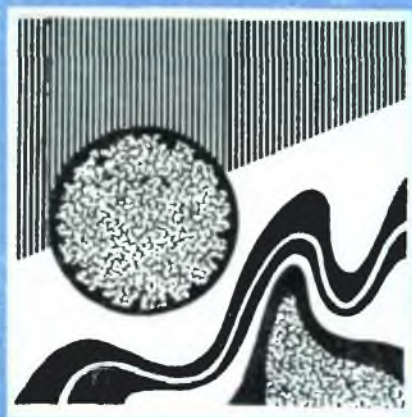




БИО
ТЕХНОЛОГИЯ

И.В. Березин
А.А. Клесов
В.К. Швядас
Н.Н. Угарова
С.Д. Варфоломеев
А.И. Яропалов
Н.Ф. Казанская
А.М. Егоров

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ





в 8-ми книгах

БИОТЕХНОЛОГИЯ

Под редакцией Н.С.Егорова
В.Д.Самуилова

И.В.Березин

А.А.Клёсов

В.К.Швядас

Н.Н.Угарова

С.Д.Варфоломеев

А.И.Ярополов

Н.Ф.Казанская

А.М.Егоров

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ



Москва «Высшая школа» 1987

ББК 30.6
Б63
УДК 574.6

Рецензенты:

кафедра биотехнологии пищевого синтеза Московского ордена Трудового Красного Знамени технологического института пищевой промышленности (зав. кафедрой проф. Кантере В. М.) и д-р техн. наук Попов В. Г. (ПО «Биопрепарат»)

Допущено Министерством высшего и среднего специального образования СССР в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности «Биология»

Биотехнология: Учеб. пособие для вузов. В 8 кн./Под Б63 ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. Кн. 8: Инженерная энзимология/И. В. Березин, А. А. Клёсов, В. К. Швядас и др. — М.: Высш. шк., 1987. — 143 с.: ил.

Показаны достижения и перспективы инженерной энзимологии. Рассмотрено получение и использование биокатализаторов в тонком органическом синтезе, производстве новых лекарственных средств, ферментативном получении сахаров и других продуктов из целлюлозосодержащих отходов промышленности и сельского хозяйства, в биохимическом и иммуноферментном анализе для целей медицинской диагностики, контроля технологических процессов и окружающей среды.

Б $\frac{291000000(430900000) - 310}{001(01) - 87}$ КБ-53-10-86

ББК 30.6+28.07

605

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМФ	— аденозин-5'-монофосфат
АДФ	— аденозин-5'-дифосфат
АТФ	— аденозин-5'-трифосфат
ЕМIT-анализ	— гомогенный иммуноферментный анализ
КПЗ	— комплекс с переносом заряда
НАД (НАДН·Н ₂)	— никотинамиддинуклеотид (восстановленный)
НАДФ	— никотинамидадениндинуклеотидфосфат, окисленная форма
РНКаза	— рибонуклеаза
ТСNQ	— тетрацианхинодиметан
ФМН	— флавиномононуклеотид
ФАД	— флавинадениндинуклеотид
ФМН·Н ₂	— флавиномононуклеотид восстановленный
ЦТФ	— цитидин-5'-трифосфат
ЦДФ	— цитидин-5'-дифосфат

ПРЕДИСЛОВИЕ

За последние 20 лет в области энзимологии достигнуто глубокое понимание физико-химической сущности биологического катализа, выявлены основы специфичности и стереоспецифичности действия ферментов, найдены механизмы регуляции таких важнейших свойств ферментов, как активность и стабильность. Широкое развитие методов химической модификации и иммобилизации белков, а также достижения современной биохимии и микробиологии дали возможность выделять практически любой фермент в нужном количестве и на его основе создавать необходимый гетерогенный катализатор. Благодаря этому, с начала 70-х годов ферменты стали находить применение в современной промышленности и медицине. Экономический эффект только от внедрения первого в нашей стране процесса инженерной энзимологии — биокаталитического получения 6-аминопенициллановой кислоты — составил более 100 млн. рублей. Открылись широкие перспективы использования ферментов для анализа, в гонком органическом синтезе, в системах биоконверсии солнечной энергии и ряде других областей.

В последнее десятилетие усилиями кафедры химической энзимологии МГУ им. М. В. Ломоносова были подготовлены учебные пособия «Иммобилизованные ферменты» (под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартиника, 1976) и «Введение в прикладную энзимологию» (под ред. И. В. Березина и К. Мартиника, 1982), которые уже стали библиографической редкостью. Эти издания рассчитаны на студентов университетов, специализирующихся в области физико-химической энзимологии. Настоящее учебное пособие предназначено для более широкого круга читателей — студентов и аспирантов химических, биологических, технических, медицинских и других специальностей вузов, а также всех интересующихся вопросами применения ферментов в современной биотехнологии. Оно включает в себя результаты развития исследований по инженерной энзимологии и сферам ее приложения вплоть до середины 1986 г.

Книгу открывает «Введение в инженерную энзимологию», где даются основные понятия и определения и показана взаимосвязь отдельных направлений этой научно-технической области. Поскольку отличительной особенностью инженерной энзимологии

является ее практическая направленность, первая глава учебного пособия посвящена промышленным процессам с использованием иммобилизованных ферментов и клеток. Научные основы создания некоторых из этих процессов, базирующихся на использовании биокатализа для синтеза и модификации органических соединений, даются в следующей главе. К важнейшим направлениям инженерной энзимологии как в фундаментальном, так и прикладном аспекте относится биоконверсия возобновляемого растительного сырья, научные основы которой также даются в книге. Две главы посвящены применению иммобилизованных ферментов для анализа как в химических лабораториях, так и в медицинских клиниках. В отдельной главе изложены сведения о новом направлении инженерной энзимологии — изучении и применении ферментов, иммобилизованных на электропроводящих матрицах. Наконец, рассмотрены вопросы применения иммобилизованных ферментов и белков в медицине для создания новых эффективных лекарственных средств.

В написании настоящего учебного пособия приняли участие ведущие научные сотрудники и преподаватели кафедры химической энзимологии МГУ и Межфакультетской лаборатории биорганической химии и молекулярной биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, а также Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР: И. В. Березин, А. А. Клёсов (Введение); А. А. Клёсов (гл. 1—2); В. К. Швядас (гл. 3); С. Д. Варфоломеев, А. М. Ярополов (гл. 4); Н. Н. Угарова (гл. 5); А. М. Егоров (гл. 6); Н. Ф. Казанская (гл. 7).

Основные положения этого коллективного труда используются в спецкурсе «Прикладная энзимология», который читается на химическом факультете МГУ при подготовке специалистов по физической химии ферментов.

Авторы благодарят д-ра техн. наук В. Г. Попова и сотрудников кафедры биотехнологии микробного синтеза Московского технологического института пищевой промышленности (зав. кафедрой проф. В. М. Кантере), взявших на себя труд по рецензированию настоящей книги.

Авторы

ВВЕДЕНИЕ В ИНЖЕНЕРНУЮ ЭНЗИМОЛОГИЮ

Инженерная энзимология — новое научно-техническое направление, основанное на принципах целого ряда областей современного естествознания, в первую очередь химической энзимологии, биохимии, химической технологии, а также инженерно-экономических дисциплин. Основная задача инженерной энзимологии — разработка биотехнологических процессов, в которых используется каталитическое действие ферментов, как правило, выделенных из состава биологических систем или находящихся внутри клеток, искусственно лишенных способности расти. К инженерной энзимологии относятся соответствующие научно-исследовательские и инженерные разработки, если они ставят своей целью: а) получение нового продукта; б) получение известного продукта, но лучшего качества; в) улучшение технико-экономических показателей процесса по сравнению с аналогичными существующими процессами.

Можно было бы дать другое определение инженерной энзимологии, в котором акцент делался бы на конструирование биоорганических катализаторов с заданными свойствами на основе ферментов или полиферментных комплексов, опять-таки выделенных из состава развивающихся биологических систем. Однако в любом случае, каково бы ни было определение, непреложным остается факт, что инженерная энзимология с самого своего зарождения полностью обращена к практике. Говоря о биоорганических катализаторах с заданными свойствами, подразумевают, что эти свойства задаются (исходя из практических потребностей) необходимым временем службы катализатора при определенных условиях реакции (т. е. его термостабильностью, кислотостабильностью и т. п.), селективностью (специфичностью) действия, производительностью (активностью), иммуногенностью, токсичностью и т. д. Иначе говоря, инженерная энзимология начинается с вопроса, зачем это нужно или где и с какой целью это будет применяться?

Поясним это на примере. Химическая модификация фермента, например для превращения его в водонерастворимое вещество, сама по себе еще не проблема инженерной энзимологии и относится скорее к энзимологии химической, если при этом не пресле-

дуется конкретная практическая цель. То же следует отнести к изучению структуры, функции и механизма действия биокатализаторов, если при этом не предполагается, что полученная информация будет непосредственно (или опосредованно) использована для решения определенной технологической задачи. Аналогично, вопросы тепло- и массопереноса, влияния диффузии на скорость ферментативных реакций, моделирование ферментных реакторов и соответствующие инженерные расчеты имеют малое отношение к инженерной энзимологии, если они не направлены на получение конкретных продуктов ферментативного превращения при определенных условиях реакции. Ясно, что подобным образом очерченные границы инженерной энзимологии весьма условны, но они необходимы для выявления основных особенностей развития данного направления. Поскольку инженерная энзимология является частью современной биотехнологии, данное выше определение в целом согласуется с более широким определением биотехнологии как науки об «использовании биологических процессов и агентов для промышленных целей» (Ю. А. Овчинников, 1982).

В основе современной инженерной энзимологии лежит применение иммобилизованных ферментов и ферментных систем. Однако прежде чем переходить к этому вопросу, остановимся на природе самих ферментов.

Ферменты — это катализаторы биологического происхождения. Важнейшие свойства ферментов — чрезвычайно высокая активность и специфичность (селективность) действия. Все живые организмы содержат большое количество (сотни и тысячи) ферментов, основная функция которых состоит в проведении, ускорении и регуляции практически всех химических реакций, необходимых для жизнедеятельности организма.

По общепринятой классификации ферментативных реакций ферменты катализируют (ускоряют) реакции, принадлежащие к следующим шести классам: 1) окисление и восстановление; 2) перенос химических (функциональных) групп от одних молекул на другие; 3) гидролиз; 4) реакции с участием двойных связей (образование двойных связей или, наоборот, присоединение к ним химических групп); 5) изомеризация, или структурные изменения в пределах одной молекулы; 6) синтез сложных соединений (как правило, требующий энергетических затрат).

Уникальные каталитические свойства ферментов обусловлены сложным пространственным строением и наличием в составе их молекул определенных комбинаций химических групп. Ферменты — большие органические молекулы, иногда содержащие ионы металлов. Если попытаться представить состав ферментов в виде обычных химических формул, то, например, для фермента, который находится в поджелудочной железе, она будет выглядеть следующим образом: $C_{1130}H_{1782}O_{356}N_{308}S_{12}$. К настоящему времени в природе обнаружено свыше 3 тыс. разных ферментов, каждый из которых катализирует только «свою» реакцию и если

и способен принимать участие в «чужих» реакциях, то с существенно меньшей эффективностью.

Благодаря высокой активности и специфичности некоторые ферменты уже давно нашли применение в ряде областей промышленности (табл. 1). В основном это пищевая промышленность, где применяются главным образом комплексные ферментные препараты для гидролиза природных полимеров — белков, крахмала, пектинов. По имеющимся данным, примерно половина общей стоимости ферментов, производимых в США, приходится на ферментные препараты, расщепляющие белки, а еще четверть идет на производство амилолитических ферментов, гидролизующих крахмал.

Т а б л и ц а 1. Примеры использования ферментов в промышленности

Ферменты	Области использования
<i>Глюкозидазы:</i>	
α-амилаза	Гидролиз крахмала
глюкоамилаза	Обработка текстильных изделий
инвертаза	Получение глюкозы
пектиназа	Осахаривание лекарств и пива
целлюлаза	Производство кондитерских изделий
	Осветление вин и фруктовых соков
	Обработка соломы
<i>Протеазы:</i>	
протеазы микробного происхождения	Добавки к детергентам
	Хлебопечение
	Осветление вин и пива
	Размягчение мяса
	Выделка кож
бромелаин	Производство питательных смесей на основе гидролизатов белков
	Размягчение мяса
папаин	Осветление пива
трипсин	Размягчение мяса
реннин	Выделка кож
	Сыроделие
<i>Липазы</i>	Модификация вкуса молочных продуктов
<i>Оксидоредуктазы:</i>	
глюкозооксидаза	Удаление кислорода из пищевых продуктов
каталаза	Удаление пероксида водорода после стерилизации молочных продуктов
<i>Изомеразы:</i>	
глюкозоизомераза	Производство глюкозо-фруктозных сиропов

Более широкое технологическое применение ферментов до последнего времени сдерживалось рядом причин, из которых важнейшими являются: а) трудоемкость отделения ферментов от исходных реагентов и продуктов реакции после завершения процессов, в результате чего ферменты используются, как

правило, однократно; б) неустойчивость (лабильность) ферментов при хранении, а также при различных воздействиях (главным образом тепловых); в) трудоемкость очистки ферментов и получение их в достаточно активном виде и, как следствие, высокая стоимость активных ферментов.

В последнее десятилетие определились пути преодоления этих трудностей. Они связаны с получением так называемых иммобилизованных ферментов, а также иммобилизованных клеток микроорганизмов. Вопросам иммобилизации ферментов посвящена кн. 7 серии «Биотехнология», поэтому здесь будет кратко рассмотрен лишь тот материал, который необходим для дальнейшего изложения.

Иммобилизация ферментов — это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности. Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют следующие методы:

1. Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы. К первым относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстраны, бумага, ткани, полистирол, нейлон, ионообменные смолы и т. д., ко вторым — пористое стекло, силикагели, силохромы, керамика, металлы и т. д.

2. Захват фермента в сетку геля или полимера.

3. Ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками при помощи би- или полифункционального реагента.

4. Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах).

5. Микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5—300 мкм).

В результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества гетерогенных катализаторов — их можно удалять из реакционной смеси (и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией. Этим устраняется первый из перечисленных недостатков растворимых ферментов как технологических катализаторов. Более того, появляется возможность перевода многих периодических ферментативных процессов на непрерывный режим, используя колонны или проточные аппараты с иммобилизованными ферментами.

Иммобилизованные ферменты оказались в целом значительно более устойчивыми к внешним воздействиям, чем растворимые ферменты. Таким образом, возникли перспективы преодоления и второго недостатка биокатализаторов — их лабильности.

Принцип иммобилизации был применен не только к ферментам, но и к их субстратам, ингибиторам и кофакторам, т. е. веществам, имеющим избирательное сродство к ферментам. Это позволило создать метод выделения и очистки ферментов, основанный на хроматографии по сродству, или аффинной хрома-

тографии. Тем самым существенно облегчилось выделение чистых ферментов, и в настоящее время можно рассчитывать на то, что третья причина, ограничивающая промышленное применение ферментов, будет успешно преодолена.

В последнее время получило достаточно широкое распространение применение иммобилизованных клеток микроорганизмов, содержащих естественный набор ферментов. Преимущества их по сравнению с иммобилизованными ферментами заключаются главным образом в том, что при использовании иммобилизованных клеток отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации ферментов, которые, как правило, являются наиболее дорогостоящими при осуществлении полного технологического процесса. Далее, ферменты в микроорганизме находятся в наиболее естественном окружении, что положительно сказывается на их термостабильности, а также так называемой операционной стабильности (продолжительности работы в условиях опыта). Известно много примеров, когда после выделения из организма ферменты быстро теряли активность, а иногда их вообще не удавалось выделить в активной форме, в составе же клеток микроорганизмов они сохраняли каталитические свойства достаточно долго. В этих случаях применение целых клеток, а не отдельных ферментов становится единственно приемлемым вариантом. Наконец, иммобилизованные клетки, как и иммобилизованные ферменты, представляют собой гетерогенные биокатализаторы со всеми преимуществами их использования в технологических целях. Иммобилизация клеток обычно проводится их адсорбцией на водонерастворимых носителях (часто на ионообменных смолах), ковалентной сшивкой с помощью бифункциональных реагентов (например, глутарового альдегида) или захвата их в полимер, как правило, с последующим формированием в виде частиц определенного размера и конфигурации. Иммобилизация целых клеток микроорганизмов предотвращает их размножение и обычно увеличивает сохранность и срок работы в качестве катализатора по сравнению с необработанными клетками.

Сочетание уникальных каталитических свойств ферментов с их водонерастворимостью в иммобилизованном виде послужило основой для создания инженерной энзимологии. В гл. I будет показано, что новые технологические процессы, созданные в последнее время с привлечением идей и методов инженерной энзимологии, относятся главным образом к производству пищевых продуктов и фармацевтических препаратов. Это ограничение современных реальных возможностей технологического применения иммобилизованных ферментов в широких масштабах вызвано в первую очередь жесткой конкуренцией со стороны уже существующих ныне промышленных и микробиологических процессов с детально отработанной технологией. В то же время во многих случаях ферменты пока производятся в относительно малых количествах и остаются дорогостоящими, стоимость иммобилизации и применяемых носителей зачастую также слишком высо-

ка. По-видимому, в ближайшее время можно ожидать промышленного внедрения преимущественно таких процессов инженерной энзимологии, где продукт реакции практически не может быть получен без участия ферментов или где стоимость продукта настолько превышает стоимость исходного сырья, что получаемая разница может окупить расходы на используемые ферменты и их иммобилизацию. Именно этим объясняется повышенный в последнее время интерес к иммобилизации ферментов путем простой адсорбции на носителях и к использованию иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Синтез и модификация органических соединений

Ферменты в своем естественном окружении катализируют сотни и тысячи процессов, приводящих к образованию и распаду химических связей. В принципе любой из них может быть реализован в качестве процесса «тонкого органического синтеза». Однако на практике дело обстоит не так просто, поскольку «естественное окружение» фермента невозможно создать в технологическом реакторе. Решение соответствующей задачи инженерной энзимологии зависит от того, каким образом исследователю (или технологу) удалось реализовать каталитический потенциал фермента или ферментной системы и насколько остроумные подходы, зачастую весьма далекие от тех, которые предлагает природа, были при этом использованы.

Недавно был предложен и реализован принципиально новый подход к проведению ферментативных реакций в водноорганических системах с крайне высоким содержанием неводного компонента (К. Мартинек, 1980). Основная идея решения состоит в использовании органического растворителя, практически несмешиваемого с водой (хлороформ, эфир, жирные алифатические спирты, углеводороды и т. д.), в то время как сам иммобилизованный фермент находится в водной фазе системы. Субстраты, будучи растворенными в органической фазе, свободно диффундируют из нее в воду и там под действием фермента претерпевают химическое превращение; образовавшиеся продукты могут диффундировать из воды обратно в органическую фазу. Поскольку относительное содержание органической фазы может быть в принципе сколь угодно близко к единице, то условия термодинамического равновесия реакции в такой двухфазной системе могут быть сколь угодно близки к равновесию в чистой органической среде. Эта идея была апробирована на примере синтеза этилового эфира *N*-ацетил-*L*-триптофана из этанола и *N*-ацетил-*L*-триптофана под действием иммобилизованного химотрипсина. В водной среде выход сложного эфира ничтожно мал и составляет даже при относительно высокой концентрации этанола менее 0,1%, в то время как в двухфазной системе «хлороформ + 1% по объему воды» равновесие удалось полностью сдвинуть в сторону сложного эфира и выход его составил практи-

чески 100% (К. Мартинек, И. В. Березин, 1980). Аналогичным методом П. Кюль (ГДР) синтезировал в последнее время более 60 физиологически активных пептидов.

Перспективный метод ферментативного получения незаменимой аминокислоты *L*-лизина из *DL*- α -аминокапролактама разрабатывается в Японии и СССР. В данном случае используются два фермента — *L*- α -аминокапролактамамидаза и α -аминокапролактамацеаза. Они имеют бактериальное происхождение, стабильность их после иммобилизации достаточно высока. Процесс протекает в две стадии — на первой идет гидролиз *L*- α -аминокапролактама непосредственно до *L*-лизина, а на второй — оставшийся *D*- α -аминокапролактама подвергается рацемизации под действием второго иммобилизованного фермента и опять вводится в реакцию. Данный процесс получения *L*-лизина предполагается технологически связать с крупнотоннажным производством циклогексанона, которое давно реализовано в нашей стране.

Иммобилизованная пенициллинамидаза нашла промышленное применение для получения 6-аминопенициллановой кислоты из пенициллина G (см. гл. 1 и 3). Было показано, что субстратная специфичность этого фермента достаточно широка и позволяет осуществлять гидролиз не только пенициллина, но и цефалоспорины, причем в последнем случае образуется 7-аминодезацетоксицефалоспориновая кислота (7-АДЦК) — важное исходное соединение для синтеза антибиотиков цефалоспоринового ряда. Успешно был проведен синтез ряда антибиотиков пенициллинового и цефалоспоринового ряда — ампициллина, цефалексина, цефалотина и цефалоридина — с помощью пенициллинамидазы, иммобилизованной путем связывания с нерастворимыми носителями, а также в составе клеток микроорганизмов. Эти работы направлены на получение антибиотиков с более широким спектром действия и повышенной кислотоустойчивости (П. С. Ныс, В. К. Швядас, 1984).

Интенсивно разрабатывается производство ряда физиологически активных веществ (преднизолон и других кортикостероидов, оптически активных экстрогенов, простагландина E_2 и т. д.) с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов.

Интересные возможности для синтеза оптически активных аминокислот открывает использование иммобилизованных ферментов, у которых в качестве одного из субстратов выступает пировиноградная кислота. В этом случае введение в реакционную систему аммиака и RH -компонента соответствующей боковой цепи (R аминокислоты) приводит к прямому получению аминокислоты в качестве основного продукта реакции. Таким образом были получены *L*-аминокислоты — тирозин, диоксифенилаланин (ДОФА), триптофан, 5-окситриптофан (В. И. Яковлева, 1978). Благоприятным обстоятельством является то, что равновесие этого процесса существенно сдвинуто в сторону образования аминокислоты. Здесь особое внимание привлекает синтез

ДОФА — исключительно важного препарата для лечения болезни Паркинсона. По мнению советских и зарубежных экспертов, эти процессы могут найти в будущем промышленное применение.

Биоконверсия растительного сырья

К важнейшим направлениям инженерной энзимологии как в фундаментальном, так и прикладном отношении следует отнести биоконверсию возобновляемого растительного сырья для целей пищевой, микробиологической, нефтехимической, энергетической, медицинской промышленности и сельского хозяйства. В зависимости от вида исходного сырья, желаемого продукта и технологического решения процесса в целом биоконверсия может включать в себя предварительную обработку сырья, ферментативную деструкцию его вплоть до мономера, ферментацию мономеров с получением желаемого продукта или прямую микробиологическую конверсию сырья в продукты (промежуточные или конечные). Конкретными процессами, для которых, как ожидается, будет найдено достаточно эффективное технологическое решение, являются следующие:

1. Ферментативное получение глюкозы из целлюлозосодержащего сырья (отходов промышленности и сельского хозяйства).

2. Биоконверсия целлюлозных и лигноцеллюлозных материалов в этанол.

3. Гидролитическая (возможно, окислительно-гидролитическая) деструкция растительной биомассы для повышения ее питательной ценности для сельскохозяйственных животных (в первую очередь — крупного рогатого скота).

4. Ферментативная и (или) микробиологическая деструкция лигнина для получения алкилфенольных, оксифенольных и других фенольных производных в качестве возможных исходных соединений для последующего получения продуктов полимерной химии.

Эффективная реализация данных биотехнологических процессов в решающей степени будет зависеть от того, насколько детально ферментативная (микробиологическая) конверсия растительных многокомпонентных материалов будет изучена на молекулярном уровне. Другими словами, решающую роль будет играть опережающее развитие фундаментальных основ биотехнологии возобновляемых природных (растительных) ресурсов.

Ферментативное получение глюкозы из целлюлозосодержащих веществ имеет непосредственное отношение к решению Продовольственной программы в нашей стране, к той ее части, которая посвящена производству сахара и сахаристых веществ, а также поиску альтернативных путей синтеза сахаристых веществ и их заменителей. Основным сахаристым веществом, которое может частично заменить сахар, является глюкоза. Глюкоза — практически единственное исходное сырье для получения фруктозы, которая в свою очередь в перспективе рассматри-

вается как основной заменитель сахара для промышленной переработки и прямого потребления населением. Поскольку фруктоза в настоящее время в СССР практически не производится, необходимо крупномасштабное ее получение. Однако это почти невозможно сделать, оставаясь в рамках традиционной сырьевой базы. По-видимому, единственный путь для резкого увеличения производства глюкозы и фруктозы — это их ферментативное получение из целлюлозосодержащих материалов (см. гл. 2).

Применение иммобилизованных ферментов для химического анализа

Благодаря своей высокой специфичности ферменты давно применяются в области аналитической химии. Применение иммобилизованных ферментов способствует созданию методов «безреагентного» анализа, позволяющих проводить практически непрерывный анализ водных растворов органических (а в ряде случаев и неорганических) соединений. В свою очередь достижения в этой области стимулируют развитие эффективных методов контроля окружающей среды, клинической диагностики и т. д. Созданные в недавнее время так называемые ферментные электроды применяются в быстром автоматическом анализе многокомпонентных систем. Наконец, разработаны чувствительные ферментативные методы с использованием термисторов, в том числе и с «ферментными термисторами».

Применение иммобилизованных ферментов, позволяющих проводить массовые химические анализы в отдельных пробах или в потоке (с многократным использованием одного и того же препарата фермента), в значительной степени снимает проблему высокой стоимости ферментных методов анализа и зачастую повышает точность аналитического метода. Существуют два общих подхода к аналитическому определению концентрации реагентов (субстратов) в исследуемой системе. В одном из них ферментативную реакцию доводят до полного израсходования определяемого вещества (или до установления в системе равновесия между исходными реагентами и продуктами реакции), регистрируя при этом изменение какого-либо подходящего физического или химического свойства системы, и по количеству образовавшегося продукта рассчитывают количество субстрата в исходном образце. Во втором подходе используют кинетические методы анализа для определения скорости появления продукта или исчезновения субстрата в ферментативной реакции и вычисление исходной концентрации субстрата по соответствующей калибровочной кривой. Этот метод применим также для определения концентрации эффекторов (ингибиторов или активаторов), присутствующих в реакционной системе. Оба данных подхода были реализованы на практике с применением иммобилизованных ферментов.

Следует, однако, отметить, что ферментативные методы пока

еще недостаточно используются для контроля окружающей среды. Разработано сравнительно мало ферментативных методов определения остаточных количеств пестицидов, токсичных органических и неорганических соединений, ионов физиологически активных металлов.

Новые возможности создания безреагентных методов анализа открывает впервые обнаруженное в нашей стране явление биоэлектродкатализа — ускорения электродных процессов под действием ферментов. Приложения биоэлектродкатализа не ограничиваются аналитической химией. Высокие скорости ферментативных реакций способны обеспечить весьма высокие удельные мощности электрохимических преобразователей энергии и увеличить число используемых топлив. Это в свою очередь может создать основу для внедрения окислительно-восстановительных ферментов в системы преобразования энергии химических реакций в электричество. Наконец, подобные же системы могут найти применение при решении проблемы фотоллиза воды видимым светом с образованием водорода и кислорода. Все эти вопросы рассматриваются в качестве возможных путей решения энергетических проблем будущего.

Применения иммобилизованных ферментов и белков в медицине открывают новые перспективы создания эффективных лекарственных средств. Ферменты, закрепленные на носителях или модифицированные полимерами, зачастую снижают свою антигенность из-за уменьшения доступности их для рецепторов иммунной системы. На принципах иммобилизации физиологически активных соединений базируется приготовление ферментных препаратов типа «контейнер» и других, обладающих повышенным терапевтическим эффектом.

Интересные возможности были обнаружены при использовании ферментов для повышения чувствительности иммунохимических методов анализа. Сущность любого иммунохимического анализа сводится к тому, чтобы после завершения реакции антиген-антитело определить концентрацию избыточного компонента (антигена или антитела), не вступившего в реакцию. Поскольку эти концентрации очень невысоки (10^{-12} — 10^{-8} моль/л), для их обнаружения обычно применяют легко детектируемую метку радиоактивным атомом, вводимым в один из компонентов (радиоактивный йод, тритий). Оказалось, что без потери чувствительности метода радиоактивная метка может быть заменена присоединением фермента, который после реакции обнаруживается по его каталитической активности. Накоплен достаточный материал по применению этого нового метода, получившего название иммуноферментный анализ (ИФА). С помощью ИФА могут быть детектированы любые вещества, обладающие свойствами антигенов и, естественно, многочисленные возбудители заболеваний человека, животных, растений. Многие из этих методов могут быть приспособлены к автоматическому режиму слежения, что важно для решения задач экологии, контроля технологических производств и т. д.

1

ПРОМЫШЛЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ И КЛЕТОК

Истоки современной биотехнологии уходят глубоко в прошлое. С незапамятных времен получали пищевые продукты или улучшали их качество с использованием биологических процессов и агентов. В качестве биологических агентов применялись различные организмы (от животных до микроорганизмов). На этом принципе основаны общеизвестные древнейшие способы получения молока, изготовления вин, уксуса, пивоварения, сыроделия, хлебопечения и т. д.

Хотя история пищевых технологий насчитывает тысячелетия, тем не менее совершенствование их постоянно продолжается. В последнее время наметились перспективы принципиального сдвига в технологии получения и улучшения качества пищевых продуктов. Это связано с переходом от использования целых биологических организмов на клеточный и молекулярный уровни. Появилась возможность конструировать биологические агенты, изменять структуру молекул, «резать» их на части и соединять по усмотрению исследователя-биотехнолога, извлекать биокатализаторы из естественного клеточного окружения и присоединять их с помощью ковалентных или других связей к специальным носителям (тем самым опять-таки изменять структуру молекул) и т. д. В этом и заключается главное и принципиальное отличие традиционных пищевых технологий и их традиционного научного фундамента от современной биотехнологии. Следует, впрочем, иметь в виду, что четкую грань между технической биохимией и биотехнологией провести достаточно трудно.

Может возникнуть вопрос, почему в разделе, посвященном промышленным процессам инженерной энзимологии, речь идет в основном о получении пищевых продуктов. Дело в том, что иммобилизованные ферменты и клетки в основном используются в получении пищевых продуктов и в меньшей степени фармацевтических препаратов. Такое ограничение вызвано весьма малой доступностью (в широких масштабах) ферментов, способ-

ных катализировать реакции технологической значимости, например, в органической или неорганической химии, нефтехимии, полимерной химии, фармацевтической промышленности и т. д. Напротив, традиционное использование растворимых ферментов в пищевой промышленности создало определенный фундамент для дальнейшего совершенствования методов в этой области.

К настоящему времени семь процессов с использованием иммобилизованных ферментов или клеток нашли крупномасштабное промышленное применение в ряде развитых стран мира: 1. Производство глюкозо-фруктозных сиропов и фруктозы из глюкозы. 2. Получение оптически активных *L*-аминокислот из их рацемических смесей. 3. Синтез *L*-аспарагиновой кислоты из фумаровой кислоты. 4. Синтез *L*-яблочной кислоты из фумаровой кислоты. 5. Производство диетического безлактозного молока. 6. Получение сахаров из молочной сыворотки. 7. Получение 6-аминопенициллановой кислоты (пенициллинового ядра) из обычного пенициллина (пенициллина G) для последующего производства полусинтетических антибиотиков пенициллинового ряда.

Помимо этого, некоторые процессы отрабатываются на пилотных установках и обсуждается целесообразность их промышленного применения. К ним в первую очередь относится получение 1) глюкозы из частичных гидролизатов крахмала; 2) инвертного сахара из сахарозы; 3) глюкозы из целлюлозы; 4) белковых гидролизатов.

§ 1. Получение глюкозо-фруктозных сиропов

Фруктоза, или иначе фруктовый, плодовый или медовый сахар, широко распространена в природе. Особенно богаты ей яблоки и помидоры, а также пчелиный мед, который почти наполовину состоит из фруктозы. По сравнению с обычным пищевым сахаром (в состав которого фруктоза также входит, но в виде химического соединения с менее сладкой глюкозой) фруктоза обладает более приятным вкусом, и согласно профессиональной терминологии вкус фруктозы «медовый», а обычного сахара — «приторный». Она на 60—70% слаще сахара и потреблять ее можно меньше, а значит, меньше будет и калорийность продукта. Это важно с точки зрения диетологии питания. Фруктозу в отличие от глюкозы и пищевого сахара могут потреблять больные диабетом, так как замена сахара фруктозой существенно снижает вероятность возникновения диабета. Это объясняется тем, что усвоение фруктозы не связано с превращением инсулина. Кроме того, она в меньшей степени вызывает заболевание зубов, чем сахар. В смеси с глюкозой фруктоза не кристаллизуется (не засахаривается), поэтому нашла широкое применение в производстве мороженого, кондитерских изделий и т. д.

Несмотря на неоспоримые преимущества фруктозы по срав-

нению с обычным сахаром, вплоть до начала 70-х годов она не производилась промышленным путем. В 1973 г. американской компанией «Клинтон Кори» был внедрен в промышленность процесс превращения глюкозы во фруктозу под действием иммобилизованного фермента глюкозоизомеразы, этот процесс стал самым крупным в мире по сравнению с другими, в которых используются иммобилизованные ферменты.

Основы процесса. Фермент глюкозоизомеразы катализирует превращение глюкозы, получаемой при гидролизе крахмала (кукурузного или реже картофельного), в смесь глюкозы и фруктозы. Образующийся глюкозо-фруктозный сироп содержит 42—43% фруктозы, около 51% глюкозы и не более 6% ди- или олигосахаридов, по сладости соответствует обычному сахару или инвертному сахару, получаемому кислотным (или ферментативным) гидролизом сахарозы.

Для некоторых пищевых производств (например, безалкогольных напитков типа кока-колы) употребляют глюкозо-фруктозные сиропы с содержанием фруктозы 55 и 90%. Их в свою очередь изготавливают из обычных (42%-ных по фруктозе) сиропов с использованием разделительных процессов типа жидкостной хроматографии.

Глюкозо-фруктозная смесь поступает на рынок в виде сиропа. Применяется при производстве тонизирующих и ацидофильных напитков, мороженого, кондитерских изделий, хлеба, консервированных фруктов и т. д.

Коммерческие препараты иммобилизованной глюкозоизомеразы. Они имеют вид гранул, волокон или аморфной массы. Например, компания «Клинтон Кори» производит как волокнистую, так и гранулированную иммобилизованную глюкозоизомеразу. Эти варианты фермента предназначены для использования в реакторах различной конфигурации. Волокнистые формы характеризуются большой удельной поверхностью и соответственно высокой удельной активностью фермента, поэтому применяются часто в виде слоев относительно небольшой толщины. Гранулированную глюкозоизомеразу обычно употребляют в колоннах с глубокими слоями фермента.

Компания «Ново» (Дания) производит гранулированную глюкозоизомеразу в виде жестких шариков, «Джист Брокейдс» (Голландия) — относительно мягкие шарики поперечного сшитого желатина, содержащего глюкозоизомеразу (коммерческое название — Максазим), «ICI» (Англия) — также мягкие гранулы, содержащие микробные клетки продуцента глюкозоизомеразы. Вообще среди коммерческих препаратов связанной глюкозоизомеразы почти нет ковалентно иммобилизованных препаратов, что объясняется относительной дороговизной последних. Фермент или адсорбирован на ионообменных смолах или пористых неорганических носителях, или входит в состав определенным образом обработанных клеток.

Во многих случаях используются иммобилизованные клетки вместо ферментов. Это определяется как меньшей стабильностью выделенной из клеток глюкозоизомеразы, так и отсутствием дешевых методов иммобилизации ферментов, пригодных в данном конкретном случае для экономически эффективного крупномасштабного производства.

Технологические варианты процессов. В литературе содержится немного данных о технологических деталях процессов (табл. 2). Несмотря на то, что почти в каждом процессе применяются ферменты или клетки различного происхождения, имею-

Таблица 2. Технологические сведения о процессах получения глюкозо-фруктозных сиропов с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы (R. L. Antrim, 1979; A. A. Клёсов, 1982)

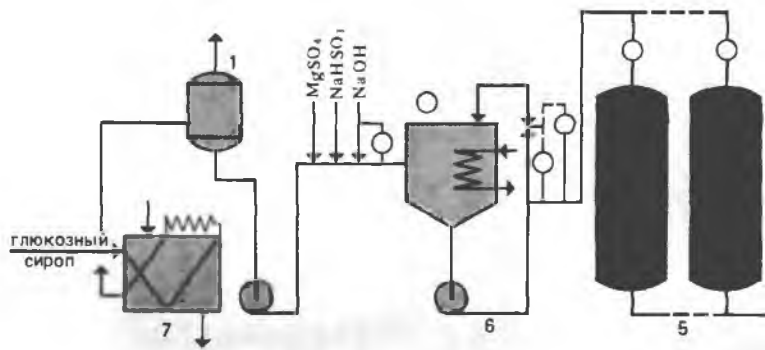
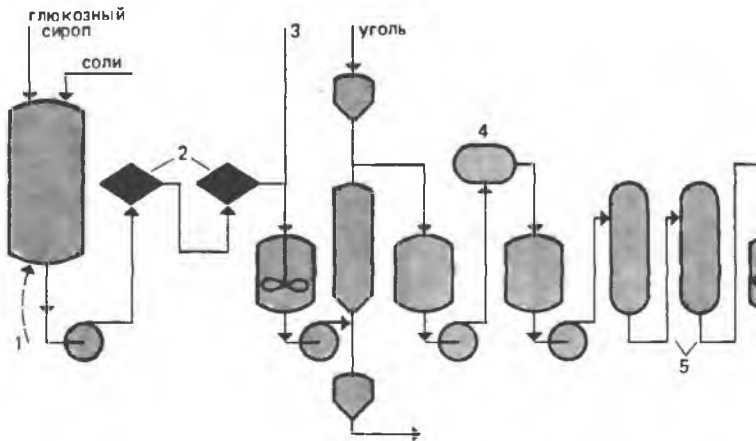
Компания	Известные характеристики процессов
«MI—CAR Int.» (США)	Колонный реактор. Производительность 2000 кг 42%-ного сиропа на 1 кг катализатора Время полуинактивации иммобилизованного фермента 20 сут, производит 42%-ный сироп. Реактор состоит из серии отдельных слоев иммобилизованного фермента толщиной 2,5—12,5 см и характеризуется отношением толщины к общему размеру (ширине) 0,02—0,05
«CLINTON CORN» (США)	
«CORNING GLASS» (США)	Колонный реактор. Время полуинактивации фермента 40 сут Колонна из нержавеющей стали высотой 5 м, диаметром 1,5 м. Время полуинактивации 500 ч. Производительность 600 кг на 1 кг иммобилизованного фермента. Исходная концентрация глюкозы 45% по массе. Условия: pH 7,5, 60°C, концентрация соли магния 3×10^{-3} моль/л. Скорость протока в колонке 8,5 погонных м/ч
«GIST BROCADES» (Голландия)	
«SANMATSU» (Япония)	Колонный реактор. Время полуинактивации 30—50 сут Колонна высотой 5 м. Производительность 2000 кг 42%-ного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента
«ICI AMERICAS» (США)	
«NOVO» (Дания)	Колонна высотой 4,5 м. Производительность 4000 кг 45%-ного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента. Условия: 60°C, pH 7,5—8,0, потеря 50% активности после 1800 ч работы Время полуинактивации 70 сут. Производительность 5000—6000 кг на 1 кг иммобилизованного фермента. При иммобилизации сохраняется 60% активности фермента
«SNAM PROGETTI» (Италия)	
«DENKI KAGAKU» (Япония)	Реактор в виде батарей колонн. После изомеризации сироп обрабатывают ионообменниками, обеспечивают и концентрируют

щие неодинаковую каталитическую активность и полученные различными методами иммобилизации, все процессы имеют общие черты.

Наиболее распространенный технологический вариант — реакторы в виде колонн с направлением потока сверху вниз. Высота колонн обычно достигает 5 м. Рекомендуется использовать возможно более чистое исходное сырье (глюкозные сиропы). Так, по данным компании «Денки Кагаку» (K. Okada, 1978) при употреблении в качестве исходного сырья кристаллической глюкозы производительность реактора достигает 4000 кг (в пересчете на сухую фруктозу) на 1 кг иммобилизованного фермента за 2400 ч работы.

Время полуинактивации катализатора при этом равно 50 сут. При использовании исходной глюкозы более низкого качества время полуинактивации может снизиться до 20 сут; производительность реактора — до 1500 кг на 1 кг иммобилизованного фермента. В целом производительность промышленных реакторов, по некоторым данным, варьирует от 1 до 9 т глюкозо-фруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованной глюкозоизомеразы (R. L. Antrim, 1979).

