

ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив	5
Список сокращений и условных обозначений	6
Введение	7
Глава 1. Биотехнология как одно из основных направлений научно-технического прогресса	11
Контрольные вопросы	20
Глава 2. Биообъекты, применяемые в биотехнологическом производстве	21
Контрольные вопросы	32
Глава 3. Совершенствование биообъектов	33
Контрольные вопросы	54
Глава 4. Молекулярные механизмы внутриклеточной регуляции	55
Контрольные вопросы	64
Глава 5. Биотехнологический процесс	66
Контрольные вопросы	119
Глава 6. Инженерная энзимология	122
Контрольные вопросы	138
Глава 7. Биотехнология ферментов	140
Контрольные вопросы	153
Глава 8. Технология рекомбинантных белков	154
Контрольные вопросы	185
Глава 9. Иммунобиотехнология	186
Контрольные вопросы	209
Глава 10. Биотехнология аминокислот	210
Контрольные вопросы	232
Глава 11. Биотехнологическое производство витаминов и коферментов	233
Контрольные вопросы	259
Глава 12. Биотехнология гормональных препаратов	260
Контрольные вопросы	267
Глава 13. Биотехнология антибиотиков	268
Контрольные вопросы	284

Глава 14. Технология производства бактериофагов	285
Контрольные вопросы	290
Глава 15. Производство препаратов нормофлоры	291
Контрольные вопросы	301
Глава 16. Фитобиотехнология	302
Контрольные вопросы	317
Глава 17. Применение хроматографических методов в биотехнологии . . .	319
Контрольные вопросы	326
Глава 18. Единая система GLP, GCP и GMP при создании лекарственных препаратов. Роль биоскрининга в разработке новых лекарственных средств	327
Контрольные вопросы	349
Глава 19. Биотехнология и пищевая промышленность	351
Контрольные вопросы	355
Глава 20. Биотехнология и экология	356
Контрольные вопросы	366
Список литературы	367
Приложение. Словарь терминов и определений	369
Предметный указатель	379

Глава 6

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Инженерная энзимология — это одно из направлений в биотехнологии, которое основано на использовании ферментов (или ферментных систем), в изолированном виде или в структуре живых клеток, в качестве катализаторов с целью получения определенных целевых продуктов. Внедрение в производство таких биотехнологических продуктов, как ферменты, резко повысило его возможности и качество. Однако существует проблема нестабильности ферментов; изолированные ферменты быстро теряют активность из-за незащищенности системами клеточного гомеостаза организма, в который они внедрены. Проблема нестабильности решена путем создания так называемых «промышленных биокатализаторов» — иммобилизованных ферментов. В данном случае под иммобилизацией подразумевают связывание фермента с нерастворимым носителем при сохранении каталитической активности фермента.

Иммобилизованные ферменты обладают рядом преимуществ:

- ▶ являясь гетерогенными катализаторами, с легкостью отделяются от реакционной среды, могут использоваться неоднократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса;
- ▶ процесс иммобилизации ведет к изменению свойств фермента, что позволяет регулировать субстратную специфичность, устойчивость, зависимость активности от условий среды;
- ▶ иммобилизованные ферменты долговечны и во много раз стабильнее свободных энзимов.

Все перечисленные свойства обеспечивают высокую эффективность, экономичность и конкурентоспособность технологий, которые используют иммобилизованные ферменты.

Носители для иммобилизации ферментов

Материалы, используемые в процессе иммобилизации ферментов, должны обладать следующими характеристиками: высокой биологической

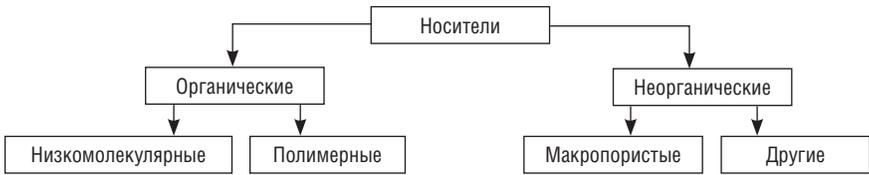


Рис. 6.1. Классификация носителей для иммобилизации ферментов

и химической стойкостью, нерастворимостью, гидрофильностью, проницаемостью для ферментов и коферментов, субстратов и продуктов реакции, быстрой активацией носителя (переход в реакционно-способную форму).

Носители для процесса иммобилизации ферментов делятся на органические и неорганические (рис. 6.1).

Органические полимерные носители. Все органические полимерные носители, которые существуют на данный момент, можно разделить на синтетические и природные. Следует отметить, что синтетические и природные носители дополнительно подразделяют в зависимости от их строения.

Среди природных полимеров выделяют липидные, белковые и полисахаридные носители, а среди синтетических — полиамидные, полиметиленовые и полиэфирные. Природные носители обладают рядом преимуществ, а именно полифункциональностью, доступностью и гидрофильностью, но наряду с этим имеют и недостатки — биодеградируемость и высокую стоимость.

