



Химические основы биологических процессов

Инженерная энзимология (Биотехнология)

Тишков Владимир Иванович

zamdekana07@gmail.com

к. 210 кафедры химической энзимологии

Москва - Баку - 2022



Этапы (виды) биотехнологии

BIO

LOGIA



τεχνη

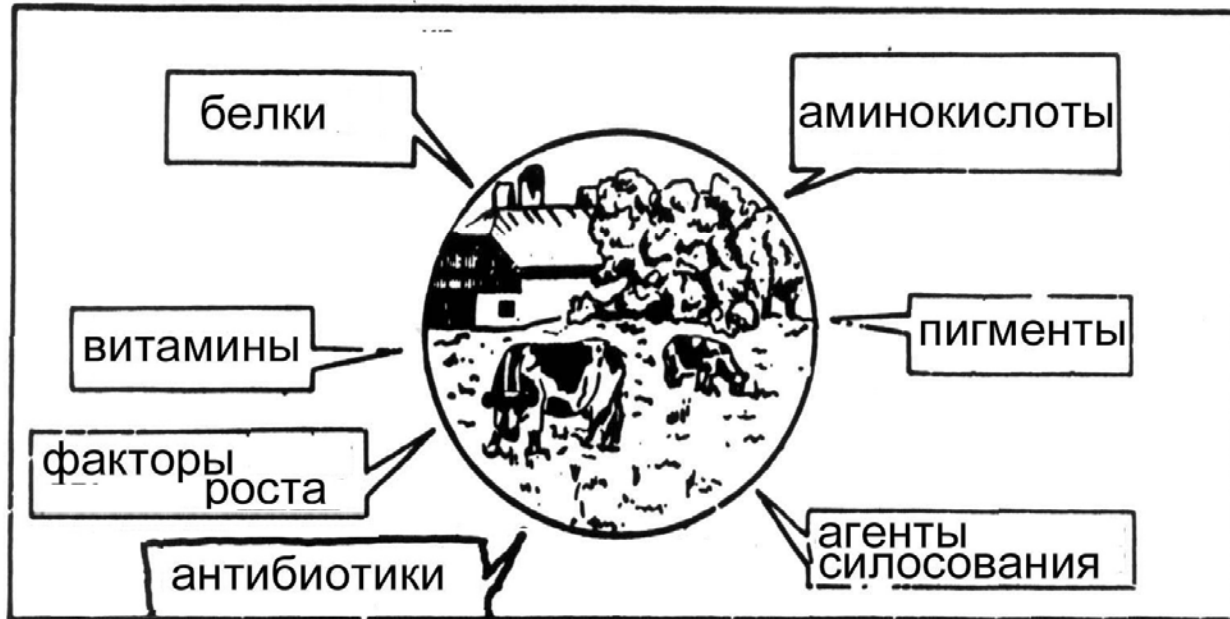
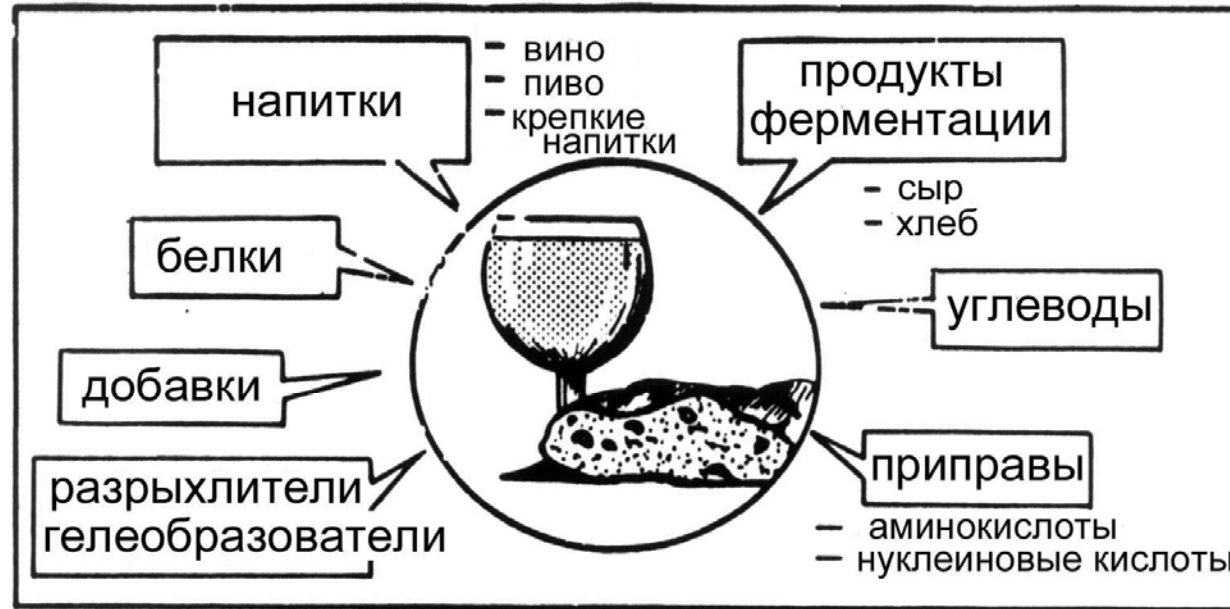
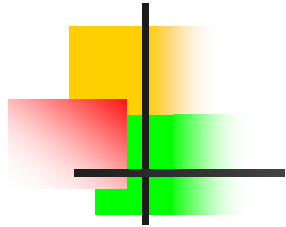
χυμος