Проточные реакторы идеального вытеснения (колонного типа) с иммобилизованной глюкозоизомеразой обычно характеризуются более высокой эффектив-



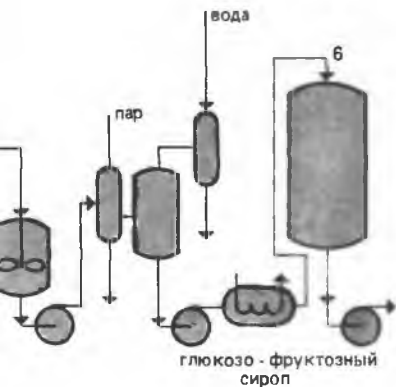


Рис. 1. Схема производства глюкозо-фруктозных сиропов с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы компанией «Клинтон Корн» (США) (J. C. Davis, 1964):

1 — резервуар для субстрата; 2 — реакторы с иммобилизованным ферментом; 3 — регулировка pH, 4 — фильтры; 5 — ионообменные колонны; 6 — резервуар

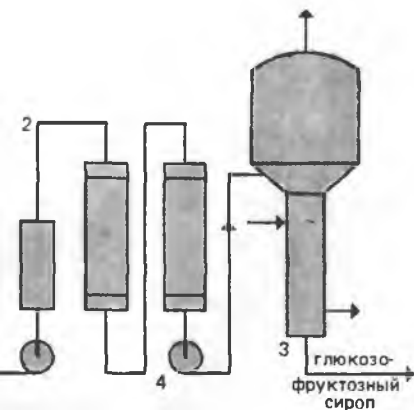


Рис. 2. Схема технологического процесса изомеризации глюкозы во фруктозу с помощью иммобилизованного фермента на венгерском заводе (г. Шабадеггаза) (G. Hollo, 1985):

1 — охлаждающая емкость; 2 — фильтр; 3 — выпарка; 4 — ионообменные колонны; 5 — колонны с иммобилизованным ферментом; 6 — система контроля; 7 — стерилизатор

ностью, чем реакторы перемешивания. Так, расход фермента в них в 1,4—4,0 раза ниже, чем в реакторах перемешивания, время контакта с субстратом составляет обычно 2—4 ч, в то время как в реакторах перемешивания 20—60 ч. Это приводит к меньшему образованию побочных продуктов в реакторах колонного типа (W. Carasik, J. O. Carroll, 1983).

Важен программный температурный контроль в ходе процесса изомеризации. Так, если температуру увеличивать ступенчато (по 2°) от 60 до 70°С в течение 14 сут, то продуктивность процесса возрастет на 42% по сравнению с изотермическим проведением процесса при 60°С в течение тех же 14 сут.

Схема производства глюкозо-фруктозных сиропов компании «Клинтон Кори» приведена на рис. 1. Особенность ее — в использовании реактора с иммобилизованным ферментом не в виде колонны, а серии каскет небольшой толщины (см. табл. 2), снижающих сопротивление потока и позволяющих проводить их последовательную замену без останковки производства.

Процесс промышленного производства фруктозы, разработанный японской компанией «Санматсу», состоит в следующем (H. Ishikawa, 1977). Глюкозоизомераза экстрагируется из соответствующих микроорганизмов и адсорбируется на ионообменной смоле, специфической данному ферменту. Полученный таким образом иммобилизованный фермент помещают в колонну. Время полуинактивации этого фермента варьирует от 50 (при использовании кристаллической глюкозы) до 30 сут.

На рис. 2 приведена технологическая схема процесса изомеризации глюкозы на венгерском заводе по переработке 120 тыс. т кукурузного зерна в год. В качестве катализатора используется иммобилизованная глюкозоизомераза «Така-свит». Объем слоя катализатора в реакторах колонного типа составляет 20 м³, общий расход иммобилизованного фермента — 35 т/год. Продуктивность процесса 2,5 т глюкозо-фруктозного сиропа на 1 кг иммобилизованного фермента (J. Hollo, 1983, 1985).

Специалисты компании «Ново» (W. Carasik, J. O. Carroll, 1983) рекомендуют следующие параметры промышленного реактора для ферментативной изомеризации глюкозы (при активности иммобилизованного фермента 200 межд. ед/г и времени работы фермента — 2 периода полуинактивации): мощность производства — 400 т/сут (по сухому веществу); исходная концентрация глюкозного сиропа — 40%; средняя скорость подачи сиропа — 35,6 м³/ч; количество иммобилизованного фермента — 15 т; объем слоя иммобилизованного фермента — 50 м³; число реакторов, работающих параллельно, — 6; внутренний диаметр реактора — 1,45 м; высота слоя иммобилизованного фермента — 5 м; линейная скорость потока — 3,6 м/ч; расход иммобилизованного фермента — 220 кг/сут; операционный цикл — 275 ч.

В начале 1980-х годов американской корпорацией «Ситус» разработан новый процесс получения 100%-ной фруктозы из глюкозных сиропов. Процесс состоит из двух стадий — ферментативной и химической. На первой стадии глюкоза окисляется в D-глюкозон под действием иммобилизованной пиранозо-2-оксидазы из *Polyporus obtusus*. На второй — глюкозон восстанавливается до фруктозы на палладиевом катализаторе. Выход фруктозы почти количественный.

Экономические оценки. Быстрое увеличение производства глюкозо-фруктозных сиропов (см. с. 19) стало возможным благодаря возрастанию эффективности технологии иммобилизации глюкозоизомеразы и улучшению характеристик иммобилизованного фермента. Каждый значительный шаг на этом пути сопровождался снижением затрат при производстве глюкозо-фруктозных сиропов.

На рис. 3 дано сопоставление экономики промышленного процесса на предприятии компании «Киёва Хакко» (Япония) с применением иммобилизованной на фенолформальдегидной смоле глюкозоизомеразы с процессом на основе растворимого фермента (Y. Yokote, 1975). Для периодического процесса с

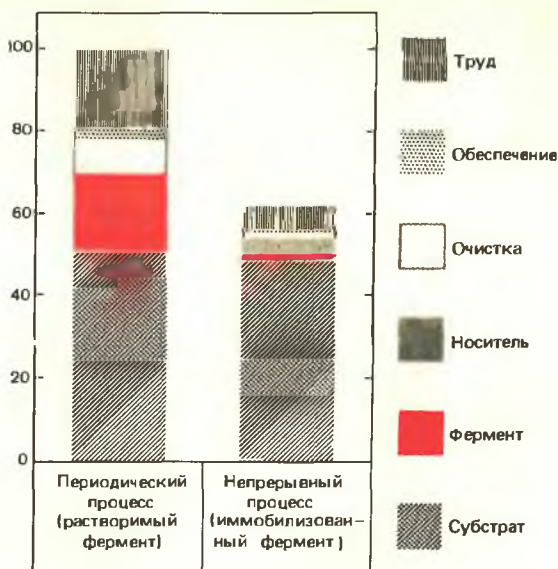


Рис. 3. Сопоставление затрат на производство глюкозо-фруктозного сиропа с использованием растворимой и иммобилизованной глюкозоизомеразы на предприятии компании «Киева Хакко» (Япония), (Y. Yokote, 1975)

использованием растворимого фермента на изомеризацию 1000 кг глюкозы расходуется 21 кг глюкозоизомеразного препарата. Из этого же количества ферментного препарата получается 9,8 л иммобилизованной глюкозоизомеразы, которая катализирует изомеризацию 2822 кг глюкозы за 30 сут. В итоге стоимость процесса с иммобилизованной глюкозоизомеразой составляет 61,5% от стоимости процесса с растворимым ферментом.

Еще один пример экономических оценок при сопоставлении эффективности ферментативной изомеризации глюкозы под действием растворимого и иммобилизованного фермента по данным университета Пурдю (шт. Индиана, США), приведен в табл. 3 (Етегу А., 1976). Как видно из таблицы, для процесса с растворимой глюкозоизомеразой основные затраты приходятся на получение фермента. Для процесса с иммобилизованным ферментом основные затраты идут на изготовление носителя и на реагенты для иммобилизации. По-видимому, в данном случае (как и для других процессов с использованием глюкозоизомеразы) эффективность применения иммобилизованного фермента по сравнению с растворимым объясняется главным образом высокой стоимостью последнего.

Экономические оценки, проведенные в Венгрии в начале 80-х годов, показали, что производство глюкозо-фруктовых си-

Таблица 3. Экономические оценки процесса получения глюкозо-фруктозных сиропов производительностью 500 т сухого продукта в год (А. Emery, 1976)

Параметры	Глюкозоизомеразы	
	Периодический процесс, растворимый фермент	Непрерывный процесс, иммобилизованный фермент
Время реакции (условное)	20 ч	—
Оптимальная продолжительность реакции	—	29 сут
Относительные годовые затраты:		
фермент	1000	37
носитель	—	1040
реагенты	—	1580
реактор (без фермента)	300	185
Стоимость продукта за 1 т	26	5,6

ропов из кукурузного крахмала с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы в полтора раза более экономично, чем получение сахара из сахарной свеклы по обычной технологии (J. Hollo, 1983).

Масштабы производства. Для промышленного производства глюкозо-фруктозных сиропов с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы рекомендуют производительность 30—100 или 400 т (по разным данным) в сутки в пересчете на сухое вещество. В целом благодаря быстрому внедрению новой технологии с использованием иммобилизованной глюкозоизомеразы производство и применение глюкозо-фруктозных сиропов в развитых странах чрезвычайно быстро расширяется.

Ниже приведены данные по производству глюкозо-фруктозных сиропов (в тыс. т) в США и Японии (Н. Ichikawa, 1977; W. Carasik, J. O. Carroll, 1983; К. Okada, 1978):

Год	США	Япония	Год	США	Япония
1972	—	—	1977	1135	216
1973	136	30	1978	1585	—
1974	363	—	1980	2300	300
1975	645	75	1983	3250	—
1976	908	130			

Предполагается, что в Японии в 1980 г. около 10% всего потребляемого сахара заменено на глюкозо-фруктозную смесь. В США уже в 1978 г. потребление населением фруктозы (6 кг на человека в год) составило 12% от потребления и ожидается дальнейший рост вплоть до 30—40% к 2000 г. Значительные количества глюкозо-фруктозного сиропа производятся также в Канаде, Аргентине и других странах.

В странах Европейского экономического сообщества (страны Общего рынка), где глюкозо-фруктозный сироп производится под

коммерческим названием «изоглуккоза», существуют определенные политические ограничения на выпуск этого продукта, вызванные защитой интересов производителей сахарной свеклы. Производство глюкозо-фруктозных сиропов в Западной Европе в 1976 г. составляло немногим более 100 тыс. т (Англия — 35, Испания — 25, ФРГ — 21, Бельгия — 14, Нидерланды — 10 тыс. т), в 1980 г. — около 0,75—1,0 млн. т. В это же время также были созданы предприятия по производству глюкозо-фруктозных сиропов во Франции, Ирландии, Италии, Югославии. В целом производство глюкозо-фруктозных сиропов в мире в 1980 г. составило 3,7 млн. т (R. L. Artrim, 1979; J. Hollo, 1983).

§ 2. Получение L-аминокислот

Аминокислоты — главный строительный материал организма, из которого формируются пептиды и белки. Растения и микроорганизмы способны сами синтезировать все нужные им аминокислоты из более простых химических соединений. Однако человеческий организм способен синтезировать лишь 12 из 20 аминокислот, необходимых ему для жизнедеятельности. Остальные 8 аминокислот получили название незаменимых* и должны поступать в организм извне — с пищей. При нехватке хотя бы одной из незаменимых аминокислот замедляется рост организма, проявляется патология. Поэтому важно синтезировать эти аминокислоты в промышленных масштабах для корректировки рационов питания, в лечебных и профилактических целях и т. д. Кроме того, аминокислоты (как заменимые, так и незаменимые) являются важнейшим сырьем для обеспечения многих биотехнологических процессов.

Производство многих аминокислот, в том числе и незаменимых, — крупнотоннажная отрасль химической промышленности. Однако с помощью химических методов получается смесь оптических изомеров аминокислот, иначе говоря, смесь L- и D-аминокислот, молекулы которых в L- и D-форме представляют собой зеркальные изомеры. В химических реакциях эти изомеры практически неразличимы, однако человеческий организм усваивает лишь L-аминокислоты (за исключением метионина). Для большинства биотехнологических процессов D-аминокислоты также не представляют ценности.

Разделение смеси L- и D-аминокислот, так называемой рацемической смеси, на составляющие их изомеры стало первым процессом в мире, осуществленным с помощью иммобилизованных ферментов на промышленном уровне. Этот процесс был реализован в Японии на предприятии, принадлежащем компании «Танабе Сейяку» в 1969 г. В течение 15 предшествующих лет данный процесс проводился с применением растворимого фер-

* К ним относятся валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан.

мента — аминоксилы, но он был недостаточно экономичен (I. Chibata, 1976). После перехода на иммобилизованную аминоксилу экономическая эффективность процесса возросла в полтора раза, и в настоящее время компания осуществляет на промышленном уровне производство пяти *L*-аминоксил, из них четыре незаменимые (метионин, валин, фенилаланин, триптофан).

В качестве исходного вещества используются ацилированные *D*, *L*-аминоксилы, полученные с помощью обычного химического синтеза. Фермент аминоксилы гидролизует один ацил-*L*-изомер, отщепляя от него объемную ацильную группу, и тем самым резко увеличивая растворимость образующейся *L*-аминоксилы по сравнению с присутствующим в реакционной системе ацил-*D*-изомером. После этого вещества легко отделяются друг от друга путем известных физико-химических методов. Так выделяется чистая *L*-аминоксил.

Остающаяся ацил-*D*-аминоксил при нагревании рацемизируется, т. е. переходит опять в смесь ацилированных *D*, *L*-аминоксил, и процесс повторяют сначала. Таким образом, в итоге единственным продуктом является *L*-аминоксил. Оказалось, что для аминоксилы не имеет значения, какую аминоксилу ей гидролизовать, важно лишь строение ацильной части, к которой фермент имеет строгую специфичность. В результате этого одна и та же реакционная колонна с иммобилизованной аминоксилы может быть применена в производстве самых различных *L*-аминоксил.

Иммобилизованный фермент легко готовить, так как он легко адсорбируется на специальной смоле, которую затем помещают в реакционную колонну. Время полуинактивации иммобилизованного фермента в промышленных условиях составляет 65 сут. Когда активность катализатора падает ниже нормы, в колонну добавляют раствор свежего фермента (раз в несколько месяцев), который опять адсорбируется на носителе. Устойчивость полимера носителя высокая; так, на предприятии японской компании «Танабе Сейяку» он используется более 8 лет в одной и той же колонне без замены (I. Chibata, 1978).

§ 3. Получение *L*-аспарагиновой кислоты

Аспарагиновая кислота не принадлежит к числу незаменимых, но производится в мире многими тысячами тонн. Она находит широкое применение в пищевой промышленности для придания (в сочетании с другой аминоксилы — глицином) кондитерским изделиям и напиткам различных оттенков кислого или сладкого вкуса. Аспарагиновую кислоту можно получать с помощью фермента аспартазы. В качестве исходных веществ для ферментативного синтеза используются фумаровая кислота и аммиак — крупнотоннажные продукты органического и неорганического синтеза. Протекающая реакция одностадийна — в присутствии

фермента молекула аммиака присоединяется к фумаровой кислоте по месту двойной связи с образованием оптически активной *L*-аспарагиновой кислоты. В этом процессе впервые в технологической практике были применены иммобилизованные клетки микроорганизма, содержащие фермент в его естественной микробной оболочке. Этот процесс был разработан японской фирмой «Танабе Сейяку» в 1973 г. (I. Chibata, 1976).

Плотный гель с иммобилизованными в нем микробными клетками, содержащими аспартазу, формируют в кубики размерами 2—3 мм, набивают ими колонну объемом 1 м³ и пропускают через нее раствор фумарата аммония. На выходе из колонны *L*-аспарагиновую кислоту кристаллизуют, центрифугируют и промывают холодной водой. Процесс практически полностью автоматизирован и осуществляется в непрерывном режиме. Масштабы производства на фирме «Танабе Сейяку» — 1700 кг чистой *L*-аспарагиновой кислоты в сутки на реактор объемом 1 м³ (I. Chibata, 1980).

§ 4. Получение *L*-яблочной кислоты

Яблочная кислота находит спрос в качестве заменителя лимонной кислоты в продуктах питания и фармацевтических препаратах. Химическим путем (гидролизом ангидрида яблочной кислоты) производят только рацемическую смесь оптических изомеров яблочной кислоты, в то время как оптически активный *L*-изомер, получаемый микробиологическим способом, пока слишком дорог для промышленного производства.

L-яблочную кислоту получают ферментативным путем, так же как и *L*-аспарагиновую кислоту, из фумаровой кислоты. Здесь в качестве катализатора используют иммобилизованные в гель клетки, содержащие фермент фумаразу. В присутствии этого фермента происходит присоединение воды по двойной связи молекулы фумаровой кислоты. В остальном реакция протекает так, как и в случае *L*-аспарагиновой кислоты. В обычных (интактных) клетках время полуинактивации фумаразы составляет 6 сут, в иммобилизованных в полиакриламидный гель — 55 сут, а в иммобилизованных в гель на основе каррагинана — полисахарида из морских водорослей — 160 сут (I. Chibata, 1980).

§ 5. Получение безлактозного молока

Лактоза, или молочный сахар, содержится в достаточно больших количествах в молоке и молочной сыворотке. Этот сахар характеризуется малой сладостью и низкой растворимостью, в его присутствии происходит кристаллизация мороженого и других молочных изделий и продуктов, что является причиной неприятных вкусовых ощущений.

Молекулы лактозы распадаются на глюкозу и галактозу при гидролизе под действием лактазы, или β -галактозидазы. Молоко после такой обработки приобретает новые диетические качества, поскольку определенная часть населения не может употреблять молоко из-за наличия в нем лактозы. Это свойство организма получило название лактазной недостаточности.

Первый промышленный процесс получения безлактозного молока с использованием иммобилизованной лактазы был осуществлен итальянской фирмой «Сентрале дель Латте» в Милане. Получаемое диетическое молоко несколько слаще по сравнению с обычным, поскольку глюкоза более сладкая, чем лактоза, однако это не мешает его употреблению. Стабильность иммобилизованного фермента достаточно высока, и после 50 сут работы он сохраняет 80% первоначальной активности. Завод в Милане производит 10 т безлактозного молока в сутки (W. Magkoní, 1979).

§ 6. Получение сахаров из молочной сыворотки

Молочная сыворотка содержит в своем составе большое количество лактозы — около 5% в жидкой и 75% в высушенной сыворотке. Ферментативный гидролиз лактозы в сыворотке открывает новые возможности получения сахаристых веществ из нетрадиционного сырья, вносит определенный вклад в решение кормовой проблемы и в проблему охраны окружающей среды, поскольку сыворотка большей частью не утилизируется. Первый промышленный процесс гидролиза лактозы в молочной сыворотке с помощью иммобилизованной лактазы был реализован в 1980 г. совместно английской, французской и американской компаниями одновременно в Англии и Франции (L. A. Dohan, 1980).

Перед введением в колонный реактор с иммобилизованным ферментом сыворотку пастеризуют, подвергают ультрафильтрации и пропускают через ионообменник, чем добиваются ее деминерализации. Мощность установки составляет около 1000 л при степени конверсии лактозы 80%. Установка полностью автоматизирована. Получаемые при этом сахара (глюкоза и галактоза) по сладости в полтора раза превышают сладость пищевого сахара в расчете на одинаковые экономические затраты.

По данным итальянской компании «Снам Проджетти», продолжительность работы иммобилизованного фермента в реакторе с молочной сывороткой существенно зависит от качества сыворотки и время полунинактивации фермента изменяется от 60 (при обработке депротеинизованной и деминерализованной сыворотки) до 8 сут (для необработанной кислой сыворотки). В связи с этим в промышленных условиях ежедневно по полчаса производят очистку колонны (с иммобилизованной лактазой) разбавленной уксусной кислотой. Время работы подобной системы в лабораторных условиях составляет около двух лет (W. Magkoní, 1979).

§ 7. Получение 6-аминопенициллановой кислоты

Проведение химического деацилирования бензилпенициллина, обычно являющегося исходным сырьем для получения 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК), представляет трудную задачу из-за наличия в его молекуле чрезвычайно лабильного β -лактамного кольца (см. гл. 3). Поэтому в промышленности до недавнего времени обрабатывали бензилпенициллин бактериальной массой *E. coli*, содержащей фермент пенициллинамидазу, который специфически и без побочных реакций расщеплял именно ту амидную связь, которая необходима для образования 6-АПК (П. С. Ныс, В. К. Швядас и др., 1976).

В результате применения иммобилизованных бактериальных клеток, содержащих пенициллинамидазу, а затем и самой иммобилизованной пенициллинамидазы, удалось значительно повысить продуктивность и экономичность промышленного процесса получения 6-АПК. В 1975 г. процесс получения 6-АПК с использованием иммобилизованной пенициллинамидазы был внедрен в нашей стране. В настоящее время значительная доля 6-АПК в Италии и вся 6-АПК, выпускаемая в СССР, производится с помощью иммобилизованных ферментов (Ю. Э. Бартошевич, 1986).

Итальянская компания использует иммобилизованную пенициллинамидазу, полученную включением фермента в волокна триацетата целлюлозы. При этом эмульсию, образованную при смешивании раствора фермента с раствором триацетата целлюлозы в метиленхлориде, подвергают экструзии в нити. Волокна закрепляют вдоль термостатируемой колонны и пропускают через нее 6%-ный раствор бензилпенициллина до степени конверсии последнего 97% или выше. По данным итальянских ученых, общий выход 6-АПК составляет 85% с чистотой 96% и выше (W. Markoni, 1979).

По технологии компании «Танабе Сейяку», использующей бактериальные клетки, иммобилизованные в полиакриламидный гель (с временем полуинактивации 42 сут при 30°C или 17 сут при 40°C), общий выход 6-АПК составляет около 80% (I. Chibata, 1980). На советском производстве употребляют пенициллинамидазу, иммобилизованную в полиакриламидном геле, модифицированном глутаровым альдегидом (П. С. Ныс, А. И. Кестнер, 1977).

§ 8. Процессы на уровне опытных установок

Перечислим кратко особенности важнейших процессов с применением иммобилизованных ферментов, которые пока разрабатываются на уровне опытных установок. В первую очередь следует упомянуть процесс получения глюкозы из крахмала. Как известно, он состоит из ряда последовательных реакций с участием двух ферментов — α -амилазы и глюкоамилазы. α -Амилаза

атакует крахмал и расщепляет его на отдельные фрагменты (олигосахариды) по беспорядочному типу действия. Глюкоамилаза реагирует с образовавшимися олигосахаридами, отщепляя концевые остатки глюкозы. При этом именно второй фермент применяют в иммобилизованном виде, пропуская частичные гидролизаты крахмала через колонну с иммобилизованной глюкоамилазой. Этот процесс достаточно отработан и обсуждается целесообразность его крупномасштабного применения.

Получение инвертного сахара (почти эквивалентной смеси глюкозы и фруктозы) из пищевого сахара, или сахарозы, производят с помощью фермента инвертазы. Однако в связи с интенсивным развитием промышленного процесса ферментативной изомеризации глюкозы интерес к прикладному применению иммобилизованной инвертазы упал и процесс получения инвертного сахара из сахарозы был осуществлен пока только на опытном уровне.

В СССР проводятся испытания иммобилизованных протеаз для получения белковых гидролизатов определенного состава. Они нужны, в частности, для создания особых рационов для людей, подвергающихся сильным физическим и психическим нагрузкам, — летчикам, спортсменам. Для их питания целесообразно сочетать обычные пищевые продукты с искусственными аминокислотными смесями. Получение белковых гидролизатов отрабатывается на пилотной установке с объемом реактора 100 л, где гидролизу подвергаются пептиды аутолизина, казеина и яичного белка — отходов ряда промышленных производств (В. М. Беликов, 1984).

Создана опытная установка для непрерывного ферментативного получения глюкозы из целлюлозосодержащих отходов промышленности и сельского хозяйства (М. Л. Рабинович, А. А. Клёсов, 1986). В колонну, содержащую целлюлозу, вводится раствор ферментов целлюлаз, способных гидролизовать целлюлозу вплоть до глюкозы. Ферменты при определенных условиях настолько прочно адсорбируются на целлюлозе, что их можно рассматривать как иммобилизованные. Вместе с тем они осуществляют эффективный гидролиз своего носителя и образующийся глюкозный сироп выносится потоком воды из колонны. В колонну непрерывно подаются новые порции целлюлозы, которые также подвергаются гидролизу, и т. д. В итоге однократно введенный в колонну фермент может несколько месяцев непрерывно гидролизовать целлюлозу при многократной загрузке ее в реактор. Этим открываются возможности экономически эффективного использования возобновляемого растительного сырья для получения глюкозы, которая затем может быть превращена в этанол, фруктозу, кормовой белок и другие продукты микробиологического синтеза. Приведенные примеры показывают, что применение иммобилизованных ферментов в промышленности превращается в достаточно мощную отрасль, которая уже сейчас достигла уровня ежегодного мирового производства продукции в сотни тысяч и миллионы тонн.

ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ПРЕВРАЩЕНИЕ
ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В САХАРА

Целлюлоза построена из звеньев *D*-глюкозы, которые соединены 1-4-β-глюкозидными связями (по типу «голова к хвосту») в длинные, вплоть до тысяч глюкозных единиц, цепи, уложенные в плотную упаковку со своеобразной кристаллической структурой. Прочность упаковки обусловлена главным образом тем, что цепи поперечно «прошиты» водородными связями, которые по отдельности относительно слабы, но в совокупности с тысячами других образуют, можно сказать, монолитный блок. В результате целлюлоза не только нерастворима в воде, но ее кристаллические участки непроницаемы практически для любых химических агентов, в том числе и для сильных кислот. Но там, где плотная упаковка глюкозных цепей нарушена (на поверхности целлюлозы, в местах поворота цепей, а также после специальной обработки целлюлозы, например с помощью интенсивного измельчения), образуются «аморфные области», куда могут проникать и растворители, и механические агенты. Это свойство используется при промышленном получении так называемой микрокристаллической целлюлозы, которая широко применяется для специальных химических целей. Природную целлюлозу обрабатывают кислотой, аморфные участки легко расщепляются и уходят в раствор, оставляя мелкие микрокристаллиты, чрезвычайно стойкие к химическим реагентам.

§ 1. Целлюлолитические микроорганизмы и ферменты

В природе имеются так называемые целлюлолитические микроорганизмы, содержащие набор ферментов — целлюлаз, способных к расщеплению не только аморфной, но и кристаллической целлюлозы до глюкозы. Попадая на поверхность целлюлозосодержащего материала и прикрепляясь к ней, микроорганизм выделяет целлюлазы, под действием которых субстрат целлюлаза в непосредственной близости от грибка-паразита расщепляется до

конечного продукта — глюкозы. Микроорганизм поглощает глюкозу в качестве основного продукта питания, размножается, растет, захватывая все большие участки поверхности, выбрасывает все новые и новые порции ферментов, пока не истощится доступная целлюлоза.

Однако эти процессы протекают весьма медленно. Для того чтобы пень в лесу полностью сгнил, нужны годы. Если же отделить от микроорганизма ферменты целлюлазы, сконцентрировать их и добавить к целлюлозе, процесс значительно ускорится. При этом образующаяся глюкоза не потребляется грибами, а накапливается в реакционной смеси. Кроме того, если в качестве субстрата использовать не чистую целлюлозу, а целлюлозосодержащие отходы промышленности или сельского хозяйства, то можно решить и еще одну важную проблему — утилизацию отходов. Полученная глюкоза в зависимости от ее чистоты и экономической эффективности процесса может найти применение в медицине, пищевой промышленности, тонкой химической технологии или технической микробиологии. Глюкозу, как известно, можно сбраживать в этанол и затем употреблять как «жидкое топливо» в качестве заменителя части нефтепродуктов. Наконец, дегидратация этанола дает этилен — основу современной «большей химии».

Целлюлоза на нашей планете — самое «крупнотоннажное» из всех возобновляемых видов сырья. Ежегодный естественный прирост целлюлозы составляет около 100 млрд. т (Н. Н. Семенов, 1973). Использование человеком части этого сырья приводит к накоплению значительного количества целлюлозосодержащих отходов. Если даже малую долю этих отходов превращать ферментативным путем в полезные продукты, это даст ощутимый (и возобновляемый!) источник пищевых углеводов и заменителей нефти. Поэтому данной проблемой в последние годы столь упорно занимаются и исследователи, и технологи всего мира.

§ 2. Механизм действия целлюлаз

По месту атаки и способу действия ферменты, разрушающие целлюлозу, делятся на четыре группы: первую группу составляют эндоферменты, две другие — экзоферменты и четвертую — ферменты, расщепляющие образовавшие небольшие фрагменты целлюлозы до глюкозы.

Напомним, что приставки «эндо» или «экзо» обычно вводятся в названия ферментов, атакующих полимерные субстраты, чтобы пояснить, какую часть полимера — большую или малую — отщепляет фермент. Если фермент предпочтительно действует на химическую связь, удаленную от концов длинной полимерной молекулы, то это фермент эндодействия, а если на концевые группы, то экзодействия.

Деградация полимерных субстратов в природе происходит, как правило, под действием полиферментных комплексов, в

состав которых входят и эндо-, и экзоферменты. Их совместное действие позволяет с оптимальной эффективностью превращать полимер в мономерные единицы, которые затем служат строительными блоками для создания новых химических веществ, необходимых для жизнедеятельности организмов. В этом суть круговорота веществ в живой природе.

Первыми в процесс деградации целлюлозы вступают эндоглюканызы, поскольку молекула природной целлюлозы состоит из нескольких тысяч мономерных глюкозных единиц и количество концевых глюкозных остатков в исходном полимере слишком мало (по сравнению с числом «срединных» глюкозильных связей), чтобы действие экзоферментов было сколько-нибудь заметно на начальных этапах реакции. Однако каждая удавшаяся атака эндоглюканызы приводит к разрыву полимерной цепи и к соответствующему образованию двух новых концов в укороченной молекуле целлюлозы, которые в свою очередь могут атаковываться экзоферментами. Иначе говоря, роль экзоферментов и скорость их действия прогрессивно возрастают по мере деградации целлюлозы эндоферментами.

Экзоферменты, действующие на частично расщепленную целлюлозу, представлены в целлюлозных комплексах двумя видами — одни отщепляют от концов сразу конечный продукт гидролиза целлюлозы — глюкозу, другие, из-за специфики строения активного центра, — целлобиозу — димер глюкозы. Первый тип экзоферментов называется экзоглюкозидазой, второй — экзоцеллобиогидролазой. Наконец, целлобиоза расщепляется пополам, образуя две молекулы глюкозы под действием последнего фермента целлюлазного комплекса — целлобиазы. В целом ферментативное превращение целлюлозы в глюкозу может быть представлено в следующем виде (рис. 4).

Итак, для того чтобы в реакционной системе появилась глюкоза — конечный продукт ферментативного действия на целлюлозу, реакция должна пройти через несколько этапов, или стадий, включающих частичную деградацию исходного субстра-

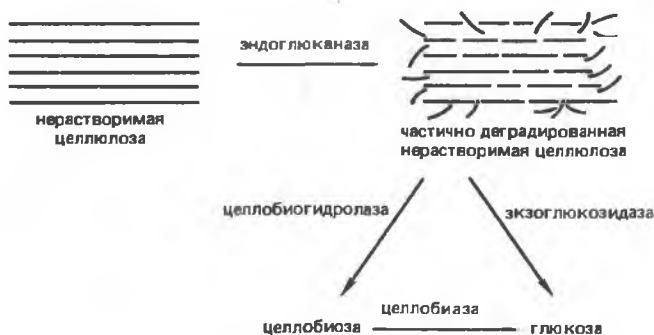


Рис. 4. Схема ферментативного гидролиза целлюлозы

та. На это требуется определенное время, которое зависит, в частности, от состава и количества ферментов, добавляемых к целлюлозе, состояния исходного субстрата (степени его полимеризации, степени кристалличности и т. д.), количества исходной целлюлозы, условий проведения реакции и т. д. Типичная зависимость концентрации образующейся глюкозы от времени опыта имеет вид кривой (рис. 5). После некоторого индукционного периода эта кривая переходит в прямую, которая соответствует так называемому стационарному режиму реакции. Такой режим может продолжаться довольно долго, пока исходная целлюлоза не превратится в заметной степени в конечный продукт. Тогда скорость образования глюкозы постепенно замедлится вплоть до полного прекращения реакции.

Если прямолинейный участок кривой продолжить до пересечения с осью времени, то на последней обозначится отрезок, который называется лаг-периодом реакции. Он характеризует начальную задержку образования конечного продукта, т. е. глюкозы. Как показывают расчеты, эта величина непосредственно связана с активностью самого «быстрого» фермента в полиферментной системе. Стационарная скорость образования глюкозы, которая соответствует прямолинейному участку, определяется активностью самого «медленного» фермента в полиферментной цепи. Таким образом, изучая кинетику (т. е. временную зависимость) накопления глюкозы в ходе ферментативного превращения целлюлозы, можно сделать вывод, какой фермент в целлюлазном комплексе «тормозит» весь процесс.

Например, если специально выделить в чистом виде какой-либо целлюлолитический фермент, добавить его в исходный целлюлазный комплекс и проверить, как изменились при этом лаг-период и стационарная скорость реакции, то следует ожидать одного из двух противоположных эффектов. Если возрастает стационарная скорость, а лаг-период остается неизменным, то добавляемый фермент участвует в медленной стадии гидролиза целлюлозы и лимитирует общую скорость реакции. Если уменьшится лаг-период при неизменной стационарной скорости, то фермент катализирует быструю стадию гидролиза и не лимити-

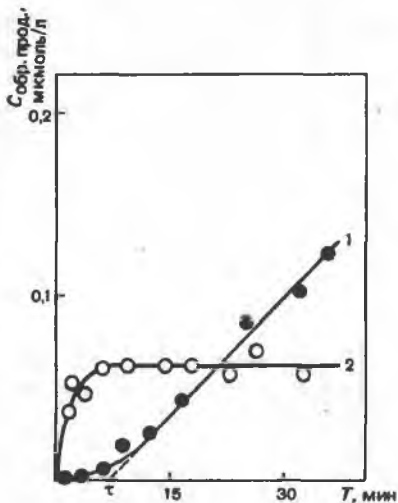


Рис. 5. Типичная зависимость образования конечного продукта — глюкозы, и промежуточного продукта — целлобиозы, в ходе ферментативного гидролиза целлюлозы: τ — лаг-период образования глюкозы; 1 — глюкоза; 2 — целлобиоза

рует общую скорость реакции. Естественно, возможны и промежуточные случаи. Таким образом можно создавать и композиционные целлюлозные комплексы, сбалансированные по составу, где не будет явных «тормозящих» путей реакции.

Обычно при изучении кинетики ферментативного превращения целлюлозы регистрируют образование не только глюкозы, но и целлобиозы — промежуточного продукта реакции. Как видно из рис. 9, образование целлобиозы происходит с «выбросом», затем скорость получения целлобиозы становится равной скорости ее распада и далее, к концу реакции, она вся превращается в глюкозу.

Итак, у исследователей появляется дополнительная информация о протекании процесса, исходными данными для которой служат лаг-период образования глюкозы, стационарная концентрация промежуточной целлобиозы и кинетика ее превращения в глюкозу на последних стадиях реакции. С помощью подобных данных и была выявлена схема гидролиза целлюлозы, определена роль отдельных компонентов целлюлазного комплекса в ходе реакции и вычислены скорости стадий превращения целлюлозы под действием нескольких десятков целлюлазных комплексов из самых различных целлюлозоразрушающих микроорганизмов.

При этом выяснилась, пожалуй, самая главная особенность ферментативного гидролиза целлюлозы — механизм гидролиза, или способ действия ферментов на целлюлозу, оказался принципиально одинаков для всех изученных целлюлазных комплексов, независимо от их состава и происхождения. Иначе говоря, из какого бы микроорганизма, грибка или бактерии (и независимо от его вида) не выделяли бы целлюлолитические ферменты, во всех случаях наблюдаются одни и те же зависимости образования продуктов реакции — глюкозы и целлобиозы. При вариации целлюлазных комплексов на опыте будут изменяться лаг-периоды, стационарные скорости реакции, стационарные концентрации промежуточной целлобиозы и т. д., но все эти величины каждый раз находятся в строгом соответствии с тем, какие ферменты из четырех перечисленных целлюлаз и в каких количествах входят в состав целлюлазного комплекса.

Более того, оказалось, что если выделять целлюлолитические ферменты из целлюлазных комплексов, полученных из различных микроорганизмов, смешивать друг с другом в разных пропорциях, то в каждом случае на основании разработанной кинетической теории полиферментных целлюлазных систем количественно удастся предсказать, какой вид будут иметь кривые накопления продуктов реакции, следовательно, предсказать выход реакции в любой момент времени. В этом и заключается практическое предназначение ферментативной кинетики (и химической кинетики в целом) — дать возможность управлять процессом, исходя из взаимосвязи между структурой (или составом) реагирующих веществ и их реакционной способностью.

§ 3. Влияние структуры целлюлозы на эффективность ее гидролиза

Все закономерности, о которых только что шла речь, относятся к аморфной целлюлозе. Природная целлюлоза, как правило, в значительной степени имеет кристаллическую структуру. Для того чтобы превратить ее в аморфную, необходимо разрушить весьма прочную упорядоченную укладку ее полимерных цепей, например, с помощью интенсивного измельчения на вибромельнице, обработкой фосфорной кислотой или растворением в особых составах. Все эти методы технологически разрешимы.

Но прежде чем осваивать способы перевода кристаллической целлюлозы в аморфную, следует выяснить, как влияет кристалличность целлюлозы на эффективность ее ферментативного гидролиза? Эта задача была также решена и к тому же в более комплексном виде. Вопрос был поставлен следующим образом: как воздействуют основные структурные факторы целлюлозы — ее удельная поверхность (т. е. поверхность, приходящаяся на 1 г материала), размеры частиц, степень полимеризации и степень кристалличности — на скорость ферментативного гидролиза?

Для опытов было взято несколько десятков образцов целлюлозы, в том числе и природной. Измерены все соответствующие структурные параметры, а также скорость ферментативного гидролиза, и полученные величины были сопоставлены. Так как происхождение и методы предварительной обработки образцов целлюлозы во всех случаях различались, их структурные факторы варьировались в довольно широких пределах. Например, у хлопка степень полимеризации была максимальной — 1200, у хлопка, измельченного на вибромельнице, ниже — от 900 до 300 (в зависимости от времени измельчения), у образцов целлюлозы, подвергнутых радиационной обработке с помощью изотопов кобальт-60 или на ускорителях электронов, минимальной — до 20. Выяснилось, что степень полимеризации и средний размер частиц исходной целлюлозы не влияют на эффективность ее ферментативного гидролиза (рис. 6). Так как целлюлоза — пористый материал с весьма развитой «внутренней» поверхностью, то именно эта поверхность, а не средний «внешний» размер частиц определяет доступность целлюлозы действию ферментов. На рис. 6 скорость гидролиза целлюлозы сопоставлена с ее удельной поверхностью, которая определялась путем адсорбции вплоть до заполнения поверхности ферментами, размеры которых заранее известны. Между этими двумя величинами существует прямая зависимость. Кристалличность целлюлозы, которую измеряют простыми методами рентгеноструктурного анализа (определение занимает всего несколько минут), также линейно связана со скоростью ферментативного гидролиза, причем чем ниже степень кристалличности субстрата, тем выше скорость действия ферментов. Тот факт, что степень кристалличности целлюлозы и ее удельная поверхность взаимосвязаны (поскольку

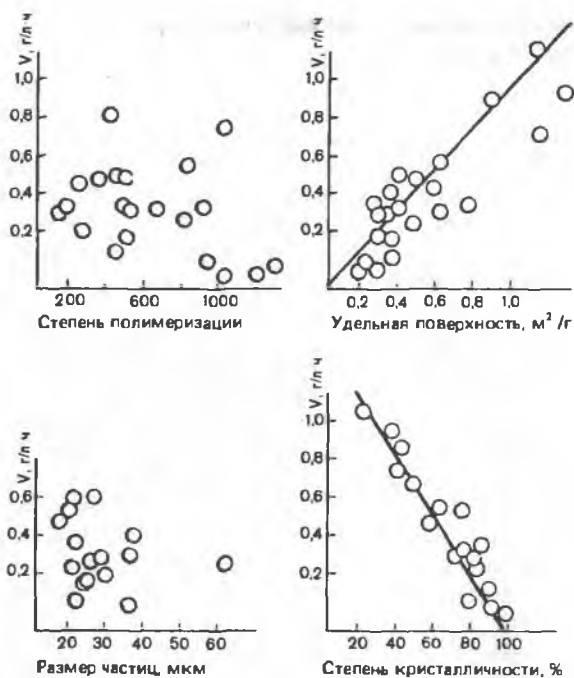


Рис. 6. Влияние основных структурных факторов целлюлозы на эффективность (скорость) ее ферментативного гидролиза:

ось координат — скорость реакции, приведена в граммах глюкозы, которая образуется в одном литре раствора за 1 ч

обе они определяют скорость ферментативного гидролиза целлюлозы), не удивителен. Ясно, что чем выше степень кристалличности или чем плотнее упаковка полимерных цепей целлюлозы, тем менее доступна ферментам поверхность субстрата. Напротив, при разрушении кристаллической структуры внутренние цепи целлюлозы раскрываются и ее доступная поверхность возрастает.

Следовательно, практически для любого образца целлюлозы можно предсказать скорость ее ферментативного гидролиза. Надо только предварительно измерить удельную поверхность целлюлозы или степень ее кристалличности. Это в свою очередь позволяет стандартизировать целлюлозосодержащие материалы в промышленных условиях, что также представляет собой немаловажную задачу. Итак, существует связь между, казалось бы, сугубо научной задачей о зависимости реакционной способности вещества от его структуры, с одной стороны, и практической задачей — технологией ферментативного получения глюкозы из целлюлозы — с другой.

