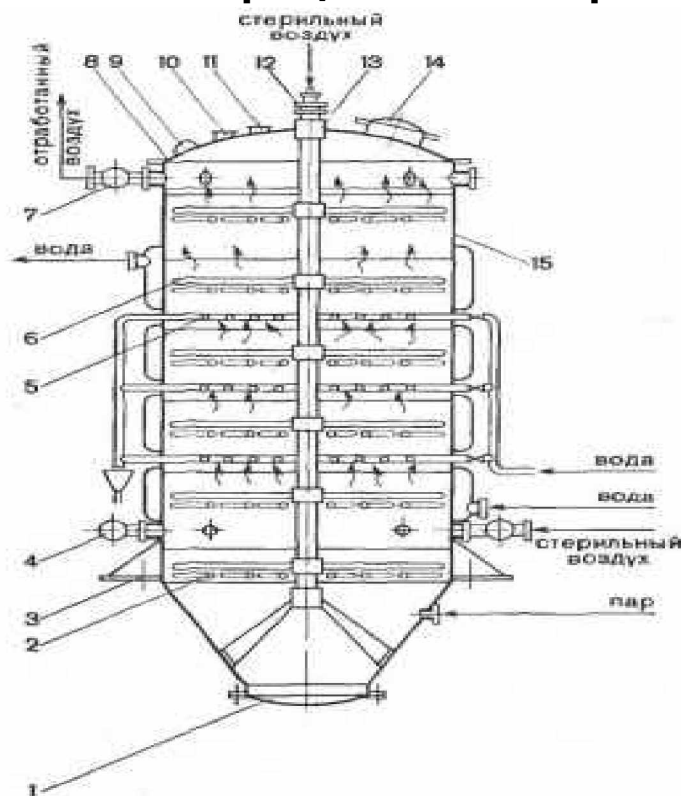


Рис. 35. Колонный аппарат с объемной аэрацией для выращивания поверхностной культуры (по К. А. Калунянцу, Л. И. Голгеру, 1979):

1 — люк для выгрузки; 2 — валик секции; 3 — опора; 4 — коллектор воды/стерильного воздуха; 5 — охлаждающие замесники; 6 — лопасть вала; 7 — коллектор отвода отработанного воздуха; 8 — крышка; 9 — бобышка манометра; 10 — штуцер; 11 — воздушник; 12 — шестерня привода вала; 13 — вал; 14 — люк для загрузки; 15 — корпус

Выделение ферментных препаратов

Ферментные препараты, полученные поверхностным способом, выделяют из коржа.

Процесс проходит в несколько стадий:

1. Дробление: корж, имеющий влажность 40—50%, сушат до 10—12%, чтобы предотвратить инактивацию ферментов при температуре не превышающей 40°C, а длительность не более 30 мин (используют конвективные сушилки ленточного, тоннельного, барабанного, шахтного типа, барабанные сушилки).

2. Экстракция. Экстрагент - вода. При этом в раствор переходят сахара,

продукты гидролиза пектиновых веществ и целлюлозы.

3. Очистка фермента после экстракции.

4. Сушка готового ферментного препарата. После сушки препарат должен содержать не более 6-8% влаги, в герметичной упаковке хранится до года без потери активности.

Ферменты, полученные путем твердофазной ферментации в основном имеют невысокий уровень очистки и используются в сельском хозяйстве и пищевой промышленности.

Лекция № 3

Тема: Биотехнология микробных ферментных препаратов глубинным способом

План

1. Преимущества глубинного способа получения микробных ферментов.
2. Технология глубинного способа получения микробных ферментов.
3. Выделение ферментных препаратов.
4. Номенклатура ферментных препаратов.

Глубинный способ получения микробных ферментов имеет преимущества:

1. проходит в контролируемых условиях ферментации,
2. исключает ручной труд,
3. Позволяет автоматизировать процесс.

Основное углеродное сырье: крахмал (кукурузный, пшеничный, картофельный), кукурузный экстракт, свекловичный жом, а также глюкоза, мальтоза, декстрины.

Источники азота: органические соединения (гидролизаты казеина или микробных биомасс), а также минеральные соли (NaNO_3 , NH_4NO_3 , NH_4HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Для целлюлолитических ферментов источники углерода: хлопок, солома, целлюлоза; липолитических - липиды.

При глубинном культивировании продуцентов ферментов выделяют 5 этапов

1. *Приготовление питательных сред: зависит от состава компонентов.*

Некоторые компоненты предварительно измельчают, отваривают или гидролитически расщепляют.

Готовые к растворению компоненты подают при постоянном помешивании в емкость для приготовления среды в определенной последовательности.

Стерилизацию среды проводят либо путем микрофльтрации с помощью полупроницаемых мембран, либо при помощи высоких температур. Время обработки в этом случае зависит как от интенсивности фактора, так и от уровня обсемененности объекта.

Стерилизуются также все коммуникации и аппараты. Воздух очищается до и после аэрирования.

2. Получение посевного материала.

Для засева питательной среды материал готовят также глубинным методом. Вид его зависит от продуцента: для грибов это мицелиальная вегетативная масса, для бактерий - молодая растущая культура на начальной стадии спорообразования.

Получение посевного материала состоит в увеличении массы продуцента в 3-4 стадии. Объем посевного материала зависит от физиологических особенностей продуцента. Если продуцент размножается только вегетативно, он резко возрастает (до 5-20%). Если же происходит обильное спороношение - сокращается до 1%.

3. Ферментация продуцента.

Биосинтез ферментов в глубинной периодической культуре протекает в течение 2-4 суток при непрерывной подаче воздуха и перемешивании.

Высокая концентрация питательных веществ на первых этапах могут тормозить рост биомассы продуцента, поэтому часто свежая среда или некоторые её компоненты вводятся в ферментер на стадии активного роста. Температурный оптимум находится в интервале 22-32°C.

В биотехнологических процессах ведется непрерывное автоматическое определение содержания в среде углеводов, количества образовавшихся метаболитов и концентрации клеток. Данные поступают в компьютер, который определяет стратегию коррекции процесса и автоматически регулирует его. Этим достигается максимальная производительность и наилучшее качество продуктов.