Из полисахаридов в процессе иммобилизации часто используют декстран, целлюлозу, агарозу и их производные. Для придания устойчивости химической структуре линейные цепи декстрана и целлюлозы поперечно сшивают эпихлоргидрином. Сетчатые структуры, полученные путем сшивания, используют для введения различных ионогенных группировок. Химической модификацией крахмала сшивающими агентами (глутаровый альдегид, формальдегид, глиоксаль) синтезирован новый носитель — губчатый крахмал, который обладает высокой устойчивостью к гликозидазам.

Из природных аминсахаридов в качестве носителей в процессе иммобилизации применяют хитин, накапливающийся в значительных количествах в виде отходов в результате промышленной переработки представителей ракообразных (креветки, крабы). Хитин обладает химической стойкостью и имеет ярко выраженную пористую структуру.

В качестве носителей практическое применение среди белков нашли структурные протеины: кератин, коллаген, желатин (продукт переработки коллагена). Перечисленные белки широко распространены в природе, что объясняет их доступность в значительных количествах, дешевизну и наличие большого числа функциональных групп для связывания фермента. Следует отметить способность белков к биодegradации, что необходимо при конструировании иммобилизованных ферментов в медицинских целях. К недостаткам белков как носителей относят их высокую иммуногенность.

Наряду с природными носителями в инженерной энзимологии широко используются синтетические полимерные носители благодаря их многообразию и доступности. К синтетическим носителям относятся полимеры на основе стирола, поливинилового спирта, акриловой кислоты; полиуретановые и полиамидные полимеры. Многие синтетические полимерные носители механически прочны, но при образовании обладают способностью обеспечивать варьирование в широких пределах величины пор и тем самым дают возможность поступления различным функциональным группам. Часть синтетических полимеров может быть произведена в различных формах: гранулы, волокна, трубы. Все перечисленные свойства полезны для разных способов иммобилизации ферментов.

Носители неорганической природы. В качестве неорганических носителей чаще всего применяют материалы из глины, стекла, керамики, силикагеля, графитовой сажи; кроме этого, могут использоваться силохромы и оксиды металлов. Особенностью неорганических носителей является то, что они могут быть подвержены химической модификации, с этой целью они покрываются пленкой оксидов алюминия, циркония, титана или обрабатываются органическими полимерами. Следует отметить, что основным преимуществом неорганических носителей является легкость регенерации; кроме этого, подобно синтетическим полимерам, они могут быть произведены в любой форме и получить их можно с разной степенью пористости.

Таким образом, к настоящему моменту создано значительное количество разных носителей для иммобилизации ферментов. Однако для каждого индивидуального фермента, который используется в определенном технологическом процессе, должны подбираться приемлемые варианты как носителя, так и способов и условий иммобилизации.

Методы иммобилизации ферментов

Методы иммобилизации ферментов разделяют на две группы: физические методы — без образования ковалентных связей между энзимом и носителем; и химические методы иммобилизации — с возникновением ковалентной связи между ними (рис. 6.2).

Реализация **физических методов иммобилизации ферментов** осуществляется посредством адсорбции энзима на нерастворимом носителе путем включения его в поры поперечно-сшитого геля, в полупроницаемые структуры или двухфазные системы.

Адсорбция ферментов на нерастворимых носителях. При адсорбционной иммобилизации молекула белка удерживается на поверхности носителя за счет гидрофобных, электростатических, дисперсионных взаимодействий и водородных связей. Для определения эффективности адсорбции белковой молекулы на носителе необходимо учитывать удельную поверхность (плотность центров сорбции) и пористость носителя. Следует отметить, что процесс адсорбции ферментов на носителях, относящихся к нерастворимым, крайне прост и достигается при контакте водного раствора энзима с носителем. При таком варианте иммобилизации активность фермента сохраняется практически на уровне 100%.

Данный метод имеет недостаток, проявляющийся невысокой прочностью связывания энзима с носителем. При изменении условий