ΛΟΓΟΣ

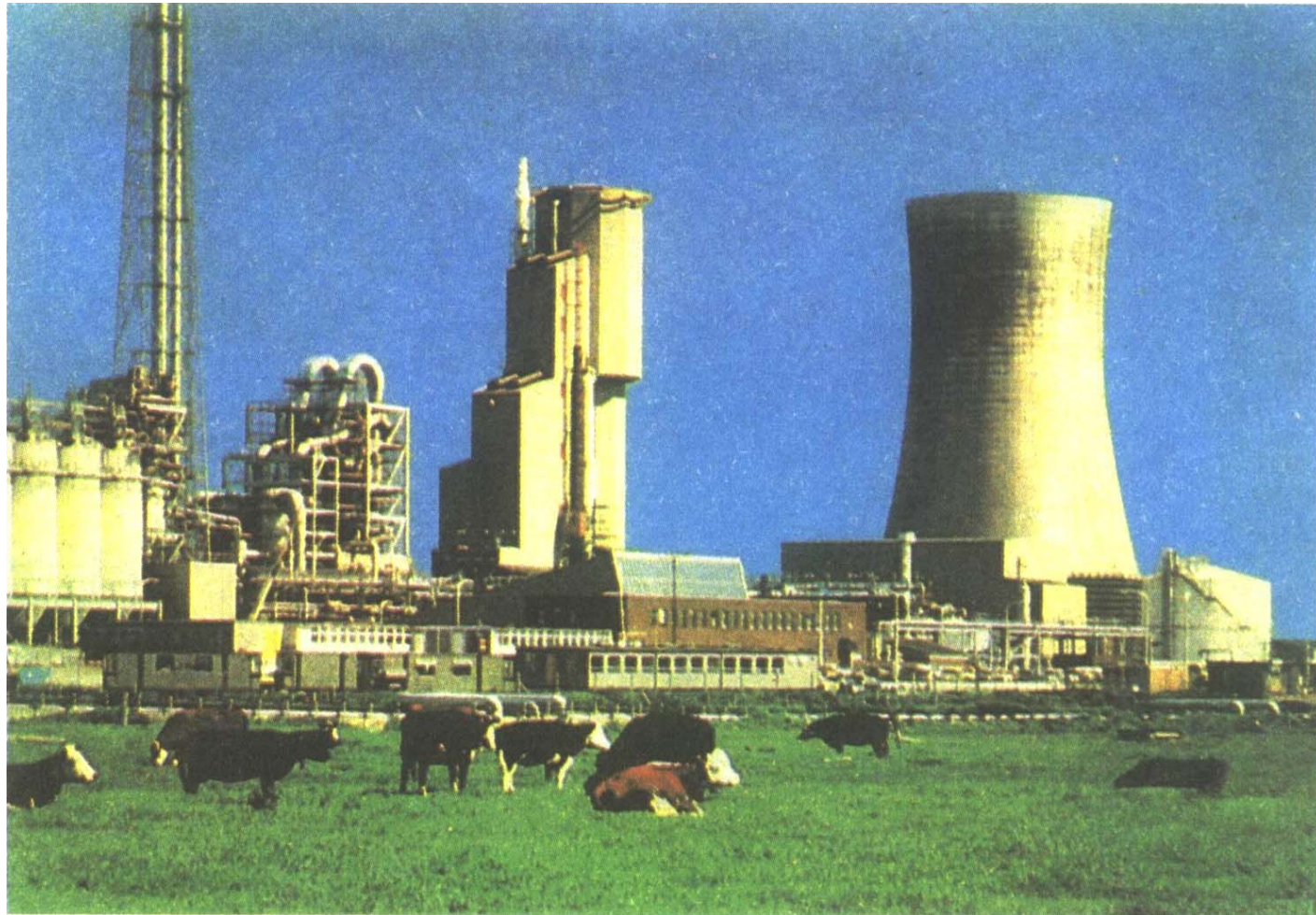
ПОТРЕБНОСТИ:

1. ПЕЩЕРНО-НЕЗАПАМЯТНАЯ (ЕСТЕСТВЕННАЯ)
2. ТРАДИЦИОННАЯ (ИСКУССТВЕННАЯ)
3. СОВРЕМЕННАЯ (“НАУЧНАЯ”)