4. Выделение ферментных препаратов

Ферментные препараты, полученные глубинным способом, выделяют из биомассы и культуральной жидкости.

В мицелии и клетках бактерий культуры обычно остается не более 15% ферментов. Остальные выделяются в окружающую клетки жидкую среду. В этом случае препараты ферментов выделяют из фильтратов и из биомассы.

1. Завершение ферментации: для предотвращения инактивации ферментов культуральную жидкость охлаждают до 3-5 °С и направляют на обработку.

2. Отделение культуральной среды от биомассы и грубых взвешенных частиц: флотация, сепарация, фильтрация.

3. Концентрирование культуральной среды: под вакуумом или путем ультрафильтрации.

4. Очистка.

В связи с термолабильностью многих ферментов процессы обработки ведут при контролируемых, часто пониженных температурах.

Отделение твердой фазы

Фильтрация жидкостей, содержащих мелкодисперсный клеточный материал.

В исходную смесь добавляют вспомогательные фильтрующие материалы — диатомитов, фильтроперлита (размолотые вулканические породы SiO₂, Al₂O₃), кизельгура, бентонита и т. п.

На ткани фильтра также добавляют эти вещества, при этом образуются

несжимаемые осадки с хорошо развитой пористой структурой, производительность фильтрации повышается.

Процесс проводят в вакуумных фильтрах ленточного, барабанного и фильтр-прессного типов. Потери фермента на стадии фильтрации 5—10% в основном с биомассой, которая сегодня практически не используется и поступает в отвал.

Центрифугирование.

Имеются специально разработанные сепараторы с коническими тарелками для отделения мицелиальной и бактериальной массы. Сепараторы снабжены устройством пульсирующей выгрузки осадка, обычно отделяют 96—97% твердой фазы.

Очистка ферментных препаратов из биомассы

Культуру высушивают до 10-12% влажности при температурах не выше 40°C, не более 30 минут. Массу размельчают до гранул 5-5 мм.

Наиболее распространенный дезинтегратор содержит два диска, вращающихся в разные стороны, каждый от своего привода.

Материал подают в центр между дисками, на них концентрическими кругами расположены пальцы, проходя между которыми материал дробится и отбрасывается на периферию. При диаметре дисков 400 мм и скорости вращения 1400 об/мин производительность дезинтегратора составляет 200 кг/ч. Иногда препарат применяют прямо в неочищенном виде - в кожевенной и спиртовой промышленности.

Получение очищенных ферментных препаратов

Доля собственно ферментов — активных белков в поверхностной культуре и культуральной жидкости — составляет около 1% для поверхностных и не более 0,1% — для глубинных культур.

Выделение и очистка ферментов — трудоемкий и дорогой процесс. В бытовом обслуживании, в текстильных и микробиологических производствах и особенно в медицине могут использоваться только ферменты достаточно высокой, иногда предельной степени очистки.

В процессе очистки происходит повышение удельной активности препарата.

В лабораторной практике применяют множество препаративных методов в нестандартной последовательности и в самых разных комбинациях.

Получение очищенных ферментов, включает отдельные технологические стадии, не связывая их в единую технологическую линию.

Схема состоит из:

- 1) освобождения от нерастворимых веществ;
- 2) освобождения от сопутствующих растворимых веществ;
- 3) фракционирования хроматографическими методами.

В большинстве случаев на первом этапе используют экстракцию фермента.

Экстракция ферментов из биомассы культуры

Наилучшим и наиболее употребляемым экстрагентом для белков является вода. В воду переходят примеси:

- сахара, не потребленные в процессе роста,
- полностью гидролизованные гемицеллюлозы и пектиновые вещества,
- продукты гидролиза целлюлозы и белковых веществ,
- растворимые пигменты, образуемые плесневыми грибами и бактериями.

Извлекаемость ферментов значительно выше из сухих культур (10—12% влажности). Ферменты диффундируют в экстрагирующую жидкость, процесс проводят при температурах не выше 30°C. В производственных условиях одна и та же порция материала подвергается многократному выщелачиванию. Однократная экстракция водой дает растворы с концентрацией АСВ 4—5%, 8-секционная батарея позволяет поднять содержание АСВ в экстракте до 14-15%.

Концентрирование ферментных растворов

Обычно проводят перед кристаллизацией чистого продукта и чаще всего ограничивается упариванием. Основным условием процесса является снижение температуры кипения и уменьшение длительности процесса.

Выпаривание проводят не в циркуляционных, а в проточных выпарных аппаратах пленочного типа, с дальнейшим снижением температуры и сокращением времени пребывания раствора в нагретом состоянии, т. е. обеспечить высокий вакуум.

В исходную емкость закачивают определенный объем жидкости, уже прошедшей стадии отделения биомассы и стерилизующей фильтрации. Раствор постоянно охлаждается в емкости и температура составляет от 4 до 15°C. В результате оттока через мембраны уровень жидкости в емкости постоянно понижается, по нему иногда судят об окончании процесса.

Ультрафильтрация ферментных растворов.

Ультрафильтрация позволяет:

- одновременно удалить из растворов все низкомолекулярные балластные примеси,
- выполняет функции и концентрирования, и очистки.

Основной элемент ультрафильтрационной установки — полупроницаемая мембрана. Процесс основан на разделении веществ по молекулярной массе:

- не требует изменения температуры и фазового состояния,
- проводится без добавления химических реагентов,
- позволяет получить теоретически любую необходимую концентрацию белка
- достичь любой заданной степени очистки от примесей.

Отечественная промышленность выпускает мембраны из ацетата целлюлозы, полиамидов, других материалов с размерами пор от 3 до 100 нм.

Диафильтрация

Во время ультрафильтрации в емкость добавляют обессоленную воду, т. е. осуществляют режим диафильтрации.

Такое разбавление способствует еще более высокой очистке раствора от примесей, хотя приводит к увеличению длительности процесса.

Совместное использование диафильтрации и концентрирования позволяет на практике в 250—300 раз повысить удельную ферментативную активность раствора.