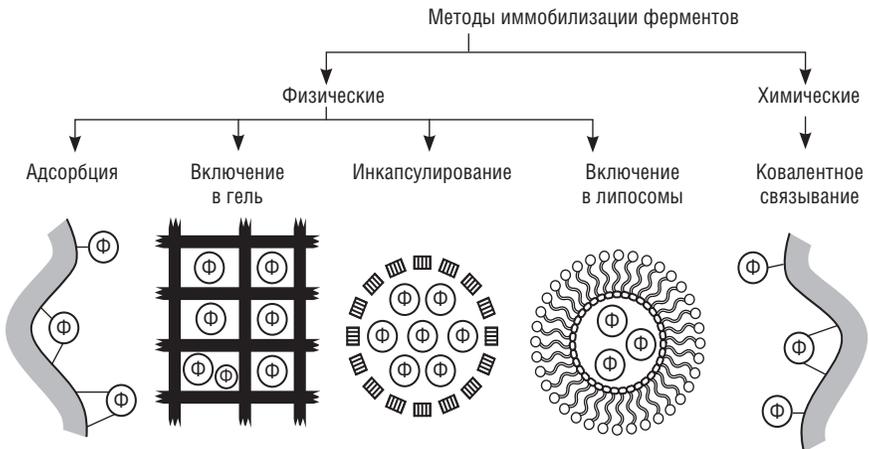


Рис. 6.2. Методы иммобилизации ферментов: Ф — молекула фермента

процесса иммобилизации может происходить десорбция фермента и как следствие, потеря его активности. С целью повышения прочности связывания фермента с носителем предварительно его подвергают модификации, то есть обработке ионами металлов, полифункциональными агентами — полимерами, гидрофобными соединениями, белками, монослоем липида и др. Иногда, наоборот, молекула исходного фермента подвергается модификации, однако в большинстве случаев это приводит к снижению его активности.

Иммобилизация ферментов путем включения в гель. Данный способ иммобилизации широко распространен благодаря своей уникальности и простоте. Метод применяют для иммобилизации индивидуальных ферментов, мультиэнзимных комплексов и интактных клеток. Иммобилизация ферментов путем включения в гель осуществляется в основном двумя способами. В первом случае в водный раствор мономера вводят энзим, а затем осуществляют полимеризацию, результатом которой является образование пространственной структуры полимерного геля, в ячейки которого включены молекулы фермента. Во втором случае энзим вносят в уже готовый полимерный раствор, который впоследствии переводят в состояние геля. Для первого варианта используют гели полиакриламида, поливинилпирролидона, поливинилового спирта, силикагеля, для второго — гели крахмала, каррагинана, агар-агара, фосфата кальция, агарозы.

Иммобилизация энзимов путем включения в гель обеспечивает равномерное распределение фермента в объеме носителя. Большинство из представленных гелей обладает высокой химической, механической, тепловой и биологической стойкостью, что обеспечивает возможность многократного использования ферментов. Следует отметить, что данный метод не подходит для иммобилизации энзимов, которые действуют на субстраты, нерастворимые в воде.

Иммобилизация ферментов в полупроницаемые структуры. Отделение водного раствора фермента от водного раствора субстрата с использованием полупроницаемой мембраны, которая пропускает низкомолекулярные молекулы субстратов и кофакторов, задерживая большие молекулы энзима, является основой иммобилизации ферментов в полупроницаемые структуры. Большой интерес представляют микрокапсулирование и включение ферментов в липосомы.

Процесс микрокапсулирования заключается во включении водного раствора фермента в замкнутую микрокапсулу, стенки которой образованы полупроницаемым полимером. Один из механизмов обра-

зования мембраны на поверхности водных микрокапсул энзима основан на реакции межфазной поликонденсации соединений: одно соединение растворено в водной, а другое — в органической фазе. К достоинствам данного метода можно отнести простоту, универсальность и возможность многократного использования нативного энзима. Важно подчеркнуть, что с помощью метода микрокапсулирования могут быть иммобилизованы индивидуальные ферменты, мультиэнзимные комплексы, целые клетки и даже отдельные фрагменты клеток. Недостатком метода является невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять трансформацию высокомолекулярных субстратов.

Близким к инкапсулированию методом иммобилизации считают включение водных растворов энзимов в липосомы, которые представляют собой сферические системы двойных липидных слоев. Органический растворитель подвергается упариванию с целью получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина). Оставшуюся тонкую пленку липидов диспергируют в водном растворе, в котором содержится энзим. В процессе диспергирования происходит самосборка бислойных липидных структур липосом, в которых включен раствор фермента.

Ферменты, которые получены путем включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и научных целях, так как значительная часть энзимов в клетке расположена в составе липидного матрикса биологических мембран, поэтому изучение таких структур, как липосомы, имеет большое практическое значение для понимания процессов жизнедеятельности клетки.

Химические методы иммобилизации ферментов. Иммобилизация ферментов путем возникновения ковалентных связей между энзимом и носителем обеспечивает необратимую и прочную связь фермента с носителем и в большинстве случаев сопровождается стабилизацией фермента (рис. 6.3). Следует отметить, что локализация энзима относительно носителя на расстоянии одной ковалентной связи создает стерические трудности в осуществлении каталитического процесса. В процессе отделения фермента от носителя используется вставка (спейсер, сшивка), в роли которой чаще всего выступают бифункциональные и полифункциональные агенты (бромциан, глутаровый диальдегид, гидразин и др.). В этом случае структура фермента, подвергшегося иммобилизации, включает носитель, вставку и фермент, которые между собой соединены ковалентными связями. Важным для

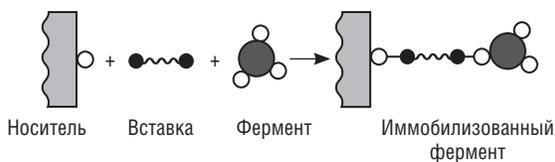


Рис. 6.3. Схема иммобилизации фермента химическим методом

процесса иммобилизации является обязательное участие функциональных групп, несущественных для каталитической функции фермента.