ПИЩА
ОДЕЖДА
КРОВ (МАТЕРИАЛЫ)
ОРУДИЯ (ИНСТРУМЕНТЫ)
ЛЕКАРСТВА
ЭНЕРГИЯ



Этапы (виды) биотехнологии



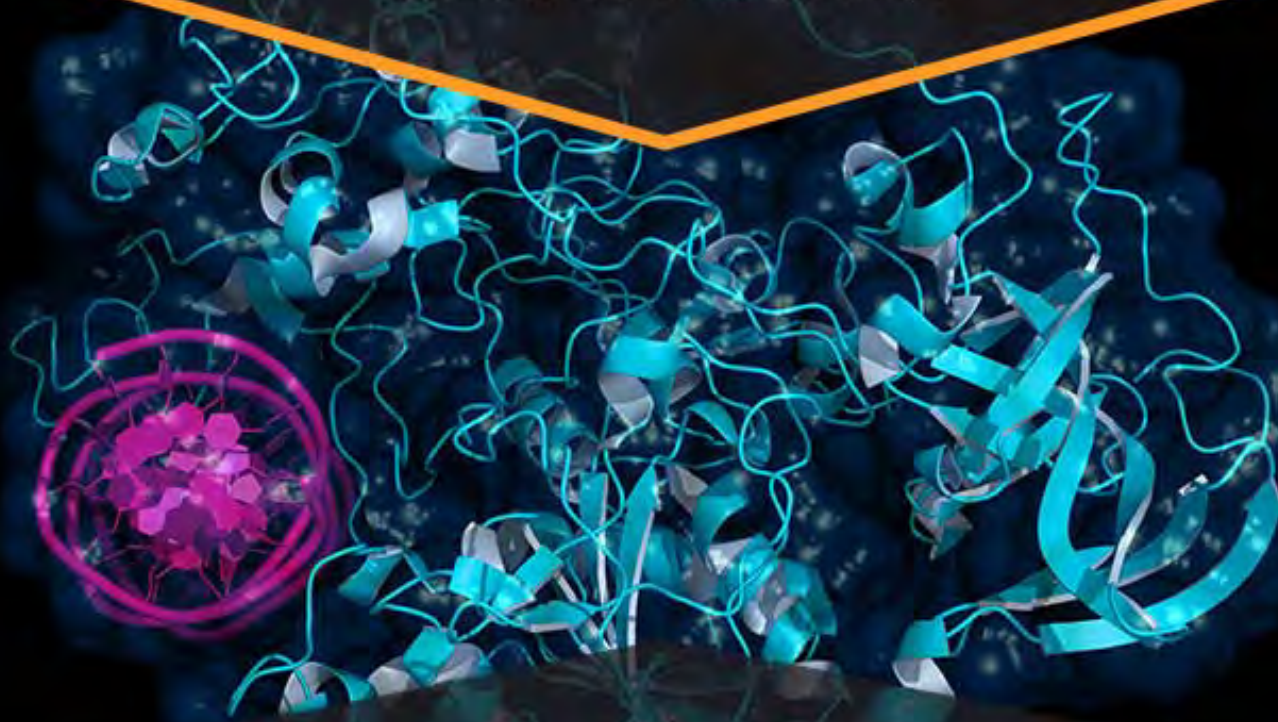
РЫНОК ФЕРМЕНТОВ В США (1990-1995г.г.), в млн. \$ USA.

Сферы применения	1990г.	1991г.	1995г.	Среднегодовой прирост, %
1. Медицина	186,6	233,2	568,2	25,0
2. Химия	15,2	17,3	28,8	13,7
3. Экология	33,0	37,2	60,0	12,7
4. Моющие средства	75,0	82,5	120,0	10,0
5. Биотехнология, исследования	80,0	86,9	119,8	8,6
6. Пищевая промышленность, текстиль, кожа, бумага	190,0	194,8	215,4	2,5
7. Диагностика	21,4	22,1	25,0	0,9
ИТОГО:	601,2	674,0	1137,2	13,5

ОЦЕНКА РЫНКА ФЕРМЕНТОВ

GLOBAL **ENZYMES** MARKET

OPPORTUNITIES AND FORECASTS, 2018-2024



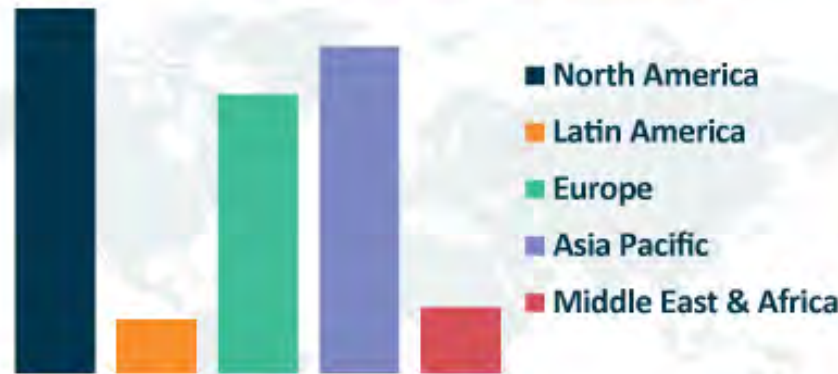
Global Enzymes Market is expected to reach **\$10,519 million** by 2024.

Growing at a **CAGR of 5.7%** (2018-2024)

Enzymes Market

2019-2027

Market by Region, 2019



~8%

CAGR
(2019-2027)

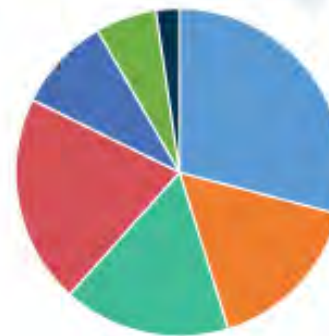
Market Value, 2027

~US\$

12.2 Bn

Application

- Food & Beverages Processing
- Personal & Household Care
- Animal Feed
- Bioenergy
- Pharmaceutical
- Textiles
- Others



Type

- Carbohydrases
- Lipases
- Proteases
- Phytases
- Polymerases & Nucleases
- Others