Теоретически процесс ультрафильтрации можно проводить без потерь фермента. На практике же потери достигают 20—30%, причины:

- неправильный выбор мембран,
- несовершенства конструкции мембранных аппаратов, допускающих протечки исходного раствора в пермеат, минуя мембрану,
- потери фермента с регенерирующими растворами,
- несоблюдение температурного режима в установке.

Осаждение ферментов органическими растворителями

Действие органических растворителей основано на снижении диэлектрической постоянной среды.

Принцип: если разрушить гидратную оболочку, начинается конгломерация и осаждение белков. Для этого молекулы добавляемого вещества должны быть более гидрофильными, чем молекулы белка. Осадители: этанол, метанол, ацетон, изопропанол.

Осаждение проводят в реакторах периодического действия. Для уменьшения потерь фермента при смешивании растворителя с водой обе жидкости первоначально охлаждают до 0—5°C. Надосадочную жидкость, содержащую 50—70% растворителя, направляют на регенерацию в ректификационную колонну. За каждый цикл теряется 5—7% растворителя, потери фермента достигают 15% по причине инактивации при длительном контакте с растворителем.

Высаливание

Механизм этого процесса тот же, что и при действии растворителей.

Используют растворы солей: сульфат аммония, сульфат натрия, сульфат магния, фосфат калия.

Осадок ферментов различной природы образуется за разное время — от 0,5 до 12 ч. Длительность этого процесса, а также расход соли сильно зависят от содержания АСВ в растворе, поскольку надо связать разное количество воды. Для выделения 1 кг препарата непосредственно из культуральной жидкости надо затратить 45—50 кг соли, а из раствора, упаренного до содержания 30% АСВ, — только около 1,5 кг. Содержание соли в осажденном препарате зависит от концентрации ее в растворе, но в любом случае оно велико — от 30

до 80%. Растворение и повторное осаждение растворителями позволяет получать даже высокочистые препараты медицинского назначения.

Сорбционная очистка

Метод основан на способности белков сорбироваться по ионообменному механизму. Для сорбции белков применяют: иониты на основе целлюлозы, катионит — карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) и анионит — диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ).

Высоко селективные иониты:

- термически обработанный крахмал,
- сефадексы на основе декстрана,
- аниониты на основе поливинилового спирта,
- катиониты на основе полиметакриловой кислоты и т. п.

После сорбции и промывки проводят десорбцию элюирующими растворами, специально подбираемыми для каждого сорбента и фермента. Сорбционную очистку проводят непрерывно в колонках насадочного типа и периодически в аппаратах с мешалкой с последующим отделением твердой фазы.

Гель-фильтрация (или эксклюзивная хроматография)

Метод основан на времени выхода вещества из хроматографической колонки и зависит от размера его молекул или молекулярной массы (более крупные молекулы не входят в поры сорбента и элюируются раньше).

Эксклюзивная хроматография осуществляется в жидкостных хроматографах. Колонки наполняют сорбентами - мягкими (сефадексы и декстрановые гели), полужесткими (полиакриламидные гели) или жесткими (пористые стекла), чаще всего на практике используют гель - фильтрацию через сефадекс.

Сефадекс - полисахарид декстран, цепи которого соединены поперечными связями, образуя «молекулярное сито». Чем больше поперечных сшивок, тем меньше размер ячеек «молекулярного сита».

Молекулы небольших размеров диффундируют внутрь набухших гранул, а крупные белковые молекулы проходят сквозь колонку.

При гель-фильтрации может происходить и частичное фракционирование белков.

Сушка ферментных препаратов

Этот процесс завершает стадии выделения и очистки. Высушиванию подвергают:

- культуральные жидкости,
- диффузионные вытяжки,
- концентраты после упаривания
- концентраты после ультрафильтрации,
- осадки после осаждения растворителями или солями.

Жидкие полупродукты сушат в распылительных сушилках.

Общие требования к процессу: исходное содержание АСВ не должно

превышать 20—22%, температура теплоносителя не должна быть выше 130°C на входе и 50—70°C на выходе, время контакта — несколько секунд, гидродинамика газовых потоков в сушильной камере должна обеспечить отсутствие контакта капель жидкости со стенками камеры.

Перед сушкой в раствор обязательно добавляют наполнители (обычно NaCl) для предотвращения слипания частиц из-за большого количества остаточных сахаров. Наполнителя вносится до 100% от массы АСВ, потери ферментативной активности при сушке с наполнителями — 5—6, без них — 25—30%.

Стандартизация ферментных препаратов

Стандартизацией называют операцию по доводке активности препарата до стандартной, определяемой ГОСТ или техническими условиями.

Для этого используют различного рода нейтральные наполнители, обычно это крахмал, лактоза, пищевая соль.

Препарат и наполнитель перемешивают в барабанном смесителе в течение 20—30 мин, количество наполнителя рассчитывают по формуле:

$$t = A_{исх} * M / A_{ст} - M$$

где t — масса наполнителя; M — масса исходного препарата; $A_{исх}$ — активность исходного препарата; $A_{ст}$ — стандартная активность.

Вся потребность народного хозяйства в ферментах может быть покрыта их микробиологическим производством при условии правильного выбора продуцента и оптимальной разработки технологии биосинтеза.

Промышленные названия препаратов ферментов

Название ферментных препаратов складывается из: основного фермента и видового названия микроорганизма-продуцента. Препарат, содержащий в своей основе амилолитические ферменты и полученный при помощи культуры *Aspergillus oryzae*, называется амилоризин.

В названии препарата указывается также способ культивирования и степень концентрирования и очистки:

Амилоризин Г 10Х

I II III IV V

I - название основного фермента;

II - название микроорганизма-продуцента;

III - окончание; IV - способ культивирования, V - степень очистки:

"II" - поверхностный, "Г" - глубинный; I-V - степень очистки (концентрирования):

"X" - поверхностная культура или культуральная жидкость;

"2X" - концентрированные растворы ферментов, освобожденные от

биомассы;

"3X" - высушенные препараты "2X";

"10X" - осажденные органическими растворителями и солями;

"15X" - "30X" - очищенные от балластных веществ и других ферментов с использованием различных методов очистки и фракционирования.