Следует отметить, что иммобилизация, осуществляемая путем химического присоединения энзима к носителю, отличается высокой эффективностью и прочностью, однако этот метод все еще малодоступен в связи с высокой стоимостью и сложностью процесса.

Использование иммобилизованных ферментов в производстве

На настоящий момент в мировой практике созданы следующие крупномасштабные производства, в которых используют иммобилизованные ферменты и клетки:

- 1) получение глюкозо-фруктозных сиропов;
- 2) получение оптически активных L-аминокислот из рацемических смесей;
- 3) синтез L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония;
- 4) синтез L-аланина из L-аспарагиновой кислоты;
- 5) синтез L-яблочной кислоты из фумаровой кислоты;
- 6) получение безлактозного молока;
- 7) получение сахаров из молочной сыворотки;
- 8) получение 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК).

Получение глюкозо-фруктозных сиропов. Фруктоза (фруктовый, медовый или плодовый сахар) является важнейшим в физиологическом и технологическом отношении природным моносахаридом. Фруктоза, трансформируясь в глюкозу в печени и кишечнике млекопитающих, включается в метаболизм клетки, а именно пластический и энергетический обмен. Фруктоза является низкокалорийным пищевым продуктом, несмотря на то что слаще глюкозы в 2,5 раза, а тростникового сахара (сахарозы) — в 1,7 раза. Следует отметить, что обмен фруктозы в отличие от глюкозы не находится под контролем инсулина, поэтому

фруктозный сахар может входить в рацион больного диабетом. Кроме этого, фруктоза не способствует развитию кариеса зубов. В комплексе с глюкозой фруктоза не кристаллизуется, поэтому широко применяется в производстве кондитерских изделий.

Несмотря на все преимущества применения фруктозы, впервые промышленная установка для трансформации глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованного фермента глюкоизомеразы была запущена лишь в 1973 г. (США). Глюкоза является исходным сырьем для этого процесса, ее получают в присутствии минеральных кислот путем гидролиза кукурузного или картофельного крахмала. Для получения глюкозоизомеразы как промышленного биокатализатора сорбцию проводят на пористых неорганических носителях или ионообменных смолах. Применяют иммобилизованные клетки разного происхождения (*Streptomyces phaeochromogenes*, *Aspergillus niger* и др.). В результате катализа образуется глюкозо-фруктозный сироп, который содержит чуть более 50% глюкозы, около 45% фруктозы и минимальное количество олигосахаридов. Полученную глюкозо-фруктозную смесь широко используют в производстве тонизирующих напитков, хлеба, кондитерских изделий, мороженого, консервированных фруктов и др. Экономически производство глюкозо-фруктозных сиропов с использованием иммобилизованного фермента глюкоизомеразы в 1,5 раза выгоднее получения из сахарной свеклы сахарозы по традиционной технологии.

Биотрансформация других углеводов

Важную роль наряду с процессами изомеризации играют процессы микробиологической окислительно-восстановительной трансформации углеводов. Окислительная трансформация углеводов представляет собой окисление полиолов, например, сорбита в сорбозу или маннита во фруктозу. Все полиолы (полиспирты) подвержены окислению. Полиспирты обладают двумя вторичными гидроксилами в цис-положении, прилежащими к терминальной первичной спиртовой группе, причем следует отметить, что окисляется атом углерода, смежный с терминальным. Процесс окисления полиолов получил название кетогенной ферментации.

В производстве промышленного масштаба окисление полиолов осуществляется двумя способами: трансформация глицерина в диоксиацетон и трансформация D-сорбита в L-сорбозу (одна из стадий синтеза аскорбиновой кислоты).

В промышленном производстве диоксиацетона применяют *Acetobacter suboxydans*. Диоксиацетон (1,3-дигидрокси-2-пропанон) широко используют для обработки изделий, состоящих из целлюлозных волокон, с целью придания эксплуатационных свойств (устойчивости к стирке, несминаемости и др.); сложные эфиры диоксиацетона относятся к репеллентам; из аминокислот и диоксиацетона синтезируют косметические и пищевые красители; производные диоксиацетона применяют как эмульгаторы, консерванты, фунгициды, пластификаторы.

В лабораторных условиях окисление D-сорбита в L-сорбозу осуществляют с помощью бактерий, которые иммобилизованы включением в каррагинановый гель.

Восстановительная трансформация углеводов основана на превращении кетоз или альдоз в полиолы. В промышленном пищевом производстве важным является процесс получения из ксилозы ксилита, поскольку его используют в качестве заменителя сахара.