Key Market Strategies

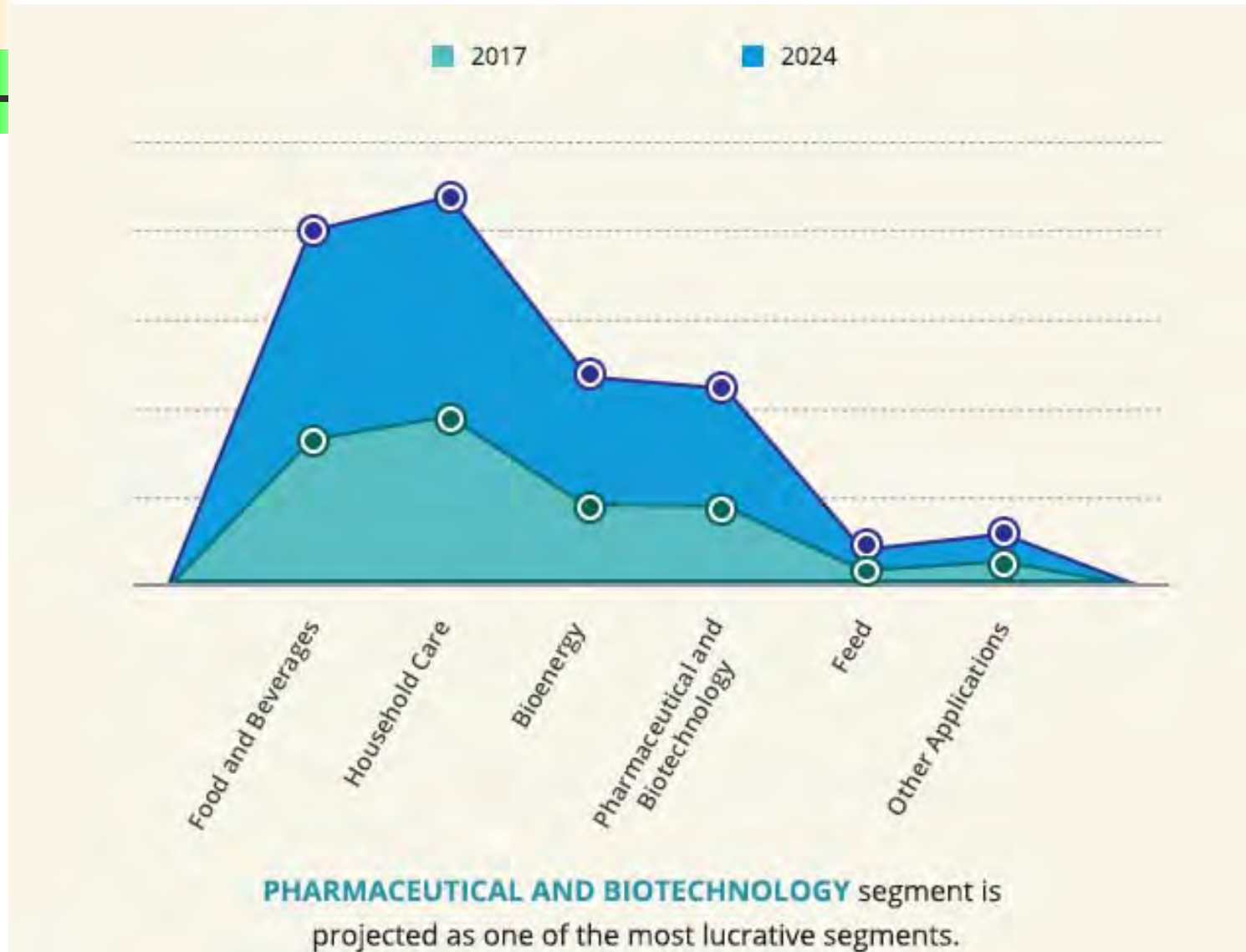
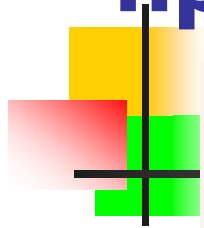