§ 4. Адсорбция целлюлаз на целлюлозе и ее роль в катализе

Еще в начале 50-х годов, на раннем этапе изучения ферментов целлюлазного комплекса, была обнаружена особенность их действия. Она заключалась в том, что растворимые производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлоза) или аморфная целлюлоза легко гидролизуются под действием целлюлазных комплексов из любых целлюлозоразрушающих организмов, но способность гидролизовать кристаллическую целлюлозу обладали лишь немногие целлюлазы. Более того, наблюдали, как одни целлюлазные комплексы с очень высокой активностью по отношению к растворимой целлюлозе вовсе не действовали на целлюлозу кристаллическую, в то время как другие целлюлазы, имеющие гораздо меньшую активность гидролиза растворимой целлюлозы, довольно эффективно воздействовали на кристаллическую целлюлозу. Иначе говоря, не отмечалось никакой взаимосвязи между действием целлюлаз на растворимую и нерастворимую целлюлозу. Причина этого оставалась неясной.

На первых порах противоречие пытались разрешить с помощью гипотезы, что некоторые целлюлазные микроорганизмы могут синтезировать и выбрасывать в окружающую среду особый фермент или некий биологический «фактор» неферментной природы, который каким-то образом ослабляет связь целлюлозных цепей друг с другом, «растаскивает» эти цепи, превращая кристаллические участки целлюлозы в аморфные. Этот фактор получил условное название «С₁-фермент», где С — первая буква английского слова «целлюлоза», а индекс «1» означает, что данный фактор действует на целлюлозу первым, аморфизируя ее и таким образом подготавливая для действия остальных ферментов целлюлазного комплекса, или «С_x-ферментов» (здесь индекс «x» обозначал, что природа остальных ферментов и их число пока неизвестны).

Гипотеза на первых порах казалась привлекательной, поскольку она давала направление для поиска эффективных целлюлазных комплексов. Достаточно было бы «приучить» организм вырабатывать С₁-фермент и разработать метод его идентификации. Однако найти С₁-фермент не удалось, несмотря на использование многих физико-химических и биохимических методов.

Встал вопрос: что если «С₁-фактор» не индивидуальное вещество, не особый фермент, а просто неизвестное пока свойство уже известных ферментов? Тогда становится понятным, почему все использованные методы разделения и очистки целлюлазных комплексов не приводят к обнаружению «С₁-фермента», а неизменно дают уже хорошо известный набор целлюлаз. И действительно, исследования показали, что одни и те же целлюлазные ферменты из различных микроорганизмов исклю-

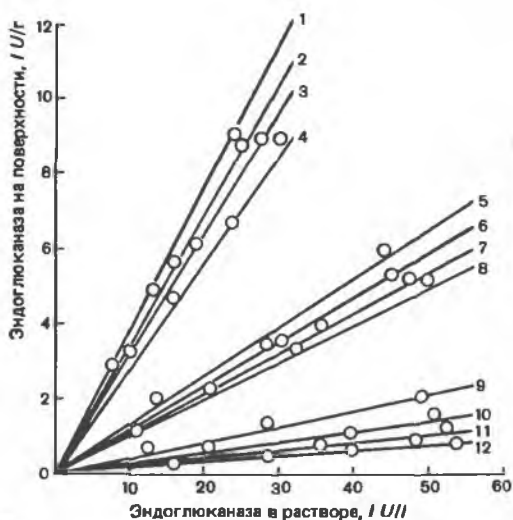


Рис. 7. Адсорбция эндоглюканаза (и их множественных форм) из различных микробных источников на целлюлозе:

1 — *Trichoderma viride*; 2 — *T. reesei*; 3 — *T. longibrachiatum*; 4 — *Geotrichum candidum*; 5 — *Aspergillus terreus*; 6 — *T. koningii*; 7 — *T. lignorum*; 8 — *Myrothecium verrucaria*; 9 — *Rapidade*; 10 — *Asp. niger*; 11 — *T. viride*; 12 — *Asp. foetidus*

тем выше его поверхностная концентрация, тем большее количество фермента непосредственно участвует в гидролизе целлюлозы и тем больше выход продукта гидролиза.

На рис. 8 представлены примеры кривых накопления глюкозы при ферментативном гидролизе микрокристаллической целлюлозы под действием 11 целлюлазных препаратов из различных микроорганизмов. Здесь следует подчеркнуть, что во всех случаях были взяты одинаковые количества ферментов. При сопоставлении рис. 7 и 8 видно, чем прочнее ферменты адсорбируются на кристаллической целлюлозе, тем выше скорость реакции и больше выход глюкозы при любой продолжительности реакции. Более того, для целлюлазных препаратов, которые слабо адсорбируются на целлюлозе, степень гидролиза целлюлозы не превышает 5—7% (нижняя кривая на рис. 8) и примерно соответствует доле аморфной целлюлозы в субстрате. Напротив, для целлюлаз, которые способны прочно адсорбироваться, происходит практически полный гидролиз кристаллической целлюлозы (верхняя кривая на рис. 8).

Итак, «С₁-фактор» — это не особый фермент или другая индивидуальная биологическая субстанция, а скорее свойство целлюлаз адсорбироваться на целлюлозе, которое выражено у ферментов в большей или меньшей степени.

чительно различаются по способности адсорбироваться на целлюлозе, причем эти различия достигают сотен и тысяч раз. Иллюстрация этого положения для некоторых препаратов приведена на рис. 7 (ср. верхнюю и нижнюю линии графика). Ясно, что для создания одной и той же поверхностной концентрации фермента необходимо во втором случае взять ферментного препарата в десятки и сотни раз больше, чем в первом. В реальных условиях это практически недостижимо. И поэтому чем выше способность фермента адсорбироваться на целлюлозе,

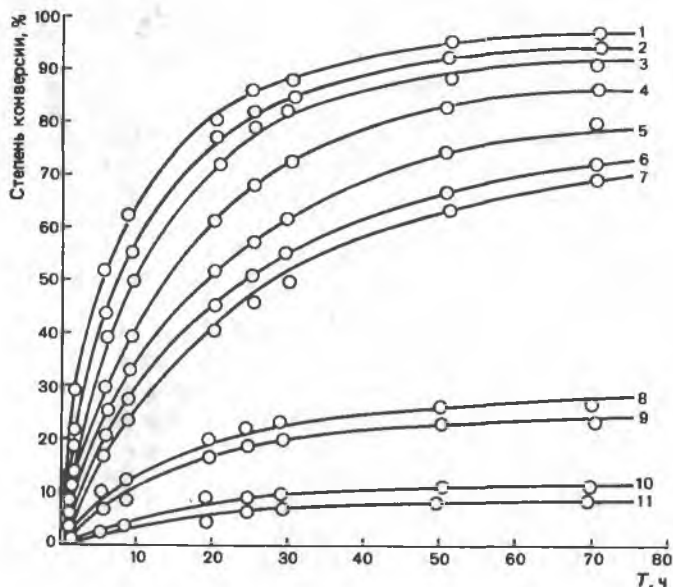


Рис. 8. Степень превращения (глубина гидролиза) микрокристаллической целлюлозы в глюкозу под действием одинакового количества целлюлазных комплексов из различных микробных источников:

1 — *T. reesei*; 2 — *T. viride*; 3 — *T. longibrachiatum*; 4 — *G. candidum*; 5 — *T. lignorum*; 6 — *T. koningii*; 7 — *Asp. terreus*;
 8 — *M. verrucaria*; 9 — *Rapidase*; 10 — *T. viride*; 11 — *Asp. niger*,
Asp. foetidus

Наряду с высокой каталитической активностью ферментов это свойство является решающим для эффективной деградации целлюлозы.

§ 5. Основы биотехнологии ферментативного гидролиза целлюлозы

Выявленные закономерности адсорбции целлюлаз на целлюлозе и поведения адсорбированных ферментов позволили сформулировать требования к конструкции реактора для ферментативного гидролиза целлюлозы и проверить их на практике. В результате были выработаны принципы создания противоточных ферментных реакторов для непрерывного гидролиза целлюлозы. Особенности действия подобных реакторов следующие. 1. Рабочая зона колонного реактора плотно набивается целлюлозой, этим достигаются ее более высокие концентрации (до 40—60%) и объемная скорость гидролиза, а отсюда и больший выход продукта реакции — глюкозы, чем в реакторах другого типа, например с перемешиванием. 2. Целлюлазы удерживаются на целлюлозе в реакторе за счет адсорбции по принципу аффинной хроматографии. Это позволяет обойтись без специальных мем-

бран, удерживающих ферменты в реакторе, что удешевляет процесс. 3. Можно использовать культуральные жидкости с достаточно низким содержанием целлюлаз, так как эти ферменты концентрируются в таком реакторе за счет адсорбции. 4. Протеазы и другие ферменты, инактивирующие целлюлазы, немедленно выводятся из реактора еще до начала гидролиза целлюлозы, поскольку они, как правило, адсорбируются на целлюлозе значительно хуже целлюлаз. 5. Процесс ферментативного гидролиза идет непрерывно за счет постоянной подпитки свежей целлюлозой и многократного употребления целлюлаз в ходе реакции путем регенерации ферментов.

Адсорбция целлюлаз на целлюлозосодержащем сырье для ферментов из нескольких микробных источников оказалась настолько прочна (при соответствующей оптимизации условий адсорбции), что позволила применять противоточный реактор колонного типа для масштабирования процесса. При этом максимальная концентрация глюкозы на выходе из реактора составляла 12—15%, но объемная продуктивность была довольно низкой в результате ингибирования продуктами гидролиза (глюкозой и целлобиозой) и не превышала 1,0 г/л·ч. Более высокая продуктивность, до 3 г/л·ч, наблюдалась при концентрации 2—5% глюкозы в сиропе. Математическое моделирование действия данного реактора показывает, что его продуктивность может достичь 7—9 г/л·ч, в то время как реактора перемешивания — только 1,5—1,6 г/л·ч. Если целлюлозу полностью перевести в аморфное состояние, то производительность противоточного колонного реактора, как показывают расчеты, может достичь 12—15 г/л·ч (реактора перемешивания — 3—4 г/л·ч). Если, наконец, повысить содержание аморфной целлюлозы в колонном реакторе до 40%, то его производительность может достичь 18—20 г/л·ч (А. В. Гусakov, А. П. Синицын, 1985). В принципе эти показатели могут быть еще более увеличены при переходе к целлюлазам, менее подверженным ингибированию продуктами гидролиза целлюлозы, а также к более термостабильным целлюлазам, позволяющим дополнительно ускорить процесс при более высокой температуре (60—70°) и перейти к условиям гидролиза с меньшей вероятностью инфицирования посторонней микрофлорой.

Однако продуктивность гидролиза даже на уровне 5 г/л·ч в технологических условиях означает, что промышленный реактор объемом 200 куб. м будет производить 24 т сахара в сутки. Батарея из 10 таких реакторов даст 80 тыс. т сахара, или 40 млн. л спирта в год. Эти цифры можно рассматривать как весьма условные оценки потенциала будущей технологии (А. А. Клёсов, 1985). В перспективе, если окажутся успешными попытки найти более «технологичный» продуцент целлюлаз или «сконструировать» его, например, методами генетической инженерии, эти показатели могут быть увеличены еще в 5—10 раз.

БИОКАТАЛИЗ В ТОНКОМ
ОРГАНИЧЕСКОМ СИНТЕЗЕ

Одним из ярких примеров применения биокатализа является его использование в тонком органическом синтезе. Уникальная специфичность и стереоспецифичность действия ферментов, возможность проведения процессов в «мягких» условиях, протекание реакций с высокой скоростью при использовании незначительных количеств катализатора, практическое отсутствие побочных реакций — все это делает биокаталитические процессы чрезвычайно привлекательными и перспективными с технологической точки зрения. На сегодняшний день перечисленные преимущества технологических процессов с использованием ферментов особенно наглядны при создании лекарственных препаратов (антибиотики, стероиды, простагландины и т. д.), получении энантиомеров аминокислот и ряда других органических соединений, пептидов, производстве реагентов для научных исследований и меченых веществ.

Для осуществления биокаталитического процесса необходимо решить целый комплекс научно-исследовательских и технологических задач:

1. Провести поиск фермента необходимой специфичности или стереоспецифичности.
2. Изучить основные свойства исходных веществ и продуктов реакций и их возможные превращения.
3. Выявить факторы, определяющие эффективность биокаталитического превращения.
4. Создать на основе фермента подходящий катализатор для технологического процесса.
5. Провести аппаратурное оформление масштабного биотехнологического процесса.

Вероятно, в связи с тем, что решение всех перечисленных задач требует комплексного подхода и широкого взаимодействия представителей различных специальностей, на сегодняшний день имеется ограниченное число реализованных биокаталитических процессов в области тонкого органического синтеза. Достоинства существующих биокаталитических процессов, однако, настолько очевидны и велики, что нет никаких сомнений в скором внедрении ряда новых технологий с использованием ферментов.

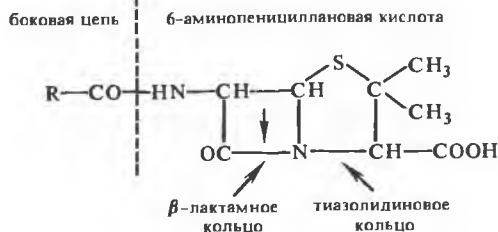
Наибольшее применение в практике пока нашли гидролитические ферменты. Это обусловлено несколькими причинами. Во-первых, гидролитические реакции в водной среде, как правило, полностью термодинамически сдвинуты в сторону образования продуктов; кинетика реакций ферментативного гидролиза монотонна и легко поддается количественному описанию вплоть до глубоких степеней превращения. Во-вторых, гидролазы являются, пожалуй, наиболее хорошо изученными, а следовательно, и наиболее легко управляемыми ферментами. Гидролитические ферментативные реакции, проводимые в водном растворе, приходится оптимизировать главным образом по двум параметрам — концентрации расщепляемого субстрата и активности фермента.

Гидролазы энантиоселективны, избирательны к типу катализируемой реакции и часто проявляют широкую субстратную специфичность в реакции данного типа. Хотя для них характерно ингибирование продуктами реакции и даже подавление ферментативной активности при высоких концентрациях субстрата, эти факторы чаще всего не ограничивают использования ферментов этого класса. Так как микроорганизмы содержат значительные количества различных гидролаз, ферменты этого класса весьма доступны и могут быть получены в необходимых количествах.

§ 1. Ферментативная модификация β -лактамных антибиотиков

Особенно ярко возможности и достоинства гидролаз были продемонстрированы при модификации самых эффективных и широко применяемых антибиотиков — пенициллинов и цефалоспоринов.

В своей лекции, прочитанной по случаю присуждения Нобелевской премии, Р. Б. Вудвард назвал пенициллины вызовом химикам-синтетикам XX в. Действительно, синтез этих соединений представляет собой чрезвычайно сложную задачу. Получение новых, более эффективных аналогов пенициллина связано с изменением его боковой цепи при сохранении целостности остальной части, так называемого «ядра» антибиотика — 6-аминопенициллановой кислоты:



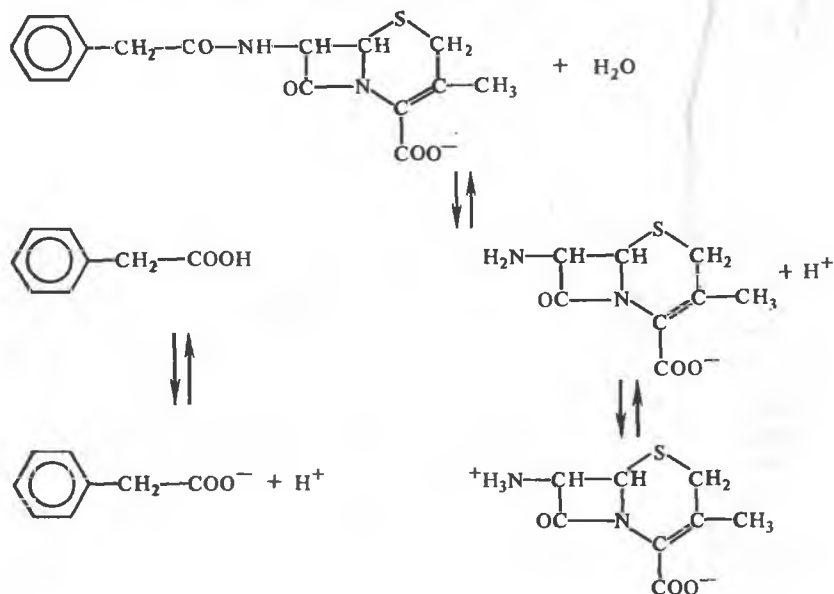
Поскольку масштабный химический синтез таких соединений в настоящее время невозможен, самым простым путем проведения необходимого превращения является отщепление боковой цепи биосинтетического пенициллина, выделение 6-аминопенициллановой кислоты и последующее ацилирование ее аминогруппы с получением «полусинтетического» аналога. Следует отметить, однако, что такая модификация представляет собой сложную задачу, поскольку при удалении боковой цепи необходимо расщепить весьма устойчивую амидную связь и сохранить значительно более лабильную связь в β -лактамном кольце пенициллина (в формуле показана красной стрелкой); ее разрушение ведет к необратимой инактивации антибиотика. Провести такую химическую реакцию в обычных условиях не удастся, так как при щелочном гидролизе пенициллинов выход 6-аминопенициллановой кислоты не превышает 1%. Поэтому для удаления бокового радикала в молекуле антибиотика химическим путем необходим специальный подход, например получение его иминоэфира (что возможно при предварительной защите карбоксильной группы) и последующий гидролиз иминоэфира при низкой температуре (от -25 до -40°C). Такой процесс многостадийный, энергоемкий и требует использования больших объемов органических растворителей.

Подобное избирательное превращение может быть проведено в одну стадию в самых обычных условиях при 10 — 40°C в водной среде с использованием специфического фермента — пенициллинамидазы (см. гл. 1).

Переход к биокаталитической технологии существенно упрощает процесс, позволяет значительно поднять выход целевого продукта и увеличить объем производства. Внедрение масштабного метода производства 6-аминопенициллановой кислоты привело к существенному увеличению выпуска полусинтетических пенициллинов и снижению их себестоимости.

С использованием иммобилизованной пенициллинамидазы связан еще один процесс инженерной энзимологии — получение 7-аминодезацетоксицефалоспороановой кислоты, ключевого соединения для синтеза новых цефалоспоринов. Он также основан на свойстве пенициллинамидазы катализировать гидролиз весьма устойчивой связи в молекуле исходного соединения

7-фенилацетамидодезацетоксицефалоспоровой кислоты при сохранении целостности лабильного β -лактамного кольца:



§ 2. Ферментативное превращение рацематов в энантиомеры

Примером практического использования биокатализа служит ферментативное превращение рацематов в энантиомеры аминокислот (см. гл. 1). Поскольку скорости ферментативного расщепления энантиомеров исходного соединения, как правило, сильно различаются (например, гидролиз *L*-формы *N*-ацетилметионина ацилазой аминокислот в 10 000 раз превышает скорость гидролиза *D*-формы субстрата), это позволяет получить энантиомеры аминокислот чрезвычайно высокой оптической чистоты.

При помощи ацилаз можно разделить рацемические смеси большинства аминокислот. Ацилазы аминокислот — широко распространенные ферменты, они содержатся в тканях животных (хорошо изучена и широко используется ацилаза из почек свиньи), у растений и микроорганизмов. Ферменты из различных источников различаются по своей субстратной специфичности, обнаружен даже фермент, избирательно гидролизующий *N*-ацетил-*D*-аминокислоты. Известен фермент, гидролизующий *N*- ϵ -ациллизин.

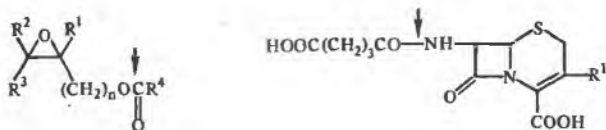
Разделять рацемические смеси аминокислот можно, используя не только ацилазы, но также и ряд протеолитических

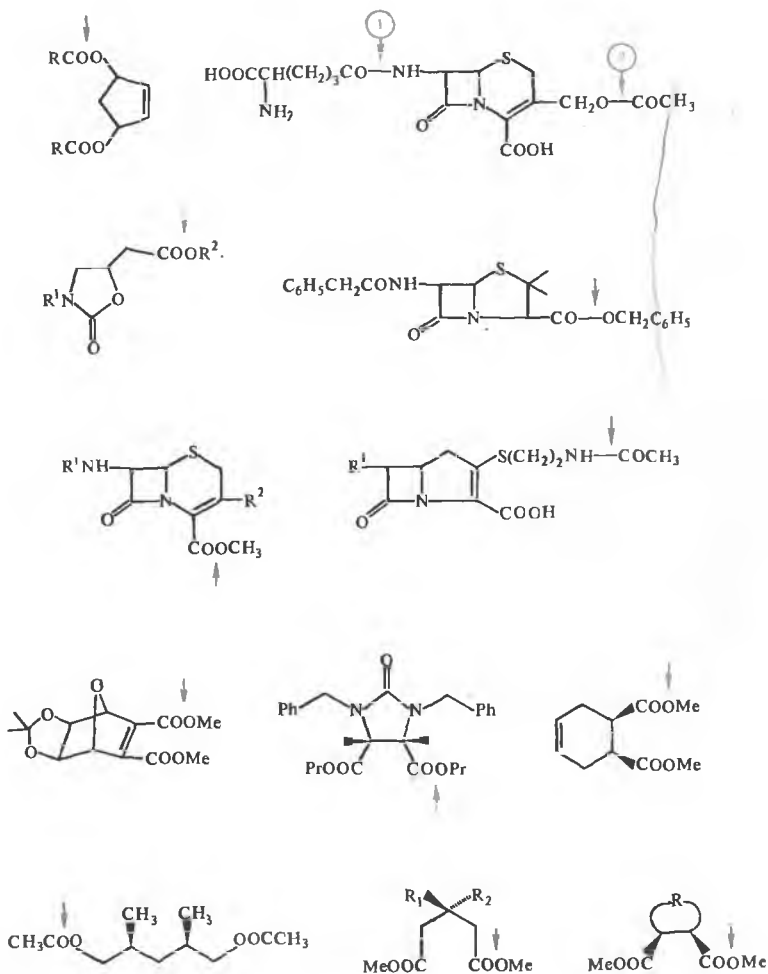
ферментов, обладающих высокой стереоспецифичностью в реакции гидролиза сложных эфиров аминокислот. И в этом случае соотношение скоростей гидролиза *L*- и *D*-формы исходного субстрата может составлять десятки тысяч раз. В принципе возможно получение энантиомеров аминокислот из рацемических смесей и при помощи энантиоселективного ферментативного декарбоксилирования, хотя в результате подобной реакции теряется половина исходного вещества. При использовании оксидаз *L*- или *D*-аминокислот из рацемата можно получить α -кетокислоту и *D*- или *L*-аминокислоту.

К перспективному способу получения оптически чистых аминокислот относится энантиоселективное ферментативное превращение в аминокислоты ряда циклических производных, химический синтез рацематов которых представляет собой более легкую задачу, чем получение рацемата самой аминокислоты. К таким удобным для модификации циклическим соединениям следует отнести α -аминокапролактам, 5-замещенные гидантоины и 2-амино- Δ^2 -тиазолин-4-карбоновую кислоту. При помощи α -аминокапролактамагидролазы *L*-изомер α -аминокапролактама может быть превращен в *L*-лизин. Остающийся *D*- α -аминокапролактама можно подвергнуть рацемизации либо под действием *D*- α -аминокапролактамацемазы, либо химически возвращать в процесс. Указанные стадии могут быть оформлены в эффективный метод получения *L*-лизина.

Важным путем синтеза *D*-(-)- α -аминофенилуксусной кислоты, необходимой для производства β -лактамов антибиотиков, является использование гидантоиназы (дигидропиримидиназы), катализирующей превращение 5-фенилгидантоина в *N*-карбамоил-*D*-(-)- α -аминофенилуксусную кислоту, которая в дальнейшем либо химически, либо при помощи специфического фермента превращается в необходимую *D*-аминокислоту. Использованию гидантоиназы в технологическом процессе способствует спонтанная рацемизация исходного 5-фенилгидантоина. Так, в условиях действия гидантоиназы (рН 8,5, 30°C, 0,25%-ный раствор субстрата) время полурацемизации составляет всего 19 мин. 2-Амино- Δ^2 -тиазолин-4-карбоновая кислота при помощи неохарактеризованной пока ферментной системы (или отдельного фермента) может быть превращена в *L*-цистеин.

Подобно тому как аминокислазы и некоторые протеазы используются для получения энантиомеров аминокислот, многие другие гидролитические ферменты могут идти на получение различных оптических изомеров сложных органических соединений. Ниже приведены некоторые из этих соединений:





§ 3. Синтез с использованием гидролаз

Очень часто интерес представляют не гидролитические, а обратные им синтетические реакции сложных веществ из более простых исходных соединений, например синтез новых пенициллинов и цефалоспоринов из их ядер и подходящих карбоновых кислот, конденсация аминокислот с образованием пептидов и др. Реально ли заставить гидролазы работать в обратном направлении? Для ответа на этот вопрос необходимо в первую

Таблица 4. Изменение стандартной свободной энергии (ΔG_c^{2f}) некоторых гидролитических реакций (рН 7,0, 25°C)

Исходный субстрат	ΔG_c^{2f} , кДж/моль
Уксусный ангидрид	-91,1
Ацетил-КоА	-34,7
Этилацетат	-30,1
Сахароза	-29,3
Bz—Gly	-28,4
AcPhe—OMe	-25,1
Gly—Gly	-18,0
Мальтоза	-16,7
Gln	-14,2
Asn	-12,5
AcPhe(NO ₂)—NH ₂	-8,8
AcTyr—NHOH	-7,9
BrTyr—GlyNHC ₆ H ₅	-5,9
AcPhe—AlaNH ₂	-5,4
ZTrp—GlyNH ₂	-4,6
AcPhe—GlyNH ₂	-3,4
ZTrp—SerNH ₂	-3,3
Ac—Met	-3,1
Цефалексин	-2,5
Ампициллин	-2,3
ZTrp—GlyNH ₂	-2,0
AcTyr—GlyNH ₂	-1,8
ZTrp—ValNH ₂	-1,7
ZTrp—ThrNH ₂	-1,1
AcPhe—TyrOEt	0,46
Цефалоридин	1,0
Бензилпенициллиновая кислота	1,5
Phac—Ala*	1,7
Phac—Gly*	2,0
Цефалотин	2,4
Бензилпенициллин	4,1
7-Фенилацетамидодезацетоксицефалоспоровановая кислота	7,9

* Phac — фенилацетил.

очередь рассмотреть термодинамические закономерности интересующих нас реакций.

Рассмотрим реакции гидролиза ряда соединений и попытаемся оценить термодинамические возможности проведения обратных реакций синтеза этих веществ (табл. 4). Известно, что значения свободных энергий гидролиза сложноэфирной и амидной связи существенно различаются. Гидролиз сложных эфиров в водной среде — практически необратимая реакция, в то время как гидролиз амидной связи в некоторых случаях реально обратим. Наиболее термодинамически выгодным является синтез амидной связи в некоторых β -лактамных антибиотиках (цефалотин, цефалоридин, бензилпенициллин и др.), причем оптимальный сдвиг равновесия в сторону синтеза достигается

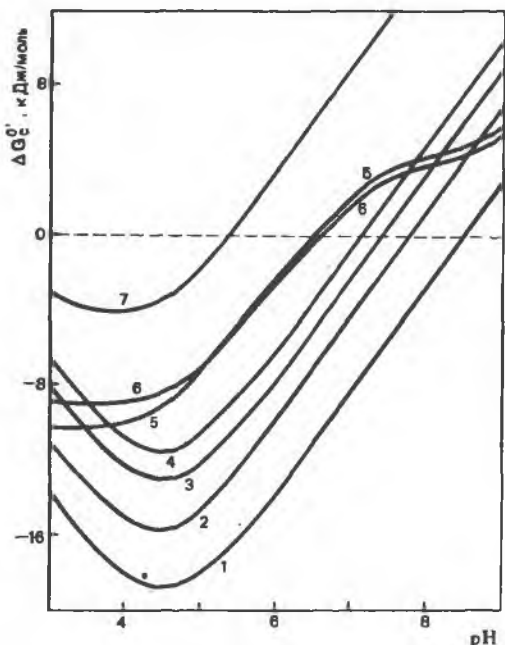


Рис. 9. Синтез амидной связи в некоторых β -лактамных антибиотиках

в слабокислой среде (рис. 9). В оптимальных условиях, например, ферментативный синтез цефалотина из тиенилуксусной и 7-аминоцефалоспоровановой кислот при концентрациях реагентов 50 и 5 ммоль/л протекает с выходом 94%.

Необходимо отметить, однако, что прямой синтез (т. е. синтез из карбоновой кислоты и аминокompонента) других амидных или пептидных связей даже в термодинамически оптимальных условиях идет с выходом, недостаточным для практического применения.

§ 4. Увеличение выхода продуктов в термодинамически неблагоприятных условиях

В органической химии для того чтобы сдвинуть равновесие процесса в сторону образования целевого соединения, стремятся изменить условия проведения реакции. Важными факторами могут быть pH, температура, состав растворителя и др. Применительно к ферментам диапазон возможных изменений в условиях проведения реакции существенно уже: ферменты, как правило, функционируют при нейтральных и близких к нейтральным значениям pH, в весьма узком температурном интервале, довольно тяжело переносят контакт с органическими растворителями. Другими словами, в отношении к ферментам возможности целенаправленного сдвига равновесия традиционными способами органической химии существенно ограничены.

Существует множество подходов к решению этой проблемы, которые можно подразделить на два основных типа.

1. Выявление таких путей целенаправленного сдвига равновесия реакции, которые не оказывают неблагоприятного воздействия на ферменты. Эти подходы в первую очередь позволяют увеличить использование уже имеющихся ферментных препаратов.

2. Расширение диапазона функционирования ферментов путем получения препаратов, переносящих контакт с органически-

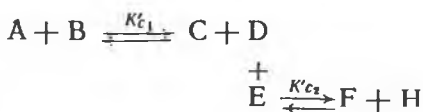
ми растворителями, устойчивых и активных в широком значении рН, при повышенных температурах и т. д. Эти методы обещают принципиально новые возможности практического применения ферментов.

В настоящей главе не имеет смысла останавливаться на путях целенаправленной модификации и стабилизации ферментов.Подробнее об этом можно прочитать в предыдущем выпуске данной серии, посвященном получению иммобилизованных ферментов. Ниже будут рассмотрены лишь примеры тех новых возможностей синтеза, которые дает использование этих препаратов.

Остановимся на подходе, который заключается в выведении продуктов из сферы реакции. При обеспечении условий, когда целевой (или какой-либо другой) продукт ферментативного превращения выводится из сферы реакции, равновесие реакции сдвигается в сторону его образования. Существует ряд методов, реализующих этот принцип. Хронологически первым, пожалуй, является метод, основанный на подборе условий, при которых синтезируемый продукт обладает низкой растворимостью. Достоинства метода были показаны при получении анилидов и фенилгидразидов ряда аминокислот, синтезе некоторых олигопептидов (М. Bergmann, Н. Fraenkel-Conrat, 1937). К недостаткам метода относится его применимость лишь к ограниченному числу соединений и невозможность использования в качестве катализатора иммобилизованных препаратов ферментов.

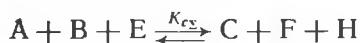
Был предложен оригинальный метод ферментативного синтеза в двухфазных водно-органических системах (К. Мартинек, И. В. Березин с соавт., 1977), где также реализуется принцип целенаправленного сдвига равновесия за счет удаления конечных продуктов. Реакцию проводят в двухфазной системе вода — не смешивающийся с водой органический растворитель. Фермент локализован в водной фазе. Соотношение вода — органический растворитель можно варьировать в широких пределах с той целью, чтобы в зависимости от распределения компонентов реакции добиться необходимого сдвига равновесия. Теоретический анализ и проведенные эксперименты показывают, что возможности регуляции состояния равновесия в таких системах очень велики: с изменением соотношения водной и органической фаз можно изменять значение эффективной константы равновесия более чем в 10 000 раз.

В ферментативных реакциях, так же как и во многих химических процессах, широко используется путь сдвига равновесия в результате включения одного из продуктов реакции в последующее, термодинамически выгодное превращение:



$$\Delta G'_{c_1} = -RT \ln K'_{c_1}; \quad \Delta G'_{c_2} = -RT \ln K'_{c_2}$$

Для суммарного процесса



изменение свободной энергии равно

$$\Delta G'_{c\Sigma} = \Delta G'_{c1} + \Delta G'_{c2}$$

Подбирая вторую реакцию таким образом, чтобы ее протекание было термодинамически выгодным, можно добиться необходимого сдвига константы равновесия суммарного процесса в сторону образования продуктов:

$$K'_{c\Sigma} = e^{-\frac{\Delta G'_{c1} + \Delta G'_{c2}}{RT}} > K'_{c1} = e^{-\frac{\Delta G'_{c1}}{RT}}$$

Этот метод оказался очень полезным, когда одним из продуктов синтеза является неорганический пирофосфат. В результате удаления пирофосфата при его последующем гидролизе неорганической пирофосфатазой равновесие первой реакции сдвигается практически до количественных выходов. Изменение свободной энергии в реакции гидролиза неорганического пирофосфата при pH 7,0 составляет $-33,5$ кДж/моль ($-8,0$ ккал/моль), что обеспечивает практически полный его гидролиз в этих условиях.

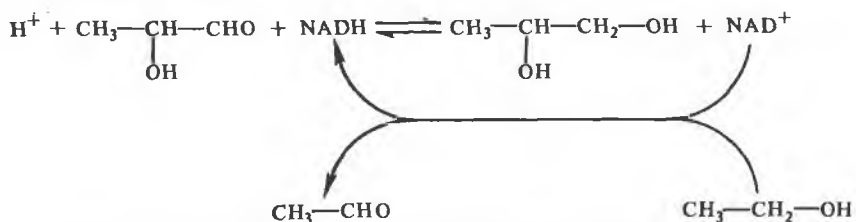
§ 5. Регенерация кофакторов ферментативной реакции

Очень близкими по своей сути к вышерассмотренному случаю являются реакции синтеза с помощью ферментов, требующих для своего действия кофакторов: нуклеозидтрифосфатов (особенно АТФ), никотинамидных кофакторов и др. Разница заключается лишь в том, что предоставляется возможность не уводить из сферы реакции прореагировавший кофактор, а регенерировать его за счет сопряженной реакции. Подобное сопряжение может быть реализовано с помощью другой ферментативной реакции, подходящего химического или электрохимического процесса:



Протекание многих синтетических реакций *in vivo* обеспечивается их сопряжением с другими ферментативными реакциями. Таким образом функционируют многие полиферментные системы. Восстановление лактальдегида алкогольдегидрогеназой с использованием этанола в качестве сопряженного субстрата было од-

ним из первых примеров реакции с регенерацией кофактора (Van Eys J., 1961):



Впоследствии при использовании меченого этанола было показано, что число циклов регенерации в подобной системе достигает 800. В последние годы эффективность регенерации достигла десятков тысяч циклов (А. П. Осипов, А. М. Егоров, 1982).

В качестве сопряженной реакции можно использовать реакцию, катализируемую другим ферментом. Так, при восстановлении дейтерированного ацетальдегида алкогольдеhydroгеназой с образованием меченого этанола в качестве сопряженной реакции было использовано окисление *D*-глюкозы глюкозодеhydroгеназой (Levy H. R. et al., 1957). Еще одним благоприятным фактором в этой системе явилось то, что образующийся в сопряженной реакции побочный продукт глюконолактон подвергается спонтанному гидролизу; это обеспечивает дополнительный сдвиг равновесия суммарного процесса в нужную сторону.

Системы регенерации кофакторов могут быть самыми разнообразными. Для обеспечения большей технологичности использования ферментов, требующих для своего действия кофакторов, в последнее время проводят селективную модификацию кофакторов полимерами с сохранением кофакторной активности. Такая модификация упрощает выделение кофактора после завершения ферментативного превращения.

Одной из наиболее острых проблем регенерации кофакторов является регенерация нуклеозидтрифосфатов, особенно АТФ. Самым перспективным путем регенерации АТФ следует считать ферментативную реакцию подходящего донора фосфатной группы с АДФ или АМФ. Ниже приведены перспективные пути регенерации АТФ из АДФ:

Донор фосфата	Фермент
$\text{CH}_3 - \text{C}(\text{O})\text{OPO}_3^{2-}$	Ацетаткиназа
$ \begin{array}{l} \text{CH}_2 = \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{OPO}_3^{2-} \\ \diagdown \text{COO}^- \end{array} \\ \text{CH}_3\text{OC}(\text{O})\text{OPO}_3^{2-} \end{array} $	Пируваткиназа Ацетаткиназа

Следует обратить внимание на достоинства и недостатки доноров фосфата — фосфоенолпируват и метоксикарбонилфосфат обеспечивают наиболее термодинамически выгодные условия регенерации АТФ (табл. 5), причем метоксикарбонилфосфат имеет преимущество в том, что его химический синтез (как и ацетил-

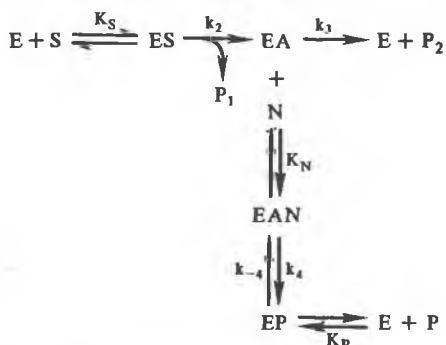
Таблица 5. Изменение стандартной свободной энергии (ΔG_c°) гидролиза некоторых фосфорилированных соединений (рН 7,0)

Исходный субстрат	ΔG_c° , кДж/моль
Фосфоенолпируват	-53,5
Метоксикарбонилфосфат	-51,8
1,3- Дифосфоглицерат	-49,3
Креатинфосфат	-43,1
Ацетилфосфат	-42,2
Пирофосфат	-33,4
Аргининфосфат	-32,2
АТФ	-30,5
АДФ	-30,5
Глюкозо-1-фосфат	-20,9
Фруктозо-6-фосфат	-15,9
АМФ	-14,2
Глюкозо-6-фосфат	-13,8
Глицерол-1-фосфат	-9,2

фосфата) заметно проще. В то же время необходимо учитывать, что ацетилфосфат и особенно метоксикарбонилфосфат недостаточно стабильны в растворах и подвержены спонтанному гидролизу.

§ 6. Перенос ацильных групп при помощи ферментов

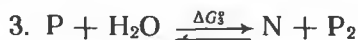
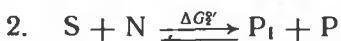
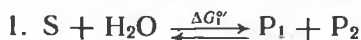
Большие возможности при использовании гидролаз в синтетических реакциях представляет метод ферментативного переноса ацильных групп. В общем виде реакции такого типа могут быть представлены следующим образом:



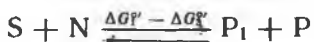
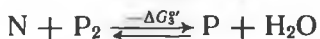
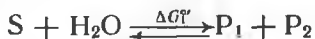
Анализируя ферментативные реакции, протекающие подобным образом, следует учитывать как термодинамические, так и кинетические закономерности этого процесса.

Целевым продуктом данного ферментативного превращения является продукт Р; им может быть полусинтетический β -лактамный антибиотик, пептид и т. д. Попытаемся оценить термодинамические особенности его образования.