Еще к одному классу реакций с участием углеводов, который приводит к получению полезных продуктов, относятся гидролитические реакции, особую роль среди которых играют гидролиз сахарозы, лактозы, раффинозы и целлобиозы.

Примерами процессов в биотехнологии с использованием иммобилизованных биокатализаторов являются гидролиз лактозы, в результате которого образуется глюкоза и галактоза, а также гидролиз сахарозы с получением фруктозы и глюкозы.

Следует отметить, что технологической основой гидролиза лактозы является применение иммобилизованных дрожжевых или грибных ферментов β -лактозидаз. Тем не менее уже имеются промышленные установки для гидролиза лактозы с помощью иммобилизованных клеток, которые обладают β -галактозидазной активностью. Для этого процесса используют клетки *Caldariella acidophila*, *Bacillus species*.

Раффиноза, или галактозилсахароза, является наиболее распространенным олигосахаридом после сахарозы, который встречается в свободном виде в сахарной свекле и других растениях (при ферментативном гидролизе раффинозы образуется сахароза и галактоза). В процессе получения галактозилсахарозы используют иммобилизованный биокатализатор, который представляет собой клетки *Vortierella vinacea*, сшитые глутаровым альдегидом. Клетки *Vortierella vinacea* обладают α -галактозидазной активностью.

Гидролиз целлобиозы осуществляется с участием иммобилизованных в альгинате микроорганизмов с целлобиазной активностью.

Данный биокатализатор может применяться, например, в процессе ферментативного осахаривания целлюлозы в условиях содержания целлобиозы в гидролизате.

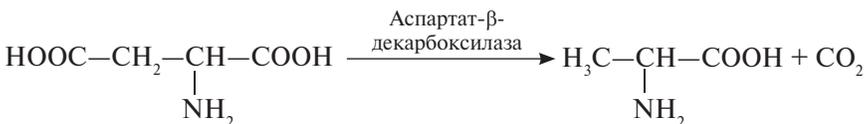
Получение L-аминокислот из рацемических смесей

Для синтеза аминокислот, в том числе незаменимых, используют ряд химических реакций, в результате которых с одинаковой скоростью образуются как D-, так и L-стереоизомеры, то есть образуется рацемическая смесь. Следует отметить, что в живых клетках метаболизируются лишь аминокислоты L-формы. В промышленном масштабе первым процессом, в котором применялись иммобилизованные энзимы, явилось разделение рацемических смесей на оптические изомеры, в частности с помощью аминоксилазы, иммобилизованной на целлюлозе. Исходными соединениями в данном превращении являются N-ацилированные производные D,L-аминокислот, которые получают с помощью химического синтеза. Аминоксилаза, вследствие своей стереоспецифичности, гидролизует лишь N-ацил-L-стереоизомер путем отщепления от него ацильного радикала, в результате чего образуется L-аминокислота. L-аминокислоту легко можно отделить от антипода за счет ее резко возросшей растворимости. При нагревании оставшаяся N-ацил-D-аминокислота рацемизируется, то есть трансформируется в исходную смесь, которая вновь подвергается воздействию энзима.

Для получения различных аминокислот, например L-валина, L-метионина, L-фенилаланина и L-триптофана, используется одна и та же установка с иммобилизованным энзимом, так как аминоксилаза обладает строгой специфичностью к структуре только ацильной части субстрата.

Аспарагиновую кислоту широко применяют в качестве пищевой добавки (подкислитель и подсластитель). В промышленном производстве L-аспарагиновой кислоты из получаемого fumarата аммония химическим путем используют иммобилизованные в полиакриламидном геле клетки *E. coli*, содержащие аспаратаммиаклиазу.

В настоящее время ферментативное декарбоксилирование L-аспарагиновой кислоты является основным промышленным способом получения L-аланина:



Аспаргат-β-декарбоксилаза катализирует трансформацию L-аспартата в L-аланин ряда микроорганизмов (*Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter pestifier*, *Pseudomonas dacunha*), иммобилизованных в каррагинане или полиакриламидном геле. Использование фумарата аммония в качестве сырья способствует оптимизации процесса: реализация процесса получения L-аланина осуществляется в двух реакционных колонках, которые расположены последовательно, и становится двухстадийным. На первой стадии фумарат аммония трансформируется в L-аспарагиновую кислоту, которая, не выделяясь из реакционной среды, во второй стадии претерпевает β-декарбоксилирование с образованием аланина.

L-изолейцин синтезируют из треонина и глюкозы с использованием иммобилизованных клеток *Serratia marcescens*, синтез L-глутаминовой кислоты из L-глюкозы с помощью иммобилизованных клеток *Corynebacterium glutamicum*; L-триптофан — из индола; L-орнитин — из L-аргинина.