Increase Production Efficiency for Enzymes Used in Health and Wellness Products

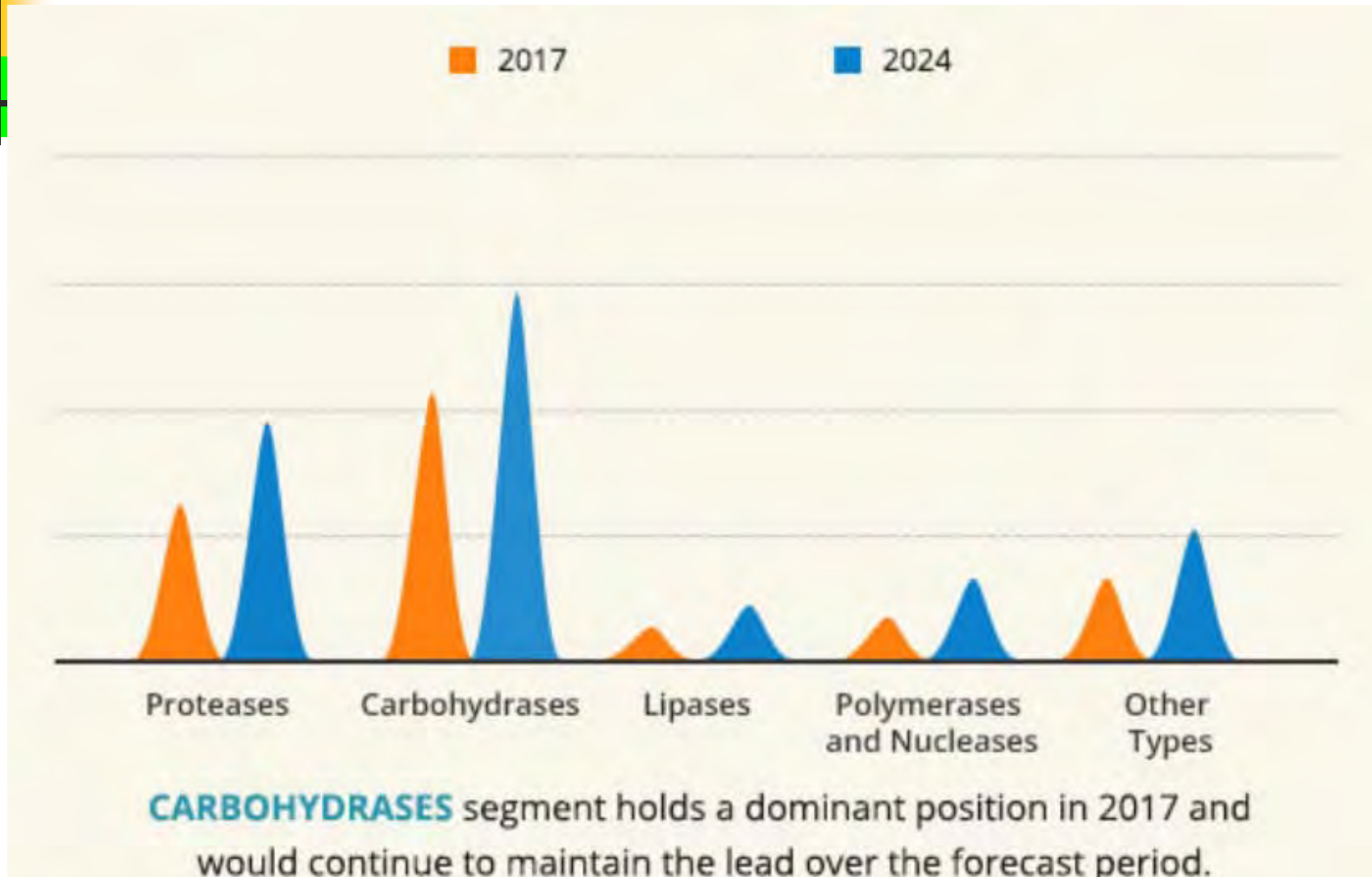


Tap Opportunities in Starch-based Ethanol to Lower CO2 Emissions in Transportation Sector

Распределение рынка по областям применения ферментов



МИРОВОЙ РЫНОК ФЕРМЕНТОВ



Enzymes Market

Segmentation

Application

- Food & Beverages Processing
- Personal & Household Care
- Animal Feed
- Bioenergy
- Pharmaceutical
- Textiles
- Others

Type

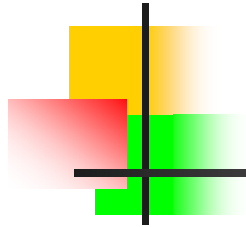
- Carbohydrases
- Proteases
- Polymerases & Nucleases
- Lipases
- Phytases
- Others

Region

- North America
- Latin America
- Europe
- Asia Pacific
- Middle East & Africa

Grade

- Technical Grade
- Specialty Grade



Иммобилизованные ферменты



Преимущества иммобилизованных ферментов

- **ТЕХНОЛОГИЧНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ**
- **ПРОСТОТА МАНИПУЛЯЦИЙ**
- **ПОВЫШЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ** (термостабильность и стабильность при хранении)
- **СОЗДАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КАТАЛИЗА** (создание оптимального локального pH на поверхности)
- **ПОВЫШЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ В МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ РЕАКЦИЯХ** (сближение на поверхности активных центров разных ферментов)



Иммобилизация

- ФИЗИЧЕСКАЯ
- ХИМИЧЕСКАЯ
- (ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ)