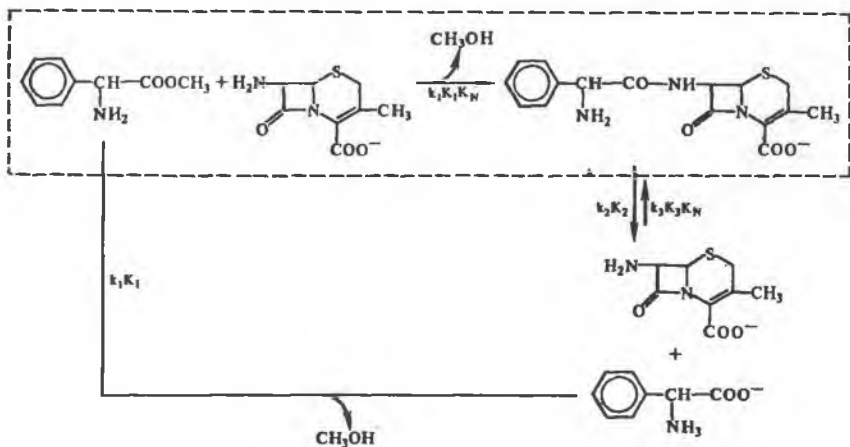
Представленный процесс состоит по сути из трех реакций: гидролиза исходного донора ацильной части S (реакция 1); переноса ацильной части донора S на нуклеофильный агент N (реакция 2) и гидролиза образующегося в результате этого переноса целевого продукта P (реакция 3). Каждая реакция характеризуется соответствующим изменением свободной энергии:



В первую очередь представляет интерес термодинамика реакции 2, в то время как термодинамические характеристики гидролитических реакций 1 и 3 во многих случаях известны. Нетрудно показать, что $\Delta G_2^{\circ'}$ представляет собой разницу $\Delta G_1^{\circ'}$ и $\Delta G_3^{\circ'}$, так как



Практически всегда можно выбрать такой донор ацильной части, чтобы создать термодинамически выгодные условия синтеза целевого продукта P (т. е. $\Delta G_2^{\circ'} = \Delta G_1^{\circ'} - \Delta G_3^{\circ'} < 0$). Такими донорами при ферментативном синтезе β -лактамовых антибиотиков и пептидов могут являться сложные эфиры аминокислот или карбоновых кислот. Например, общая схема реакций, протекающих при ферментативном синтезе цефалексина с переисосом ацильной группы (основная реакция выделена красным пунктиром), имеет следующий вид (кинетика синтеза цефалексина представлена на рис. 10):



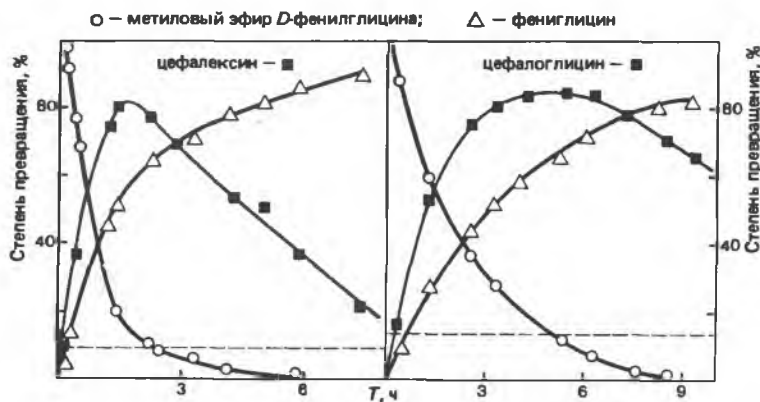


Рис. 10. Кинетика ферментативного синтеза цефалоспоринов с переносом ацильной группы (по данным А. М. Блинковского, В. К. Швядаса, 1982). (Ацилирующий агент в обоих случаях — метиловый эфир *D*-(-)- α -аминофенилуксусной кислоты. Нуклеофильный агент: при синтезе цефалексина 7-аминодезацетоксицефалоспороновая кислота, при синтезе цефалоглицина — 7-аминоцефалоспороновая кислота. Катализатор — *D*-(-)-фенилглицил- β -лактамаמידогидролаза): пунктиром указаны конечные равновесные состояния

Особое значение в реакциях ферментативного переноса ацильной группы имеет кинетика процесса. Хотя термодинамически накопление продукта *P* выгодно, этот продукт промежуточный, так как еще более термодинамически выгодным является

последующий его гидролиз. Следовательно, кинетика всего процесса имеет сложный характер, а кривая накопления продукта *P* от времени характеризуется наличием максимума (рис. 10). Конечное равновесное состояние такой системы в целом определяет $\Delta G_3^{\circ'}$ (реакция 1 практически необратима, и ее равновесие целиком сдвинуто в сторону гидролиза донора *S*).

Чтобы достичь максимального выхода целевого продукта при использовании метода ферментативного синтеза с переносом ацильной группы, требуется глубокое понимание закономерностей протекающих превра-

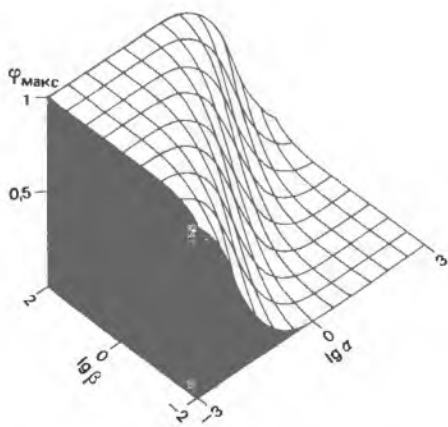


Рис. 11. Зависимость выхода ($\Phi_{\max} = [P]_{\max}/[N]_0$) при синтезе целевого продукта методом ацильного переноса (см. схему на с. 53) от параметра специфичности фермента α и параметра нуклеофильности β

щений. Здесь важен и выбор ацилирующего агента, и умение остановить реакцию в нужный момент времени.

Количественное описание кинетики реакций, протекающих по схеме, представляет собой сложную задачу и в общем случае требует численных методов решения, хотя при некоторых ограничениях возможно получение аналитических выражений. Ключевыми параметрами, определяющими максимальную степень конверсии нуклеофила ($\varphi_{\text{макс}}$), в процессе по схеме являются параметр специфичности фермента $\alpha = \frac{k_{-4}}{K_P} / \frac{k_2}{K_S}$ и параметр нуклеофильности $\beta = k_4 / (k_3 K_N)$. Существует довольно широкая область значений ключевых параметров, в которой выход целевого продукта превышает 90% (рис. 11).

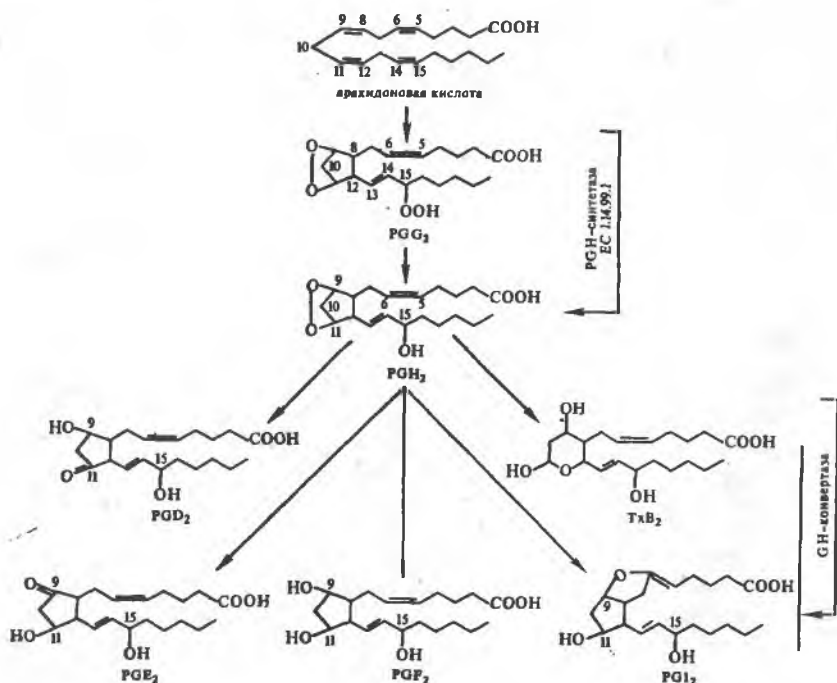
§ 7. Биокаталитическое получение простаноидов

Очень интересным примером использования биокатализа для получения лекарственных средств является область ферментативного превращения арахидоновой кислоты с образованием простагландинов, тромбоксанов, простациклина и лейкотриенов. Эти внутриклеточные регуляторы в чрезвычайно низких концентрациях обеспечивают мощные физиологические ответы организма. Простагландины уже находят, а простациклин и лейкотриены, по-видимому, будут находить широкое применение в таких областях медицины, как гигиена, лечение бронхиальной астмы, гастроэнтерология, регуляция кровяного давления, лечение сердечно-сосудистых заболеваний и т. д. Наряду с этим уже сегодня значительна роль простагландинов в промышленном животноводстве.

Превращение арахидоновой (5, 8, 11, 14-эйкозатетраеновой) кислоты в простагландины, тромбоксаны и простациклин катализируют сложные полиферментные системы. Ключевым ферментом синтеза следует считать общий для всех этих соединений первый фермент цепи — простагландинэндопероксидсинтетазу. Этот фермент катализирует образование простагландина H_2 — общего промежуточного соединения при получении всех простагландинов, тромбоксанов и простациклина (схема 1).

Простагландинэндопероксидсинтетаза — гемсодержащий фермент, катализирующий трехсубстратную реакцию, в ходе которой происходит сопряженное окисление кислородом арахидоновой кислоты и какого-либо донора электронов. Донорами электронов могут служить слабые органические и неорганические восстановители, например ферроцианид, адреналин, триптофан, НАДН. Значительные осложнения в создание биотехнологических процессов получения простагландинов вносит тот факт, что промежуточный продукт каталитического действия простагландинэндопероксидсинтетазы — простагландин G_2 — является эффективным инактиватором самого фермента, его образующего. Ясно, что создание эффективных биокаталитических процессов получения простагландинов представляет собой чрезвычайно сложную задачу.

Схема 1. Ферментативное превращение арахидоновой кислоты в простагландины (PGG₂, PGH₂, PGD₂, PGE₂ и PGF₂), тромбоксаны В₂ (TxB₂) и простациклины (PGI₂)

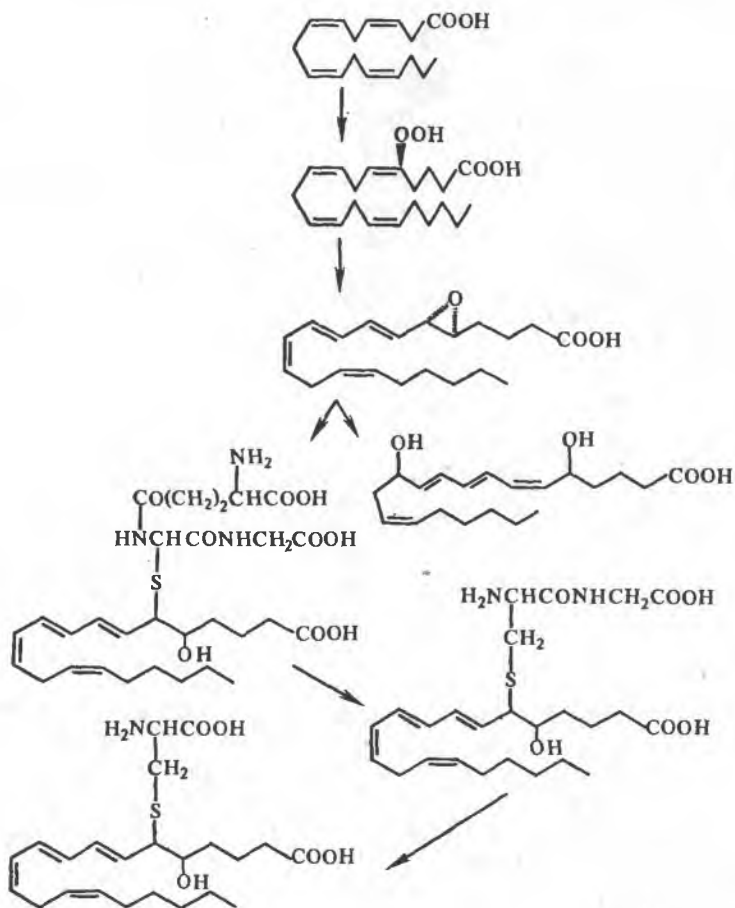


Механизм инактивации простагландинэндопероксидсинтетазы в ходе ферментативной реакции детально исследован. Инактивация простагландинэндопероксидсинтетазы промежуточным продуктом ее каталитического действия имеет, по-видимому, значительный физиологический смысл, так как позволяет поддерживать постоянный (и строго определенный) уровень концентрации этих физиологически активных соединений в живых системах (С. Д. Варфоломеев, А. Т. Мевх, 1983). При создании биокаталитических процессов получения простагландинов подобная инактивация одного из ферментов системы в ходе реакции является, пожалуй, основным осложняющим фактором. Выяснение механизма инактивации простагландинэндопероксидсинтетазы позволяет, однако, надеяться, что возможен выбор условий использования фермента, при которых достигается максимальный выход целевого соединения с минимальной потерей биокатализатора. Не следует исключать также путь регенерации инактивированного фермента.

Выше была обсуждена только одна сторона проблемы биокаталитического превращения арахидоновой кислоты в простагландины, тромбоксаны и простациклины, связанная с действием первого фермента цепи. Другая сторона проблемы связана с фер-

ментативным превращением простагландина H_2 в интересные исследователя соединения под действием ферментов, объединяемых общим названием эндопероксидпростагландинконвертазы. Специфичность второго фермента используемой полиферментной системы и определяет путь дальнейшего превращения промежуточного соединения. В настоящее время известны такие ферменты, как эндопероксидпростагландин-Е-изомераза, эндопероксидпростагландин- F_2 -редуктаза, простациклинизомераза, эндопероксидпростагландинтромбоксан-А-изомераза (или тромбоксансинтетаза), эндопероксидпростагландин- D -изомераза.

Схема 2. Биокаталитическое превращение арахидоновой кислоты в лейкотриены A_4 , B_4 , C_4 , D_4 , E_4



(Общее промежуточное соединение биосинтеза лейкотриенов (5S)-5-оксиперокси-6,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота)

Биокаталитическое превращение арахидоновой кислоты в лейкотриены протекает по другому пути, с промежуточным синтезом 5S-5-оксиперокси-6,8,11,14-эйкозатетраеновой кислоты и последующим образованием лейкотриена A₄, который в дальнейшем может превращаться в лейкотриены B₄, C₄, D₄, E₄ и их изомеры (схема 2).

Биокаталитические превращения протекают с участием липоксигеназы, γ -глутамилтранспептидазы и, возможно, ряда других еще неизученных ферментов. Лейкотриены представляют собой крайне интересный для медицины класс соединений, играющих важную роль при протекании воспалительных процессов, бронхиальной астмы, регуляции адгезии и агрегации нейтрофилов, полиморфноядерных лейкоцитов и т. д. Широко проводимые исследования физиологической роли всех продуктов ферментативных превращений каскада арахидоновой кислоты в ближайшее время выявят те ключевые соединения, которые будут иметь наибольшее клиническое значение. Это потребует создания эффективной технологии производства новых лекарственных препаратов. Несмотря на сложности создания биокаталитических процессов в этой области, есть все основания полагать, что на базе природных полиферментных систем превращения арахидоновой кислоты могут быть созданы катализаторы биотехнологических процессов. Следует отметить, что и сам исходный продукт этих превращений — арахидоновая кислота — может быть получен из подходящих масел биокаталитическим путем с использованием специфичных фосфолипаз.

§ 8. Синтез аминокислот лиазами

Важную практическую роль имеют лиазы, катализирующие синтез ряда аминокислот (табл. 6).

Т а б л и ц а 6. Синтез аминокислот с использованием лиаз

Исходные субстраты	Фермент	L-аминокислота
Фумарат аммония	Аспаратаммиаклиаза	Аспарагиновая кислота
Аммониевая соль коричной кислоты	Фенилаланинаммиаклиаза	Фенилаланин
Фенол, пируват аммония	Тирозинфеноллиаза	Тирозин
Прокатехин, пируват аммония	»	3,4-Диоксифенилаланин (ДОФА)
Индол, пируват аммония	Триптофаниндоллиаза	Триптофан
5-Оксииндол, пируват аммония	»	5-Окситриптофан

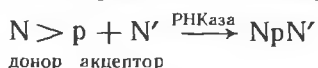
Использование замещенных фенолов и индолов в реакциях, катализируемых тирозинфеноллизой и триптофаназой, дает уникальную возможность получать замещенные производные тирозина и триптофана. Разработка удобного и дешевого метода

получения аспарагиновой кислоты из фумарата аммония позволяет использовать аспарат как сырье для получения *L*-аланина при помощи аспарат-4-декарбоксилазы. Вообще превращение более доступных аминокислот в более редкие аминокислоты с применением ферментов является довольно распространенным методом: таким путем получают также *L*-цитрулин из *L*-аргинина, *L*-триптофан из *L*-серина, *L*-глутаминовую кислоту из *L*-аспарагиновой, ДОФА из тирозина, урокаиновую кислоту из *L*-гистидина. Из аминокислот в присутствии оксидаз *L*- и *D*-аминокислот можно получать α -кетокислоты. При помощи иммобилизованных ферментов и клеток получают также ряд органических кислот; например, биокаталитический метод получения яблочной кислоты из фумаровой с использованием фумаратгидратазы является наиболее перспективным путем масштабного получения этого продукта (см. гл. 1).

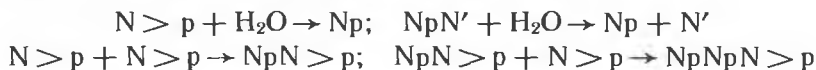
§ 9. Ферментативная модификация нуклеиновых кислот, синтез олиго- и полинуклеотидов

Ферменты играют огромную роль в развитии технологии рекомбинантной ДНК. Химическая трансформация ДНК, необходимая для целей генетической инженерии, не может быть обеспечена традиционными методами химии нуклеиновых кислот, и поэтому масштабное внедрение методов генетической инженерии в значительной степени зависит от использования ферментов. Особую роль здесь играют ДНК-лигаза и эндонуклеазы рестрикции. Интерес представляет не только ферментативная модификация макромолекул, но также и ферментативный синтез олигонуклеотидов.

В настоящее время достаточно хорошо разработаны методы синтеза дирибонуклеотидов с использованием рибонуклеаз (С. М. Женодарова с соавт., 1974). Применение ферментов различной специфичности позволяет получать динуклеотиды практически любого состава, включая в качестве компонентов даже модифицированные соединения, не встречающиеся в природе. Синтез дирибонуклеотидов протекает по следующей схеме:

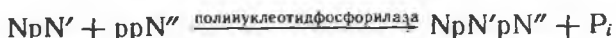
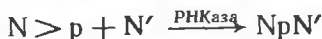


Сложности ферментативного синтеза дирибонуклеотидов заключаются в том, что исходный донор и образующийся продукт подвергаются гидролизу, кроме того, образующийся продукт может вступать в последующую полимеризацию:

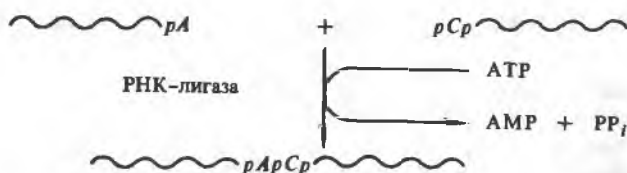


Как и в случае ферментативного переноса ацильной группы, при ферментативном образовании олигорибонуклеотидов необходимо провести оптимизацию биокаталитического процесса с целью достижения максимального выхода целевого продукта.

Для получения олигорибонуклеотидов с большим числом звеньев можно использовать рибонуклеазу и полинуклеотидфосфорилазу:



Полинуклеотидфосфорилаза отличается низкой субстратной специфичностью, что позволяет синтезировать любую последовательность, причем не только олигорибо-, но и олигодезоксирибонуклеотидов. Благоприятным фактором также является то, что полинуклеотидфосфорилаза в условиях процесса практически не гидролизует фосфодиэфирную связь. Хорошим примером использования полинуклеотидфосфорилазы служит синтез индуктора интерферона поли I:C (С. Н. Hoffmann et al, 1970). Олигонуклеотиды различной длины можно синтезировать также при помощи РНК-лигазы:



Акцепторами в реакциях, катализируемых РНК-лигазой, могут быть ди-, три- и другие олигомеры, а донором — даже мономеры. Фермент способен также использовать в качестве субстрата одноцепочечную ДНК и полезен при модификации нуклеиновых кислот и включении радиоактивных меток.

§ 10. Синтез меченых соединений

Меченые соединения имеют широкое применение в медицине, научных исследованиях и ряде других областей. Преимущества ферментов при синтезе таких соединений в первую очередь заключаются в появлении возможности более быстрого и селективного введения метки. Это приводит к экономии исходных дорогостоящих радиоактивных веществ, создает дополнительные резервы для внедрения изотопов с малыми временами полураспада, упрощает выделение целевого продукта.

Для синтеза меченых аминокислот наиболее распространен метод с использованием аммиака в качестве исходного радиоактивного вещества, хотя получают ^{14}C - и ^{11}C -меченые аминокислоты. Катализаторами включения метки могут быть лиазы, дегидрогеназы, трансминазы, синтетазы, метилтрансферазы.

Для получения меченых нуклеозидфосфатов чаще всего применяют ^{32}P -неорганический фосфат. Получаемые нуклеозидтрифосфаты в качестве кофакторов широко употребляются при радиоактивном фосфорилировании других соединений ферментами. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТФ}$ может быть получен при обмене концевой фосфатной группы на меченый органический фосфат в присутствии

двух ферментов: 3-фосфоглицераткиназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Для увеличения выхода меченого АТФ необходимо обеспечить эффективную регенерацию NAD (см. с. 53). Меченый АТФ служит важным исходным соединением для синтеза других меченых нуклеозидфосфатов, меченых белков, нуклеиновых кислот, многих низкомолекулярных соединений.

Меченые белки можно получать не только при фосфорилировании, но и в результате иодирования изотопом ^{125}I двумя путями. В первом случае в результате ферментативного иодирования пероксидазой в мягких условиях модифицируются аминокислотные остатки тирозина и протекает лишь одна побочная реакция — окисление аминокислотных остатков триптофана. Во втором случае модификация протекает в две стадии: сначала под действием индолил-3-алкангидроксилазы происходит дегидрирование с образованием двойной связи в аминокислотных остатках триптофана, а затем проводится либо галогенирование $^{125}\text{I}_2$ или ^{125}ICl , либо каталитическое гидрирование изотопами водорода.

§ 11. Ферментативный синтез сахаров

Получение ряда редких или не встречающихся в природе сахаров возможно с помощью альдолазы (A. S. Seriani et al, 1982, G. M. Whitesides et al, 1983) — фермента, катализирующего альдольную конденсацию диоксиацетонфосфата и некоторых его аналогов с альдегидами. Альдолазы могут найти применение также при получении меченых соединений. С учетом интереса к реакциям альдольной конденсации в органическом синтезе, а также синтезу углеводов можно предположить, что альдолазы в ближайшие годы найдут широкое практическое применение.

Синтез олиго- и полисахаридов также привлекает большое внимание. Здесь, как и при образовании олигонуклеотидов или пептидов, приходится сталкиваться с побочными реакциями гидролиза или последующей олигомеризацией. Показано, однако, что в случае эндогликаназ синтез может протекать эффективнее гидролиза. Важным моментом является то, что используемые ферментные препараты не должны содержать экзогликаназ. В качестве доноров для эндогликаназ предпочтительны полисахариды со степенью полимеризации 10—30 (хитодекстрин, целлодекстрин, ламинарин), акцепторами — углеводы или их гликозидные производные. Для гликозидаз донорами должны быть гликозиды или низшие олигосахариды.

В качестве примеров можно привести ферментативный синтез левана, состоящего из β -2,6-связанных звеньев *D*-фруктозы, под действием левансахаразы; при помощи иммобилизованной ацилнейраминат-9-фосфатсинтазы проведен масштабный синтез одной из важнейших сиаловых кислот — *N*-ацетилнейраминовой из *N*-ацетилманнозамина и *N*-ацетилглюкозамина. Ряд необычных сахаров получен при стереоспецифическом окислении полиолов под действием *D*-галактозооксидазы.

§ 12. Ферментативные реакции в безводной среде

В последние десять лет уделяется огромное внимание исследованию поведения ферментов в средах с малым содержанием воды. Ферментативные реакции в органических растворителях представляют наибольший интерес для синтетической органической химии, так как практическое отсутствие воды в системе при сохранении ферментом каталитической активности дает надежду на проведение синтеза новых связей, которые в воде полностью расщепляются главным образом из-за термодинамически выгодной ионизации образующихся продуктов. Исследования, проводимые в этом направлении, можно условно подразделить на три группы: 1) попытки проведения реакций в водно-органических смесях; 2) ферментативные реакции в двухфазных системах «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель»; 3) проведение реакций в органических растворителях при помощи особым образом модифицированных ферментов.

Рассмотрим первую группу исследований. Добавки органических растворителей, смешивающихся с водой, позволяют в некоторых случаях решить проблему растворимости субстратов. Кроме того, в водно-органических смесях с высоким содержанием неводного компонента наблюдается некоторый сдвиг равновесия обратимых реакций гидролиза — синтеза в сторону синтеза; это обусловлено главным образом не столько уменьшением концентрации воды в системе, сколько сдвигом равновесия за счет изменения pK ионогенных групп компонентов реакции. Наиболее сильно с увеличением содержания органического растворителя в смеси увеличиваются константы диссоциации кислот. Такое изменение приводит к сдвигу равновесия в сторону образования производного кислоты. Например, в реакции прямого ферментативного синтеза пептидов при переходе от воды к смеси, содержащей 85% 1,4-бутандиола, константа равновесия возрастает в 80 раз (M. Laskowski, Jr. et al, 1978). Следует отметить, однако, что активность и стабильность большинства ферментов в таких системах заметно падает, особенно при высоких концентрациях органического растворителя. Известны тем не менее примеры, когда, учитывая все эти факты, удается найти условия проведения ферментативного синтеза пептида с высокой скоростью и выходом до 97% (K. Nilson, K. Mosbach, 1984).

Ранее уже отмечалось, что в двухфазных водно-органических системах можно достичь значительных сдвигов равновесия реакций, оптимизируя соотношение объемов двух фаз и регулируя значения коэффициентов распределения компонентов между ними. В таких системах удается синтезировать сложные эфиры *N*-защищенных аминокислот и пептиды с практически количественными выходами. Необходимо отметить, что кинетику реакций в двухфазных системах осложняет перенос веществ из одной фазы в другую. Кроме того, в некоторых случаях существует опасность выпадения целевого продукта в осадок в водной фазе,

что осложняет разделение и забивает поры носителя в иммобилизованном препарате фермента.

Рассматривая ферментативные реакции в двухфазных водно-органических системах, следует обратить внимание на тот случай, когда в качестве катализатора используются сухие препараты лиофилизированных ферментов без какой-либо предварительной модификации или иммобилизации. Показано, что лиофилизированные препараты некоторых ферментов, суспендированные в органических растворителях, не смешивающихся с водой, обладают каталитической активностью и сохраняют специфичность действия (F. R. Dastoli, S. Price, 1967). Необходимо отметить, что уровни достигаемой активности в такой системе пока недостаточно для проведения процессов с препаративной целью. Надо полагать, что в ближайшем будущем будут получены ответы на вопрос, как препарат лиофилизованного фермента, содержащий минимальное количество гидратационной воды, сохраняет свои основные свойства при контакте с органическим растворителем и какая часть активных центров ферментного препарата принимает участие в катализе.

Наиболее значительных успехов с точки зрения тонкого органического синтеза удалось добиться при использовании двухфазных водно-органических систем для биокаталитической перезетерификации и в ферментативном синтезе пептидов. В результате реакций перезетерификации, катализируемых различными липазами, стало возможным получать большее число оптически активных сложных эфиров и спиртов или проводить обогащение жиров необходимыми компонентами.

Очень перспективным представляется третий подход. Наиболее ярким примером особым образом модифицированных ферментов, активных в органических средах, являются ферменты, включенные в обращенные мицеллы. Эта область, чрезвычайно активно развивающаяся в последние 5 лет, получила название «мицеллярной энзимологии» (К. Мартинек, И. В. Березин с соавт., 1977). Обращенные мицеллы в своем ядре содержат некоторое количество гидратационной воды, которая и обеспечивает микросреду для функционирования фермента. Включение некоторых ферментов в состав обращенных мицелл приводит к заметному изменению свойств, например активации в случае пероксидазы и люциферазы или изменению специфичности действия в случае алкогольдегидрогеназы. Достоинства ферментов, включенных в состав обращенных мицелл, особенно ярко проявляются при синтезе аполярных соединений, таких, как стероиды (C. Laane et al, 1984).

Недавно предложен еще один путь, при помощи которого можно солюбилизовать ферменты в органические растворители с сохранением каталитической активности, — это ковалентная модификация полиэтиленгликолем (J. Inada et al, 1984). Таким способом получены препараты пероксидазы, липазы, каталазы и химотрипсина, которые сохраняют значительную часть своей ак-

тивности в бензоле, а в случае каталазы наблюдается активация фермента в органическом растворителе. Для того чтобы достичь хорошей растворимости в бензоле, необходимо модифицировать значительную часть аминогрупп в молекуле фермента для присоединения нужного количества полиэтиленгликоля.

По своей физико-химической сущности метод ковалентной модификации ферментов полиэтиленгликолем принципиально не отличается от метода включения в обращенные мицеллы. Роль полимера и роль мицелл низкомолекулярных детергентов заключается в том, чтобы создать коллоидный раствор воды в органическом растворителе и таким образом обеспечить микрогетерогенную среду для функционирования ферментов. Важным достоинством этих систем по сравнению с гетерогенными системами «вода — не смешивающийся с водой органический растворитель» является существенно более развитая поверхность раздела между фазами, что должно отражаться на кинетике превращений по всей системе в целом.

§ 13. Перспективы ферментативного органического синтеза

Ферментативный органический синтез находится только на начальном этапе своего развития. Одна из причин этого заключается в психологии, в том, что лишь малая часть исследователей, занимающихся ферментами, смотрят на них, как на самые обычные химические катализаторы, которыми можно управлять и которые следует использовать. Только в последние несколько лет наметилась важная новая тенденция — желание пересмотреть сложившиеся представления о свойствах ферментов, о специфичности и энантиоселективности их действия. При более широкой проверке оказалось, что многие ферменты способны на каталитические превращения гораздо большего числа субстратов, они могут функционировать в значительно более широком диапазоне условий. Эти наблюдения дают основания полагать, что сфера практического использования биокатализа в ближайшие годы существенно расширится. Представляет интерес внедрение ферментов в крупнотоннажный синтез (табл. 7). Следует ожидать также широкого применения в синтезе полиферментных систем. В принципе уже сегодня бесклеточная энзимология может провести ряд сложных последовательных превращений подобно тому, как действуют при биосинтезе целые клетки. Успехи в этой области будут связаны прежде всего с углублением наших знаний о поведении полиферментных систем и с умением управлять такими системами.

Острой проблемой в тонком органическом синтезе является подбор подходящего биокатализатора. Как его найти или как его создать?

Когда фермент, катализирующий необходимое превращение,

Т а б л и ц а 7. Примеры ферментативных реакций, продукты которых представляют интерес для крупнотоннажного производства

Исходный субстрат	Фермент	Целевой продукт
Акрилонитрил	Нитрилгидратаза	Акриламид
Непредельные углеводороды	Амидаза	Акриловая кислота
	Галопероксидаза	Галогензамещенные окси- и оксосоединения
Пропилен	Моноксигеназы	Эпоксиды
	Дегидрогеназы	Гликоли
Углеводороды	Галопероксидаза	Галогидрин
	Галогидринэпоксидаза	Оксид пропилена
Природные цефалоспорины	Моноксигеназы	Спирты
	Алкогольдегидрогеназы	Альдегиды, кислоты
	Ацилазы	«Ядра» цефалоспоринов

известен, дело обстоит проще. В настоящее время хорошо отработаны методы выделения и очистки ферментов, их иммобилизации и стабилизации. Однако на этом перечень возможных воздействий на фермент кончается. На сегодня неизвестны подходы к расширению специфичности действия фермента, к увеличению его активности.

Реально ли конструирование ферментов? Вероятно, ответ на этот вопрос можно будет получить с развитием генетической инженерии. Первые успехи в сайт-специфическом мутагенезе ферментов уже имеются; показана возможность биосинтеза T4 лизоцима, содержащего дополнительную дисульфидную связь для увеличения стабильности (L. D. Perry, R. Wetrel, 1984). Для тирозил-тРНК-синтетазы заменой аминокислоты в структуре активного центра удается понизить значение K_m ферментативной реакции (A. R. Fersht et al, 1984).

Большой потенциал, возможно, имеет идея получения «полусинтетических» ферментов в результате селективной их модификации. Есть основания полагать, что таким путем можно изменять не только стабильность ферментов, но и регулировать такие параметры, как активность и специфичность. Не следует исключать вероятность того, что по мере углубления наших знаний о действии ферментов можно будет создавать искусственные ферментоподобные катализаторы для решения конкретных технологических проблем.

В завершение следует остановиться на ферментах термофильных микроорганизмов и микроорганизмов, живущих в других экспериментальных условиях. О полезных отличительных свойствах ферментов из нетрадиционных источников сегодня известно еще мало. Можно не сомневаться, что более широкое изучение самых разнообразных ферментов откроет новые возможности для синтеза.

4

БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Фундаментальная особенность энергетики живых систем заключается в том, что трансформация энергии в процессах жизнедеятельности осуществляется в окислительно-восстановительных реакциях с участием ферментов и белковых переносчиков электрона. В результате исследований последних десяти лет обнаружен удивительный по своей простоте и универсальности молекулярный механизм преобразования энергии в клетках, включающий транспорт электронов и сопряженную с ним поляризацию биологической мембраны. Локализованные и структурно организованные в биологических мембранах белки осуществляют процессы обмена электронами. При этом часть энергии процесса трансформируется в концентрационный потенциал ионов водорода, поляризующий биологическую мембрану.

Возникает вопрос, можно ли в искусственных, существенно более простых системах с использованием ферментов реализовать трансформацию энергии химических реакций в электрохимический потенциал и создать системы, которые по скоростям и эффективности преобразования энергии не уступали бы биологическим? Ответ будет положительным, если удастся осуществить сопряжение электродных и ферментативных процессов и использовать высокую специфичность и каталитическую активность ферментов для ускорения электрохимических реакций. А для этого необходимо «научить» ферменты реализовать ионизацию молекул и транспорт электронов в электропроводящую матрицу (электрод).

Исследования последних лет показали, что катализ ферментами электродных процессов действительно может быть осуществлен и экспериментально изучен. Для определения самого

феномена ускорения ферментами электрохимических реакций предложено использовать термин «биоэлектрокатализ». Наиболее сложная проблема биоэлектрокатализа — реализация эффективного переноса электронов между активным центром фермента и электродом.

Известно несколько путей, позволяющих осуществить эффективное «заселение» активных центров ферментов электронами (или электронными вакансиями). Первый путь предполагает использование низкомолекулярных диффузионно подвижных переносчиков электронов (медиаторов), способных акцептировать электроны с электрода и отдавать их активному центру фермента. Этот механизм используется в большом числе ферментативных электродных систем, в частности, в реакциях с участием гидрогеназ — биологических катализаторов активации молекулярного водорода. (В системе гидрогеназа — метилвиолген — угольный электрод удается электрохимически окислять водород без перенапряжения в условиях, близких к равновесным.) Второй путь заключается в непосредственном электрохимическом окислении — восстановлении активных центров ферментов, прямом переносе электронов (вакансий) с активного центра фермента на электрод (или обратно). Механизм прямого переноса электронов по пути электрод — активный центр фермента уже реализован в реакции электрохимического восстановления кислорода до воды с участием медьсодержащей оксидазы, в реакции электровосстановления водорода с помощью гидрогеназы. Третий путь состоит в использовании ферментов, включенных в матрицу органического полупроводника. Для этого применяют полимеры с системой сопряженных связей, обладающие длинной цепью сопряжения, или полимеры с комплексами переноса заряда. С помощью ферментов, иммобилизованных в органические полупроводники, удалось осуществить ряд интересных электрохимических реакций, в частности электрохимическое окисление глюкозы с участием глюкозооксидазы.

Биоэлектрокатализ открывает новые возможности в изучении действия биокатализаторов. Электрохимические методы позволяют выяснить тонкие детали молекулярных механизмов действия ферментов. Экспериментальное исследование зависимости тока от потенциала, концентрации фермента, концентрации ионов водорода и субстратов с последующим анализом на основе теории электрохимической кинетики помогает выявить механизм превращений субстрата в активном центре фермента. Например, исследование кинетики действия медьсодержащей оксидазы, иммобилизованной на электроде, показывает, что наиболее вероятный механизм действия активного центра включает стадию присоединения кислорода, быстрый равновесный перенос одного электрона, двух протонов и синхронный замедленный перенос двух электронов на лимитирующей стадии процесса. Кинетическое исследование с привлечением структурных данных дает представление о молекулярном механизме действия оксидазы.

Практическая значимость биоэлектрокатализа определяется возможностью использования активных биологических катализаторов в электрохимических генераторах тока. Биохимический топливный элемент представляет собой два ферментных электрода: электровосстанавливающий (кислородный электрод) и электроокисляющий, которые связаны между собой ионопроводящей средой. В такого рода системах происходит окисление топлива кислородом с генерацией на электродах разности потенциалов, определяемой энергией реакции «сгорания» топлива.

Высокие скорости ферментативных реакций способны обеспечить весьма высокие удельные мощности электрохимических преобразователей энергии и расширить круг употребляемых топлив. Развитие методов получения и очистки ферментов приводит к тому, что ферментные препараты становятся относительно недороги и доступны. Решение технической задачи крупномасштабного получения окислительно-восстановительных ферментов создает основу для широкого использования их в системах преобразования энергии химических реакций в электричество.

Электрокаталитические эффекты могут оказаться весьма полезными при решении проблемы фотолиза воды видимым светом с применением биологических принципов и биологических объектов. Задача сводится к проблеме переноса электронов из электронно-транспортной цепи фотосинтеза на электроды подходящей природы. На этой основе могут быть созданы как фотоэлектрические преобразователи, так и системы фоторазложения воды на водород и кислород.

Биоэлектрокаталитические эффекты применяются при создании сенсоров — электрохимических датчиков, необходимых для количественного определения различных химических соединений. Использование биоэлектрокатализа по механизму прямого переноса электронов с активного центра фермента на электрод может существенно упростить создание такого рода систем. Перспективными представляются и системы биоспецифического электросинтеза.

§ 1. Каталитические возможности ферментов в электрохимических реакциях

Рассмотрим систему, в которой фермент равномерно распределен по поверхности электрода с поверхностной концентрацией $[E]_{\text{пов}}$ моль/см², при этом лимитирующей стадией является ферментативная реакция:



где ES — фермент-субстратный комплекс; $E(n\bar{e})$ — фермент, акцептировавший электроны (или лишенный их).

С учетом существования на границе раздела фаз твердое тело — движущая жидкость диффузионного слоя толщиной δ решение уравнения диффузии в стационарном режиме с граничными условиями

$$D \left(\frac{\partial S}{\partial X} \right)_{x=0} = j([E]_{\text{пов}}, [S]);$$

при $X \gg \delta$ $[S] = [S]^\delta$ (где D — коэффициент диффузии субстрата; $j([E]_{\text{пов}}, [S])$ — поток, определяемый скоростью ферментативной реакции) приводит к следующей зависимости удельного тока:

$$i = - \frac{nFk_{\text{кат}} [E]_{\text{пов}}}{1 + \left\{ \frac{[S]^\delta / K_m - (1 + \theta)}{2} + \sqrt{\left\{ \left[\frac{[S]^\delta / K_m - (1 + \theta)}{2} \right]^2 + [S]^\delta / K_m} \right\}^{-1}} \right\}} \quad (1)$$

где F — постоянная Фарадея; n — число переносимых электронов на молекулу субстрата; $[S]^\delta$ — концентрация субстрата в объеме; θ — безразмерный параметр.

Параметр θ определяют по уравнению

$$\theta = k_{\text{кат}} [E]_{\text{пов}} \delta / K_m D.$$

От параметра θ и отношения $[S]^\delta / K_m$ зависит, в какой области — кинетической ($\theta \ll 1$) или диффузионной ($\theta \gg 1$, $[S]^\delta / K_m \approx 1$) работает система.

На основании уравнения (1) можно сделать некоторые оценки. Каталитический ток, который должен наблюдаться при $\theta \ll 1$, определяется поверхностной концентрацией и эффективностью каталитического действия фермента. При монослойном заполнении поверхности электрода белком средних размеров поверхностная концентрация его составляет $1 \cdot 10^{-11}$ моль/см². Если константа скорости лимитирующей стадии ферментативного превращения близка к 10^3 с⁻¹, каталитический ток будет равен 10^{-4} А на квадратный сантиметр гладкой поверхности.

Условно все ферменты можно разбить на три основные группы: 1) малоактивные, имеющие отношение каталитической константы к константе Михаэлиса $k_{\text{кат}}/K_m < 10^3$ л/моль·с; 2) — активные с $k_{\text{кат}}/K_m$ в интервале 10^6 — 10^3 и 3) — высокоактивные с $k_{\text{кат}}/K_m$ выше 10^6 л/(моль·с). Если условно принять проницаемость диффузионного слоя $P = D/\delta = 10^{-3}$ см/с, для ферментов третьей группы при монослойном заполнении поверхности электрода и при использовании концентраций субстрата, соизмеримых с K_m , скорость ферментативной реакции существенно превысит скорость диффузии и фермент будет работать в строго диффузионном режиме. Уменьшение поверхностной концентрации фермента вплоть до 1% заполнения поверхности не должно заметно изменить регистрируемую скорость процесса. Ферменты первой группы в силу низких значений $k_{\text{кат}}/K_m$ при любой концентрации субстрата будут работать в кинетическом режиме. При этом скорости реакции и, соответственно,

каталитические токи реакций окажутся относительно невелики. Резервы в увеличении скоростей реакций лежат в получении полислоев катализатора.

Очевидно, что реакции ферментов, имеющих кинетические параметры (в л/моль·с) в промежуточной области $10^6 < \frac{k_{кат}}{K_m} < 10^3$, в зависимости от условий эксперимента могут протекать как в диффузионном, так и в кинетическом режиме.

Обычно иммобилизация ферментов на различных носителях приводит к образцам с содержанием белка 10—100 мг на 1 г носителя, что соответствует при «средней» молярной массе белка $3 \cdot 10^4$ г/моль содержанию активных центров $\sim 3 \cdot 10^{-7}$ — $3 \cdot 10^{-6}$ моль/г. При создании из такого образца электрода, работающего в кинетическом режиме со «средней» константой скорости 10^2 с⁻¹, плотности тока должны иметь значения 3—30 А/г. К близким значениям приводят оценки, основанные на данных о поверхности доступных электропроводящих носителей. При использовании носителя с удельной поверхностью 10—50 мг/л и при «среднем» каталитическом токе 10^{-4} А/см² можно ожидать плотности тока при работе электрода в кинетическом режиме 10—50 А/г.