Таким образом, масштабное производство аминокислот стало возможным благодаря разработке технологических процессов получения промышленных биокатализаторов.

Получение органических кислот

Органические кислоты, а также их соли широко используются в фармацевтической, пищевой, текстильной, химической, кожевенной, металлургической и других отраслях промышленности. Производство кислот можно осуществлять химическим и микробиологическим путем, при этом для медико-фармацевтической и пищевой промышленности более предпочтителен второй путь.

Органические кислоты, углеводы, спирты являются источником углерода для микроорганизмов-продуцентов. Рост микробных культур прекращается в результате недостатка витаминов или минеральных компонентов. Для получения органических кислот ограничивают рост культур с помощью источника азота, используя при этом избыточное количество источника углерода и энергии. После исчерпывания дефицитного компонента синтез кислот в стационарной фазе роста продолжается до тех пор, пока клетки продуцента жизнеспособны и в среде находится источник углерода.

В настоящее время в промышленных объемах производят несколько органических кислот, причем лимонную, кетоглюконовую, глюко-

новую, яблочную и итаконовую кислоты получают микробиологическим путем, а уксусную и молочную — микробиологическим и химическим методами.

В условиях промышленного производства уксусная кислота является наиболее важной органической кислотой, которую используют при производстве фармацевтических препаратов, волокон, инсектицидов, в пищевой промышленности, как субстрат для получения аминокислот. Следует отметить преимущество микробиологического способа в случае окисления этанола ацетобактериями (получения пищевого уксуса), так как этот способ экономически оправдан. Применяют химический синтез, путем карбонилирования метанола получают техническую уксусную кислоту.

В конце XIX в. было отрегулировано в промышленных масштабах при участии молочнокислых бактерий (*Lactobacillus leichmanii*, *Lactobacillus debrueckii*) производство молочной кислоты. Молочная кислота нашла свое применение и эффективное использование в различных сферах: в качестве добавки к пищевым продуктам, эссенциям, сокам и напиткам; кроме этого, в пищевой промышленности — как окислитель, а также при производстве пластмасс.

Лимонную кислоту получают с помощью грибов *Aspergillus niger* из мелассы. Лимонная кислота применяется для работы с металлом (очистка, шлифовка), в пищевой промышленности (ароматизатор, консервант), в качестве пластификатора лакокрасочных материалов; кроме этого, эфиры лимонной кислоты находят применение при производстве пластмасс.

Показательные результаты по технологическому применению иммобилизованных клеток имеются при получении яблочной кислоты путем микробиологической трансформации фумаровой кислоты.

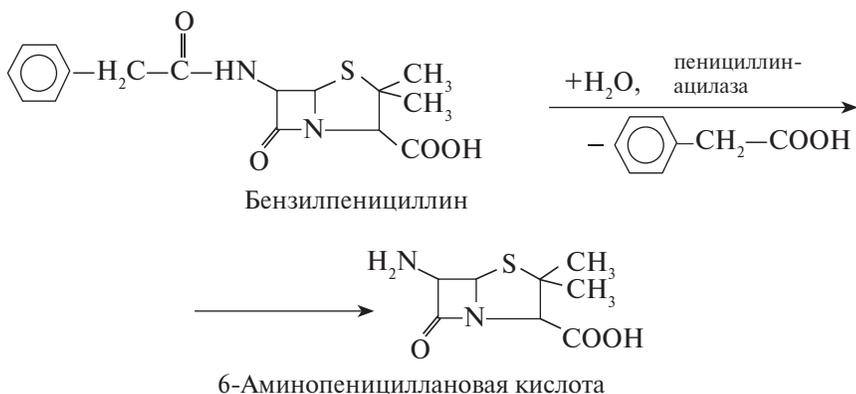
Продуктами окисления глюкозы являются глюконовая кислота и ее лактон. Промышленное производство глюконовой кислоты осуществляют с помощью *Aspergillus niger*. Глюконовая кислота используется как моющее средство, в медицинской практике применяют соли данной кислоты, в пищевой промышленности — лактон как подкислитель. Производные глюконовой кислоты — 5-кетоглюконовую и 2-кетоглюконовую кислоты — получают с помощью микроорганизмов *Gluconobacter oxydans*, *Pseudomonas spinosa*.

Применение итаконовой кислоты находит свое место в производстве пластмасс и красителей, получают ее с высоким выходом из глюкозы с помощью грибов *Aspergillus terreus*.

Получение антибиотиков

Получение антибиотиков не обходится без применения иммобилизованных биокатализаторов. Иммобилизованные ферменты позволили достичь значительных успехов в этой области.

Начиная со второй половины XX в. ученые отошли от поиска новых антибиотиков и перешли к модификации структуры уже имеющихся. Значительные результаты достигнуты в производстве β -лактамных антибиотиков. Химическая модификация β -лактамного кольца, а именно «добавление» к нему какой-либо химической группы, позволяет расширить перечень полусинтетических антибиотиков.