Ниже приводится пример последовательных стадий очистки фермента α -амилазы.

Таблица 1 - Последовательность очистки фермента α -амилазы

Стадия очистки	Марка препарата	Активность,	
		Е/г	АСВ
Поверхностная культура гриба	ПХ	38	
Упаренный водный экстракт из культуры	П2Х	120	-140
Осаждение этанолом из экстракта	П10Х	600	-800
Осаждение этанолом из диализованного экстракта	П15Х	1300	-1400
Повторная кристаллизация	П20Х	2000-	-2500
Кристаллическая α -амилаза		6600	

Из таблицы видно, что с повышением степени очистки увеличивается активность ферментного препарата.

Лекция №4

Тема: Имобилизованные ферменты

План

1. Характеристика иммобилизованных ферментных препаратов.
2. Носители для иммобилизации ферментов.
3. Методы иммобилизации ферментов.
4. Физические методы иммобилизации.
5. Химические методы иммобилизации ферментов.

Имобилизованные ферменты - ферменты, искусственно связанные с нерастворимым носителем, но сохраняющие свои каталитические свойства. В 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахараза (зимаза), сорбированная на угле, сохраняет свою каталитическую активность.

В 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт впервые осуществили ковалентные связывания амилазы, пепсина, РНК-азы и карбоксипептидазы с нерастворимым носителем.

В 1971 г. на первой конференции по инженерной энзимологии был узаконен термин «иммобилизованные ферменты».

В понятие «иммобилизация» вкладывается более широкий смысл, чем связывание на нерастворимом носителе, а именно - полное или частичное ограничение свободы движения белковых молекул.

Преимущества иммобилизованных ферментов в сравнении со свободными молекулами:

- представляют собой гетерогенные катализаторы,
- легко отделяются от реакционной среды,
- могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса,
- иммобилизация ведет к изменению свойств фермента: субстратной специфичности, устойчивости, зависимости активности от параметров среды,
- долговечны,
- в тысячи и десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов.
- Пример:

Происходящая при температуре 65 °С термоинактивация лактатдегидрогеназы, иммобилизованной в 60 %-м полиакриламидном геле, замедлена в 3600 раз по сравнению с нативным ферментом. Все перечисленное обеспечивает высокую экономичность, эффективность и конкурентоспособность технологий, использующих иммобилизованные ферменты.

Носители для иммобилизации ферментов

По определению Дж. Порату (1974) идеальные материалы, используемые для иммобилизации ферментов, должны обладать следующими основными

свойствами:

- нерастворимостью;
- высокой химической и биологической стойкостью;
- значительной гидрофильностью;
- достаточной проницаемостью, как для ферментов, так и для коферментов, субстратов и продуктов реакции;
- способностью носителя легко активироваться (переходить в реакционноспособную форму).

Анализ показал, что ни один из используемых в настоящее время в качестве носителя материал не отвечает полностью перечисленным требованиям. Однако, существует широкий набор носителей, пригодных для иммобилизации определенных энзимов в конкретных условиях.

В зависимости от природы носители делят на органические и неорганические материалы. **Органические** полимерные носители: природные (белковые. Полисахаридные, липидные) и синтетические (полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные).

Преимущества природных носителей:

- доступность,
- полифункциональность
- гидрофильность.

Недостатки:

- биodeградируемость,
- достаточно высокая стоимость.

Полисахариды для иммобилизации: целлюлоза, декстран, агароза (агар) и их производные.

Для придания химической устойчивости линейные цепи целлюлозы и декстрана поперечно сшивают этихлоргидрином. В полученные сетчатые структуры вводят различные ионогенные группировки. Химическая модификация крахмала сшивающими агентами: формальдегидом, глиоксалем, глутаровым альдегидом.

Получают новый носитель - губчатый крахмал, который обладает повышенной устойчивостью к гликозидазам.

Природные аминосахариды: хитин (без модификации).

Хитин химически стоек и имеет хорошо выраженную пористую структуру.

Белки для иммобилизации: структурные протеины, (кератин, фиброин, коллаген, продукт переработки коллагена - желатин). Белки способны к биodeградации, их используют при конструировании иммобилизованных ферментов для медицинских целей.

Недостатки: высокая иммуногенность.

Синтетические полимерные носители.

- на основе стирола,
- акриловой кислоты,
- поливинилового спирта;
- полиамидные и полиуретановые полимеры.

Достоинства полимерных носителей:

- обладают механической прочностью,
- имеют возможность варьирования величины пор в широких пределах,
- имеют возможность введения различных функциональных групп,
- могут быть произведены в различных физических формах (трубы, волокна, гранулы).

Все эти свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

Носители неорганической природы

- материалы из стекла,
- глины,
- керамики,
- графитовой сажи,
- силикагеля, силохромы,
- оксиды металлов.

Их подвергают химической модификации, покрывают пленкой оксидов алюминия, титана, гафния, циркония или обрабатывают органическими полимерами.

Основное преимущество неорганических носителей

- легкость регенерации,
- можно придать любую форму,
- получать их с любой степенью пористости.

Методы иммобилизации ферментов

Основные принципы методов иммобилизации ферментов:

1. без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем (физические методы иммобилизации);
2. с образованием ковалентной связи между ферментом и носителем (химические методы иммобилизации).

Каждый из этих методов осуществляется разными способами.

Физические методы иммобилизации ферментов реализуются посредством:

- адсорбции на нерастворимом носителе:
- включение в поры поперечносшитого геля,
 - включение в полупроницаемые структуры
 - включение в двухфазные системы.

Механизм адсорбции ферментов на нерастворимых носителях: белковая

молекула удерживается на поверхности носителя за счет электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий и водородных связей (рисунок 4).