Приведенные оценки иллюстрируют высокие каталитические возможности ферментов в электрохимических системах.

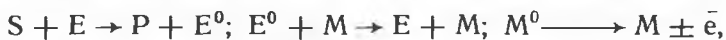
§ 2. Механизмы переноса электрона между активным центром фермента и электродом

В настоящее время имеется определенная информация о поведении ферментов и белков на поверхности ртутного электрода. При адсорбции на поверхности ртути происходят существенные конформационные изменения белков. Молекулы биополимеров «расплющиваются» и «растекаются» по поверхности ртути, образуя монослой толщиной в одну полипептидную цепь. Возникающая структура содержит большое число пор, допускающих диффузию низкомолекулярных реагентов к поверхности электрода. При адсорбции ферментов на твердых поверхностях они, как правило, сохраняют свою структуру и проявляют каталитическую активность. На этом основан способ адсорбционной иммобилизации ферментов.

В рассмотренной схеме катализа ферментами электрохимических реакций использовано предположение о том, что активный центр фермента способен быстро и обратимо обмениваться электронами с электродом. Осуществление такого рода процессов является необходимым условием электрокатализа. Электрокаталитический транспорт электронов может быть осуществлен тремя принципиально различными путями.

1. Перенос электронов протекает с помощью диффузионно-подвижного промежуточного низкомолекулярного переносчика

электронов — медиатора. Схему процесса в этом случае можно представить в виде



где E и E⁰ — окисленная и восстановленная формы активного центра фермента; M и M⁰ — окисленная и восстановленная формы медиатора.

Медиатор должен быть достаточно специфичным субстратом фермента и быть электрохимически активным на электроде из данного материала. Окислительно-восстановительный потенциал медиатора должен быть близок к окислительно-восстановительному потенциалу топлива или окислителя. Важно, чтобы медиатор был достаточно устойчив и не разрушался.

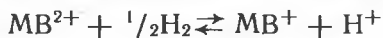
2. Происходит прямой электрокаталитический перенос электронов между электродом и активным центром фермента. Например, в атмосфере кислорода в присутствии медьсодержащей оксидазы — лакказы, сорбированной на электродах из различных материалов, устанавливается потенциал, близкий к термодинамическому потенциалу кислорода. Лакказа катализирует электрохимическое четырёхэлектронное восстановление кислорода; при этом имеет место стадия переноса электронов с электрода на активный центр фермента.

3. При включении ферментов в органические полупроводники (органические металлы) можно наблюдать перенос электронов между активным центром фермента и доменами в полупроводнике.

§ 3. Ферментативное электрохимическое окисление водорода

Водородные электроды послужили модельными системами для создания современной теоретической электрохимии. Они достаточно интересны как в теоретическом, так и в прикладном плане и до настоящего времени. В качестве катализатора для водородных электродов в большинстве случаев используют металлическую платину или другие металлы VIII группы Периодической системы элементов.

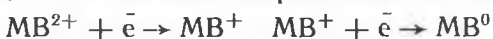
Рассмотрим систему, в которой катализатором ионизации и образования водорода является гидрогеназа — белковый катализатор активации водорода. Процесс протекает по медиаторному механизму переноса. Гидрогеназа ускоряет процесс установления равновесия в системе метилвиологен* — водород:



Было обнаружено, что восстановленный метилвиологен — высокореакционная частица, электрохимически активен на элект-

* Метилвиологен — 1,1'-диметил-4,4'-дипиридинийдихлорид.

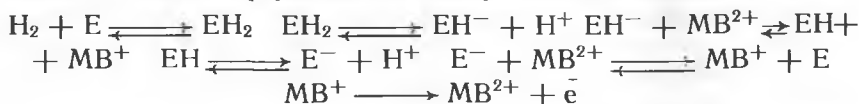
родах из различных материалов. Как следует из полярографических данных, он способен акцептировать один или два электрона:



Нормальный окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{MB}^{2+}/\text{MB}^+$ равен 0,011 В, т. е. весьма близок к окислительно-восстановительному потенциалу водородного электрода*.

Электрохимическое поведение метилвиологена на угольных электродах полностью обратимо, т. е. можно наблюдать как электрохимическое восстановление медиатора, так и окисление его восстановленной формы. Кинетика электрохимических реакций восстановления и окисления метилвиологена достаточно хорошо описывается уравнением идеально поляризуемого электрода. Это указывает на то, что в условиях эксперимента редокс реакции метилвиологена протекают в диффузионном режиме.

Схему процесса ионизации водорода с учетом данных о механизме действия фермента можно представить в виде



Экспериментально было обнаружено, что предельные анодные токи в системе водород — гидрогеназа — метилвиологен зависят от концентрации фермента в растворе. Эта зависимость была объяснена тем, что наблюдается неспецифическое окисление метилвиологена примесями окислителей, приводящее к образованию стационарного состояния по восстановительной форме медиатора.

При высоких концентрациях фермента процесс переходит в чисто диффузионный режим, в котором скорость реакции не зависит от концентрации катализатора. Значения тока на единицу поверхности гладкого электрода — пирографита, соответствующим ожидаемым из рассмотрения кинетической модели биоэлектрокатализа (см. выше).

Существенным резервом повышения общей скорости электродного процесса в системах с участием медиаторов является увеличение концентрации медиатора. Экспериментальное исследование зависимости токов окисления водорода на пирографитовом электроде от концентрации метилвиологена показывает, что при высоких концентрациях медиатора наблюдается существенное отклонение предельного тока от линейной зависимости, которая объясняется обратимой димеризацией медиатора.

Была продемонстрирована принципиальная возможность создания пористых газодиффузионных ферментных электродов. Как известно, угольные электроды инертны в электрохимической

* Значения потенциалов определены относительно водородного электрода в том же растворе.

реакции окисления водорода. Процесс ионизации водорода на угольных электродах протекает с большим перенапряжением. Исследование системы водород — гидрогеназа — медиатор — угольный электрод показало, что в этой системе удастся осуществить окисление молекулярного водорода в условиях, близких к равновесным.

В отличие от обычных водородных электродов специфической особенностью обсуждаемой системы является возможность широкой вариации электрокаталитических параметров путем изменения концентрации фермента и медиатора.

§ 4. Ферментативное электрохимическое восстановление кислорода

Принципиальный интерес представляет исследование ферментативного электрокатализа восстановления кислорода. В «классической» электрохимии электровосстановление кислорода — одна из наиболее сложных проблем. Известно, что равновесный потенциал окисления — восстановления пары O_2/H_2O , равный 1,23 В, устанавливается лишь на предварительно специально обработанной платине и в особо чистых растворах. Токи обмена кислорода на платине весьма малы и составляют 10^{-11} А/см².

В то же время известны ферменты, которые активно восстанавливают кислород по четырехэлектронному механизму до воды без промежуточного образования в растворе пероксида водорода. Таких ферментов немного. В рамках биоэлектрокатализа эти ферменты могут рассматриваться как потенциальные катализаторы реакции катодного восстановления кислорода.

Описаны системы, в которых катализаторами восстановления кислорода служили пероксидаза и цитохром-с-оксидаза. Перенос электронов с электрода на активные центры фермента осуществляли медиаторы. Потенциал электрода, определяемый в этом случае отношением восстановленной и окисленной форм медиатора, составлял 0,6—0,8 В, что значительно ниже равновесного кислородного потенциала.

Лакказы является медьсодержащим ферментом, осуществляющим четырехэлектронное восстановление кислорода при использовании в качестве донора различных ароматических аминов и фенолов. В активный центр фермента входят 4 иона меди, осуществляющие координированное восстановление кислорода. Лакказы — «типичный» фермент в плане каталитической эффективности, имеет $k_{кат} = 200$ с⁻¹ и K_m по кислороду $\sim 10^{-5}$ М.

Известно, что электровосстановление кислорода в нейтральных или слабокислых растворах на угольных материалах протекает со значительным перенапряжением. При введении в систему лакказы в значительных количествах (10^{-9} моль/л) было замечено существенное смещение стационарного потенциала в область положительных значений и ускорение электровосстановления кислорода.

Наблюдаемые эффекты не зависят от природы электрода. Электрохимические измерения проводили на электродах из сажи, пирографита, стеклогуглерода или золота. Имобилизацию лакказы осуществляли адсорбционным способом непосредственно на электрод. В присутствии кислорода и лакказы наблюдалось увеличение потенциала для всех исследуемых электродов. Максимальное значение потенциала $+1,207$ В, близкое к равновесному потенциалу кислородного электрода, устанавливалось на электродах из сажи, которые предварительно были выдержаны в растворе лакказы (10^{-5} моль/л) в течение суток.

Адсорбция фермента на электродах из сажи практически необратима. После иммобилизации электрод сохраняет каталитические свойства в отсутствие лакказы в растворе. Ферментативная природа электрокатализа была доказана его специфическим ингибированием фторид- и азид-ионами, инактивацией ферментов прогреванием, сопоставлением рН-зависимости электрокаталитических эффектов и каталитической активности в реакции окисления феррицианид-иона кислородом.

Экспериментально было обнаружено, что стационарный потенциал электрода зависит от парциального давления кислорода и рН раствора. Для выяснения природы стационарного потенциала, устанавливающегося на электроде с иммобилизованной лакказой, были исследованы зависимости $E_{ст}$ от парциального давления кислорода и рН раствора. Найдено, что $dE_{ст}/d \lg P_{O_2}$ составляет $10-12$ мВ, $dE_{ст}/d \text{pH} \sim 60$ мВ. Эти значения близки к теоретически ожидаемым значениям коэффициентов в уравнении Нернста для системы O_2/H_2O . При исследовании системы методом вращающегося дискового электрода с кольцом образования в растворе промежуточного продукта — пероксида водорода — не обнаружено.

Наблюдаемый электрохимический процесс на электроде с иммобилизованной лакказой определяется реакцией четырех-электронного восстановления кислорода до воды:



Кислородные электроды на основе иммобилизованной лакказы достаточно стабильны.

Таким образом, данные указывают на возможность ферментативного электрокатализа реакции восстановления кислорода по механизму прямого безмедиаторного переноса электронов по цепи электрод — активный центр — молекула кислорода и создают основы разработки эффективных электродов биокаталитического восстановления кислорода.

§ 5. Проводниковые и полупроводниковые матрицы для иммобилизованных ферментов

Один из подходов к осуществлению переноса электронов между активным центром фермента и электродом заключается в использовании для иммобилизации ферментов матриц проводникового

и полупроводникового характера. В настоящее время известны способы, позволяющие иммобилизовать ферменты на носители, обладающие электрической проводимостью. Одним из наиболее перспективных материалов для создания электрокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов является углерод. Для получения электродов с большой поверхностью перспективна высокодисперсная сажа, на которую возможна адсорбционная и химическая иммобилизация ферментов. В ряде случаев адсорбция ферментов на поверхности сажи практически необратима. С использованием различных связующих из сажи может быть сформирован высокопористый электрод, обладающий развитой поверхностью.

Большой класс потенциальных носителей при создании биоэлектрокатализаторов составляют органические полимерные полупроводники. Электрическая проводимость полупроводниковых полимеров может изменяться в широком интервале (10^{-15} — 10^4 Ом $^{-1}$ ·см $^{-1}$) и приближаться к таковой металлов. Для иммобилизации ферментов интерес представляют по крайней мере два класса органических полупроводников.

1. Полимеры с системой сопряженных связей, обладающие длинной цепью сопряжения. Они имеют сравнительно высокую электрическую проводимость и представляют собой электронно-неоднородные системы, в которых области полисопряжений, характеризующиеся «металлической» проводимостью, разделены диэлектрическими участками. Перенос электронов через диэлектрические участки определяет общий барьер транспорта электронов.

2. Полимерные комплексы с переносом заряда (КПЗ). Предельным случаем КПЗ являются ион-радикальные пары. В системах с КПЗ, так же как и в системах с полисопряжением, электрическая проводимость обеспечивается за счет π -электронов, но делокализация их происходит в плоскостях, перпендикулярных плоскостям упакованных в «пачки» молекул. Механизм проводимости обусловлен ион-радикальным диспропорционированием в «пачках», состоящих из доноров и акцепторов электронов.

Классическим примером проводников, действующих по ион-радикальному механизму, являются соли на основе тетрацианхинодиметана (ТЦХДМ). Проводимость в таких системах обычно связывают с образованием КПЗ между молекулами ТЦХДМ. Очевидно, что для эффективного переноса электрона из полупроводника на активный центр фермента должно существовать определенное энергетическое соответствие, например, между уровнем Ферми полупроводника и окислительно-восстановительным потенциалом группы активного центра, акцептирующей электрон. Систематические исследования в этой области пока отсутствуют; давать обоснованные рекомендации еще нельзя.

Следует отметить, что оба указанных класса органических полупроводников могут быть использованы как носители иммобилизованных ферментов для целей биоэлектрокатализа.

Термически модифицированные полиакрилонитрилы. Термически обработанный полиакрилонитрил является достаточно хорошо изученным полимерным полупроводником. Электрическая проводимость образцов зависит от температуры термической обработки.

Носители были химически модифицированы: окислением концентрированной азотной кислоты (введение нитро- и гидроксигрупп), обработкой гидразином, восстановлением с образованием аминогрупп. Имобилизацию гидрогеназы проводили на окисленных образцах термически обработанного полиакрилонитрила после гидрогенолиза и восстановления с использованием бифункционального реагента — глутарового альдегида. В ряде экспериментов гидрогеназу иммобилизовали на окисленный полимер, обработанный гексаметилендиамином.

Интересно отметить, что между степенью окисления термически обработанного полиакрилонитрила и активностью иммобилизованного на нем фермента существует определенная корреляция. Аналогичная зависимость наблюдается между электрической проводимостью матрицы и остаточной активностью фермента. Неактивный фермент, иммобилизованный на матрицах с высокой электрической проводимостью или степенью окисления, может быть активирован продолжительным восстановлением матрицы с ферментом восстановленной формой метилвиологена.

Таким образом, термически модифицированный полиакрилонитрил, обладающий высокой электрической проводимостью, может служить носителем для иммобилизованных ферментов. Емкость носителя — до 100 мг белка на 1 г полимера. Такой гетерогенный катализатор можно использовать в качестве компонента композиционных электродных материалов.

Полупроводниковые полимерные носители на основе комплексных солей тетрацианхинодимертана. В общем случае для прямого транспорта электрона необходима достаточно строгая ориентация активного центра фермента относительно электрода с созданием наименьшего (или оптимального) расстояния для переноса электрона. В этом плане интерес представляет разработка носителей, обладающих свойствами водопроницаемых полимеров с высокой электрической проводимостью. Включение окислительно-восстановительных ферментов в такого рода полимеры должно приводить к возникновению необходимых для прямого транспорта электрона статистически возникающих структурных соответствий.

Способ получения таких иммобилизованных ферментов заключается в соосаждении поликатионов с ферментами под действием полувосстановленной соли ТЦХДМ. Фермент иммобилизуется в водопроницаемые полимеры с высокой электрической проводимостью (вплоть до 10^{-2} Ом⁻¹·см⁻¹). Емкость носителей — до 500 мг белка на 1 г носителя.

Использование полимеров на основе комплексных солей ТЦХДМ позволяет осуществить перенос электрона между электронпроводящей матрицей с активным центром фермента. Образование водорода происходит только в присутствии гидрогеназы,

иммобилизованной в полупроводниковую матрицу. Транспорт электрона в этом случае можно представить в виде
электрод→матрица→активный центр→H₂.

Интересно отметить, что гидрогеназа, иммобилизованная в полупроводник, обладает более высокой специфической активностью.

Эффект «электронной губки» в системах полупроводниковая матрица — фермент. Электропроводящая полупроводниковая матрица выступает в качестве донора (акцептора) электронов для активного центра фермента. Проводя электрохимические реакции с матрицей, восстанавливая полимер, можно наблюдать эффект «электронной губки» — обратимого окисления или восстановления матрицы — и процессы ферментативной каталитической трансформации носителей электричества.

Рассмотрим эффект «электронной губки» на примере гидрогеназы, иммобилизованной на термически обработанном полиакрилонитриле. В электрохимической ячейке суспензию полупроводника с иммобилизованным ферментом поляризовали с помощью дополнительного электрода. После снятия поляризующего потенциала наблюдали образование молекулярного водорода, протекающее с участием активного центра гидрогеназы. Процесс можно остановить введением в систему ингибитора фермента.

Известно, что структура органических полупроводников характеризуется наличием хорошо проводящих доменов — областей полисопряжения, разделенных диэлектрическими барьерами. Домены являются донорами — акцепторами электрона. Перенос электронов через диэлектрические участки относится к активационному процессу. Для описания поведения ферментов в органических полупроводниках полезно ввести представления об энзомене — структурной единице, включающей активный центр фермента, связанный с группой доменов, способных обмениваться электронами между собой и переносить электроны на активный центр. Определение предельного количества водорода, выделяющегося на один активный центр фермента, показывает, что энзомен включает около 40 доменов (в предположении, что каждый домен способен акцептировать один электрон).

В системах с участием энзоменов протекает несколько последовательных процессов: 1) междоменный обмен электронами; 2) перенос электронов на активный центр (восстановление активного центра); 3) образование продукта восстановленным активным центром фермента. Исследование кинетики выделения водорода после предварительной поляризации матрицы для образцов с различным удельным содержанием активных центров фермента показало, что скорость процесса лимитирует ферментативная стадия. Междоменный обмен и перенос электронов на активные центры фермента протекают существенно быстрее.

§ 6. Перспективы практического использования биоэлектродкатализа

Использование ферментов как катализаторов переноса электронов в электрохимических элементах, осуществляющих преобразование химической энергии в электрическую, достаточно перспективно. Попытки создания такого рода систем известны. Топливный элемент, в котором топливом служит глюкоза, а окислителем — кислород, растворенный в крови, предполагается применить для электростимуляции сердечной деятельности.

Разработка электрохимических преобразований энергии может происходить двумя путями: использованием способности ферментов катализировать окисление различного рода органических субстратов — спиртов, углеводов (это позволяет надеяться на разработку электродкатализаторов, окисляющих органические топлива) и созданием электрохимических преобразователей с высокими удельными характеристиками. Эффективность ферментов как катализаторов при решении высоких скоростей реакции и высоких удельных мощностей систем.

Статистический анализ констант скоростей различных окислительно-восстановительных процессов, катализируемых ферментами, показывает, что достаточно распространены процессы с $k_{\text{кат}}$ около $5 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$. В соответствии с этим в ферментативных системах могут быть достигнуты весьма высокие скорости реакций. Если, например, в систему введен фермент в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л (высокая, но вполне достижимая концентрация), то при «насыщении» фермента субстратом ($[S]_0 \gg K_m$) скорость процесса будет равна 1 моль/(л·с). Такая скорость переноса электронов соответствует «микротокам» в 10^5 А/л. Если при этом удалось бы реализовать процесс в макрокинетическом режиме и генерировать электрохимический потенциал на двух электродах с разностью потенциалов в один вольт, общая мощность такого преобразователя энергии соответствовала бы 100 кВт. Полученные оценки предельных мощностей ферментных электрохимических преобразователей являются одним из стимулов для развития работ в области биоэлектродкатализа.

Перспективным представляется исследование биоэлектродкатализа гидрогеназами, системами ферментов, окисляющими метан и метанол, глюкозооксидазой, дегидрогеназами различных кислот, альдегидов, спиртов. Для разработки биокатода интересно изучать ферменты, активирующие молекулярный кислород. Выше продемонстрированы возможности создания катода и анода на основе иммобилизованной лактазы и гидрогеназы. Конструирование биоэлектрохимических преобразователей энергии, имеющих параметры, приближающиеся к теоретически возможным значениям, сдерживается отсутствием достаточно больших количеств необходимых ферментных препаратов. Эта трудность с развитием инженерной энзимологии будет, безусловно, преодолена.

Другим направлением использования биоэлектродокатализаторов в электрохимических системах является разработка «безреагентных» методов анализа на основе ферментных электродов (см. также гл. 5).

В зависимости от способа электрохимической регистрации сигнала ферментные электроды подразделяются на амперометрические и потенциометрические. В первом случае регистрируется изменение тока в системе, а во втором — ее потенциал, которые обусловлены протеканием ферментативной реакции. Концентрацию определяемого компонента производят по соответствующему калибровочному графику.

В амперометрических ферментных электродах используют, как правило, окислительно-восстановительные ферменты, относящиеся к классу оксидаз, и катализирующие окисление различных субстратов кислородом. При этом в процессе реакции происходит потребление кислорода, а продуктом является пероксид водорода или вода. К одному из наиболее ценных соединений, анализ которого важен в медицине, микробиологической или пищевой промышленности, относится глюкоза. Ее определение с использованием ферментного электрода основано на реакции окисления глюкозы кислородом или искусственным акцептором электронов, катализируемое глюкозооксидазой. В процессе ферментативной реакции, протекающей в тонкой пленке иммобилизованной глюкозооксидазы, непосредственно контактирующей с электрохимическим детектором, в системе изменяются такие параметры, как рН раствора, концентрация кислорода и пероксида водорода. Причем их изменение происходит в строгом соответствии с определенной концентрацией глюкозы, что позволяет ее количественно определить по соответствующему калибровочному графику. В соответствии с этим можно выбрать тот или иной способ детекции. Изменение концентрации кислорода регистрируется кислородным электродом, отделенным от исследуемого раствора проницаемой для газов мембраной. Электрохимическая реакция происходит при потенциале электрода, соответствующем предельному диффузионному току кислорода. При регистрации пероксида водорода в конструкции электрода отсутствует полупроницаемая мембрана и анализ глюкозы проводят при потенциале электроокисления пероксида водорода.

Вместо кислорода в реакции, катализируемой глюкозооксидазой, могут выступать искусственные акцепторы электронов, такие, как хиноны, поливиологены и другие соединения. Восстановленные в результате ферментативной реакции переносчики окисляются при соответствующих потенциалах на электроде. Наиболее удобной является конструкция, когда переносчик электронов и фермент ковалентно закреплены на поверхности электрода.

Предложен метод иммобилизации ферментов в полупроводниковых матрицах, компонентами которых являются анион-радикал тетрациан-*n*-хинодиметана и полимерных субстратов

фермента. Такой способ иммобилизации позволяет получить гетерогенный биокатализатор, обладающий электрической проводимостью и высоким удельным содержанием фермента. Кроме того, в результате иммобилизации повышаются удельная активность и стабильность фермента. Электроды, изготовленные с помощью такого биокатализатора, позволяют в ряде случаев повысить чувствительность метода анализа и расширить линейную область отклика электрода от концентрации определяемого субстрата.

Описанные способы анализа являются в известной степени универсальными и позволяют определять десятки различных соединений, подбирая тот или иной фермент и соответствующий ему и способу детекции метод иммобилизации.

Использование для аналитических целей сопряженных ферментативных реакций открывает принципиально новые возможности ферментных электродов. Суть их сводится к подбору мультиферментных систем, катализирующих последовательные превращения, в начале которых находится определяемое вещество, а в конце — электрохимически активный продукт ферментативной реакции. Одним из вариантов этого подхода служит создание электродов на основе иммобилизованных клеток, которые исходно содержат сопряженные мультиферментные системы. Этот метод позволяет проводить определение требуемого компонента на основе ферментов, являющихся малостабильными *in vitro*, и избежать сложности, связанные с иммобилизацией нескольких ферментов. Однако время измерения на таких электродах резко возрастает, а чувствительность анализа падает.

По-видимому, в ближайшее время будут разработаны методы анализа, основанные на иммуноферментных подходах и электрохимической детекции. В частности, перспективным представляется использование ЕМІТ-анализа в сочетании с ферментными электродами, что позволяет конструировать системы непрерывного анализа антигенов.

Важной представляется реализация электросинтетических возможностей иммобилизованных ферментов. При создании обратимых электродов на основе иммобилизованных ферментов удалось бы решить проблему биоспецифического электросинтеза. Сопряжение электродных и ферментативных процессов открывает весьма перспективные пути для электросинтеза. Проведение ферментативных электросинтетических процессов *in vivo* в принципе дает возможность поставить задачу создать системы анаэробного дыхания и электропитания живых организмов — замкнуть энергетику метаболических циклов на электроэнергию.

Проблемы охраны окружающей среды, контроля биотехнологических процессов, увеличение числа клинических тестов в медицинской диагностике требуют все более широкого использования в практике и научных исследованиях селективных, высокочувствительных, быстрых и экономных методов анализа. Наряду с усовершенствованием различных физико-химических инструментальных методов (хроматографические, радиохимические, люминесцентные и др.) широкое применение получают методы анализа с использованием в качестве реагентов ферментов для обнаружения и количественного определения самых разнообразных веществ: металлов, органических и неорганических соединений, метаболитов, ферментов, мутагенов, онкогенов и т. д.

§ 1. Ферменты — идеальные аналитические реагенты

Интерес к аналитическому применению ферментов объясняется прежде всего уникальными свойствами природных биокатализаторов. Какие же свойства обуславливают идеальную пригодность ферментов как аналитических реагентов?

Специфичность действия ферментов — наиболее важное его свойство. Большинство ферментов активны только в реакциях с субстратом строго определенной структуры или с группой субстратов, имеющих общие структурные группы. Например, фермент глюкозооксидаза окисляет только глюкозу, поэтому ферментативное определение глюкозы можно проводить без разделения сложной смеси моно- и олигосахаридов, что, естественно, упрощает выполнение анализа.

Высокая каталитическая активность ферментов позволяет осуществлять ферментативную реакцию даже при очень малых концентрациях субстратов, на чем и основаны ферментативные методы определения микроколичеств веществ. Например, перок-

сидаза с заметной скоростью катализирует окисление ароматических аминов уже при концентрациях $\text{H}_2\text{O}_2 \geq 0,1$ ммоль/л. Именно с помощью ферментов достигаются исключительно низкие пределы обнаружения веществ. Например, при использовании люциферазы биолюминесцентным методом определяют даже фемтомольные (10^{-15} моль/л) концентрации АТФ, ФМН или НАД · Н₂.

Простота выполнения анализа и экспрессность являются следствием первых двух свойств ферментов. Здесь не требуется сложных манипуляций по разделению или концентрированию анализируемой смеси. Ферментативная реакция протекает быстро даже при очень малых концентрациях определяемого вещества, поэтому анализ можно провести с минимальной затратой времени и усилий оператора.

Многообразие веществ, которое можно определять с помощью ферментов, — одно из важнейших достоинств ферментативных методов анализа. Многие вещества — это либо субстраты, либо эффекторы (активаторы или ингибиторы) ферментов. Ученые, все глубже проникая в тайны живой клетки, открывают новые специфические ферменты, выясняют механизм действия на ферменты различных веществ, которые активируют или ингибируют биохимические реакции. Поэтому постоянно увеличивается число веществ, определяемых с помощью ферментов, и сейчас уже трудно назвать такое органическое соединение, которое нельзя было бы анализировать с использованием ферментных методов.

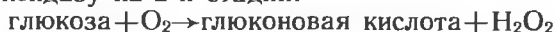
§ 2. Применение в анализе сопряженных ферментативных систем

Многие ферментативные процессы взаимосвязаны, т. е. продукт одной ферментативной реакции, как правило, является субстратом другой. Если инструментально трудно идентифицировать продукт первой реакции, то берется второй фермент, который превратит первый продукт в легко детектируемое вещество. С помощью таких сопряженных ферментативных реакций не только расширяется круг определяемых веществ, но во многих случаях значительно увеличивается чувствительность анализа.

Рассмотрим один пример с применением уже упоминавшегося фермента — глюкозооксидазы. Как использовать этот фермент для анализа, например, сахарозы? Берут два фермента: сахарозу на 1-й стадии:

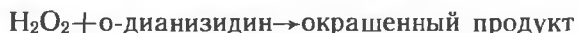


и глюкозооксидазу на 2-й стадии:



Количество образовавшейся H_2O_2 будет пропорционально количеству анализируемой сахарозы. H_2O_2 можно, например,

определить полярографически: по убыли кислорода или по накоплению H_2O_2 . В этом случае нижний предел обнаружения сахарозы составит 0,1 ммоль/л. Если же анализируются меньшие количества сахарозы, то используют третий фермент — пероксидазу, катализирующую реакцию



В этом случае чувствительность анализа повышается в 100—1000 раз.

§ 3. Кинетические основы ферментативных методов анализа

Ферментативные методы анализа — это частный случай так называемых кинетических методов анализа, когда вещество определяют по скорости реакции, которая пропорциональна концентрации этого вещества. Рассмотрим простейшую реакцию превращения вещества (А) в продукт (Р);



Концентрация Р будет нарастать во времени, при этом начальная скорость процесса v_0 будет пропорциональна концентрации [А]:

$$v_0 = k[\text{A}],$$

где k — константа скорости реакции.

Чем выше [А], тем больше v_0 . С помощью предварительно построенного калибровочного графика (зависимость v_0 от [А]) можно измерять неизвестные концентрации вещества А в анализируемой смеси.

На практике используются и другие варианты кинетического метода. В методе «фиксированного времени» реакцию останавливают через определенное время и измеряют концентрацию образовавшегося продукта [Р]_τ. Калибровочный график будет описывать зависимость [Р]_τ от [А]. Нередко используется метод «конечной точки». В этом случае реакцию доводят до конца (до полного превращения А в Р) либо до равновесия, поскольку многие ферментативные реакции являются обратимыми:



Затем строят калибровочный график зависимости [Р]_∞ от [А].

§ 4. Методы детекции в ферментативном анализе

Ферменты наиболее эффективно используются в тех случаях, когда анализируемое вещество трудно или даже невозможно обнаружить в сложной смеси с помощью быстрых и удобных физико-химических методов: спектроскопически, электрохимиче-

ски или люминесцентно. В реакции, катализируемой ферментом, это вещество превращается в продукт, который легко детектируется инструментально. В этом состоит одно из главных удобств и преимуществ ферментных методов. В зависимости от того, какие концентрации веществ анализируют, выбирают и соответствующий метод детекции. Поясним это на нескольких примерах.

Имеется большая группа специфических ферментов — ФАД-зависимых оксидаз. Они катализируют окисление кислородом воздуха специфических субстратов (глюкоза, холестерин, аминокислоты и др.). В этих случаях образуется один и тот же продукт — H_2O_2 . Таким образом, анализ различных субстратов сводится к определению H_2O_2 , которое можно проводить не только электрохимически или спектрофотометрически (о чем уже говорилось), но и с помощью флуори- или хемилюминесценции, используя следующие реакции, катализируемые пероксидазой:



Этими методами можно определять количества H_2O_2 до 10^{-9} и 10^{-10} моль/л.

Другой пример — применение специфических дегидрогеназ, которые окисляют различные субстраты: спирты, оксикислоты, аминокислоты, оксистероиды и другие — с помощью НАД. При этом образуется восстановленный НАД· H_2 . В зависимости от того, какие концентрации субстратов необходимо определять, можно использовать один из подходящих методов анализа НАД· H_2 :

<i>Метод</i>	<i>Предельно низкая обнаруживаемая концентрация вещества, мкмоль/л</i>
Электрохимический	100
Спектрофотометрический (360 нм)	1
Флуоресцентный (450 нм, возбуждение при 360 нм)	0,001
Биолюминесцентный (в сопряженной реакции с биферментной реакцией светящихся бактерий)	0,000001

Чувствительность анализа в зависимости от используемого метода детекции можно варьировать от 1 мкмоль/л до 1 нмоль/л НАД· H_2 .

§ 5. Преимущества использования в анализе иммобилизованных ферментов

Несмотря на явные преимущества ферментативных методов анализа, их применение до недавнего времени ограничивалось лишь областью клинической биохимии. Это объясняется несколь-

кими причинами: 1) ферменты — это, в большинстве случаев, весьма дорогостоящие препараты, выделяемые из дефицитного растительного или животного сырья; 2) многие ферменты в растворе весьма нестабильны и быстро теряют свою каталитическую активность; хранятся они, как правило, при низкой температуре; 3) растворимые ферменты очень чувствительны к действию различных примесей, которые могут содержаться в анализируемых объектах; 4) растворимые ферменты могут быть использованы лишь один раз, что также повышает стоимость анализа.

Для широкого внедрения ферментных методов анализа в медицину, экологию и технологическое производство необходимо было решить несколько практически важных задач: найти более дешевые и доступные источники ферментов, повысить стабильность биокатализаторов, сделать возможным многократное использование препаратов. Это достигается методами биотехнологии, технической микробиологии и генной инженерии.

Ферменты растительного или животного происхождения постепенно заменяются на микробные ферменты. Биотехнологи и генные инженеры научились получать «по заказу» такие штаммы-мутанты, которые синтезируют необходимый фермент в десятки и сотни раз больших количествах, чем исходные штаммы. Понятно, насколько упрощается работа по получению и выделению ферментов из таких источников. Особо важную роль в расширении использования ферментативных методов анализа сыграло внедрение в аналитическую практику иммобилизованных ферментов. Методами инженерной энзимологии можно получать различные формы гетерогенных стабилизированных биокатализаторов, которые лишены многих недостатков, присущих растворимым ферментам. Иммобилизованные ферменты могут применяться многократно, обладают повышенной стабильностью и к тому же менее чувствительны к действию случайных примесей в анализируемых смесях. Иммобилизованные ферменты во многих случаях оказались более эффективными, чем химические реагенты.

§ 6. Первые работы по аналитическому применению иммобилизованных ферментов

Первые работы по аналитическому использованию иммобилизованных ферментов относятся к середине 60-х годов. В 1965 г. Дж. Гилболт включил холинэстеразу в крахмальный гель, который нанесли на полиуретановую пластинку и применили для обнаружения фосфорорганических инсектицидов в воздухе. Холинэстераза очень чувствительна к фосфорорганическим соединениям, легко ими ингибируется. После пропускания известного объема анализируемого воздуха через ферментный датчик измеряют остаточную активность холинэстеразы. Зная исходную активность фермента A_0 и активность после контакта с ингиби-

тором А, рассчитывают их разность ΔA . По градуировочному графику зависимости ΔA от концентрации ингибитора находят содержание этих токсичных веществ. Имобилизованная холинэстераза используется в автоматических датчиках в промышленном производстве инсектофунгицидов для постоянного контроля воздушной среды цехов.

В 1966 г. Г. Хикс и С. Апдайк впервые применили аналитические колоночные реакторы с ферментами, включенными в полиакриламидный гель. С помощью глюкозооксидазы определяли глюкозу, а лактатдегидрогеназы — молочную кислоту. Субстраты пропускали через небольшие колонки объемом 1—5 мл; образующийся продукт (H_2O_2 или $НАД \cdot H_2$) исследовали колориметрически. С одной колонкой, т. е. с одной порцией иммобилизованного фермента, удавалось проводить десятки и даже сотни анализов. С этого времени и началась эра иммобилизованных ферментов в химическом анализе. Дальнейшее развитие работ в этой области происходило по нескольким направлениям.

§ 7. Аналитические проточные реакторы с иммобилизованными ферментами

Многие фирмы выпускают проточные клинические анализаторы метаболитов и ферментов, и их прежде всего стали приспособлять для работы не с растворимыми, как раньше, а с иммобилизованными ферментами. Метод регистрации продукта реакции оставался прежним (либо спектрофотометрическим — для цветных индикаторных реакций, либо электрохимическим — при использовании потенциометрических или амперометрических датчиков). Были предложены самые разнообразные реакторы с иммобилизованными ферментами — в виде колонок, трубок, полых нитей. Для заполнения колонок использовали ферменты, ковалентно связанные с аминированным стеклом, акриловыми полимерами, агарозой или сефарозой, найлоновым порошком, силикагелем, силохромом и др. Основное требование к носителям — это способность связывать наибольшее количество фермента, обеспечивать быстрое прохождение анализируемой смеси через реактор и отсутствие сильной неспецифической сорбции компонентов анализируемой смеси на носителе, поскольку это может приводить к падению активности фермента и к увеличению давления в колонке.

Одним из лучших носителей для колоночных реакторов оказалась сефароза, активированная бромцианом. На ней успешно иммобилизовали и использовали в анализе не только отдельные ферменты, но и полиферментные системы. Один из первых таких датчиков был предложен для определения триптофана. Два фермента: триптофаназу и лактатдегидрогеназу — соимобилизовали на ВгСN-сефарозе, заполнили колонку. Анализируемую смесь с добавкой двух кофакторов: пиридоксальфосфата

и НАД·Н₂ пропускали через колонку. При этом протекали следующие сопряженные реакции:



Убыль НАД·Н₂ в системе измеряли по уменьшению оптической плотности раствора при 360 нм после прохождения его через колонку. Содержание триптофана в интервале концентраций 2,5—20 мкмоль/л было пропорционально скорости расходования НАД·Н₂

Р. Сандерем (1977) в качестве ферментных реакторов использовал нейлоновые трубки. Внутренняя поверхность частично была гидролизована кислотой, затем на нейлоне ковалентно был иммобилизован фермент. Эти трубки подсоединяли в автоматические проточные анализаторы фирмы «Техникон». Через такой реактор насосом прокачивали анализируемую смесь. Длина трубки (около 3 м) подбиралась такой, чтобы на выходе из нее ферментативная реакция заканчивалась. На выходе измеряли концентрацию образовавшегося продукта, которая была пропорциональна концентрации исходного, анализируемого субстрата. С помощью таких реакторов определяли самые различные метаболиты и лекарства в сыворотке крови: мочевину, мочевую кислоту, аминокислоты, глюкозу, лактозу, мальтозу, пенициллин и др.

Оригинальный вариант ферментного реактора предложили итальянские химики (В. Маркони и др., 1975). Они разработали метод включения фермента внутрь полых волокон триацетатцеллюлозы в момент ее формования, т. е. в момент вытягивания нити из раствора. Фермент оказывался включенным во внутреннюю полость, куда могут проникать только низкомолекулярные субстраты. Эти нити накручивали в виде катушек, заключали в стеклянную оболочку и через такой ферментный реактор пропускали анализируемую смесь.

С помощью этого метода В. Маркони определял пенициллин, мочевину, глюкозу и другие важные для клинической химии вещества.

§ 8. Ферментные микрокалориметрические датчики

В 1975 г. К. Мосбах с сотр. (Швеция) впервые предложили использовать в колоночных ферментных реакторах микрокалориметрический датчик для анализа метаболитов. Принцип дей-

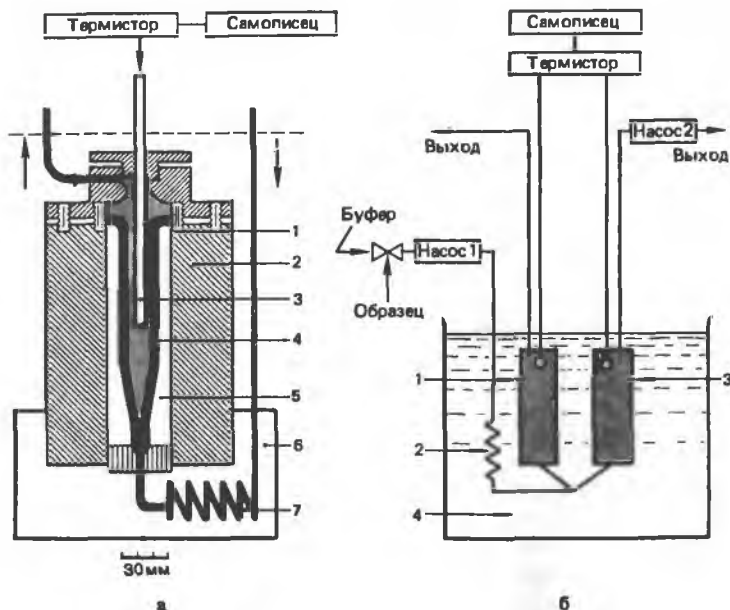


Рис. 12. Микрокалориметрический датчик для анализа метаболитов с помощью иммобилизованных ферментов:

а — устройство измерительного блока; 1 — крепление верхней и нижней части колонки; 2 — металлический блок; 3 — термистор; 4 — микроколонка, заполненная иммобилизованным ферментом; 5 — внутренняя часть блока; б — водяная баня; 7 — теплообменник; б — общая схема установки: стрелками показано направление потока анализируемого раствора; 1 — колонка с ферментом; 2 — теплообменник; 3 — колонка сравнения; 4 — водяная баня

ствия такого датчика показан на рис. 12. Он состоит из двух идентичных колонок, заполненных иммобилизованным на стекле или сефарозе ферментом. В нижней части каждой колонки имеется термистор. Если через обе колонки прокачивается буферный раствор и никакой реакции не происходит, то разность температур между двумя термисторами равна нулю. Когда в измерительную колонку вводится буферный раствор, содержащий анализируемый субстрат, то в результате ферментативного превращения субстрата выделяется теплота. Температура в этой колонке повышается. Фиксируемая разность температур пропорциональна количеству превращенного субстрата. Преимущество такого термометрического датчика состоит прежде всего в том, что он может быть использован для любой ферментной системы, непрозрачных сред, для реакций, где не образуется окрашенного продукта. Чувствительность метода позволяет обнаруживать микромолярные количества самых разнообразных веществ.

§ 9. Ферментные электроды

Рассмотрим еще один тип ферментных реакторов — ферментные электроды, в которых фермент и электрод образуют единую конструкцию, не требующую для их функционирования дополнительных реагентов, кроме буферного раствора. Такие электроды получили название «безреагентных» датчиков, а основанные на их использовании методы анализа называются «безреагентными».