Основой для получения полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда является 6-АПК. Путем химического гидролиза бензилпенициллина получают 6-АПК, но данный процесс является трудоемким из-за крайней неустойчивости лактамного цикла его молекулы. Например, при щелочном гидролизе бензилпенициллина выход 6-АПК составляет всего 1%. Производительность процесса получения 6-АПК удалось повысить до 80–85% именно благодаря использованию иммобилизованных бактериальных клеток, которые содержат пенициллинацилазу.

Для получения биокатализаторов в промышленных масштабах с целью трансформации антибиотиков применяют иммобилизацию микроорганизмов путем включения в желатиновый гель. Поскольку для осуществления трансформации антибиотиков необходим один фермент из всего многообразия их в клетке, сохранять жизненные функции клеток при этом необязательно, а активность катализатора можно повысить путем разрушения клеточных оболочек. Однако все не так

просто. В частности, простое включение в гель клеток *E. coli* приводит к быстрой инактивации фермента вследствие его вымывания в процессе получения геля. В связи с этим был разработан способ включения в гель клеток, предварительно прошедших модификацию в растворе мономеров путем сшивки бифункциональным реагентом.

К изменению структуры клетки *E. coli*, а именно проницаемости клеточной стенки, приводит мягкое воздействие органическими растворителями, которые замещают часть воды, что способствует увеличению доступа к внутриклеточным ферментам субстрата и ускорению выхода продукта при одновременном сохранении целостности клеточных покровов, что, в свою очередь, приводит к увеличению активности и стабильности биокатализатора.

Для иммобилизации микроорганизмов, которые осуществляют биосинтез антибиотиков, используют разные методы — включение в полые волокна, включение в гели альгината, агара, каррагинана, коллагена, адсорбцию на цеолите, нейлоне, поликарбонате и др.

Трансформация стероидов

Развитие методов микробиологической трансформации дало начало активному промышленному синтезу лекарственных препаратов на основе стероидов.

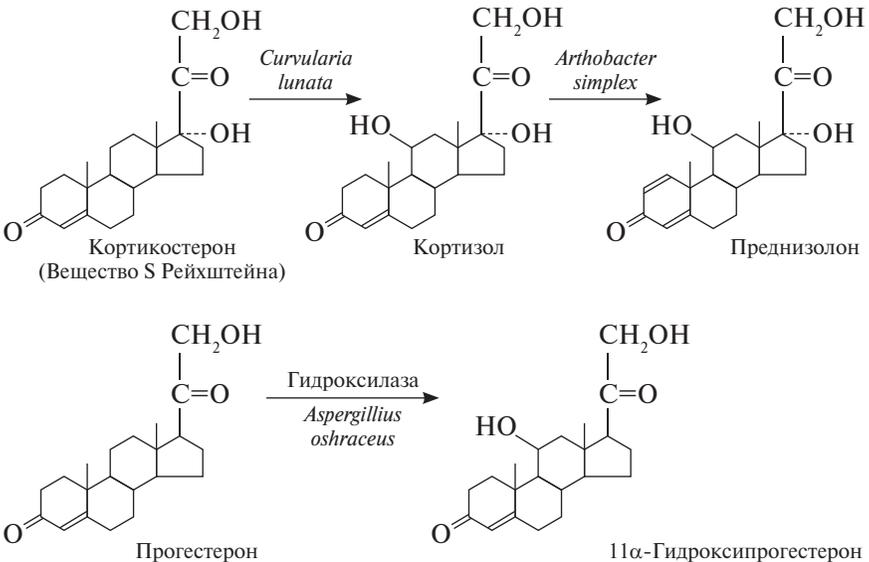


Таблица 6.1. Микроорганизмы, применяемые для биотрансформации стероидов

Реакция	Субстрат	Продукт	Микроорганизм трансформатор
11 α -Гидроксилирование	Прогестерон	11 α -Гидрокси-прогестерон	<i>Rhizopus nigricans</i>
11 β -Гидроксилирование	Вещество S Рейхштейна (4-прегнен-17 α , 21-диол-3,20-дион)	Гидрокортизон	<i>Carvularia lunata</i>
16 α -Гидроксилирование	9 α -Фторкортизол	9 α -Фтор-16 α -гидроксикортизон	<i>Streptomyces roscochromogenus</i>
1,2-Дегидрирование	Гидрокортизон	Преднизолон	<i>Arthrobacter simplex</i>
Расщепление боковой цепи	β -Ситостерин	Андростадиендион и/или андростендион	<i>Mycobacterium</i> spp.

Для промышленных процессов в качестве сырья используют природные стерины, которые выделяют из различных органов животных или растений (табл. 6.1).

Трансформация стероидов осуществляется с участием микроорганизмов, для иммобилизации которых применяют различные методы. При использовании непрерывного (проточного) реактора у клеток, адсорбированных на керамическом носителе, а также периодического реактора — у клеток, включенных в гель, наблюдаются максимальная активность и стабильность.