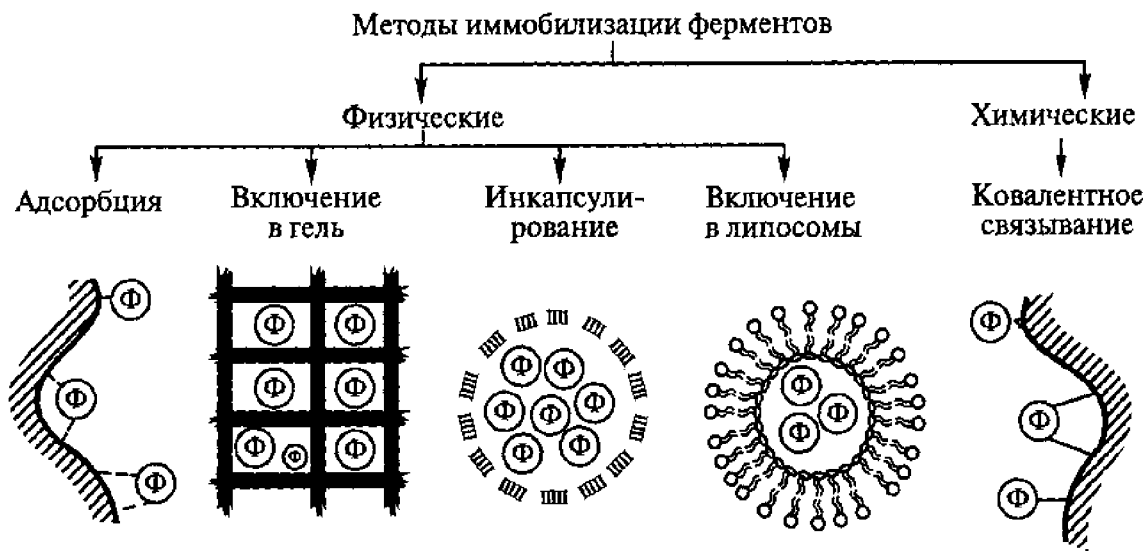


Рисунок 4 - Методы иммобилизации ферментов (ф-молекула фермента)

Более 70 ферментов иммобилизуют с использованием носителей:

- кремнезем,
- активированный уголь,
- графитовая сажа,
- различные глины,
- пористое стекло,
- полисахариды,
- синтетические полимеры,
- оксиды алюминия, титана и других металлов.

Процесс адсорбции ферментов на нерастворимых носителях отличается простотой и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем:

- статистическим способом при перемешивании,
- динамическим способом с использованием колонок.

Недостатки адсорбционного метода:

- невысокая прочность связывания фермента с носителем.
- при изменении условий иммобилизации могут происходить десорбция фермента, его потеря,
- загрязнение продуктов реакции.

Какое решение проблемы?

Повысить прочность связывания фермента удастся путём предварительной его модификации:

- обработкой ионами металлов,
- обработкой полифункциональными агентами - полимерами, белками, гидрофобными соединениями, монослоем липида и пр.

Недостаток:

Модификации подвергается молекула исходного фермента, зачастую это ведет к снижению его активности.

Иммобилизация ферментов путем включения в гель

Это способ иммобилизации ферментов путем включения в трехмерную структуру полимерного геля.

Метод прост и применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но и мультиэнзимных комплексов и даже интактных клеток.

Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами.

1. фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию.

В результате возникает пространственная структура полимерного геля с включенными в его ячейки молекулами фермента.

Используют гели полиакриламида, поливинилового спирта, поливинилпирролидона, силикагеля.

2. фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние.

Используют гели крахмала, агар-агара, каррагинана, агарозы, фосфата кальция.

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает:

- равномерное распределение энзима в объеме носителя,
- большинство гелевых матриц обладают высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью,
- обеспечивают возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру.

Недостаток:

Метод непригоден для иммобилизации ферментов, действующих на водонерастворимые субстраты.

Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры

Сущность метода: разделение водного раствора фермента от водного раствора субстрата с помощью полупроницаемой мембраны, пропускающей низкомолекулярные молекулы субстратов и кофакторов, но задерживающей большие молекулы фермента.

Разработано несколько модификаций этого метода:

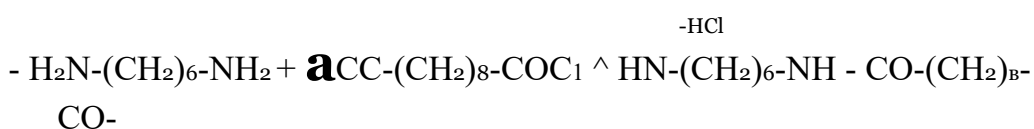
- микрокапсулирование
- включение ферментов в липосомы.

Первый способ Т. Чанга (в 1964 г.)

Водный раствор фермента включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером.

Один из механизмов возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул фермента заключается в реакции межфазной поликонденсации двух соединений, одно из которых растворено в водной, а другое — в органической фазе.

Образование на поверхности раздела фаз микрокапсулы, получаемой путем поликонденсации гексаметилендиамина-1,6 (водная фаза) и галогенангидрида себациновой кислоты (органическая фаза):



Размер получаемых капсул составляет десятки или сотни микрометров, а толщина мембраны - сотые доли микрометра.

Достоинства метода микрокапсулирования:

1. простота, универсальность,
2. возможность многократного использования нативного фермента (фермент может быть отделен от непрореагировавшего субстрата и продуктов реакции процедурой простого фильтрования).
3. методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но и мультиэнзимные комплексы, целые клетки и отдельные фрагменты клеток.

Недостатком метода является:

- невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

Второй метод: включение водных растворов ферментов в липосомы.

Это сферические или ламеллярные системы двойных липидных бислоев.

Впервые данный способ был применен для иммобилизации ферментов Дж.

Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 г.

Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель. Оставшуюся тонкую пленку липидов диспергируют в водном растворе, содержащем фермент.

В процессе диспергирования происходит самосборка бислоевых липидных структур - липосом, содержащих включенный раствор фермента.

Химические методы иммобилизации ферментов

Они основаны на образовании прочной ковалентной связи между ферментом

и носителем. Методы химической иммобилизации классифицируют в зависимости от природы реакционной группы носителя, вступающей во взаимодействие с молекулой фермента.