Основной ферментного электрода является обычный электрод. Ионоселективный электрод генерирует потенциал E , значение которого пропорционально логарифму активности ионов:

$$\Delta E = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{a'}{a''},$$

где Z — заряд электрона; F — постоянная Фарадея; a' и a'' — активности ионов во внутреннем и внешнем объеме электродного пространства. Наиболее известен стеклянный электрод для измерения рН. Если его окружить мембраной, селективно про-

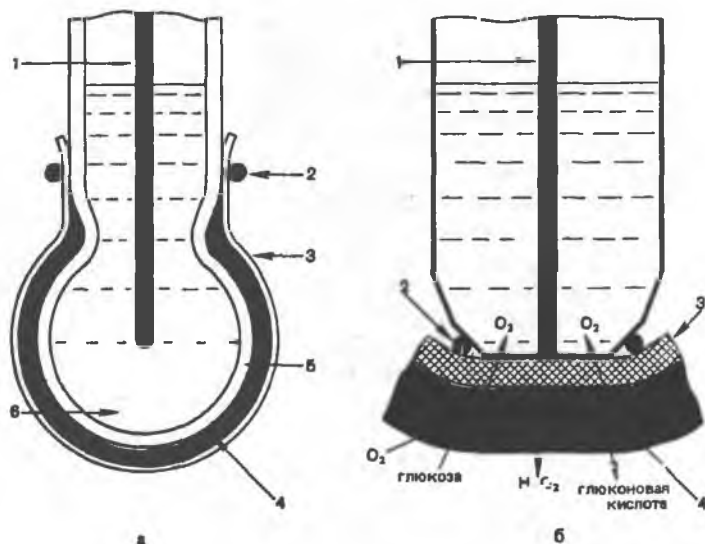


Рис. 13. Ферментные электроды:

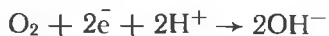
a — ферментный электрод на основе стеклянного электрода для измерения рН: 1 — металлический электрод; 2 — резиновое кольцо; 3 — диализная пленка или другая полупроницаемая мембрана; 4 — раствор фермента или слой полимерного геля, содержащего фермент; 5 — стеклянная мембрана; проницаемая для ионов водорода; 6 — приэлектродный буферный раствор; *б* — схема электрода для определения глюкозы: 1 — катод; 2 — электрод сравнения, находящийся во внутреннем буферном растворе; 3 — полупроницаемая полимерная мембрана; 4 — слой иммобилизованной глюкозооксидазы

пускающей в приэлектродное пространство газ, который при реакции с водой образует кислоту или основание, то получают газовый мембранный электрод. С помощью такого электрода можно определять NH_3 , HF , CO_2 и т. д. С использованием селективных мембран были изготовлены и другие ионоселективные электроды (рис. 13).

Второй тип электрохимических датчиков, наиболее пригодных для целей ферментативного анализа, — это амперометрические датчики (платиновые, золотые, угольные электроды) для определения O_2 , H_2O_2 , феррицианид-, иодид-ионов. В этих датчиках регистрируемый диффузионный ток пропорционален концентрации определяемого вещества $[C]$, которое окисляется на электроде:

$$i = k[C].$$

Среди амперометрических датчиков наиболее известен кислородный электрод Л. Кларка, предложенный в 1956 г. для измерения парциального давления кислорода в крови. Мембраны кислородных датчиков изготавливаются из полиэтилена, полипропилена, тефлона, они пропускают только кислород, который восстанавливается при потенциале $\sim 0,7$ В:



Если ферментативная реакция сопровождается изменением концентрации таких частиц, как H^+ , OH^- , O_2 , H_2O_2 , то для контроля ее скорости можно применить электрохимические датчики.

Подобные электроды вместе с иммобилизованными ферментами, образуя единую конструкцию, представляют собой ферментный электрод. Каким образом создается такая единая конструкция? В простейшем случае растворимый фермент или фермент, иммобилизованный на растворимом носителе, помещается в приэлектродном слое, отделенном от остального пространства диализной мембраной. Однако чаще ферменты включают в полимерные или гелевые пленки альбумина, желатина, коллагена, агар-агара, гидроксида алюминия или ковалентно присоединяют к полупроницаемым целлюлозным, поликарбонатным мембранам или к поверхности стеклянных дисков. Затем такая пленка (или диск) прикрепляется к поверхности электрода. Дж. Гилболт (1973) при изготовлении электрода наносил раствор альбумина или желатина с ферментом на поверхность электрода, перемешивал, затем добавлял каплю глутарового альдегида, и через несколько минут на поверхности электрода образовывался плотный гель, содержащий фермент (рис. 13).

Потенциометрические ферментные электроды были предложены для определения аминокислот, мочевины, нитрат- и нитрит-ионов, пенициллина. В качестве ферментов в них использовались оксидазы или декарбоксилазы аминокислот, уреазы, нитрит-

и нитратредуктаза и другие, а в качестве электрохимических датчиков — стеклянный рН-электрод, газовые электроды для CO_2 , NH_3 или CN^- , NH_4^+ -специфичные электроды.

В амперометрических ферментных датчиках чаще всего применяются ФАД-зависимые оксидазы для определения глюкозы, холестерина, аминокислот и т. д. в сочетании с O_2 - или H_2O_2 -электродами.

В электрохимических безреагентных сенсорах на основе НАД-зависимых дегидрогеназ важной проблемой является регенерация кофермента и предотвращение его потерь в ходе анализа. Для этого используется НАД, ковалентно связанный с декстраном. НАД-декстран, к тому же, отличается повышенной стабильностью. Такие сенсоры позволяют определять 0,1—1 ммоль/л глутамата, пирувата, до 4 ммоль/л лактата.

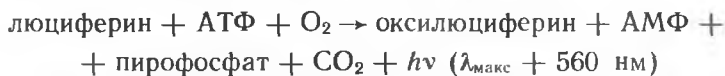
В ферментных электродах, как и в других ферментных аналитических системах, могут быть использованы не только одноферментные, но и полиферментные системы и даже клетки микроорганизмов. В последнем случае получают так называемые «бактериальные» электроды. Г. Рехниц в 1977 г. покрыл NH_3 -чувствительный электрод пастой клеток *Streptococcus faecalis* и определял с его помощью аргинин по реакции дезаминирования. Время работы такого электрода составило 20 сут, а время ответа — 20 мин. Если на электрод наносить предварительно разрушенные клетки, то время ответа сокращается до 10 мин, а продолжительность работы электрода возрастает до 40 сут.

При оптимизации работы ферментных электродов необходимо учитывать большую роль диффузионных эффектов, особенно когда измерения ведутся по диффузионному току. При этом важное значение имеют толщина мембраны, ее проницаемость и стабильность. В целом стабильность ферментных электродов колеблется от нескольких дней до нескольких месяцев. Но в процессе работы операционные характеристики электродов постепенно изменяются, что затрудняет стандартизацию методов анализа и широкое внедрение ферментных электродов в практику аналитических и клинических лабораторий.

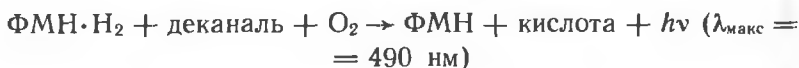
§ 10. Биоломинесцентный микроанализ

Стремление к повышению чувствительности методов микроанализа объясняет все возрастающий интерес к люминесцентным методам анализа: био- и хемилюминесцентным. В этих методах используются следующие реакции:

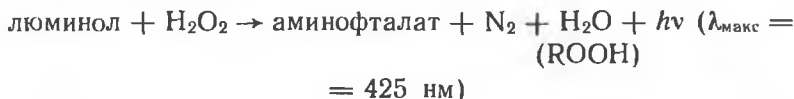
1) реакция, катализируемая люциферазой* светляков:



2) реакция, катализируемая биферментной системой (люцифераза + оксидоредуктаза) светящихся бактерий:



3) реакция, катализируемая ионами или комплексами железа, пероксидазой, геминном:



При анализе регистрируется свет, излучаемый электронно-возбужденными продуктами реакции, интенсивность которого в оптимальных условиях проведения процесса пропорциональна

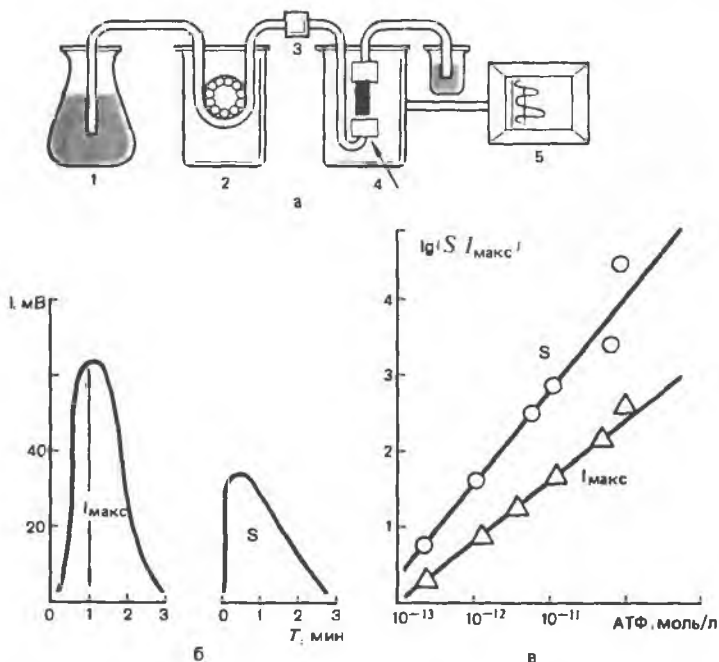


Рис. 14. Билюминесцентный микроанализ с колоночным реактором:

а — схема установки; 1 — раствор субстрата; 2 — перистальтический насос; 3 — устройство для ввода анализируемого образца; 4 — колонка с иммобилизованной люциферазой в кюветном отделении люминиметра; 5 — регистрирующее устройство (самописец или дисплей); *б* — вид получаемых кривых зависимости интенсивности свечения от времени при введении различных образцов АТФ; *в* — калибровочный график для определения АТФ по площади под кривой (*S*) или по максимальной интенсивности свечения ($I_{\text{макс}}$)

концентрации таких важных метаболитов или коферментов, как АТФ, НАД·Н₂, Н₂О₂, гемин, ФМН и т. д. Высокая специфичность этих реакций по отношению к определяемым субстратам, высокий квантовый выход (от 0,01 до 1,0) позволяет анализировать многие вещества с пределом обнаружения до 1 фмоль при использовании полиферментных сопряженных реакций.

В 1976 г. впервые были получены препараты иммобилизованной люциферазы бактерий. В 1977 г. люциферазу светляков иммобилизовали на стеклянных шариках и на ВгСN-сефарозе. Из стеклянных шариков были изготовлены стержни, с их помощью определяли 10⁻⁶ моль/л и более высокие концентрации НАД·Н₂ и АТФ. Позднее в качестве носителей применяли диализные пленки, ацетатцеллюлозные мембраны, целлюлозу и др. Иммобилизованные люциферазы имеют в 10—100 раз более высокую стабильность, их можно использовать многократно для определения АТФ, НАД·Н₂.

На рис. 14 показано устройство колонного проточного анализатора с иммобилизованной люциферазой. Небольшая колонка 4, заполненная ВгСN—сефарозой, с которой ковалентно связана люцифераза, помещена в кюветное отделение люминметра. Через нее с помощью насоса 2 прокачивается раствор люциферина 1. В момент анализа через специальный ввод 3 вносят 2—100 мкл анализируемого раствора АТФ и получают сигнал на самописце 5. По значению максимальной интенсивности I_{\max} или по площади пика S строят калибровочный график для определения АТФ в интервале от 10⁻¹³ до 10⁻⁶ моль АТФ в анализируемой пробе. По этому графику находят неизвестные концентрации АТФ. Аналогичный реактор с иммобилизованной биферментной системой бактерий позволяет определять микроколичества НАД·Н₂.

Многие диагностически важ-

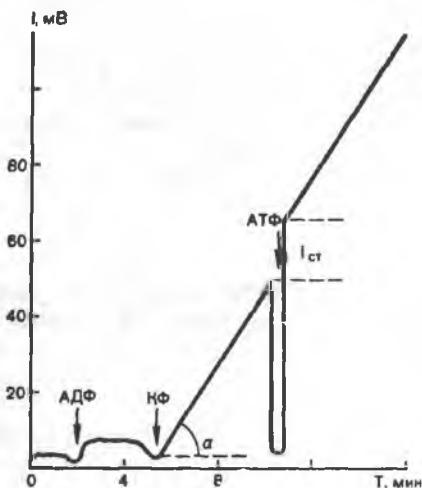


Рис. 15. Экспериментальная кривая, получаемая при определении активности крeатинкиназы:

стрелки — моменты введения в реакцию смесь субстратов крeатинкиназы: АДФ и крeатинфосфата (КФ), а также момент введения стандартв АТФ (Активность крeатинкиназы рассчитывают по формуле: $A = ktga/I_{ст} [(ME/l)]$, где k — коэффициент пропорциональности, в который входят отношения объемов и концентраций используемых реагентов и анализируемой сыворотки. Эти величины предварительно подбираются такими, чтобы обеспечить необходимую правильность и чувствительность анализа. Выбор условий анализа в клинических лабораториях определяется национальными комитетами по стандартизации методов определения активности ферментов (биологических объектах)

ные биохимические тесты, в которых определяемым веществом является АТФ или НАД·Н₂, сейчас могут выполняться биолюминесцентными методами.

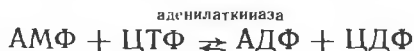
Повышение в сыворотке крови активности креатинкиназы наблюдается при таких тяжелых заболеваниях, как инфаркт, инсульт или мышечная дистрофия. Биолюминесцентный метод позволяет устанавливать активности этого фермента от 0,1 до 1000 МЕ (в норме сыворотка содержит менее 10 МЕ креатинкиназы). Ферментативный метод анализа креатинкиназы основан на следующих реакциях:



Скорость образования АТФ регистрируется по скорости (t_{gr} на рис. 15) увеличения интенсивности свечения при добавлении сыворотки крови к раствору, который содержит субстраты креатинкиназы, люциферин и иммобилизованную люциферазу светляков. Для того чтобы рассчитать активность креатинкиназы в международных единицах, используется внутренний стандарт АТФ. Через 2—3 мин после начала реакции вводят очень малый объем раствора АТФ с известной концентрацией и определяют $I_{ст}$ — скачок интенсивности, пропорциональный введенной концентрации АТФ.

§ 11. Соиммобилизованные полиферментные системы в биолюминесцентном анализе

В последние годы появилось много работ по использованию в микроанализе соиммобилизованных полиферментных биолюминесцентных систем. Например, с помощью трехферментной соиммобилизованной системы: аденилаткиназа + пируваткиназа + люцифераза светляков — определяют различные адениновые нуклеотиды: АМФ, АДФ и АТФ, как это показано ниже:



и далее АТФ измеряют с люциферазой светляков. При анализе АДФ помимо люциферина берут субстрат пируваткиназы — фосфоенолпируват, а для определения АМФ в реакционную смесь вводят еще и цитидинтрифосфат (ЦТФ). Таким образом, один и тот же биокатализатор, содержащий три соиммобилизованных фермента, используется для определения трех нуклеотидов.

Трехферментная система: бактериальная люцифераза + ок-

сидоредуктаза + формиатдегидрогеназа, соиммобилизованная на ВгСN-сефарозе, была использована для определения НАД в интервале концентраций 10^{-12} — 10^{-6} моль/л и формиата с пределом обнаружения 10^{-12} моль/л. В данном случае НАД необратимо превращался по реакции



в НАД·Н₂, который затем измеряли биолюминесцентно, как описано выше.

Большим преимуществом соиммобилизованных полиферментных систем является то, что активность соиммобилизованных ферментов возрастает в десятки, а иногда сотни раз по сравнению с тем же количеством фермента, взятым в растворе. Вследствие этого увеличивается чувствительность биоаналитических методов. Например, при одинаковой активности трехферментной системы в растворе и на носителе предел обнаружения АДФ составляет 10^{-9} при применении растворимых ферментов и 10^{-11} моль/л — при использовании соиммобилизованных ферментов. По-видимому, при соиммобилизации достигается более высокая локальная концентрация ферментов и продуктов промежуточных реакций на поверхности носителя, облегчается диффузия продуктов одной ферментативной реакции к активному центру другого фермента.

В настоящее время 4, 7 и даже 13-ферментные соиммобилизованные системы применены для биолюминесцентного микроанализа различных метаболитов: стероидов, триглицеридов, желчных кислот и др.

§ 12. Области применения биосенсоров с иммобилизованными ферментами

Внедрение иммобилизованных ферментов в практику биохимических, клинических, заводских и других аналитических лабораторий еще только начинается. Предстоит еще немало сделать, чтобы ферментные электроды, реакторы с иммобилизованными ферментами стали доступными для каждого химика-аналитика. Автоматические системы с биосенсорами позволяют не только облегчить утомительный труд химика-аналитика, но и снизить требуемые для анализа объемы проб (а это особенно важно, например, при анализе крови), расширить перечень определяемых веществ, повысить чувствительность, специфичность анализа.

Биосенсоры с иммобилизованными ферментами особенно пригодны для решения биоаналитических задач в медицине, пищевой, химической и микробиологической промышленности, в биотехнологии и для контроля окружающей среды, а также в научных исследованиях.

Десятки биохимических тестов выполняются при постановке диагноза и для контроля за ходом лечения, и многие из них основаны на использовании ферментов, в том числе и иммобилизованных. Например, ферментный электрод на глюкозу, вмонтированный в автоматическую систему, помогает не только контролировать уровень глюкозы в крови больных диабетом, но и корректировать этот уровень, подавая управляющие сигналы на дозатор инсулина в организм.

В пищевой промышленности ферментные датчики позволяют определять качество исходного сырья и, что особенно важно, измерять остаточные количества пестицидов и других вредных веществ, присутствие которых в пищевых продуктах недопустимо. Анализаторы с иммобилизованной холинэстеразой, контролирующие состав воздуха в химических цехах, помогают обеспечивать безопасные условия труда рабочих в особо вредных условиях.

Контроль за стерильностью образцов является важной задачей биохимической, фармакологической промышленности и медицинской микробиологии. И в этом случае нам пригодятся реагенты на основе иммобилизованной люциферазы, с помощью которых можно измерять биoluminesцентным методом 500—1000 клеток в 1 мл, что трудно выполнить другими известными методами.

Таким образом, даже эти отдельные примеры показывают широкие перспективы аналитического применения иммобилизованных ферментов.

Среди различных требований, предъявляемых к современному биохимическому анализу, самым важным является специфичность, т. е. способность детектировать данное вещество в сложных многокомпонентных средах, таких, как сыворотка крови, сок растений или ферментационная среда. Наибольшей специфичностью обладают иммунохимические методы, основанные на реакции антител с антигеном, образующие друг с другом прочные комплексы. Возможность получения высокоспецифичных антител к широкому кругу различных веществ в сочетании с чувствительными методами регистрации образовавшихся комплексов обуславливают широкое практическое использование методов иммунохимического анализа в различных областях медицины, ветеринарии, растениеводства, охраны окружающей среды, контроля биотехнологических процессов, научных исследованиях.

§ 1. Структура антител

Главным компонентом иммунохимической реакции являются антитела, или иммуноглобулины (оба понятия являются практически синонимами), — белки сыворотки крови, которые синтезируются в организме любого позвоночного животного и человека как проявление защитной реакции (иммунитет) при попадании в него чужеродного вещества — антигена.

Все иммуноглобулины (Ig) характеризуются общим планом организации вторичной, третичной и четвертичной структуры. Основным структурным элементом является четырехцепочная молекула, состоящая из двух пар идентичных полипептидных цепей: легких (L) и тяжелых (H) с молекулярной массой 22 000 и 50 000—70 000 соответственно. Все цепи соединены

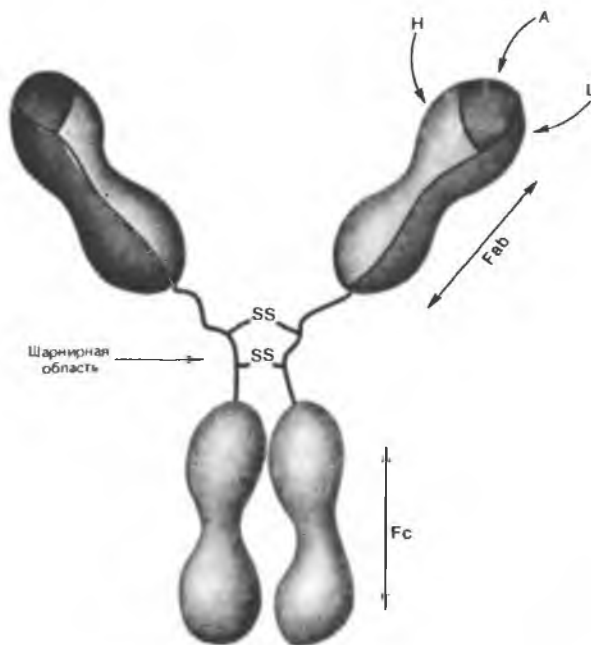


Рис. 16. Схематическая структура молекул иммуноглобулина:

L — легкая; H — тяжелая цепи; A — активный центр анти-
тела

между собой дисульфидными связями. К обеим H-цепям ковалентно присоединены олигосахаридные фрагменты (рис. 16).

Различия в размерах H-цепей, аминокислотной последовательности их константных частей, содержании углеводов, положении и количестве S — S-связей и тенденции к полимеризации позволяют выделить 5 классов иммуноглобулинов человека: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. На основании различий в химическом строении H-цепей в пределах класса можно выделить подклассы иммуноглобулинов: 4 для IgG, 2 для IgA и 2 для IgM.

IgM присутствует в сыворотке в виде пентамера, в котором мономеры соединены S—S-связями между H-цепями. Некоторое количество IgA сыворотки также присутствует в димерной или более высокоолигомерной формах. Полимерные IgA и IgM содержат небольшой кислый пептид — J-цепь, который, по-видимому, стабилизирует полимерную структуру. Кроме того, IgA, секретируемый слизистыми оболочками, содержит большой гликопротеид — секреторный компонент. Легкие цепи иммуноглобулинов бывают только двух типов: λ или χ — и являются общими для всех классов.

При контролируемом ферментативном гидролизе иммуноглобулинов образуются два типа фрагментов — Fab и Fc, которые содержат антигенсвязывающие и эффекторные центры соответственно. Полипептидные цепи иммуноглобулинов свернуты таким образом, что образуют глобулярные домены из 110—115 остатков. N-концевые домены имеют вариабельную (V) аминокислотную последовательность и участвуют в образовании активного центра. С-концевые домены — C_L в L-цепях, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} в H-цепях IgG и IgA, а также C_{H4} в IgM, IgE и IgD одинаковы в пределах подкласса и определяют биологические свойства иммуноглобулинов.

Аминокислотные последовательности константных доменов (C_L—C_{L1}—C_{H2}—C_{H3}) отличаются высокой степенью гомологии (40—60% идентичных остатков), тогда как гомология между С- и V-доменами выражена гораздо слабее. Особенностью первичной структуры вариабельных областей является наличие трех типов участков полипептидной цепи: 1) консервативных, играющих важную роль в поддержании нативной конформации цепи; 2) полуинвариантных, определяющих принадлежность к той или иной подгруппе; 3) гипервариабельных, участвующих в организации антигенсвязывающего центра; три таких участка локализованы вокруг остатков 30, 50 и 95L-цепей и остатков 31—37, 51—68, 100—110 H-цепей, но не имеют твердых границ. Степень изменчивости в гипервариабельных участках H-цепей больше, чем в L-цепях.

Вариабельные домены легких и тяжелых цепей образуют активный центр антител соответствующей специфичности. Согласно оценкам существует около миллиона различных специфических антител, что может обеспечить определение практически любых биологически активных веществ как природного происхождения, так и синтезированных искусственно.

Рентгеноструктурными исследованиями комплексов Fab-фрагментов с антигенами показано, что связывание антигена происходит в щели активного центра, образованной главным образом гипервариабельными участками L- и H-цепей. Длина щели индуцируемых антител варьирует от 0,4—0,6 до 3,4 нм, а средние размеры области связывания для полимерных антигенов различной природы (углеводы, полиаминокислоты, полинуклеотиды) составляют (2,5—3,6) × (1,0—1,7) × (0,6—0,7) нм.

Особую роль в построении антигенсвязывающего центра антител играет третий гипервариабельный участок H-цепей, длина которого в различных исследованных белках колеблется от 1 до 20 остатков. Длина этого участка и контактирующего с ним первичного гипервариабельного участка L-цепи во многом определяют размеры активных центров антител.

Во взаимодействии с антигеном участвует большое количество аминокислотных остатков молекулы антитела. Большая функциональная нагрузка, как правило, приходится на H-цепи. Основным принципом организации активных центров иммуно-

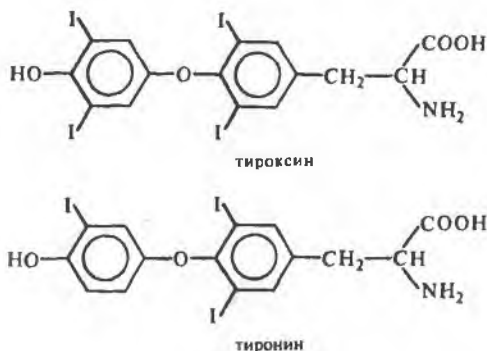
глобулинов является полицентровая структура, состоящая из нескольких участков связывания.

Малые антигенные детерминанты связываются на ограниченном участке активного центра, комплементарном данной детерминанте. Большие детерминанты могут занимать практически всю область связывания. В этом случае можно выделить подцентры связывания отдельных частей антигенной детерминанты. Именно такое многоточечное взаимодействие активного центра антител с антигеном обеспечивает их уникальную специфичность и является весьма характерным для многих биологических систем, например фермента и субстрата, клеточных рецепторов и гормонов. Хорошей моделью подобного взаимодействия может служить соответствие между рукой и перчаткой или ключом и замком.

§ 2. Антиген

В качестве антигенов могут выступать различные вещества: клетки микроорганизмов, вирусы, белки, нуклеиновые кислоты, а в некоторых случаях и такие низкомолекулярные соединения, как антибиотики или пестициды. Понятие антиген является общим, обозначающим некоторую химическую структуру, против которой могут быть получены антитела. В действительности, антитела образуются не против всей молекулы белка или бактериальной клетки, а только к небольшим участкам на их поверхности, получившим название антигенных детерминант. Так, в случае белковых молекул антигенными детерминантами являются участки поверхности, содержащие около пяти аминокислотных остатков.

На примере таких белков, как лизоцим или миоглобин, было показано, что антигенные детерминанты представляют собой выпуклые части молекулы, которые могут входить внутрь активного центра антител. В случае бактериальных клеток в качестве антигенных детерминант часто выступают короткие цепочки из 3—5 остатков сахаров, образующие стенку бактерий. Низкомолекулярные соединения, например некоторые лекарства, сами по себе не могут вызывать образование антител. Их называют гаптенами. Однако после присоединения гаптенных к поверхности той или иной макромолекулы организм начинает вырабатывать на них антитела. Очевидно, что размеры гаптена могут быть меньше объема полости активного центра антитела, в результате чего происходит связывание гаптена только с частью специфических участков активного центра. Тем не менее, как показывает опыт, и в этих случаях антитела являются высокоспецифичными. В качестве примера можно привести структуру молекул двух гормонов — тироксина и тиронина



которые отличаются между собой только одним атомом иода, а антитела против них различаются по константам связывания более чем в 1000 раз.

§ 3. Получение антител

Механизм биосинтеза антител, который в настоящее время активно изучается, становится все более и более понятным. Согласно сегодняшним представлениям иммунный ответ — это сложный процесс межклеточного взаимодействия различных типов лимфоидных клеток с участием специальных гормонов, в результате чего одна группа участников этого процесса — В-клетки — начинает активно синтезировать и выделять в кровь специфические антитела против данного антигена. На поверхности В-клеток предсуществуют рецепторы, аналогичные антителам, взаимодействие которых с антигеном в сложном межклеточном комплексе служит стимулом для начала биосинтеза антитела. Следует отметить, что иммунный ответ на одно вещество сопровождается синтезом различных видов антител, имеющих у разных особей различный состав, что отражает генетические особенности каждого организма.

Для целей анализа подбирают такие условия иммунизации животных, при которых образовывались бы антитела с максимальной специфичностью и прочностью связи с антигеном. В зависимости от структуры антигена и поставленной задачи для получения антител используют различные виды животных: от мелких лабораторных (мыши, морские свинки, кролики, куры) до крупных (овцы, козы, лошади). После нескольких инъекций антигена в присутствии стимуляторов иммунного ответа в сыворотке крови накапливаются специфические антитела. При иммунизации крупных животных можно получать большие количества антител для практических целей. В последнее время для иммунизации стали использовать кур, у которых антитела накапливаются в желтке яиц, что упрощает их получение и выделение.

Обычно антитела выделяют из сыворотки в виде γ -глобулиновой фракции, осаждая сыворотку крови при определенных условиях сульфатом аммония, спиртом или полиэтиленгликолем. Полученные таким образом антитела содержат много примесных белков. Высокоочищенные антитела выделяют с помощью ионнообменной хроматографии. В тех случаях, когда

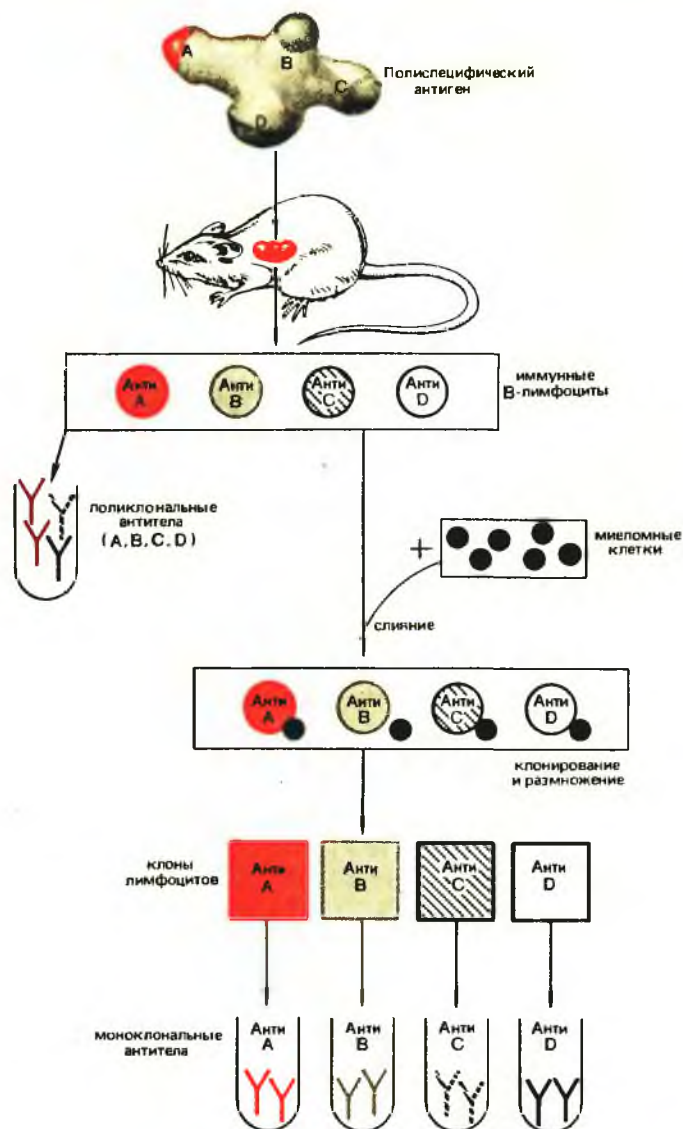


Рис. 17. Получение поликлональных и моноклональных антител

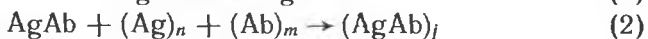
необходимо получение специфических антител, дополнительно используют афинную хроматографию на иммуносорбентах.

Сложность получения стандартных препаратов антисывороток, состав которых зависит от вида животного и его индивидуальных особенностей, цикла иммунизации и многих других трудно контролируемых факторов ограничивает использование антител для количественного анализа антигенов.

Принципиально новый шаг в решении этой проблемы был сделан после того, как был предложен способ получения моноклональных антител (Г. Кёлер, К. Мильштейн, 1975) (рис. 17). В ответ на введение антигена в организме мыши активируются продуцирующие антитела В-клетки. Эти клетки могут жить только в организме хозяина и при их переводе в искусственную культуральную среду быстро гибнут. Однако если «слить» иммунную клетку с опухолевой (миеломные лимфоциты, которые способны неограниченно долго жить в искусственной среде), то в результате образуются гибридные клетки, унаследовавшие свойства своих предшественников, так как они способны долго жить в искусственных условиях и одновременно синтезировать антитела. Такие клетки получили название «гибридом». С помощью специальных методов на особых ростовых средах можно отобрать отдельные клетки, синтезирующие только один тип антител. Такие клетки помещают в культуральную жидкость, в которой они размножаются и образуют много родственных («клон»), синтезирующих большое количество антител, получивших название моноклональных. Моноклональные антитела — это антитела, однородные по своей структуре и специфичности, которые можно производить в неограниченных количествах.

§ 4. Принципы иммунохимического анализа

Антитело, образуя комплекс с антигеном, может обеспечить уникальное по специфичности узнавание определяемого вещества в любых сложных многокомпонентных системах. Каким образом проводят иммунохимический анализ? Первоначально в их основу было положено свойство антител (Ab) «склеивать» антигены (Ag) (рис. 18). Этот процесс описывается следующей системой уравнений:



Действительно, так как молекулы антител двухвалентны, они способны связаться с двумя молекулами антигена в комплекс, который, в свою очередь, может связать другое антитело, и т. д. Образование таких агрегатов можно обнаружить либо по увеличению мутности раствора, либо по выпадению в осадок. Этот подход применяется, например, для определения групп крови при «склеивании» эритроцитов антителами той или иной спе-

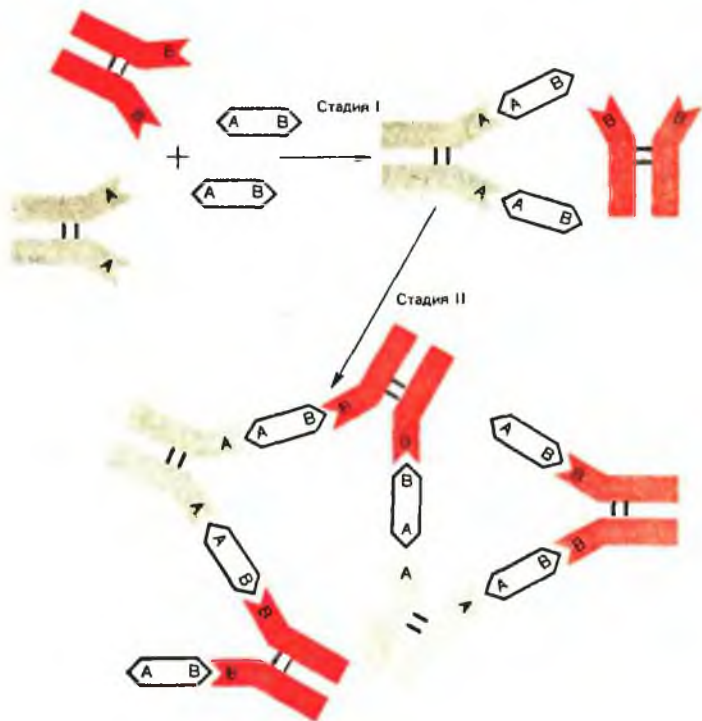


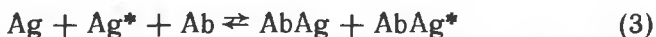
Рис. 18. Схема процесса образования комплекса поливалентного антигена с антителами: АВ — антиген, А и В — антитела со специфичностью анти-А и анти-В

цифичности. Эта реакция получила название гемагглютинации и до сих пор широко используется. Взаимодействие белковых антигенов с антителами вызывает их осаждение, т. е. преципитацию. Этот метод также широко употребим при определении белков плазмы крови в концентрации до 10^{-6} г/мл.

Так как реакция антиген-антитело основана на формировании крупномолекулярного комплекса согласно уравнению (2), то очевидно, что из-за отсутствия точной стехиометрии реакции эти методы не могут обеспечить количественное определение веществ. Поэтому методы агглютинации и преципитации относятся к качественным или полуколичественным.

Принципиально новый шаг был сделан при использовании в иммунохимических реакциях компонентов, помеченных маркером, который детектируется одним из известных физико-химических методов с высокой чувствительностью.

Установление концентрации антигена основано на принципе конкурентного связывания антителами меченого и немеченого антигена. Сущность этих методов описывается следующим уравнением:



где Ag^* и Ag — определяемый антиген с меткой и без метки; Ab — антитела; AgAb и Ag^*Ab — соответствующие комплексы.

Если в пробирку с раствором, содержащим постоянную концентрацию антител и меченого антигена, добавить различные концентрации немеченого антигена, то концентрация комплекса AbAg^* , содержащего метку, будет обратно пропорциональна концентрации немеченого антигена. Таким образом можно построить калибровочный график зависимости активности Ag^*Ab от свободного Ag . Для того чтобы определить концентрацию комплекса Ag^*Ab , его нужно либо отделить от свободного меченого антигена Ag^* , либо изменить свойства маркера в комплексе с антителами. Оба принципа нашли практическое применение в методах иммунохимического анализа.

Из схемы, описываемой уравнением (3), вытекают следующие основные задачи, связанные с разработкой методов иммунохимического анализа: а) получение специфических антител; б) выбор и получение высокоочищенных антигенов; в) введение маркера в исследуемое вещество; г) разделение связавшихся и свободных компонентов; д) выбор метода определения концентрации маркера; е) оптимизация и стандартизация условий проведения анализа.

Первые две задачи уже были рассмотрены в начале данной главы. Поэтому не будем подробно останавливаться на них в дальнейшем, однако еще раз подчеркнем, что именно выбор и получение пары антиген-антитело является определяющим специфичность анализа.

§ 5. Маркеры в иммунохимическом анализе

В качестве метки используются различные вещества: радиоактивные изотопы ^{125}I или ^3H , ферменты или их субстраты, флуоресцирующие красители. Очевидно, что от чувствительности детекции маркера зависит чувствительность метода анализа.

Радиоактивные метки. Выбор маркера и способа его «привязки» к антигену является одним из важных этапов в проведении анализа. Первоначально широко применялись радиоизотопные метки (радиоиммунный анализ — РИА), предложенные американскими исследователями (С. А. Берсон, Р. С. Ялоу, 1959). Однако в последние годы все более широкое использование в качестве маркеров находят ферменты. Это обусловлено рядом принципиальных трудностей, связанных с применением изотопных маркеров. Так, изотоп ^{125}I имеет время полураспада 60 сут, чем ограничивается срок его использования. Изотоп ^3H имеет длительное время жизни (12,5 лет), однако под действием β -излучения происходит распад молекул антигена, в результате чего время жизни меченых ^3H соединений тоже ограничено. Кроме

того, эффективность счета трития существенно ниже, чем ¹²⁵I. Ограничивающими факторами РИА являются сложность и высокая стоимость оборудования, необходимость централизованной системы распределения иммунохимических наборов, меченных радиоактивными изотопами, определенная опасность изотопов для окружающей среды. Учитывая трудности использования радиоизотопных меток, были предложены в качестве маркеров ферменты.

Ферментные метки. Каким образом ферменты могут выступать в качестве маркеров иммунохимических реакций, т. е. каким образом можно детектировать ферменты и в каких минимальных количествах? Попадая в раствор, молекула фермента за одну секунду может превратить определенное количество субстрата в продукт. Допустим, что фермент за секунду может образовать тысячу молекул продукта, тогда за 17 мин это количество составит миллион. Если минимальное количество продукта, которое можно обнаружить фотометрическим методом, составляет 10^{15} молекул/мл, то это означает, что для получения такого количества продукта необходимо 10^9 молекул/мл фермента, т. е. $\sim 10^{-12}$ моль/л. Чем выше чувствительность метода, тем меньшее количество фермента может быть обнаружено. Так, например, используя хемилюминесцентный или флуоресцентный метод детекции продукта, можно определять до 10^6 молекул фермента в 1 мл. Фотометрические или флуоресцентные методы могут быть использованы не во всех случаях; например, если измерение проводят в очень мутной среде, применяются другие методы определения ферментативной активности: электрохимические, микрокалориметрические и т. д.

В настоящее время известно более 2000 разных ферментов, однако только некоторые находят применение в иммуноферментном анализе. Это объясняется высокими требованиями, предъявляемыми к свойствам ферментов. Фермент должен быть высоко активен, а продукты его реакции детектироваться с высокой чувствительностью, он должен быть стабилен, так чтобы его активность сохранялась не менее одного года. Содержание фермента-маркера в определяемом образце должно быть минимальным. Именно из-за этого для разных объектов используют разные ферменты. Во многих случаях, когда необходим качественный результат, оценка иммунохимической реакции может быть проведена визуально.