В настоящее время интенсивно ведутся разработки в области применения нерастворимых микрокристаллических стероидных субстратов с целью иммобилизации клеток. В качестве методов иммобилизации в данном случае применяют диспергирование и измельчение субстрата, а также трансформацию его в водорастворимое состояние с участием циклодекстринов. Кроме этих методов, осваивается новый способ проведения реакций для свободных, иммобилизованных клеток и двухфазных водно-органических систем. Способ основан на локализации клеток в водной фазе, то есть внутри гранул носителя, что ведет к меньшему воздействию органического растворителя из-за неспособности смешиваться с водой.

В последние годы различные виды бактерий *Nocargia species*, применяемые для иммобилизации в гидрофобном носителе, используются в роли катализатора реакции дегидрирования стероидов в среде

содержания таких вредных веществ, как инсектициды, пестициды, удобрения, в воздухе и пищевых продуктах до диагностики заболеваний.

В последние десятилетия появились биодатчики нового поколения, разработанные по принципу биосродства, то есть аффинных взаимодействий, типа «агонист (антагонист) — клеточный рецептор», «анти-тело—антиген», «фермент—ингибитор» на основе пьезоэлектрического эффекта и полупроводниковых устройств-термисторов. Датчик представляет собой термистор, на поверхности которого находятся молекулы ферментов или иммобилизованные клетки. В его функции входит регистрация изменений температуры, которые происходят в процессе биохимических реакций с анализируемыми веществами.

Наиболее чувствительными являются пьезоэлектрические биосенсоры. Изменение частоты переменного тока, при которой пьезоэлектрик, например кристалл кварца, колеблется в резонансном режиме, лежит в основе принципа биосенсорного действия. Биосенсоры содержат иммобилизованный на пьезокристалле фермент. Следует отметить, что создание соответствующего комплекса на пьезоэлектрике, увеличивающего его массу и меняющего частоту резонансных колебаний, свидетельствует о наличии детектируемого агента, который вступает в ферментативную реакцию.

Существуют биосенсоры с соиммобилизованными клетками и изолированными энзимами, позволяющие осуществлять сложные многостадийные ферментативные реакции.

Кроме того, разработаны датчики, в основе которых используются системы рецепторов различных организмов: щупальца раков, синих крабов (биосенсоры на гормоны и аминокислоты), пучки нервов или отдельные нервы, полученные из усов краба (биосенсор на пуриновые основания и аминокислоты), собачий нос (обнаружение взрывчатки и контрабандных наркотиков). В определенных случаях применяют не целый рецепторный орган, а отдельные клетки или их органеллы, которые непосредственно отвечают за распознавание агента. Таковы также биосенсоры на основе изолированных рецепторов растений на токсины и ауксины.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Инженерная энзимология, значение в развитии биотехнологического производства.
2. Проблема нестабильности ферментов, пути решения.

3. Основные преимущества иммобилизованных ферментов.
4. Требования, предъявляемые к носителям для иммобилизации ферментов.
5. Классификация носителей для иммобилизации ферментов.
6. Характеристика органических синтетических носителей иммобилизованных ферментов.
7. Характеристика органических природных носителей иммобилизованных ферментов.
8. Характеристика носителей иммобилизованных ферментов неорганической природы.
9. Классификация методов иммобилизации ферментов.
10. Характеристика физических методов иммобилизации ферментов.
11. Характеристика способа адсорбции ферментов на нерастворимых носителях.
12. Характеристика способа иммобилизации ферментов путем включения в гель.
13. Преимущества способа иммобилизации ферментов путем включения в гель.
14. Характеристика способа микрокапсулирования ферментов.
15. Характеристика способа включения ферментов в липосомы.
16. Характеристика химических методов иммобилизации ферментов.
17. Основные направления применения иммобилизованных ферментов.
18. Процесс получения глюкозо-фруктозных сиропов с помощью иммобилизованных ферментов.
19. Примеры микробиологической окислительно-восстановительной трансформации углеводов.
20. Процессы иммобилизации при получении аминокислот.
21. Перечень аминокислот, получаемых с помощью иммобилизации клеток и ферментов.
22. Перечень органических кислот, получаемых с помощью микробиологических методов. Микроорганизмы-продуценты, примеры.
23. Основные преимущества получения антибиотиков с помощью иммобилизованных биокатализаторов.
24. Метод иммобилизации, преимущественно используемый при производстве антибиотиков.
25. Микроорганизмы, осуществляющие биотрансформацию стероидов.
26. Методы иммобилизации, используемые при получении стероидов.
27. Основные направления использования биосенсоров на основе иммобилизованных ферментов. Наиболее чувствительные биосенсоры.
28. Преимущество биосенсоров с соиммобилизованными клетками и изолированными энзимами.