Носители, используемые для иммобилизации ферментов



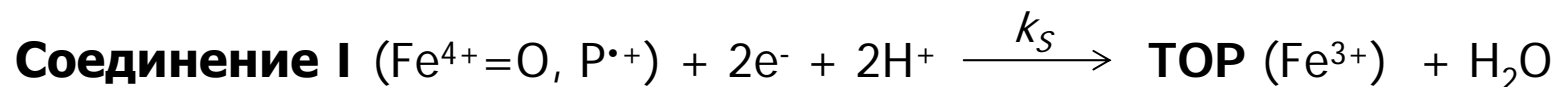
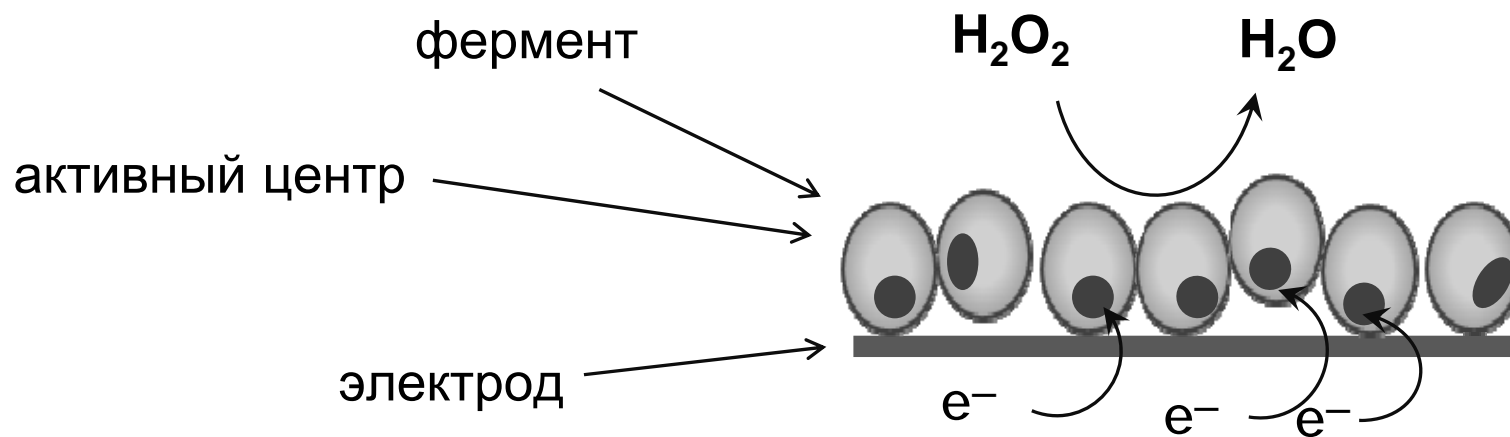
- **НЕОРГАНИЧЕСКИЕ**

- **МЕТАЛЛЫ** (Au)
- **ОКСИДЫ МЕТАЛЛОВ** (TiO₂)
- **НЕМЕТАЛЛЫ** (C)
- **ОКСИДЫ НЕМЕТАЛЛОВ** (SiO₂)
- **ГИДРОКСИДЫ, СОЛИ, СИЛИКАТЫ, АЛЮМОСИЛИКАТЫ, ЦЕОЛИТЫ, ... ГЛИНЫ** (ГИДРОКСИАППАТИТ, БЕНТОНИТ)
- **СТЕКЛА, КЕРАМИКА**

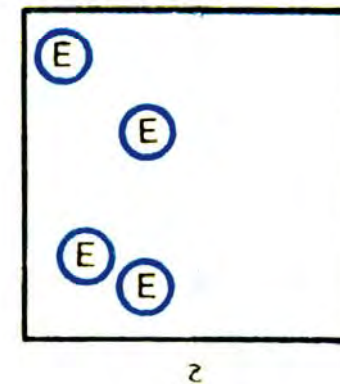
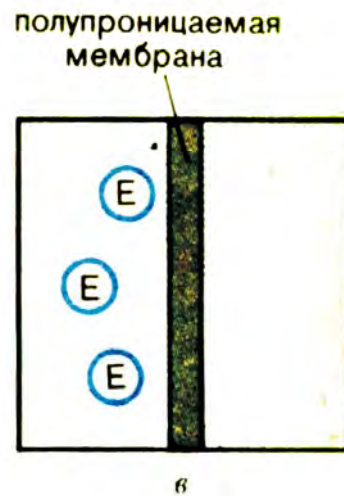
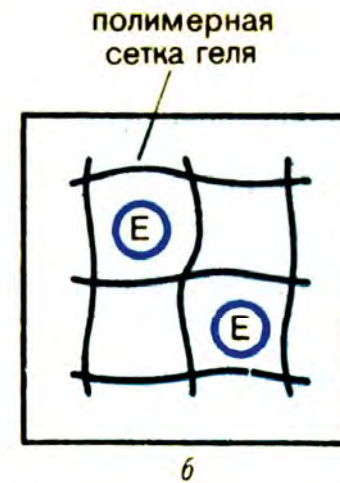
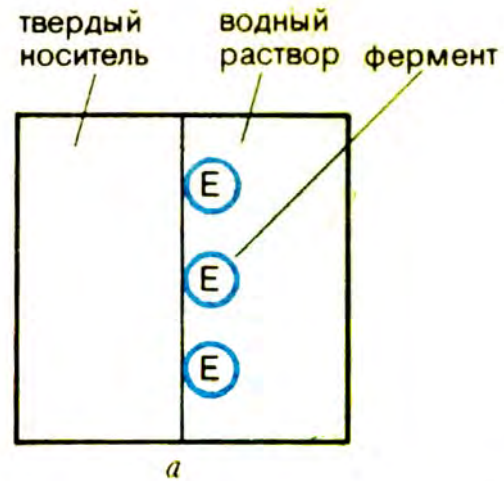
- **ОРГАНИЧЕСКИЕ**

- **СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПОЛИМЕРЫ**
- **ПРИРОДНЫЕ ПОЛИМЕРЫ** (БЕЛКИ, УГЛЕВОДЫ)
- **МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АГРЕГАТЫ**
(СИНТЕТИЧЕСКИЕ ПАВ, ЛИПИДЫ, ФОСФОЛИПИДЫ)