Ферменты как сложные биополимерные молекулы весьма чувствительны к воздействию окружающей среды (температура, pH, ингибиторы и активаторы, примеси других ферментов в исследуемом образце). Однако в настоящее время разработан целый ряд вариантов иммуноферментных методов анализа, позволяющих уменьшить влияние этих неблагоприятных факторов. Наиболее широко используются ферменты, представленные в табл. 8. Для увеличения чувствительности иммуноферментного анализа предлагается применять мультиферментные системы, обеспечи-

Таблица 8. Минимальные определяемые количества наиболее распространенных в ИФА ферментов

Фермент	Субстрат	Способ детекции*	Нижняя граница определения содержания фермента за 30 мин, моль/л
β-Галактозидаза	2-Нитрофенил-β-D-галактопиранозид	СФ	$1,85 \cdot 10^{-12}$
	4-Метилумбеллиферил-β-D-галактопиранозид	ФЛ	$5,5 \cdot 10^{-15}$
Щелочная фосфатаза кишечника теленка	4-Нитрофенилфосфат	СФ	$2 \cdot 10^{-13}$
	4-Метилумбеллиферилфосфат	ФЛ	$2,5 \cdot 10^{-15}$
Пероксидаза хрена	ABTS**	СФ	$1 \cdot 10^{-13}$
	p-Оксифенилпропионовая кислота	ФЛ	$7,4 \cdot 10^{-14}$
	Люциферин (или парайодфенол) + люминол	ЛМ	$2,5 \cdot 10^{-15}***$

Примечание: *СФ — спектрофотометрически; ФЛ — флуориметрически; ЛМ — люминометрически.

**ABTS — диаммониевая соль 2,2'-азино-ди-[3-этил-бензотиазолин-(6)]-сульфоновая кислота

***Время измерения — 1 мин.

вающие каскадное усиление сигнала. Однако эти подходы пока еще не нашли своего практического выхода.

Положительные стороны иммуоферментного анализа оказались во многих случаях настолько очевидны, что этот метод занимает прочное лидирующее место среди различных иммуохимических методов.

§ 6. Получение конъюгатов с ферментами

Для введения ферментативной метки разработано много разных химических, биохимических и иммунологических способов.

Первым реагентом, использованным для синтеза иммуоферментных конъюгатов, был глутаровый альдегид, реагирующий с ε-аминогруппами лизина белковых молекул. С помощью глутарового альдегида получены конъюгаты антител и антигенов с пероксидазой, щелочной фосфатазой, глюкозооксидазой, глюкоамилазой. Состав полученных конъюгатов можно варьировать, изменяя концентрацию альдегида и белковых компонентов.

Из водорастворимых карбодимидов наиболее успешно для синтеза иммуоферментных конъюгатов применяются 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид и 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодимидметил-*n*-толуолсульфонат, образующие

пептидную связь между свободными карбоксильными и NH_2 -группами белковых компонентов. Стабильность и активность гибридных молекул, полученных этим методом, часто оказываются сниженными по сравнению с исходными компонентами. Возможной причиной этого является взаимодействие карбодимида с различными функциональными группами молекул белка, что приводит к конформационным изменениям, сопровождающимся снижением удельной активности.

Широкое распространение получил метод синтеза иммупероксидазных конъюгатов, в основе которого лежит окисление периодатом натрия углеводной части молекулы пероксидазы с образованием альдегидных групп. Так как пероксидаза имеет восемь углеводных остатков, то в процессе синтеза могут образовываться конъюгаты полидисперсного состава, содержащие различное количество молекул фермента и иммуноглобулина или антигена. Поэтому для целей анализа исключительно важно проводить хроматографию комплексов, выбирая необходимые по составу комплексы. K_m и $k_{кат}$ пероксидазы в конъюгате с иммуноглобулином G (состав 1 : 1) практически не отличаются от этих констант для нативного фермента. Сохранение свойств фермента в конъюгате обусловлено тем, что модифицируемые периодатом углеводные группы находятся в удаленной от активного центра области молекулы пероксидазы.

Разработанные методы получения иммуноферментных конъюгатов с β -галактозидазой, содержащей до 20 SH-групп, основаны на том, что связывание через них антигенов не отражается на каталитических свойствах фермента. Восстановленный меркаптоэтанол IgG или его Fab-фрагменты связываются с β -галактозидазой с помощью N—N'-о-фенилендималеимида, специфически реагирующего с SH-группами белков. Выход конъюгата по ферменту достигает 50% при высоком сохранении компонентами специфических свойств. Сульфгидрильную группу можно ввести в мягких условиях в соединения, содержащие аминокгруппы, поэтому данная методика может быть распространена на целый ряд антигенов.

Так как ферменты с большой молекулярной массой могут ингибировать реакцию антиген-антитело за счет стерического экранирования антигенных детерминант, в ряде случаев целесообразно использовать в качестве метки не целую молекулу фермента, а обладающий специфической активностью пептид. Такой синтез осуществляется при получении конъюгата Fab-фрагмента с гемоктапептидом, имеющим пероксидазную активность.

Иммуноферментный конъюгат нужно выделять из реакционной смеси, так как примеси непрореагировавших компонентов мешают его практическому применению. Кроме широко применяемых методов гельфильтрации и ионообменной хроматографии, были предложены также метод центрифугирования в градиенте плотности, фракционирование сульфатом аммония и аффинная хроматография.

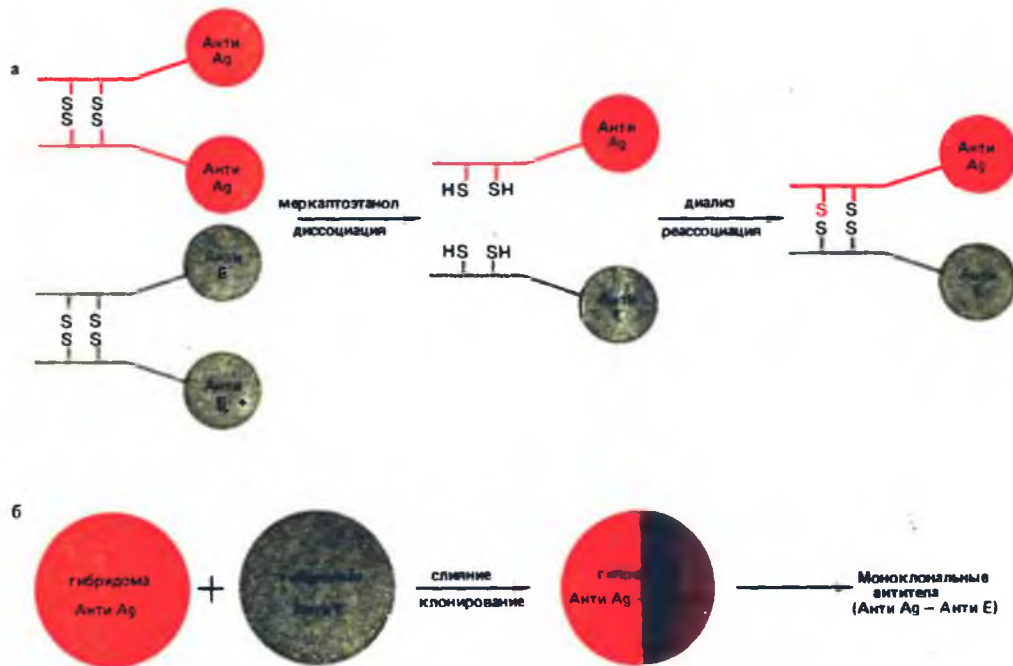


Рис. 19. Схема получения гибридных поликлональных и моноклональных антител, специфичных к антигену и ферменту-маркеру:

а — анти-Аg и анти-Е — поликлональные антитела против антигена и фермента; *б* — анти-Аg и анти-Е — клетки двух типов гибридом, продуцирующих моноклональные анти-Аg и анти-Е антитела, анти-Аg — анти-Е — гибридома, продуцирующая антитела двойной специфичности

Ковалентные методы получения иммуноферментных конъюгатов нашли весьма широкое распространение, однако в некоторых случаях действие сшивающего реагента отрицательно сказывается на ферментативной и иммунологической активности компонентов гибридной макромолекулы. В связи с этим определенный интерес представляют иммунологические методы введения ферментной метки.

Один из подходов получил название метода «гибридных антител». Ферментативным гидролизом получают Fab-фрагменты молекул антител против определяемого антигена и используемого фермента. Затем смесь продуктов гидролиза подвергают восстановлению меркаптоэтанолом; при этом Fab-фрагменты обратимо диссоциируют на симметричные части. После удаления восстанавливающего агента молекулы снова ассоциируют, образуя гибридные молекулы антител, специфичные к определяемому антигену и ферменту. При добавлении фермента образуется комплекс антитело—фермент (рис. 19, а). Гибридная технология открывает принципиально новый путь получения гибридных антител, который заключается в том, что сливаются моноклональные клетка, специфичные против данного антигена и фермента-маркера, в результате чего образуются гибридомы второго поколения, синтезирующие антитела, с двумя специфичностями (рис. 19, б).

Другой путь заключается в том, что получают антитела одного и того же вида животного (например, кролика) против определяемого антигена и фермента, которые соединяют между собой через антитела другого вида животных (антитела барана против кролика). Добавление фермента к такой тройной молекуле также приводит к образованию комплекса антитело—фермент (рис. 20). В настоящее время разрабатываются подходы получения гибридных антител методами клеточной и генной инженерии, что позволит существенно упростить способ их получения.

К перспективным можно отнести конъюгаты ферментов с бел-

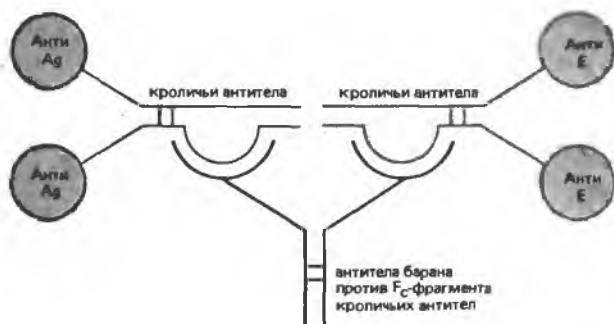


Рис. 20. Схема связывания антител против антигена (Ag) и фермента-маркера (E) с помощью антиивидовых антител против F_c-фрагмента

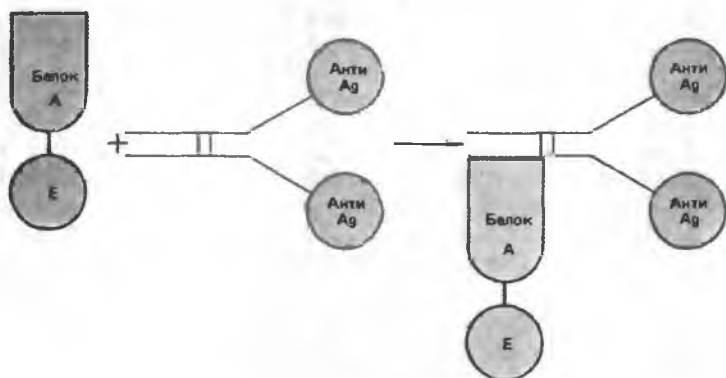


Рис. 21. Схема получения комплекса антител с ферментом с использованием белка А стафилококка

ком А стафилококка, образующие прочный комплекс с F_c-фрагментом антител различных видов животных (рис. 21).

Стабильность иммуноферментных конъюгатов при хранении — важнейший параметр, обуславливающий возможность их практического использования. Методы направленной стабилизации конъюгатов пока еще не разработаны. Не существует также корреляции между стабильностью конъюгатов и методом их получения. Однако высокая стабильность гибридных молекул обеспечивает их применение на практике и значительно превосходит стабильность антител и антигенов, меченных радиоактивными изотопами. В лиофилизованном состоянии ферментные конъюгаты сохраняют свои свойства до двух лет. Стабильность при хранении в растворе (+4°C) более года отмечена для конъюгатов с щелочной фосфатазой, β-галактозидазой, лизоцимом, пероксидазой.

Субстратные метки. Кроме ферментов в качестве маркеров могут быть использованы субстраты. В частности, в иммунофакторном анализе применяются в качестве меток АТФ и НАД, которые могут быть «пришиты» к молекуле антигена через адениновый остаток таким образом, что сохраняется их способность взаимодействовать с ферментом. Аналогично были использованы субстраты пероксидазы (люминол, изолюминол), которые могут быть окислены пероксидом водорода в реакции хемилюминесценции, катализируемой пероксидазой.

§ 7. Методы определения активности ферментов

В зависимости от поставленных задач в методах иммуноферментного анализа употребляются различные детектирующие системы. Наиболее широкое применение находят методы фотометрического анализа. С помощью различных хромогенных субстратов определяют пероксидазу, β-галактозидазу, щелочную фосфа-

тазу. В тех случаях, когда чувствительность фотометрических методов недостаточна с теми же ферментами, употребляют различные флуорогенные субстраты, которые позволяют увеличить чувствительность детекции фермента в 10—100 раз. Так, например, чувствительность определения β -галактозидазы с 4-метилумбеллиферон- β -D-галактозидом достигает 10^{-15} моль/л. Очень перспективными методами являются хемилюминесцентные методы анализа с пероксидазой хрена и биолюминесцентные методы с люциферазой светляков или бактериальной люциферазой.

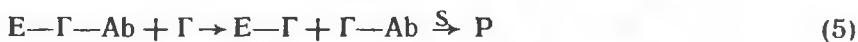
Использование ИФА в контроле биотехнологических процессов связано с измерением в мутных средах. В этом случае перспективен микрокалориметрический метод (иммуоферментные термисторы) с ферментом глюкозооксидазой, а также электрохимические методы (иммуоферментные электроды) с пероксидазой. Эти методы просты, не требуют сложного оборудования, легко поддаются автоматизации.

§ 8. Разделение свободных и связанных маркеров

Одним из важных моментов в проведении иммуоферментного анализа является разделение свободных и связанных с антителами меченых компонентов. В настоящее время разработано несколько вариантов решения данной проблемы. Наиболее распространен метод, основанный на иммобилизации антител на твердой подложке (стеики полистирольных пробирок или шариков, целлюлозные диски, гранулы макропористых носителей для хроматографии). Особенно перспективными оказались полистироловые пробирки или планшеты, содержащие 96 лунок. Сущность методов разделения основана на том, что одни из компонентов, например антитела, могут быть сорбционно иммобилизованы на поверхности измерительной кюветы. После проведения инкубации с образцом антиген сорбируется на поверхности, а все остальные компоненты остаются в растворе и могут быть легко отделены, например, с помощью пористых частиц под действием магнитного поля. Основными проблемами, возникающими при реализации твердофазных методов разделения, являются стандартизация поверхности и уменьшение неспецифического связывания меченых компонентов с носителем.

Другой путь решения проблемы разделения меченых и немеченых компонентов основан на принципе модуляции активности ферментов антителами. Действительно, в ряде работ было показано, что при взаимодействии антител с гаптеном, «пришитым» вблизи активного центра фермента, происходит полное ингибирование его активности. При добавлении к такой системе свободного гаптена происходит диссоциация комплекса, в результате чего активность фермента восстанавливается (рис. 22, а, уравнения 4,5):

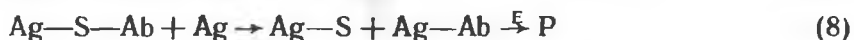




где E—Г — комплекс фермента (Е) с гаптенем (Г); Ab — анти-тело; S — субстрат; P — продукт ферментативной реакции. Эти методы получили название гомогенного анализа.

В качестве ферментов в гомогенном иммуноферментном анализе выступают дегидрогеназы, а субстратов — кофакторы. По-видимому, при образовании комплекса фермент—гаптен с анти-телом последнее так изменяет конформацию белковой глобулы, что кофактор не может продуктивно связаться с активным центром фермента, в результате чего его активность исчезает. Гомогенные методы обладают высокой экспрессностью (не более 15 мин), так как в них отсутствуют диффузионные затруднения иммунохимической реакции, характерные для твердофазных вариантов анализа.

Антигены, меченные субстратами и кофакторами, также нашли применение в гомогенных методах иммуноферментного анализа. Сущность этих методов (уравнения 6, 7, 8) заключается в том, что при взаимодействии меченого антигена с антителами субстрат становится не доступным для действия фермента, в результате чего продукт ферментативной реакции не накапливается в системе (рис. 22, б):



где Ag—S — комплекс антигена с субстратом.

Следовательно, образование комплекса Ag—Ab может быть зарегистрировано в растворе без специального разделения свободных и связавшихся компонентов непосредственно в пробирке. Эти методы очень быстрые (до 15 мин), а их чувствительность зависит от способа регистрации метки — субстрата. Так, АТФ или люминол хемилюминесцентным методом могут быть зарегистрированы в концентрации 10^{-9} или 10^{-12} .

§ 9. Основные методы ИФА

При проведении иммуноферментного анализа существует много вариантов его постановки. Однако принципиально все методы могут быть разделены на две основные группы: конкурентные и иммунометрические.

Конкурентные. В системах конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA)* антигенов можно выделить

* ELISA — enzyme linked immunosorbent assay — широко используемое в зарубежной и советской литературе обозначение твердофазного иммуноферментного анализа.

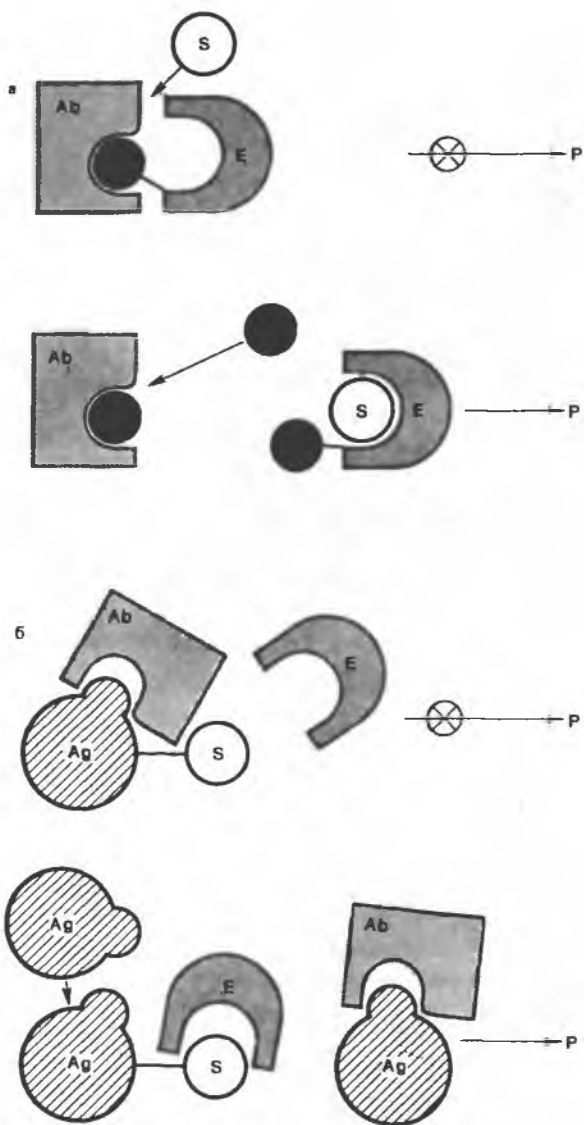


Рис. 22. Принципиальные схемы гомогенных методов иммуноферментного анализа:

а — Г — свободный гаптен; Е — Г — меченый ферментом гаптен; Ab — антитела; S и P — субстрат и продукт ферментативной реакции; б — Ag—S — меченый субстратом антиген; Ag — свободный антиген; E — фермент; P — продукт ферментативной реакции; символ x — ингибирование ферментативной реакции

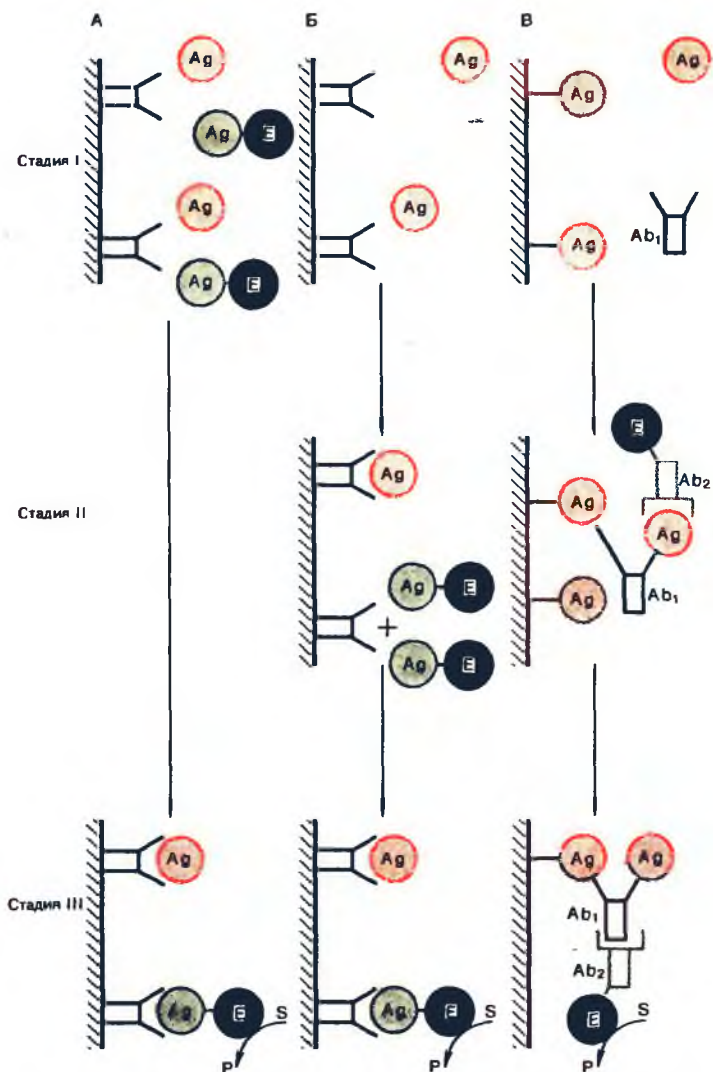
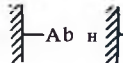


Рис. 23. Схемы конкурентных методов твердофазного анализа: А — прямой конкурентный метод; В — метод последовательного насыщения; В — метод ингибирования с использованием двойных антител;  — антитела и антигены, адсорбированные на подложке; Ag — E и Ag — меченый ферментом и свободный антиген; Ab — E — вторые антитела, меченные ферментом; S и P — субстрат и продукт ферментативной реакции; стадия I и II — инкубация с последующей отмывкой несвязавшихся компонентов; стадия III — добавление субстратов и детекция ферментативной активности

несколько вариантов (рис. 23). Например, антитела иммобилизованы на твердой фазе, а меченый и немеченый антигены, добавленные одновременно, конкурируют друг с другом за связыва-

ние (рис. 23, а). В том случае, если исследуемый образец может оказывать влияние на маркер или если константы связывания обоих компонентов с антителами различны, используют метод последовательного насыщения: вначале с антителами инкубируют образец, а затем после удаления несвязавшихся компонентов добавляют меченый антиген. Фактически этот метод аналогичен методу титрования оставшихся свободных антител (рис. 23, б). Еще один подход основан на конкуренции свободных антител с антигеном, предварительно иммобилизованным на носителе и измеряемым антигеном, находящимся в растворе (рис. 23, в). Этот метод удобен тем, что маркер может быть введен во вторичные антитела, что существенно упрощает способ приготовления наборов реагентов.

Конкурентные методы анализа используют для различных антигенов, но чаще всего для определения гаптен. Они отличаются простотой постановки реакции, но имеют ряд ограничений. Во-первых, в конкурентных методах предъявляются высокие требования к стандартизации количества связанных и добавленных реагентов. Во-вторых, чувствительность этих методов определяется в основном константой связывания антител.

Иммунометрические. Вторая группа методов — иммунометрические, основана на принципе «сэндвич»-анализа. Особенность этих методов заключается в том, что на твердой фазе иммобилизован избыток антител, с которыми проводят инкубацию антигена. После удаления несвязавшихся компонентов в систему добавляют избыток меченых антител, которые взаимодействуют с антигеном. Очевидно, этот метод применим только к поливалентным антигенам (рис. 24, а). Чувствительность и точность иммунометрических методов принципиально существенно выше конкурентных, так как используя избыток антител на твердой фазе, можно адсорбировать из раствора сколь угодно малое количество антигена, а затем избытком меченых антител определить его содержание. Кроме того, в этом случае гораздо менее строгие требования к количеству добавляемых компонентов. Чувствительность иммунометрических методов в большей степени зависит от нижнего предела детекции маркера. Однако на практике предельной чувствительности достигнуть трудно в силу того, что при большом избытке первичных и вторичных антител наблюдается значительная неспецифическая сорбция, которая фактически и лимитирует чувствительность этих методов. Использование моноклональных антител в иммунометрическом анализе очень эффективно, так как, сорбируя на твердой фазе антитела одной специфичности, а проявляя связавшийся с ними антиген мечеными антителами другой специфичности, удастся не только повысить избирательность детекции антигена, но и сократить время анализа (рис. 24, б).

В тех случаях, когда маркер вводится во вторичные антивидовые антитела, методы называются непрямыми. Непрямые методы удобны тем, что позволяют применять коммерческие конъюгаты

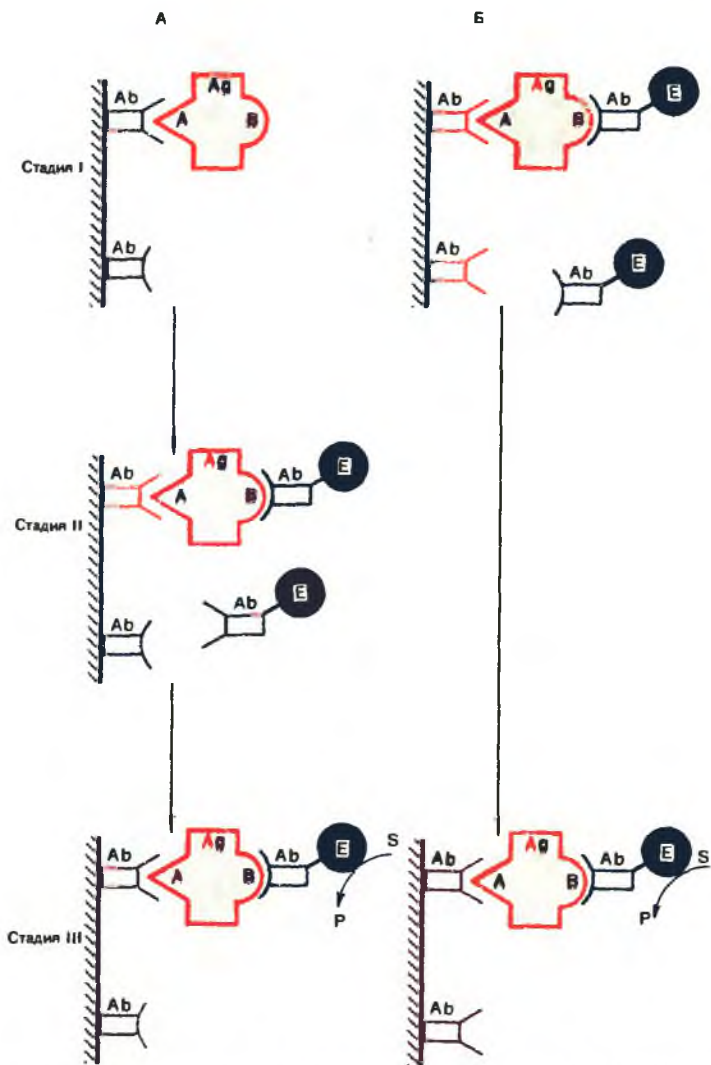


Рис. 24. Основные методы иммунометрического анализа поливалентных антигенов:

А — «сэндвич»-анализ с поликлональными антителами; стадия I — инкубация антигена с иммобилизованными антителами с последующей отмывкой несвязавшихся компонентов; стадия II — добавление меченных ферментов антител, инкубация и отмывка несвязавшихся компонентов; стадия III — детекция ферментативной активности; Б — «сэндвич»-анализ с моноклональными антителами; стадия I — инкубация антигена с моноклональными иммобилизованными антителами и конъюгатом антител с ферментом с последующей отмывкой всех несвязавшихся компонентов; стадия III — детекция ферментативной активности;

—Ab — иммобилизованные антитела; Ag (AB) — поливалентный антиген; Ab — E — конъюгат антител с ферментом; S и P — субстраты и продукты ферментативной реакции

против иммуноглобулинов различных видов животных, однако требуют большего времени для проведения анализа.

Все рассмотренные методы являются равновесными, т. е. на каждой стадии инкубации требуется достижение состояния равновесия. Поэтому обычно каждая стадия занимает несколько часов, что во многих случаях неприемлемо для практических целей.

Кинетические. Основной подход к решению проблемы ускорения анализа — проведение измерений в кинетическом режиме, т. е. в течение первых минут взаимодействия антигена с антителом. Как показывают эксперименты, переход к кинетическим режимам обеспечивает сокращение времени анализа до нескольких минут, при этом чувствительность методов определяется в основном нижней границей детекции маркера. Правда, использование кинетических методов требует высокой точности по времени выполнения всех стадий проведения анализа. Добиться этого можно при переходе к биохимическим автоанализаторам — современным роботам с программным управлением. Такие роботы уже созданы рядом зарубежных фирм и их реализация позволит существенно повысить чувствительность и точность анализа. Другим подходом в автоматизации иммуноферментных методов является использование проточного инъекционного анализа, который существенно упростит его инструментальное оформление.

§ 10. Применение ИФА

Среди различных направлений разработки иммуноферментного анализа большой интерес представляет создание методов, позволяющих в одном образце проводить одновременное определение нескольких веществ. Например, при диагностике вирусного гепатита важным является одновременное определение нескольких антигенов, что дает возможность определить стадию инфекционного процесса. Использование смеси антител, меченных разными ферментами,— один из путей, который позволяет решить данную проблему.

Методы иммуноферментного анализа уже сейчас находят широкое применение в различных областях медицины, сельского хозяйства, контроле технологических процессов и качества медицинских и пищевых продуктов, научных исследованиях.

В медицинской диагностике методы иммуноферментного анализа все активнее внедряются для обнаружения микробных и вирусных возбудителей, а также антител против них. Весьма сложной является проблема обнаружения таких возбудителей паразитарных инфекций, как гельминты, малярийный плазмодий, и других организмов, имеющих сложный и изменчивый антигенный состав. Но и в этих случаях выбор наиболее диагностически значимых антигенов позволяет проводить эффективную диагностику. Все шире применяется иммуноферментный анализ в диагностике неинфекционных болезней, таких, как диабет, рак,

сердечно-сосудистые и эндокринные заболевания. Большое значение эти методы будут иметь при широком внедрении диспансеризации населения и эпидемиологических обследованиях. Методы гомогенного иммуноферментного анализа употребимы для контроля лекарственной терапии, особенно препаратов, влияющих на сердечно-сосудистую систему, психотропных, антибиотиков. Эти методы позволяют быстро выявлять отравления, наличие наркотиков и допинговых препаратов в организме.

Другой областью практического использования иммуноферментного анализа является сельское хозяйство. Как в медицинской диагностике, так и в ветеринарии необходимо проводить определение широкого круга микробных и вирусных инфекций, при этом следует иметь в виду, что многие из них опасны и для человека. Ранняя диагностика инфекционных заболеваний способствует эффективному применению различных мер профилактики и лечения скота, что дает большой экономический эффект. Контроль гормонов позволяет проводить более рационально мероприятия по увеличению поголовья крупного рогатого скота. Иммуноферментный анализ может быть полезен для контроля качества пищевых продуктов, а также сырья животного происхождения.

Методы иммуноферментного анализа нашли применение в диагностике вирусных заболеваний растений. Известно, что вирусные поражения приводят к сильному снижению урожайности плодово-ягодных культур, картофеля, злаковых. Для эффективной борьбы с вирусными инфекциями необходимо иметь высокочувствительные методы массового анализа растений. Иммуноферментный анализ оказался самым результативным. Его использование в растениеводстве позволяет сократить время получения безвирусного посадочного картофеля, проводить быстрое определение зараженности плодовых деревьев, отбирать новые вирусостойчивые сорта в селекции растений. В комплексе с другими агротехническими мероприятиями иммуноферментный анализ способствует повышению урожайности сельскохозяйственных культур более чем в два раза, при этом увеличиваются сроки хранения, улучшаются вкусовые качества и другие качественные показатели пищевых продуктов.

В связи с интенсивным развитием промышленной биотехнологии, методы иммуноферментного анализа находят все более широкое применение в контроле технологических процессов и качества биотехнологической продукции. Так, например, в микробиологических производствах методы иммуноферментного анализа могут быть применены для быстрого выявления высокоэффективных микроорганизмов — продуцентов различных физиологически активных веществ (ферментов, антибиотиков и т. д.), контроля наличия посторонних микроорганизмов и бактериофагов в ферментерах, определения загрязненности воздуха промышленных помещений на наличие в нем вредных веществ.

вызывающих профессиональные заболевания у обслуживающего персонала.

Исключительно важен иммуноферментный анализ при производстве препаратов медицинского назначения, в том числе из животного сырья и донорской крови. Примеси сопутствующих веществ или вирусных антигенов могут оказаться исключительно вредными для организма. Так, например, актуальной является проблема обнаружения в доиорской крови, используемой для переливания или получения медицинских препаратов, вируса гепатита В. Наличие белковых примесей в препаратах инсулина, который, как известно, длительно вводится в организм, приводит к выработке антител, в результате чего эффективность его действия резко снижается. Именно поэтому необходим эффективный контроль за наличием примесей, которые не должны превышать $10^{-3}\%$. Иммуноферментный анализ позволяет обеспечить соответствующий контроль качества препаратов инсулина.

В научных исследованиях иммуноферментный анализ нашел применение как в традиционных областях биохимических исследований, так и в новых областях, связанных с разработкой методов генной и клеточной инженерии. В этой связи следует отметить большое значение традиционных методов аналитического электрофореза, в которых для идентификации отдельных компонентов употребляются иммуноферментные конъюгаты. В этом случае в качестве субстратов используются вещества, которые образуют нерастворимые красители, в результате чего происходит окрашивание компонентов на целлюлозных носителях. Тот же принцип лежит в основе иммуногистохимии, при этом вместо люминесцентных микроскопов применяются обычные световые микроскопы, что значительно упрощает эксперимент.

Без методов иммуноферментного анализа невозможно представить себе развитие клеточной инженерии. В частности, получение гибридом целиком базируется на использовании иммуноферментного анализа при клонировании клеток. При генноинженерных работах эти методы позволяют быстро отбирать клоны-продуценты. Методы иммуноферментного анализа эффективны при решении фундаментальных проблем онкологии, вирусологии, биохимии и физиологии.

Метод иммуноферментного анализа занял прочное место среди методов биохимического микроанализа. Однако следует иметь в виду, что его возможности еще до сих пор остаются неисчерпанными. С одной стороны, с каждым годом расширяется перечень соединений, для определения которых удобен этот метод, с другой — происходит непрерывный процесс его совершенствования: увеличиваются чувствительность, точность и специфичность, уменьшается время анализа, упрощается методика, разрабатываются способы автоматизации с помощью биохимических роботов и компьютеров. Важное значение для совершенствования иммуноферментного анализа как метода имеет более детальное изучение физико-химических свойств ферментов и создание высокочувствительных методов детекции их активности.



ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ И БЕЛКИ КАК ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

С первой трети нашего столетия начато медицинское использование ферментов для терапевтических целей. Однако на пути ферментной терапии выявились серьезные трудности. Дело в том, что в живом организме ферменты и физиологически важные белки содержатся почти всегда внутри клетки. При этом фермент находится в окружении, способствующем поддержанию его нативной структуры, и часто локализован в непосредственной близости от других ферментов, перерабатывающих продукт реакции первого. Ферментативные системы взаимодействуют с субстратами через мембрану клетки с помощью различных транспортных механизмов. Если фермент введен непосредственно в тело пациента, он может оказаться в условиях, способствующих его денатурации, и активность фермента будет стремительно снижаться сразу после инъекции. Другую опасность для фермента представляют протеиназы организма, расщепляющие введенный белок на неактивные пептиды, а также ингибиторы, которые свяжутся с ферментом по активному центру, в результате чего эти комплексы будут утилизированы лейкоцитами и фагоцитами. Кроме того, введенный в нативном состоянии фермент, как вещество высокой молекулярной массы, будет диффундировать очень медленно в нужное место, а введенный в болевой участок, быстро вымоется кровотоком или другими жидкостями.

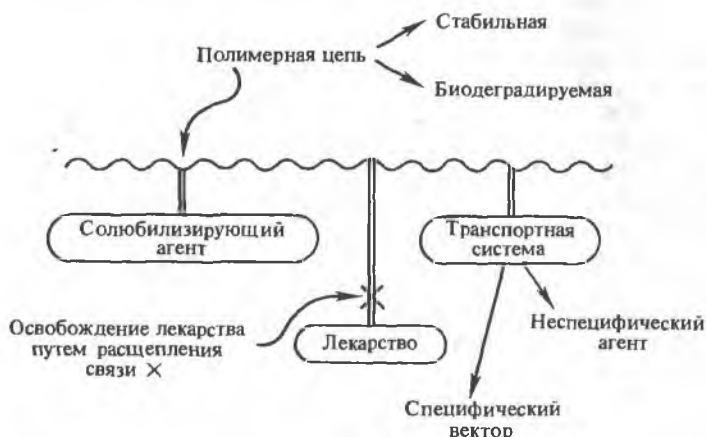
Сейчас можно считать решенными проблемы выбора ферментов, имеющих необходимую специфичность для терапии. Имеются способы высокоэффективной их очистки из различных источников, а также способы синтеза ферментов человека путем генной инженерии. Достаточно хорошо известна биохимия действия ферментов на уровне организма. Задачи же стабилизации ферментов, снижения их иммуногенности и способность быть направленными к пораженному органу решаются методами иммобилизации — связывания ферментов и других белковых физиологически активных соединений с полимерными носителями.

§ 1. Иммуобилизация белков

Иммобилизация белковых лекарственных препаратов проводится на носителях, которые сами по себе не должны оказывать осложняющих влияний и должны способствовать проникновению фермента к желаемой цели. Безусловно, и применяемый полимер, и сшивающий агент должны быть нетоксичны, кроме того, следует исключить возможность повышения токсичности при биодеградации конъюгата. Если фермент иммобилизуется на нерастворимом носителе и будет использоваться в составе, например, экстракорпорального шунта, он не должен деформировать форменные элементы биологических жидкостей.

Лекарственное вещество белкового или пептидного происхождения, иммобилизованное на соответствующем носителе, представляет собой структуру, модель которой выглядит следующим образом (схема 3).

Схема 3. Модель структуры лекарственного вещества



Легко видеть, что возможны значительные вариации иммобилизованного лекарственного препарата. Скажем, если полимер растворим — не требуется солюбилизирующего агента, а также химического связывания, если лекарственное начало заключено в полимерную оболочку (капсулу) и действует на проникающий внутрь капсулы субстрат или катализирует превращение внешнего субстрата при постепенной деградации оболочки. Комбинация желаемых свойств (т. е. растворимость, нетоксичность, специфичность) может быть достигнута при связывании белка с полимерной цепью, которая, в свою очередь, модифицируется нужным способом. Так, например, известно, что высокомолекулярное соединение само по себе не может проникнуть внутрь клетки путем диффузии, но попадает в нее путем эндоцитоза, если для этого полимер снабжен химическими группами, специфично взаимодействующими с клеточной мембраной.

Необходимо стремиться к созданию препаратов, в которых бы отмечалось высокое содержание физиологически важного начала по отношению к количеству носителя. Поскольку молекулярные массы белка и полимера одного порядка, то на одной молекуле растворимого полимера часто оказывается не более одной молекулы белка, часть полимера сопровождает лекарственный препарат, как балласт. Если полимер содержит заряженные группы, можно ожидать большего связывания, поскольку образуются нековалентные комплексы, разделить которые удастся только при высокой ионной силе раствора. Такие комплексы могут вести себя как «депо» лекарственного средства, находясь в нативном состоянии.

Препараты ферментов повышенной молекулярной массы могут быть изготовлены путем межмолекулярного сшивания белков бифункциональными реагентами. Такие препараты оказываются стабильными в физиологических условиях, повышенная молекулярная масса исключает немедленное их выведение почками. В ряде случаев показано (димеры и полимеры рибонуклеазы), что усиливается захват конъюгированных молекул культурами клеток.

Развиваемые ныне эфферентные методы лечения некоторых заболеваний основаны на гемосорбции или лимфосорбции. Носители сорбирующих колонок содержат более или менее специфические соединения, способные к связыванию токсинов, находящихся в организме. В некоторых случаях оправдано применение твердых носителей, содержащих ферменты. Основное требование к ним — они не должны вызывать деформацию форменных элементов крови. Носителями в данном случае являются сферические частицы из полимеров, стекла, керамики, силикатов. Модификация таких носителей для придания им групп, связывающих белки, проводится методами, заставляющими вступать в реакции ОН-группы носителей. Исходный материал для матрицы должен выбираться таким, чтобы наблюдалась минимальная неспецифическая сорбция. Носитель, как и лиганд, не должен иметь высокую стоимость, поскольку колонки для гемодиализа и детоксикации одноразового пользования.

К лекарственным препаратам, иммобилизованным на твердых носителях, можно отнести также перевязочные материалы, содержащие обычно протеолитические ферменты, которые применяются для очищения гнойных ран.

§ 2. Антигенность и иммуногенность иммобилизованных белков

Выше упоминалось о необходимости снижать антигенность вводимых в организм пациента препаратов. Модифицированные полимера́ми белки обычно снижают свою антигенность, что объясняется недоступностью поверхности белка для рецепторов иммунной системы. Так, продемонстрировано, что антигенность

иммобилизованного на полиэтиленгликоле препарата аспарагиназы примерно в 50 раз ниже, чем нативного белка. Кроме того, доза иммобилизованного фермента, необходимая для излечения, много ниже, чем нативного. Важно, что излечивались животные, иммунизированные нативным ферментом, поскольку антитела, выработанные на нативный белок, не ингибировали модифицированный фермент. Рассмотрим один пример более подробно, чтобы продемонстрировать сложности, встречающиеся на этом пути.