Иммобилизация ферментов путем образования новых ковалентных связей между ферментом и носителем

Этот способ иммобилизации обеспечивает прочную и необратимую связь фермента с носителем и сопровождается стабилизацией молекулы энзима.

Расположение фермента относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает стерические трудности в осуществлении каталитического процесса. Фермент отделяют от носителя с помощью вставки (сшивки, спейсер), в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, гидразин, сульфурилхлорид, глутаровый диальдегид и др.). Структура иммобилизованного фермента включает: носитель, вставку и фермент, соединенные между собой ковалентными связями (рисунок 5).

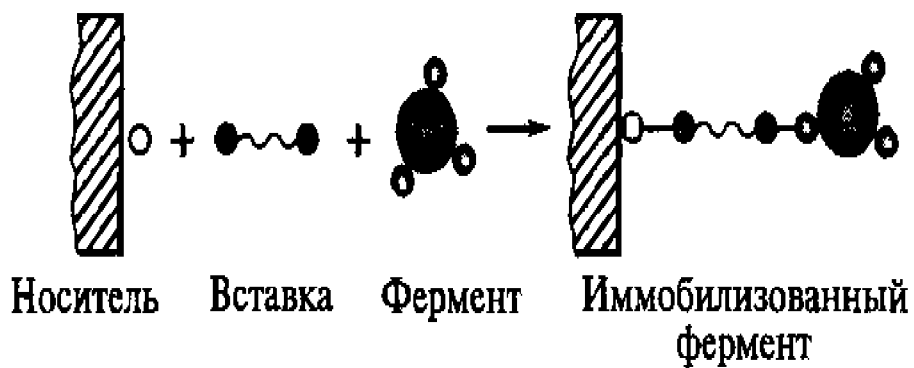
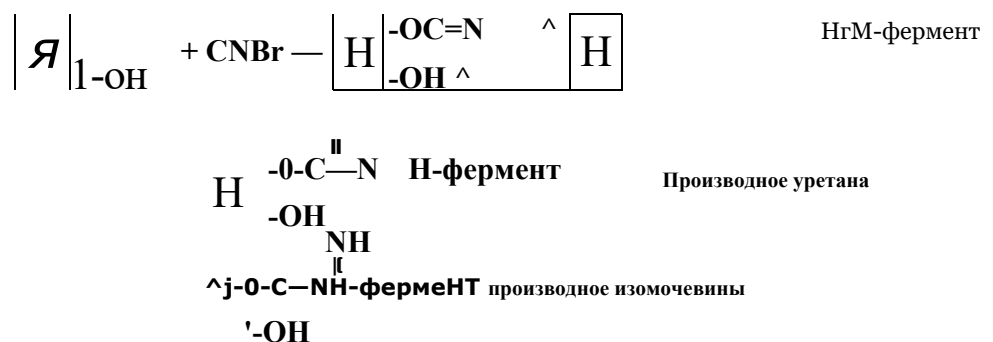


Рисунок 5 - Схема иммобилизации фермента химическим методом

Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих гидроксогруппами.

Наиболее распространенным методом является бромциановый метод (предложен Р. Аксеном, Дж. Поратом и С.Эрнбаком в 1967 г.).



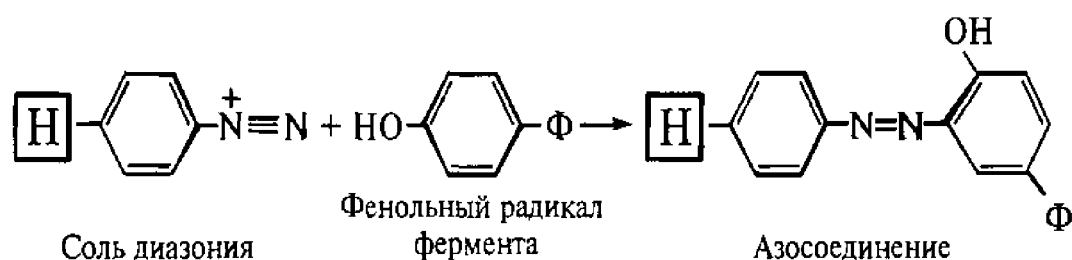
При обработке носителя бромцианом возникают реакционноспособные

цианаты и имидокарбонаты, которые при взаимодействии с нуклеофильными аминогруппами фермента образуют производные изомочевины и уретанов.

Иммобилизация ферментов на носителях, обладающих аминогруппами

Первичные аминогруппы носителя, связанные с ароматическим кольцом, предварительно превращают в соли диазония, которые подвергают разнообразным реакциям сочетания.

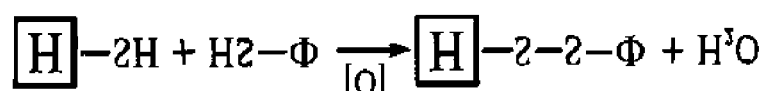
В реакции сочетания вступают фенольные, имидазольные, аминные, гуанидиновые, тиольные группы белков. В щелочной среде фенольные радикалы тирозина образуют прочные азосоединения, в составе которых белок связан с носителями:



Иммобилизация фермента с образованием азосоединения.

Иммобилизация на носителях, обладающих сульфгидрильными группами

Сульфгидрильные группы носителя и фермента легко окисляются с образованием дисульфидных связей под действием кислорода воздуха. Происходит реакция:



Эти методы незаменимы в практике проведения научных и лабораторных исследований для создания энзимов с контролируруемыми свойствами.

Иммобилизация путем химического присоединения биокатализатора к носителю высоко эффективна, потому что фермент прочно связан с носителем.

Химическая иммобилизация ферментов имеет недостатки, поэтому все методы ковалентной иммобилизации ферментов малодоступны для промышленного использования, что связано:

- со сложностью проведения иммобилизации;
- дороговизной применения.

Лекция № 5

Применение ферментов в промышленности и медицине

План

1. Задачи использования ферментов в пищевой промышленности.
2. Ферменты в медицине: проблемы и перспективы.
3. Энзимопатология.
4. Энзимодиагностика.
5. Энзимотерапия.