Ориентированная иммобилизация при создании безмедиаторных биосенсоров



Принципы физической иммобилизации



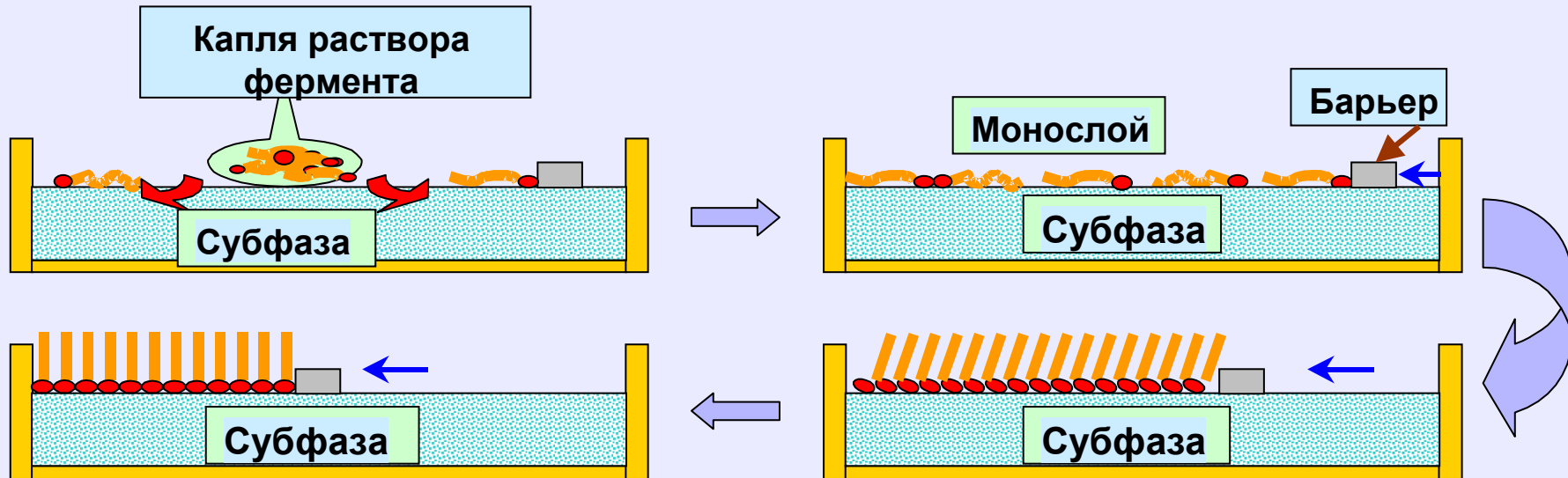


ФИЗИЧЕСКАЯ ОРИЕНТИРОВАННАЯ НАНО-ИММОБИЛИЗАЦИЯ

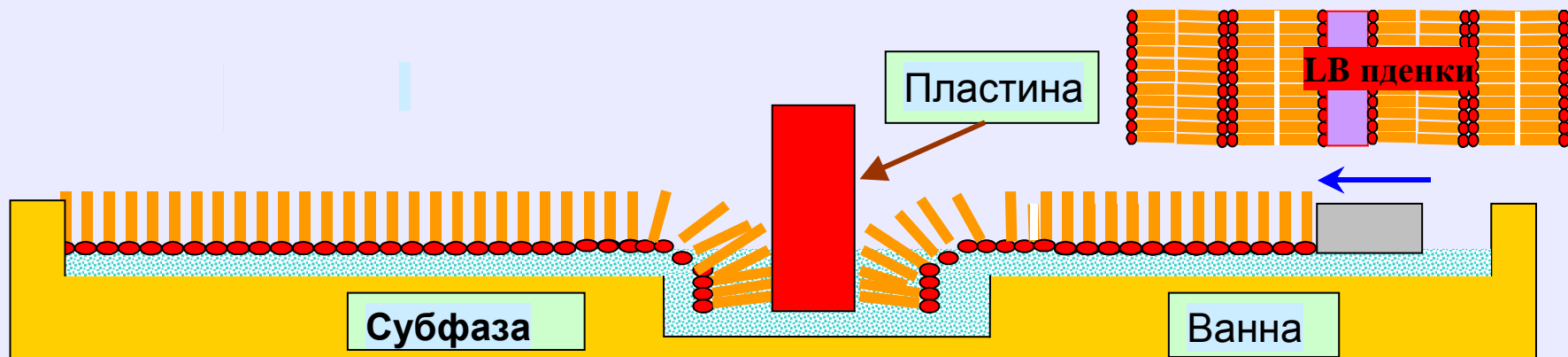
**Иммобилизация за счет
ориентированной адсорбции
монослоев фермента**