Модификация полиэтиленгликолем β -глюкозидазы была проведена таким образом, чтобы получить препараты фермента, молекулы которого содержали бы различное число полимерных молекул. Оказалось, что как активность, так и антигенные свойства зависят от числа замещенных NH_2 -групп на молекуле белка. При модификации 50% аминокрупп сохраняется около 25% активности по моносахаридам и менее 1% по трисахариду, что можно объяснить стерическими затруднениями, а также, вероятно, и изменением гидрофильности молекулы, так как различные по полярности субстраты «чувствуют» модификацию по-разному. Очень существенным в этом исследовании было обнаружение факта, что малая степень модификации (17% замещенных NH_2 -групп) усилила иммунный ответ, тогда как большая степень модификации его не вызывала. Возможно, что в случае модифицированной β -глюкозидазы антитела образуются, но они не ингибируют высокозамещенный по NH_2 -группам фермент из-за стерических затруднений, и фермент способен проявлять терапевтический эффект.

Экранирование рецепторов ферментов полимерным носителем, используемым для увеличения времени пребывания препарата в организме, тесно связано с проблемой, которая возникает при необходимости подвести тот же препарат к пораженному органу. Поскольку здесь нужны свои рецепторные взаимодействия, необходимо ввести в полимер группы для «узнавания» органа-мишени.

Другая сторона того же явления — усиление иммунного ответа организма. Например, известно, что организм не отторгает опухолевые клетки, хотя антитела к таким клеткам образуются. Можно резко повысить иммуногенность некоторых типов опухолевых клеток, если обработать их в пробирке, вне организма, ферментом нейраминидазой, который «счищает» с клеток ацетилнейраминную кислоту. Эти клетки вызывают такой сильный иммунный ответ, что опухоль (фибросаркома, спровоцированная метилхонантеном) быстро отторгается в ответ на введение обработанных клеток. К сожалению, не все раковые клетки имеют на поверхности нейраминную кислоту, поэтому исследования по изучению поверхностных рецепторов клеток и модификации их ферментами исключительно важны.

Итак, необходимо проверять как иммуногенность, так и физиологическую активность препарата в модифицированном

состоянии. Следует учитывать при этом, что в условиях организма белок может быть отделен от носителя и оказаться иммуногенным, с одной стороны, и физиологически активным, с другой. С такими примерами почти неизбежно сталкиваются, если используют в качестве лекарственных средств, нековалентные комплексы белок — полимер или твердые смеси белок — полимер, применяющиеся в качестве «депо».

Способ иммобилизации влияет на иммунный ответ организма. Ковалентное связывание с полисахаридами, полиэтиленгликолем во многих случаях приводит к снижению иммуногенности препарата, поскольку матрица носителя не допускает контакта с рецептором. С другой стороны, связывание с носителями-полиэлектролитами неоднократно приводило к повышению иммуногенности препарата. Применение полиакриловой кислоты, поливинилиридина и его производных, полимеров на основе *D*-глутаминовой кислоты и *D*-лизина в качестве носителей позволило получить препараты, дающие высокий иммунный ответ. На это могут быть разные причины. Возможно, полиэлектролиты образуют прочные комплексы с белком нековалентного типа, которые медленно высвобождают активное начало (белок без какой-либо химической модификации) с более или менее постоянной скоростью или полиэлектролит в комплексе с белком может удерживаться в районе рецептора, высвобождая белок-антиген. Сейчас трудно дать объяснение этому явлению. Но, с другой стороны, полиэлектролитные комплексы могут быть основой создания вакцин нового типа, позволяющих повысить иммунный ответ в организме животных и способствующих выработке антител к любым антигенам (Р. В. Петров, В. А. Кабанов, 1982).

§ 3. Выведение иммобилизованных препаратов

Одной из основных задач при изготовлении лекарственных препаратов на основе ферментов наряду с проблемой иммуногенности является выведение препарата целиком из организма. Если пути выведения фермента в общем ясны, то какова судьба полимера-матрицы? Первое условие, предъявляемое к такому полимеру, — отсутствие токсичности. Кроме того, его молекулярная масса должна быть такой, чтобы он мог выводиться почками. Вещества с высокой молекулярной массой (выше 60 000) будут забивать почечные канальца, что может привести к непредвиденным осложнениям. Исключение могут составить биodeградируемые полимеры, которые разрушаются в организме до нормальных метаболитов. К таким полимерам, например, относится *D,L*-полимолочная кислота, широко применяются декстраны. В ряде случаев в синтетический полимер вставляют биode-

градируемые участки, полипептиды например, подвергающиеся расщеплению протеиназами в организме, что приводит к образованию соединений с небольшой молекулярной массой, легко выводимых из организма.

Относительно выведения матрицы фермента, а также других физиологически активных полимеров, имеющих терапевтическое значение, например гепарина, имеется ряд интересных исследований. Например, описано, что избыточный гепарин выводят путем пропускания плазмы пациента через шунт с иммобилизованной гепариназой, которая разрушает гепарин до низкомолекулярных веществ. В принципе предпринятый подход, несмотря на высокую стоимость, обещает быть перспективным.

§ 4. Ферментные препараты типа «контейнер»

Лекарственные препараты, в которых соотношение белок:полимер по массе очень высокое и достигает сотен тысяч и выше, могут быть изготовлены с помощью метода так называемой «искусственной клетки», а также липосом. Эти препараты представляют собой микросферы с более или менее твердой и проницаемой оболочкой. Назначение этих лекарственных препаратов различное.

Первым типом «искусственных клеток» следует назвать микрокапсулы (Т. М. Чанг, 1965). Микрокапсулированные препараты ферментов представляют собой крошечные реакторы диаметром от 10^3 до $5 \cdot 10^4$ нм, тонкая оболочка которых (200—400 нм) проницаема для низкомолекулярных соединений, т. е. для низкомолекулярных субстратов и продуктов их превращения. Фермент, находящийся внутри оболочки, не контактирует с жидкостями и тканями организма, не разрушается протеиназами, не ингибируется, не вызывает иммунного ответа организма. Основное достоинство микрокапсул заключается в том, что их можно имплантировать в нужное место, например в непосредственной близости от опухоли. При этом микрокапсула с соответствующим содержанием будет перерабатывать метаболиты, необходимые для роста опухолевой ткани, и эта ткань не будет развиваться.

Принцип получения микрокапсул с белковым содержимым достаточно прост. Создается микроэмульсия водного раствора вещества в органическом растворителе. Полимерный материал растворен во внешней фазе, к которой добавляют вещества, способствующие его осаждению на капле эмульсии. Растворы могут содержать также мономеры, полимеризующиеся на границе раздела фаз. Используются и другие способы, которые специально подбираются в зависимости от содержимого микрокапсулы. Кинетика действия фермента в микрокапсулированном состоянии.

на субстрат, находящийся во внешней фазе, осложнена диффузионными эффектами. Так, определенную трудность для диффузии субстрата представляет стенка капсулы. Следует учитывать время насыщения субстратом фермента внутри капсулы. Возможен вариант, когда большая доля включенного внутрь капсулы фермента не принимает участия в реакции, поскольку субстрат перерабатывается ферментом, находящимся уже в пристеночных слоях. Экспериментальные данные показывают, что проявление полной каталитической активности содержимым капсулы в ряде случаев осуществляется лишь для субстратов, превращающихся с невысокими скоростями.

Фермент, включенный в капсулу, может быть предварительно стабилизирован, или в капсулы наряду с ним могут быть включены соединения, также высокомолекулярные, способствующие его стабилизации. Капсулы могут содержать микроскопические участки тканей. Например, имеются экспериментальные данные по созданию депо инсулина путем имплантации микрокапсул, содержащих островки Лангерганса, синтезирующие в поджелудочной железе инсулин. Известно, что терапии диабетических заболеваний уделяется много внимания. Имплантация лекарственного начала избавила бы пациентов от ежедневных инъекций инсулина.

Внутри микрокапсул могут быть включены полиферментные системы и их кофакторы, модифицированные с целью увеличения молекулярной массы и удержания внутри микросферы. Описаны микрокапсулированные системы для регенерации кофакторов. Такие микрореакторы предполагается в будущем применять в качестве миниатюрных источников энергии для имплантатов.

Полимерная стенка микрокапсул обычно изготавливается из прочных полимеров. Следует учитывать, что микрокапсулы, вводимые в кровь, могут забивать кровеносные сосуды и, следовательно, являться причиной образования тромбов. Однако эффективность микрокапсул при использовании их в виде колонок для диализа в аппарате «искусственная почка» несомненна. При этом объем аппаратов и, соответственно, количество необходимых и очень дорогих растворов резко сокращается. Например, для микрокапсулированной «искусственной почки» требуется колонка объемом всего 30 мл, которая работает почти в 100 раз быстрее обычного аппарата. Развитие такой техники сдерживается пока высокой стоимостью, а также необходимостью использовать уже существующую тоже очень дорогую технику. Вероятно, ферментные реакторы на микрокапсулах будут применяться для деградации недиализуемых материалов.

Внутри микрокапсул могут быть включены магнитные частицы. В этом случае извне подводят магнитное поле и препарат удерживают вблизи органа-мишени. Не имеется ограничений в типах капсулируемых материалов. Вероятно, большее значение имеет материал оболочки. Но и в этом отношении в настоящее время сделано многое. Так, предложены полимеры на основе *D,L*-поли-

молочной кислоты, биodeградируемые с достаточной скоростью. В ряде случаев используются высокомолекулярные соединения, растворимые в определенных условиях и сохраняющие высокую прочность оболочек в других. Так ведет себя ацетилфталилцеллюлоза, микрокапсулы из которой интактны в желудочном соке и растворяются в кишечнике, освобождая содержимое.

Сейчас интенсивно исследуются свойства микрокапсул, стенка которых состоит из оболочек эритроцитов. Содержимое эритроцитов удаляется, а «тень» заполняется ферментом. Серьезные успехи достигнуты при лечении аспарагин-зависимых опухолей препаратами аспарагиназы в оболочках эритроцитов. Используются оболочки и других клеток. Так, описаны лекарственные препараты, включенные в оболочки макрофагов. Последние имеют тенденцию накапливаться в очагах воспалений, а следовательно, могут транспортировать туда как низко-, так и высокомолекулярный лекарственный препарат. Существенной положительной стороной «теней» клеток в качестве носителя является их полная совместимость с организмом пациента, поскольку этот носитель готовят на основе клеток, выделенных из крови пациента, и возвращают их ему же с новым содержанием.

Задача введения лекарственного препарата в клетки может быть решена путем создания контейнеров-переносчиков типа липосом или мицелл. Оболочка липосомы представляет собой однослойную или многослойную поверхность, образованную, в свою очередь, бислойной структурой, созданной соединениями, имеющими два гидрофобных, достаточно протяженных участка и гидрофильную группу. Гидрофобные концы слипаются между собой и образуют пленку, обе стороны которой гидрофильны. Чаще всего основой таких структур является фосфатидилхолин. Длина гидрофобной цепи около 14—18 атомов углерода, цепь иногда имеет двойную связь в 9—10-м положении. Для каждого типа фосфолипидов имеется определенная температура, при которой твердая структура расплавляется. Фосфолипиды, содержащие насыщенные углеводородные цепи, плавятся уже при физиологических температурах. Липосомы формируются путем обработки ультразвуком водной дисперсии липидов выше температуры их застывания. Если используется непредельный липид, его можно «заставить» полимеризоваться под действием УФ-излучения и получить липосому с прочной оболочкой. Лекарственное начало может быть введено внутрь липосомы, если она гидрофильна, или в стенку, если она гидрофобна. Диаметр липосом составляет от 20 до 10^3 нм, следовательно, применять их как контейнеры для доставки ферментов нецелесообразно, если нет возможности с точностью нацелить липосому на определенную клетку. Однако липосомы имеют преимущества, поскольку поверхность их может быть легко модифицирована ферментом, связанным с длинноцепочечным углеводородом. Липосома, специфически или неспецифически адсорбировавшись на клетке, может быть поглощена ею путем эндоцитоза, и фермент внутри

клетки окажет физиологическое действие. Содержимое липосомы может состоять при этом из низкомолекулярного лекарственного средства или субстрата, продукт превращения которого недостаточно стабилен, но обладает высокой физиологической активностью.

Лекарственные препараты в липосомах были использованы при лечении лизосомальных болезней Фабри и Гоше в эксперименте. Заместительная терапия требует присутствия фермента β -гексозаминидазы в различных тканях. Но оказалось, что фермент быстро попадает исключительно в печень, следовательно, нужен метод, выводящий его из печени и направляющий в нейроны, эндотелий, фибробласты, мускульную ткань. Такого метода пока нет.

Определенный интерес могут представлять мицеллы — образования, еще меньшие по диаметру, чем липосомы. В ближайшее время следует ожидать их широкого применения как носителей ферментов в сложных мазевых композициях, в которых ферменты неустойчивы. Особенно интересны с этой точки зрения образцовые мицеллы с гидрофильной внутренней поверхностью. Ферменты в них стабилизированы и сохраняют при минимальном количестве молекул воды в своем окружении высокую каталитическую активность.

§ 5. Терапия иммобилизованными ферментами

Иммобилизованные ферменты, как ясно из изложенного, имеют ряд преимуществ в сравнении с нативными: они стабильны, неиммуногенны, не подвергаются протеолизу, действию микроорганизмов, могут обладать свойством концентрироваться в желаемом органе. Похоже, что исследователи-энзимологи решили большую часть проблем, связанных с терапией белковыми препаратами, и в настоящее время имеются все предпосылки для клинического использования иммобилизованных ферментов.

Наибольшие успехи достигнуты в двух направлениях: лечении острой сердечной недостаточности и терапии раневых процессов. Еще несколько лет назад А. П. Флетчер — один из виднейших исследователей терапии процессов тромбообразования — писал, что многие осложнения, связанные с применением стрептокиназы — активатора плазминогена, были бы сняты, если бы удалось иммобилизовать ее с сохранением физиологической активности. Большим успехом следует назвать практическое внедрение в отечественную клиническую практику препарата «Стрептодеказа». Он представляет собой иммобилизованную на полисахариде стрептокиназу-белок, способствующий активации плазминогена, естественного предшественника протеиназы плазмينا, предотвращающего образование тромба в кровеносной системе. Стрепто-

киназа иммобилизуется на окисленном периодатом декстране, при этом она не обнаруживает антигенных свойств, нетоксична и стабильна. Этот препарат нашел применение при самых различных патологиях, связанных с тромбообразованием. Важно, что иммобилизация придала стрептокиназе, выделяемой из микробного сырья, безопасность в отношении иммуногенности — явления, всегда вызывавшего опасения медиков при использовании этого эффективного средства. Одним из основных достоинств нового препарата является простота его применения. Терапия стрептодеказой, и это очень существенно, не искажает общей формулы крови, что было характерно для стрептокиназы.

Хорошо известно, что протеиназы, расщепляя денатурированные белки, способствуют очищению ран, и следовательно, их заживлению. В этом направлении, в клинической практике с помощью иммобилизованных протеиназ сделано многое. В качестве носителей для иммобилизации протеолитических ферментов наиболее употребимы волокнистые материалы на основе целлюлозы, поливинилового спирта, солей альгиновой кислоты, полиамидное и коллагеновое волокно. Готовят препараты, иммобилизованные также на гранулированных материалах — целлюлозных шариках, гранулах декстрана, предварительно гидролизованных шариках капрона. Применяют также препараты, изготовленные нековалентным включением фермента в растворимые целлюлозы, в медленно рассасывающийся коллаген. Готовят нити, в которые при формовании включают фермент и используют их в качестве шовного материала. Сравнительный анализ действия нативных и иммобилизованных протеиназ (в основном α -химотрипсина, трипсина, террилитина, субтилизина, коллагеназы) показал, что уже на 2—4-й день рана очищается от некротических масс и по крайней мере вдвое быстрее наступает грануляция.

Убедительные результаты получены при лечении трофических язв, лучевых язв кожи. Особенно эффективны иммобилизованные протеиназы при предоперационной подготовке и после пластических операций. Иммобилизованные протеолитические ферменты с большим успехом применяются в лечении гнойных заболеваний легких и плевры. Природный полимер коллаген очень эффективен в качестве носителя при использовании протеиназ для введения в брюшную полость, лечения эмпием, абсцессов. На примере водорастворимого иммобилизованного террилитина была продемонстрирована эффективность его применения во внутрисполостной жидкости.

Несколько лет назад был описан прием детоксикации при нефропатии с применением иммобилизованной в микросферы непатогенной бактерии. Микросферы, в свою очередь, заключались в капсулу и принимались через рот. В кишечнике они освобождались и бактерия утилизировала токсины. Так как кишечный тракт обменивается с кровью, концентрация токсинов заметно снижалась.

Серьезное внимание справедливо уделяется созданию протезов сосудов со сниженной или исключенной возможностью тромбообразования. Для этого на внутренней поверхности полимерных трубок, изготавливаемых из биосовместимых полимеров, иммобилизуют протеиназы. В ряде случаев полимер покрывают перед иммобилизацией фермента альбумином и гепарином. Такие сосуды нашли применение в хирургии.

Выше были рассмотрены возможности, которые дает иммобилизация биологических катализаторов-ферментов для успешного их использования в качестве лекарственных препаратов. Также исключительно важную роль при лечении различных патологий имеют белки-ингибиторы ферментов, в частности, основной поливалентный ингибитор протеиназ. Его существенным недостатком как лекарственного средства является быстрое выведение из организма, в основном из-за его невысокой молекулярной массы (6000). Связывание ингибитора с высокомолекулярным носителем в значительной степени предотвращает его диффузию в экстрацеллюлярную жидкость. Этот ингибитор иммобилизовали на полисахариде КМ-декстране (карбоксиметилдекстран), который в свою очередь модифицировали остатками галактозы. Известно, что печень снабжена рецепторами, связывающими галактозу, и гепатотропность дважды модифицированного препарата ингибитора (КМ-декстраном и галактозой) увеличилась в сравнении с нативным в 10 раз. Около 50% введенного белка уже через 3 мин оказывается в печени. Препарат модифицированного КМ-декстраном ингибитора был испытан при лечении острого панкреатита в эксперименте. При введении высокомолекулярного производного даже в более низкой дозе в сравнении с нативным увеличивается выживаемость животных.

Панкреатический ингибитор на нерастворимых носителях может служить прекрасным средством для эфферентной терапии. Был проведен подбор носителей и активирующих их бифункциональных агентов с целью получения препарата, обладающего высокой операционной емкостью. Лучше других оказались препараты ингибитора, связанного с сефарозой и макропористым активированным силикагелем. При использовании препаратов, иммобилизованных на твердых носителях, важно максимально избегать неспецифической сорбции. На силикатных матрицах, обработанных поливинилпирролидоном, она весьма мала.

Аффинный сорбент, полученный путем иммобилизации данного ингибитора на макропористом силикагеле, испытан при лечении экспериментального острого панкреатита у собак. В результате лечения иммобилизованными ингибиторами все собаки выжили, в то время как нелеченные животные погибли в течение суток. Очень существенно, что при применении колонок с иммобилизованными ингибиторами протеиназ форменные элементы крови и уровень общего белка оставались без изменений и не уменьшалась антипротеолитическая активность крови.

Несмотря на значительные успехи, сделанные в описанной

области, предстоит еще большая работа ученых разных специальностей, которая расширит знания о протекании в организме ферментативных процессов, что создаст научную основу использования иммобилизованных ферментов, этих мощных терапевтических средств. Инженерная энзимология не остается в стороне. Развиваемые ныне методы генной инженерии дают возможность синтезировать белки, не отличающиеся от белков организма человека. Это в значительной степени снизит их антигенность, но не уменьшит потребности в соответствующих иммобилизованных препаратах, поскольку остается необходимость удерживать лекарственный препарат в организме больного. Вероятно, будут расширены исследования по регуляции иммунного ответа организма.

Ясно, что в ближайшие годы нужно ожидать серьезного продвижения исследований в области клинического применения иммобилизованных ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инженерная энзимология как одна из главных ветвей биотехнологии развивается в разных направлениях. Если на первых этапах своего становления инженерная энзимология опиралась на связи с микробиологией и различными дисциплинами химической науки (макрокинетика, полимерная химия, адсорбция и хроматография, органическая химия, химическая технология), то новый современный этап ее развития в значительной степени связан с другими разделами биотехнологии и прежде всего генной, белковой и клеточной инженерией. Сегодня хорошо понятны те ограничения, которые накладывает белковая природа биокатализаторов на их крупномасштабное использование в промышленности: температурная нестабильность, ингибирование высокими концентрациями субстратов и продуктов, влияние рН, ионов металлов и других факторов среды. Часть этих проблем может быть решена методами инженерной энзимологии, которые позволяют изменять свойства поверхности белковой глобулы и в целом влиять на ее свойства. Этот подход, несмотря на свою простоту, не позволяет направленно изменять свойства ферментов, и поэтому часто носит эмпирический характер.

Накопленные в последние годы данные физико-химических исследований ферментов, и прежде всего рентгеноструктурного анализа, показывают важность отдельных «горячих» точек в структуре ферментов. Влиять на эти точки можно только методами белковой инженерии, которые открывают путь к избирательной точечной модификации ферментов. Именно на этом пути ожидаются новые результаты по получению высокостабильных ферментов с заданными свойствами. В частности, можно будет создавать гибридные молекулы, содержащие различные функционально активные центры, например гибриды ферментов, катализирующих определенную последовательность процессов.

С помощью методов генной инженерии можно производить новые биокатализаторы в неограниченных количествах с использованием принципов культивирования микроорганизмов. Генная инженерия позволяет также создавать штаммы микроорганизмов с заданным составом ферментов, что является исключительно важным для проведения мультиферментных процессов получения сложных органических соединений.

Рекомбинация генов может быть также достигнута методами клеточной инженерии, дающими возможность получать гибридные клетки, не существующие в природе.

Все вместе взятое позволит в ближайшем будущем создать биокатализаторы нового поколения, что является исключительно важным для решения широкого круга задач современной химической, пищевой, микробиологической промышленности, диагностики. Уже сейчас поставлена задача конструирования биокомпьютеров, в которых будут использованы такие «искусственные» белки.

Анализ достижений и неудач практического использования инженерной энзимологии в разных областях народного хозяйства еще раз убедительно показывает необходимость глубоких фундаментальных исследований в области структуры и механизма действия ферментов.

Другим важным вопросом является поиск в природе новых ферментов и их продуцентов, которые катализируют перспективные химические процессы, в частности, гидрирования, окисления и синтеза различных сложных и простых соединений. Исключительно перспективна разработка способов применения ферментов для создания новых источников энергии, в частности использования солнечной энергии и энергии водорода. С другой стороны, ферментные катализаторы позволяют создать новые энергомалоёмкие технологии синтеза органических веществ.

В связи со все более возрастающим значением проблем охраны природы задачей инженерной энзимологии будущего является создание безотходных технологий, исключающих загрязнение окружающей среды и базирующихся на применении экологически чистых видов сырья, например глюкозы, углекислого газа, водорода, метанола и т. д. Сочетание возможностей реализации возобновляемых источников сырья и энергии (в частности, солнечной) позволит создать технологию, гармонично связанную с окружающей средой.

Новые перспективы открывает инженерная энзимология в области диагностики и лечения заболеваний человека и животных. Это направление касается создания не только новых нетоксичных для организма высокоэффективных лекарственных средств, но и искусственных органов, которые могут на время или постоянно имплантироваться в организм. В частности, к актуальным относится проблема создания биосовместимых источников энергии, использующих принцип биоэлектрокатализа. На основе ферментов и антител создаются новые принципы регистрации биологических процессов и анализа физиологически активных соединений, обладающих высокой чувствительностью, специфичностью и быстродействием.

Новым направлением инженерной энзимологии является создание систем записи и хранения информации, которые могут найти применение не только в таких традиционных областях, как фотография, но и при создании биокомпьютеров.

Инженерная энзимология — мультидисциплинарная наука, и успех ее развития зависит от гармоничного развития всех естественных наук в целом.

ЛИТЕРАТУРА

Общая

Иммобилизованные ферменты//Современное состояние и перспективы/Под ред. И. В. Березина, В. К. Антонова, К. Мартинека. — М.: Изд-во МГУ, 1976. Т. 1. 296 с. Т. 2. 358 с.

Введение в прикладную энзимологию/Под ред. И. В. Березина, К. Мартинека. — М.: Изд-во МГУ, 1982. 386 с.

Успехи биоорганического катализа/Под ред. И. В. Березина, К. Мартинека. — М.: Изд-во МГУ, 1979. 284 с./Под ред. И. В. Березина. — М.: Изд-во МГУ, 1983. 250 с.

Химическая энзимология/Под ред. И. В. Березина. — М.: Изд-во МГУ, 1983. 250 с.

Биотехнология /Под ред. А. А. Баева. — М.: Наука, 1984. 318 с.

Применение иммобилизованных ферментов/Под ред. И. В. Березин//Итоги науки и техники. Сер. «Биотехнология». — М.: Изд-во ВИНТИ, 1986. Т. 6. 300 с.

К главе 1

Клёсов А. А. Технологические процессы с применением иммобилизованных ферментов//В кн.: Введение в прикладную энзимологию. — М.: Изд-во МГУ, 1982. С. 353—379.

К главе 2

Клёсов А. А., Рабинович М. Л. Ферментативный гидролиз целлюлозы//В кн.: Биологическая химия. Т. 12. Инженерная энзимология и биоорганический катализ/Под ред. В. Л. Кретовича и И. В. Березина//Итоги науки и техники. — М.: Изд-во ВИНТИ, 1978. С. 49—91.

Клёсов А. А. Ферментативное превращение целлюлозы//В кн.: Биотехнология. Т. 1. Биотехнология получения и трансформация топлив//Итоги науки и техники. — М.: Изд-во ВИНТИ. С. 63—150.

К главе 3

Шведас В. К., Клёсов А. А. Проблемы ферментативной модификации антибиотиков//В кн.: Биологическая химия. Т. 1. Инженерная энзимология и биоорганический катализ/Под ред. В. Л. Кретовича и И. В. Березина//Итоги науки и техника. — М.: Изд-во ВИНТИ, 1978. С. 209—237.

Шведас В. К., Галаев И. Ю. Успехи химии. 1983. Т. 52, в. 12. С. 2039—2071.

Варфоломеев С. Д., Мевх А. Т. Простагландины — молекулярные биорегуляторы. — М.: Изд-во МГУ. 1985. 307 с.

Бартошевич Ю. Э., Ныс П. С., Шведас В. К., Навашин С. М. Антибиотики и медицинская биотехнология. 1986. Т. 31, № 2. С. 98—104.

К главе 4

Ярополов А. И., Бачурин С. О. Биоэлектродкатализ//В кн.: Биотехнология. Т. 1. Биотехнология получения и трансформации топлив//Итоги науки и техники. — М.: Изд-во ВИНТИ, 1983. С. 195—233.

К главе 5

Кулис Ю. Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. — Вильнюс: Изд-во Мокслал, 1981. 200 с.

Угарова Н. Н., Бровка Л. Ю. Биolumинесценция и биolumинесцентный анализ. — М.: Изд-во МГУ, 1981. 138 с.

К главе 6

Журнал всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева, т. XXVII, § 4, 1982. Номер посвящен современным проблемам фундаментальной и прикладной иммунологии.

Лефковите В. О., Лефковите И. Иммунология//Методы исследований. — М.: Мир, 1983.

Петров Р. В. Иммунология. — М.: Медицина, 1982.

Егоров А. М., Дзантиев Б. Б., Гаврилова Е. М. В//Сб. Успехи биоорганического катализа. — М.: Изд-во МГУ, 1979. С. 61—84.

К главе 7

Вольф М, Рансбергер К. Лечение ферментами. — М.: Мир, 1976. 231 с.

Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н. Гемосорбция. — М.: Медицина, 1985. 286 с.

Журнал Всесоюзного химического общества им. Д. И. Менделеева. Т. XXX, § 4, 1985. Номер посвящен применению полимерных материалов в медицине.

Кабанов В. А., Петров Р. В., Хаитов Р. Н. Новый принцип создания искусственных иммуногенов//ЖВХО им. Д. И. Менделеева, 1982. Т. 27, № 4, С. 417—429.

Чанг Т. М. С. Искусственная клетка. — Киев: Наукова думка, 1979. С. 204.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Аминокислоты 26, 46, 60
— производство с помощью иммобилизованных ферментов 26, 27, 46, 60
L- и *D*-аминокислоты разделение смеси 26, 46
— синтез с использованием лиаз 60*, 61
- Антиген, определение 102
Антитела (иммуноглобулины) 99
— высокоспецифичные 99
— — — — — получение 99
— механизм биосинтеза 103, 104
— поликлональные и моноклональные 104
— — — — — получение 104
— структура 99, 100*
- Арахидоновая кислота 59
— — биокаталитическое превращение в лейкотриены 59*, 60
— — ферментативное превращение в простагландины и простациклин 58*
- Аспарагиновая кислота 28, 60
— — применение иммобилизованных клеток микроорганизмов 28, 60
- Безлактозное молоко 29
— — — — — получение с использованием иммобилизованной лактазы 29
- Белки иммобилизованные 125
— — — — — антигенность и иммуногенность 125—127
- Белковые лекарственные препараты 124
— — — — — иммобилизация 124
- Биокатализ 43
— использование в тонком органическом синтезе 43
- Биокатализаторы нового поколения 136
- Биолюминисцентный микроанализ 93, 94*—96
- Биоорганические катализаторы конструирование 8, 67
- Биосенсоры с иммобилизованными ферментами 97
— — — — — применение 97
- Биотехнология 18
— история 18
- Биоэлектрокатализ 69
— перспективы использования 80—82
- Важнейшие процессы с применением иммобилизованных ферментов 30, 44, 46
— — — — — получение белковых гидролизатов 31
— — — — — глюкозы из крахмала 30
— — — — — целлюлозосодержащих отходов промышленности и сельского хозяйства 31
— — — — — инвертного сахара 31
- Гидролитические реакции термодинамические возможности 49*
- Глюкоза — сырье для получения фруктозы 15
- Глюкозоизомераза иммобилизованная 20, 21
— — — — — коммерческие препараты 20
- Глюкозо-фруктозные сиропы 25
— — — — — масштабы производства 25, 26
— — — — — получение 20
— — — — — основы процесса 20
— — — — — с помощью иммобилизованной глюкозоизомеразы 20, 21*
— — — — — технологические варианты процессов 20—21, 23
— — — — — экономические оценки 23, 24*, 25*
— — — — — схема производства 22*, 23
- Изомеризация глюкозы во фруктозу 22
— — — — — схема технологического процесса 22*
- Иммобилизованные лекарственные препараты выведение из организма 127, 128
- Имуноферментные конъюгаты 112
— — — — — получение 112
— — — — — синтез 109, 110
- Имуноферментный анализ (ИФА) 17
— — — — — методы 115
— — — — — иммунометрические 118
— — — — — кинетические 120
— — — — — конкурентные 115, 117*, 118

* Звездочкой отмечены страницы, на которых помещены рисунки или таблицы.

- — применение 120—122
- — субстрактные метки 113
- Иммунохимический анализ 107, 109
- — принципы 105
- — радиоактивные метки 107, 108
- — ферментные метки 108
- Иммунохимические методы 99
- Индустриальная энзимология 6, 7, 9, 12, 13, 15, 133, 135
- — важнейшие направления 15, 43
- — — биоконверсия целлюлозных и лигноцеллюлозных материалов в этанол 15
- — — гидролитическая деструкция растительной биомассы 15
- — — ферментативная и (или) микробиологическая деструкция лигнина 15
- — — ферментативное получение глюкозы 15
- — определение 8
- — основные задачи 8
- — и диагностика, и лечение заболеваний человека и животных 136
- — — создание безотходной технологии 136
- — новое направление 136

Кислородные электроды на основе иммобилизованной лакказы 76

Комплекс поливалентного антигена с антителами схема образования 106*

— лактамные антибиотики синтез амидной связи 50*

— — ферментативная модификация 44—46

Маркеры в иммунохимическом анализе 107

— свободные и связанные 114, 115

— — — разделение 114, 115

Методы ферментативного переноса ацильных групп 54, 55

Меченые соединения 62

— — синтез 62—63

Нуклеиновые кислоты ферментативная модификация 61

Олиго- и полисахариды синтез 62

Оптически активные вещества 14, 46

— — — с использованием иммобилизованных ферментов 14, 46

Пенициллинамидаза иммобилизованная 14, 30, 44—46

Полупроводниковые полимерные носители на основе комплексных солей тетрацианхинодметана 78

Принцип иммобилизации 11

Проводниковые и полупроводниковые матрицы для иммобилизованных ферментов 76—77

Простаиноиды биокаталитическое получение 57—60

Реакторы с иммобилизованными ферментами 88

Регенерация кофакторов 52, 53

— — системы 53

Сахара ферментативный синтез 63

Синтез с использованием гидролаз 48—50

Система полупроводниковая матрица — фермент 79

— — — эффект «электронной губки» 79

Соиммобилизованные полиферментные биолюминесцентные системы 96, 97

— — — в микроанализе 96, 97

Сопряженные ферментативные системы 52, 53, 84, 85

— — — применение в анализе 84, 85

Термически модифицированные полиакрилнитрилы 78

Увеличение выхода продуктов в термодинамически неблагоприятных условиях 50—52

Ферментативное превращение рацематов в энантомеры 46, 47

— электрохимическое восстановление кислорода 75, 76

— — окисление водорода 73

Ферментативный анализ 85

— — кинетические основы 85, 86

— — методы детекции 85

— гидролиз целлюлозы 36, 41

— — основы биотехнологии 41—44

— органический синтез 43, 66

— — — перспективы 66

— синтез цефалексина схема реакций 56*

— — цефалоспоринов кинетика 56*

Ферментативные реакции в безводной среде 64—66

— — — водоорганических системах 13, 64—66

— — — — — новый подход 13, 60,

- 64—66
- — — крупнотоннажном производстве, примеры 67*
- — регенерация кофакторов 52
- микрокалориметрические датчики 89—90
- методы анализа 16, 17
- электроды 91*—93
- препараты типа «контейнер» 128—131
- Фермент-маркер 108
- Ферменты 6
- Ферменты — аналитические реагенты 83, 84
- , включенные в обращенные мнцеллы 65
- избирательная точечная модификация 135
- и клетки иммобилизованные 19
- — — промышленное получение 19
- иммобилизация 11
- — определеение 11
- иммобилизованные 7, 11—14
- — методы получения 11
- — на электропроводящих матрицах 7
- — применение 16
- — — в медицине 7, 17
- — — промышленности 10*
- — — промышленных процессах 7
- — терапия 131
- каталитические возможности в электрохимических реакциях 70—72

- — свойства и строение 9
- классификация 9
- медицинское использование 123
- новые, поиск в природе 136
- определение 9
- получение высокостабильных с заданными свойствами 135
- примененне в биотехнологии 6, 43
- — — системах биоконверсии солнечной энергии 6
- — — тонком органическом синтезе 6, 43, 44
- — для анализа 6
- , разрушающие целлюлозу 33
- свойства 6
- Физиологически активные вещества 14, 44, 46, 57
- — — производство с помощью иммобилизованных клеток микроорганизмов 14

- Целлюлазы 32, 399, 42
- адсорбция на целлюлозе 39
- роль в катализе 39, 40
- Целлюлоза 37
- влияние структуры на эффективность гидролиза 37

- Электрокаталитический транспорт электронов 72, 73
- — — пути 72, 73
- яблочная кислота 28
- — ферментативное получение 28

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	5
Предисловие	6
Введение и инженерную энзимологию	8
Синтез и модификация органических соединений (13). Биоконверсия растительного сырья (15). Применение иммобилизованных ферментов для химического анализа (16).	
Глава 1. Промышленные процессы с использованием иммобилизованных ферментов и клеток	18
§ 1. Получение глюкозо-фруктозных сиропов (19). § 2. Получение L-аминокислот (26). § 3. Получение L-аспарагиновой кислоты (27). § 4. Получение L-яблочной кислоты (28). § 5. Получение безлактозного молока (28). § 6. Получение сахаров из молочной сыворотки (29). § 7. Получение 6-аминопенициллановой кислоты (30). § 8. Процессы на уровне опытных установок (30).	
Глава 2. Ферментативное превращение целлюлозы в сахара	32
§ 1. Целлюлолитические микроорганизмы и ферменты (32). § 2. Механизм действия целлюлаз (33). § 3. Влияние структуры целлюлозы на эффективность ее гидролиза (37). § 4. Адсорбция целлюлаз на целлюлозе и ее роль в катализе (39). § 5. Основы биотехнологии ферментативного гидролиза целлюлозы (41).	
Глава 3. Биокатализ в тонком органическом синтезе	43
§ 1. Ферментативная модификация β -лактамных антибиотиков (44). § 2. Ферментативное превращение рцемаатов в энантиомеры (46). § 3. Синтез с использованием гидролаз (48). § 4. Увеличение выхода продуктов в термодинамически неблагоприятных условиях (50). § 5. Регеирация кофакторов ферментативной реакции (52). § 6. Перенос ацильных групп при помощи ферментов (54). § 7. Биокаталитическое получение простанаидов (57). § 8. Синтез аминокислот лиазами (60). § 9. Ферментативная модификация нуклеиновых кислот, синтез олиго- и полинуклеотидов (61). § 10. Синтез меченых соединений (62). § 11. Ферментативный синтез сахаров (63). § 12. Ферментативные реакции в безводной среде (64). § 13. Перспективы ферментативного органического синтеза (66).	
Глава 4. Биоэлектроанализ и использование ферментов в электрохимических системах	68
§ 1. Каталитические возможности ферментов в электрохимических реакциях (70). § 2. Механизмы переноса электрона между активным центром фермента и электродом (72). § 3. Ферментативное электрохимическое окисление водорода (73). § 4. Ферментативное электрохимическое восстановление кислорода (75). § 5. Проводниковые и полупроводниковые матрицы для иммобилизованных ферментов (76). § 6. Перспективы практического использования биоэлектродкатализа (80).	
Глава 5. Иммобилизованные ферменты в микроанализе	83
§ 1. Ферменты — идеальные аналитические реагенты (83). § 2. Применение в анализе сопряженных ферментативных систем (84). § 3. Кинетические основных ферментативных методов анализа (85). § 4. Методы детекции в ферментативном анализе (85). § 5. Преимущества использования в анализе иммобилизованных фермен-	

тов (86). § 6. Первые работы по аналитическому применению иммобилизованных ферментов (87). § 7. Аналитические проточные реакторы с иммобилизованными ферментами (88). § 8. Ферментные микрокалориметрические датчики (89). § 9. Ферментные электроды (91). § 10. Биоломинесцентный анализ (93). § 11. Соиммобилизованные полиферментные системы в биоломинесцентном анализе (96). § 12. Области применения биосенсоров с иммобилизованными ферментами (97).

Глава 6. Иммуоферментный анализ и его использование в медицине	99
§ 1. Структура антител (99). § 2. Антиген (102). § 3. Получение антител (103). § 4. Принципы иммуохимического анализа (105). § 5. Маркеры в иммуохимическом анализе (107). § 6. Получение конъюгатов с ферментами (109). § 7. Методы определения активности ферментов (113). § 8. Разделение свободных и связанных маркеров (114). § 9. Основные методы ИФА (115). § 10. Применение ИФА (120).	
Глава 7. Иммобилизованные ферменты и белки как лекарственные средства	123
§ 1. Иммобилизация белков (124). § 2. Антигенность и иммуногенность иммобилизованных белков (125). § 3. Введение иммобилизованных препаратов (127). § 4. Ферментные препараты типа «контейнер» (128). § 5. Терапия иммобилизованными ферментами (131).	
Заключение	135
Литература	137
Предметный указатель	139

Учебное издание

БИОТЕХНОЛОГИЯ. В 8-ми кн.

Березин Илья Васильевич
Клесов Анатолий Алексеевич
Швядас Витутас-Юозапас Каятоно
Угарова Наталия Николаевна
Варфоломеев Сергей Дмитриевич
Ярополов Александр Иванович
Казанская Новелла Федоровна
Егоров Алексей Михайлович

К н и г а 8

ИНЖЕНЕРНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Зав. редакцией *А. Г. Гаврилов*
Редактор *М. М. Пенкина*
Мл. редактор *И. М. Павлова*
Художник *В. В. Стоноженко*
Художественный редактор *Т. А. Коленкова*
Технические редакторы *Ю. А. Хорева и Н. А. Битюкова.*
Корректор *С. К. Завьялова*

ИБ № 6704

Изд. № Е—537. Сдано в набор 16.02.87. Подп. в печать 07.05.87. Т-10460. Формат 60×90^{1/16}. Бум. кн.-журн. Гарнитура Литературная. Печать офсетная. Объем 9 усл. печ. л. 18,5 усл. кр.-отт. 9,67 уч.-изд. л. Тираж 30 000 экз. Зак. № 120. Цена 35 коп.

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., 29/14.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014, Ярославль, ул. Свободы, 97.

1

ПРОБЛЕМЫ
И ПЕРСПЕКТИВЫ

2

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ
СОЗДАНИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ
ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

3

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

4

АВТОМАТИЗАЦИЯ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

5

ПРОИЗВОДСТВО
БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ

6

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ
ПРОИЗВОДСТВО БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И ПРЕПАРАТОВ

7

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ
ФЕРМЕНТЫ

8

ИНЖЕНЕРНАЯ
ЭНЗИМОЛОГИЯ