Цели использования ферментов в современных пищевых производствах: улучшение качества и снижение себестоимости пищевых продуктов.

История пищевых технологий насчитывает тысячелетия: биологические агенты в виде смешанных культур и ферментов, полученных автолизом клеток. Доля биокатализа в пищевых технологиях в настоящее время наиболее высокая (до 80-85 %). Причина: наиболее мягкие условия протекания технологических процессов и малой доступностью протекания процессов в нефтехимии и фармхимии для ферментов.

Используют иммобилизованные ферменты и свободные.

Традиционное применение ферментов в пищевой промышленности создало предпосылки для совершенствования их в других отраслях.

Использование ферментов в бродильных производствах

Основные области применения ферментов для получения продуктов:

- в пивоварении и виноделии.
- в хлебопечении.
- в спиртовой промышленности.

Следует отметить, что масштабное использование иммобилизованных ферментов в технологиях:

1. Производства фруктозы из глюкозо-фруктозных и глюкозных сиропов.
2. Получения оптических активных L-производных аминокислот из их рацемических смесей.
3. Синтеза L-аспарагиновой кислоты из фумаровой.
4. Синтеза L-яблочной кислоты из фумаровой.
5. Производстве диетического безлактозного молока.
6. Получении сахаров из молочной сыворотки.
7. Получении 6-аминопенициллановой кислоты из пенициллина для создания полусинтетических фармпрепаратов.

Все остальные иммобилизованные ферментные препараты используют мелкомасштабно.

Ферменты в медицине

Функции ферментов в организме:

1. Ферменты сохраняют постоянство внутренней среды (гомеостаз); с высокой эффективностью,

2. Обладают экономичностью материалов,
3. Обладают рациональностью и ювелирной точностью результатов в микропространстве клетки.
4. Выполняют важные защитные функции, обезвреживая как экзогенные (поступающие из внешней среды), так и эндогенные (образующиеся в самом организме) токсические вещества;
5. Участвуют в реакциях окисления, восстановления и распада на продукты, теряющие свои токсические свойства.

Эта область исследования - ксенобиохимия.

Медицинская энзимология - одно из перспективных направлений исследования ферментов

Современная биология и медицина - язык энзимологии - возможности применения ферментов в медицине теоретически безграничны.

Три основных направления исследований в области медицинской энзимологии:

- энзимопатология
- энзимодиагностика
- энзимотерапия.

В каждой из этих областей медицинской энзимологии имеются собственные цели и конкретные задачи. Существуют и особые методологические подходы и методические приемы.

Энзимопатология

Это направление по выявлению патологии: отсутствие синтеза или активности ферментов на генетическом уровне.

Пример болезни - отсутствие синтеза в печени специфического фермента является фенилпировиноградная олигофрения - наследственное заболевание, приводящее в раннем детстве к гибели ребенка или к развитию тяжелой умственной отсталости.

Молекулярный дефект болезни заключается в блокировании превращения незаменимой аминокислоты фенилаланина (Фен) в тирозин (Тир).

Фермент, катализирующий реакцию, - Фен-4-гидроксилаза, или Фен-4-монооксигеназа, - не синтезируется в клетках печени, единственном органе, где он в норме.

Следствие - нарушение обмена фенилаланина - развитие тяжелого наследственного заболевания, обусловленного избыточным накоплением самого фенилаланина и продуктов его побочного пути обмена - фенилпировиноградной кислоты - в организме.

Установление диагноза: химическим методом выявляют фенилаланин или фенилпировиноградную кислоту на пеленках детей.

Галактоземия - непереносимость молочного сахара, связано с отсутствием синтеза в клетках печени фермента, катализирующего превращение галактозы в глюкозу.

Следствие - накопление галактозы в тканях и развитие катаракты в раннем детстве, поражения тканей печени и мозга, приводящие к гибели ребенка;

Лечение: исключение из диеты молочного сахара.

Энзимопатология решает и проблемы патогенеза соматических болезней, установление механизмов развития наиболее распространенных болезней человека. В задачу этих проблем входит выяснение молекулярных основ, злокачественного роста, атеросклероза или ревматоидных артритов.

Направление дальнейшего использования ферментов в энзимопатологии: использование ферментных систем или отдельных ферментов, в оценке нарушения регуляции активности или синтеза, формированию патологического процесса.

Перспективы развития энзимопатологии:

Ферменты могут быть использованы в качестве самых тонких и избирательных инструментов для направленного воздействия на патологический процесс. Из более чем двух тысяч наследственных болезней человека молекулярный механизм развития выяснен только у двух - трех десятков. Чаще всего: развитие болезни непосредственно связано с наследственной недостаточностью или полным отсутствием синтеза одного-единственного фермента в организме больного.

Энзимодиагностика

Эта область энзимологии занимается разработкой ферментных тестов, основанных на определении активности (уровня) ферментов и изоферментов в биологических жидкостях организма больного (сыворотка крови, желудочный или дуоденальный сок, спинномозговая жидкость, моча и др.).

Исследования развиваются в двух направлениях:

1. по пути поиска органотропных или тканетропных ферментов, специфичных для определенного органа, группы органов или целостного организма человека;
2. по пути совершенствования уже описанных в литературе методов определения активности ферментов в биосредах.

Задача: постановка правильного диагноза заболевания, выяснение степени тяжести болезни, в определении правильности избранного метода лечения.

В настоящее время разработаны:

- количественные методы анализа многих распространенных ферментов, выявляемых в биологических жидкостях при поражении разных органов.
- для каждого из ферментов определены контрольные величины (уровни) активности и пределы колебания в норме как в сыворотке крови, так и в самом органе.

Пример 1:

Оценка активности двух трансаминаз: аспартатаминотрансферазы или глутамат-оксалоацетат-трансаминаза - GOT и аланинаминотрансферазы (глутамат-пируват-трансаминазы - GPT). В норме: величины активности в сыворотке крови между 5 - 40 международными единицами.

При ишемической болезни сердца активность обеих трансаминаз в сыворотке крови больного достоверно повышается. При наступлении инфаркта миокарда уже через 20 минут активность обеих трансаминаз в сыворотке крови резко, в десятки и сотни раз, превышает уровни контрольных величин в крови здорового человека.

Пример 2:

Фермент лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует обратимое превращение пирувиноградной кислоты в молочную кислоту по уравнению:



ЛДГ - ключевой фермент анаэробного обмена углеводов во всех живых организмах, определяя скорость образования энергии в виде АТФ.

Два типа ЛДГ: сердечный тип, обозначаемый Н-тип (от англ. heart), и мышечный тип, обозначаемый М-тип (от англ. muscle);

Каждый из них состоит из четырех субъединиц, обозначаемых соответственно цифрами. Если в молекуле ЛДГ все четыре субъединицы представлены Н-типом, ее обозначают ЛДГ Н₄; если все субъединицы составлены из М-типа, тогда фермент обозначают М₄.

В клетках всегда содержатся оба типа молекул Н и М, суммарно четыре субъединицы строятся как из Н-, так и из М-типов.

Различают 5 изоферментов ЛДГ, составленных из типов Н и М:

Н₄ (1-й тип), Н₃М₁ (2-й тип), Н₂М₂ (3-й тип), Н₁М₃ (4-й тип), М₄ (5-й тип) ЛДГ.

Патологии, выявляющиеся с помощью ЛДГ:

- органическое поражение сердечной мышцы,
- инфаркт миокарда

в сыворотке крови: повышается уровень общей лактатдегидрогеназы, повышается количество изоферментов 1 и 2, соответственно Н₄ и Н₃М₁.

Патологии, выявляющиеся с помощью ЛДГ:

- скелетной мускулатуры,
- воспалительные процессы печени (гепатиты),
- вирусные поражения ткани печени,
- отравлении ядами

Изоферментный спектр повышается к уровню 5 и 4 изоферментов ЛДГ при почти неизменном уровне 1 и 2 изоферментов).

Пример 3

Фермент креатинфосфокиназа (КФК) - диагностическая оценка при инфаркте миокарда. Катализирует биосинтез креатинфосфата из креатина и АТФ.

Креатинфосфат играет наряду с АТФ роль в биоэнергетике сердечной мышцы и всего организма. Молекула КФК также состоит из двух типов субъединиц: из М-типа (то есть мышечный тип, от англ. muscle) и В-типа (то есть мозговой; от англ. brain);

Выделены и охарактеризованы три изофермента КФК, которые обозначаются латинскими буквами: ММ-изофермент (мышечный тип), преимущественно характерный для поперечно-полосатой мускулатуры, ВВ-изофермент (мозговой тип, преимущественно содержится в ткани мозга) и смешанный тип, обозначаемый МВ-изоферментом, который содержится только в сердечной мышце.

Учитывая органотропность изоферментов КФК при органических или функциональных поражениях этих тканей: в сыворотке крови больного появляются в норме отсутствующие изоферменты КФК, они обнаруживаются

при электрофорезе.

Широко используют в клинической практике, определение трансаминазы в сыворотке крови - фермента, открытого только в ткани почек и поджелудочной железы; или определяют активность фермента гистидазы, обнаруженного только в клетках печени и эпидермиса кожи.

При органических поражениях этих органов, воспалительных процессах, травмах, хирургических вмешательствах в сыворотке крови больных появляются указанные ферменты, в норме отсутствующие в сыворотке.

Энзимотерапия

Это применение ферментов в лечении заболеваний. Использование ферментов в качестве терапевтических средств имеет много ограничений вследствие их высокой иммуногениости.

Энзимотерапию активно развивают в следующих направлениях:

- заместительная терапия - использование ферментов в случае их недостаточности;
- элементы комплексной терапии - применение ферментов в сочетании с другой терапией.

Широкое направление получило использование иммобилизованных ферментов в энзимотерапии.

Основные методы:

- создание лекарственных препаратов пролонгированного действия со сниженной токсичностью и аллергенностью;
- направленный транспорт лекарств в организме.

Заместительная энзимотерапия

В этом методе используют протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, субтилизин, коллагеназа), иммобилизованные на волокнистых материалах (целлюлоза, полиамидные волокна, декстран и др.), их применяют для эффективного лечения ран, язв, ожогов, абсцессов.

Применяют белковые ингибиторы - для лечения эмфиземы и панкреатитов.

Направленный транспорт лекарственных веществ

Ферменты, разрушающие некоторые незаменимые аминокислоты (аспарагиназа), используют для борьбы со злокачественным ростом опухолей. В этом направлении используют инкапсулированные ферменты типа искусственной клетки.

Микрокапсулы, стенки которых представлены оболочкой эритроцита («тень эритроцита»), а их содержимое заполнено ферментом аспарагиназой, переносятся кровотоком к зонам скопления аспарагина и поэтому применяются для лечения аспарагинзависимых опухолей, в частности саркомы.

Другой пример, *проведение диализа почек*. Колонки, заполненные микрокапсулами с ферментом, используют для диализа в аппарате «искусственная почка», которая работает в 100 раз эффективнее обычного аппарата.

В качестве дополнительных терапевтических средств ферменты используют

- протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин) для обработки гнойных ран с целью расщепления белков погибших клеток,
- для удаления сгустков крови или вязких секретов при воспалительных заболеваниях дыхательных путей.

Ферменты применяются в виде инъекций или вводятся в состав мазей.

Ферментные препараты: рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза применяют как противовирусные препараты при лечении аденовирусных конъюнктивитов, герпетических кератитов.

Фермент гиалуронидаза (лидазу), катализирующий расщепление гиалуроновой кислоты - применяют для рассасывания контрактур рубцов после ожогов и операций.

Однако, потенциальные возможности использования ферментов в медицине еще не использованы в большей степени, в сравнении с объемами применения в настоящее время.

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН
ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ

Сертификат: 4E4C8F6C0D0FDC62FAAF7108E6CEFD6A
Владелец: Глыбочко Петр Витальевич
Действителен: с 19.05.2025 до 12.08.2026