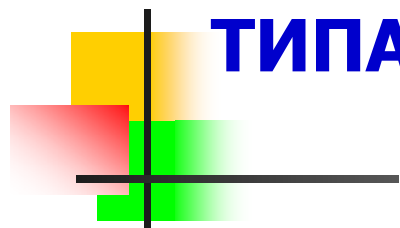
ПОЛУЧЕНИЕ МОНОСЛОЕВ ФЕРМЕНТА НА ГРАНИЦЕ ВОДА-ВОЗДУХ



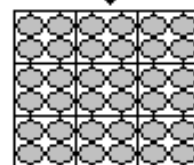
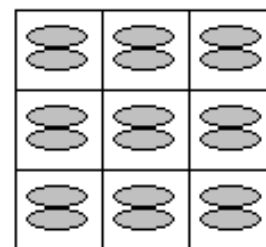
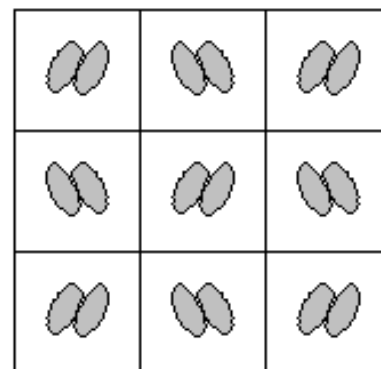
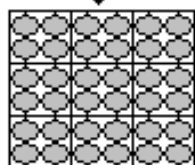
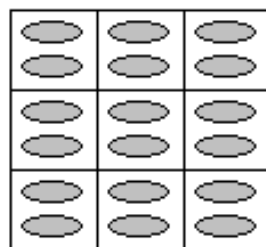
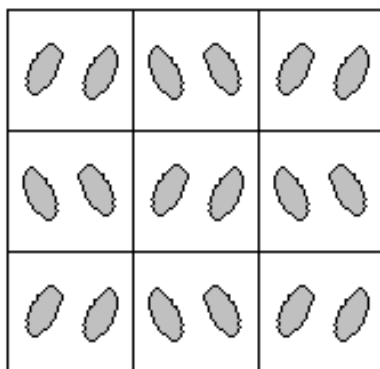
ПОЛУЧЕНИЕ МОНОСЛОЕВ ФЕРМЕНТА НА ТВЕРДОЙ ПОДЛОЖКЕ



МЕХАНИЗМЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОСЛОЕВ ФОРМИАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДИКОГО ТИПА И МУТАНТА GAV



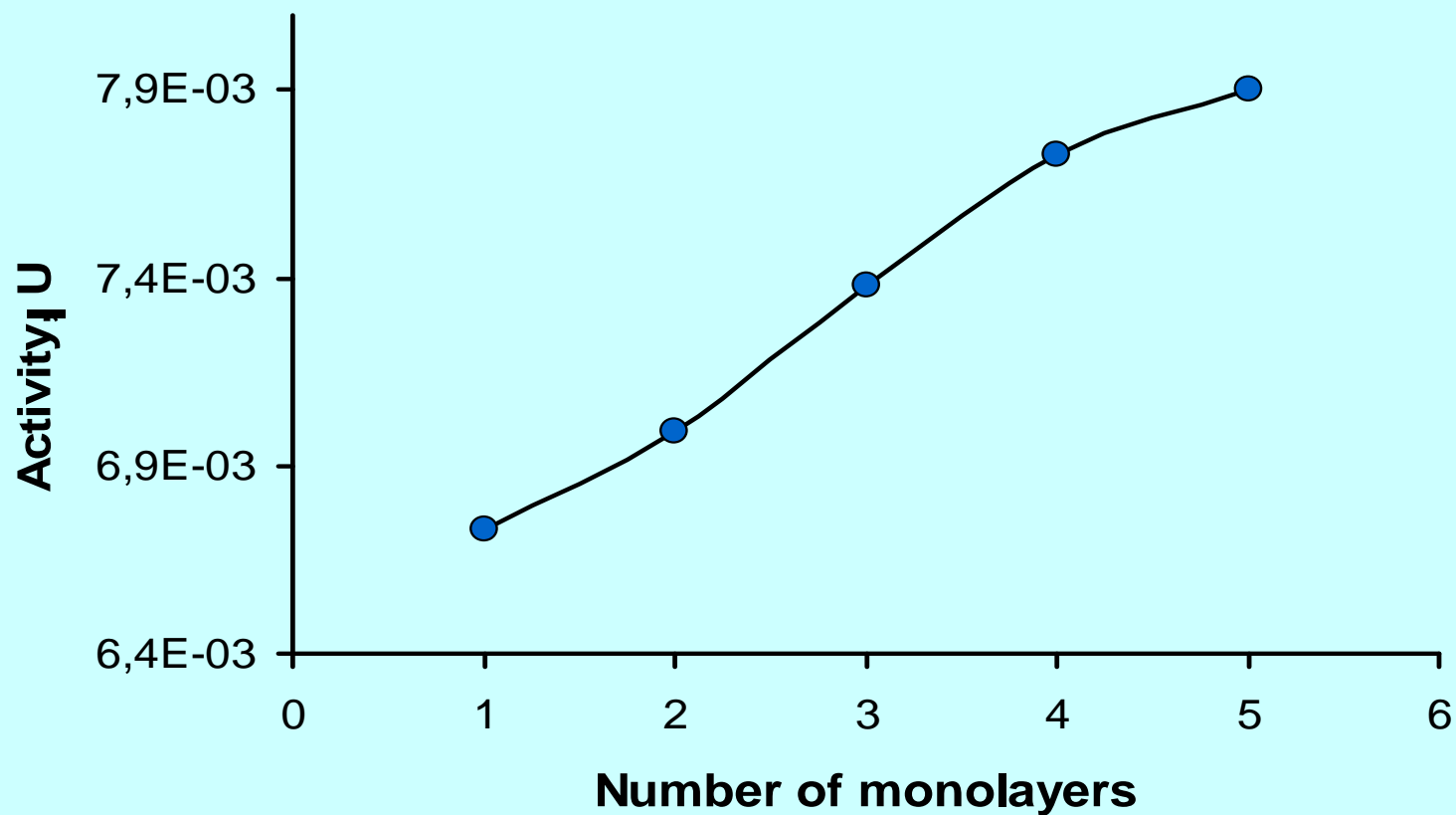
Нативная
FDH



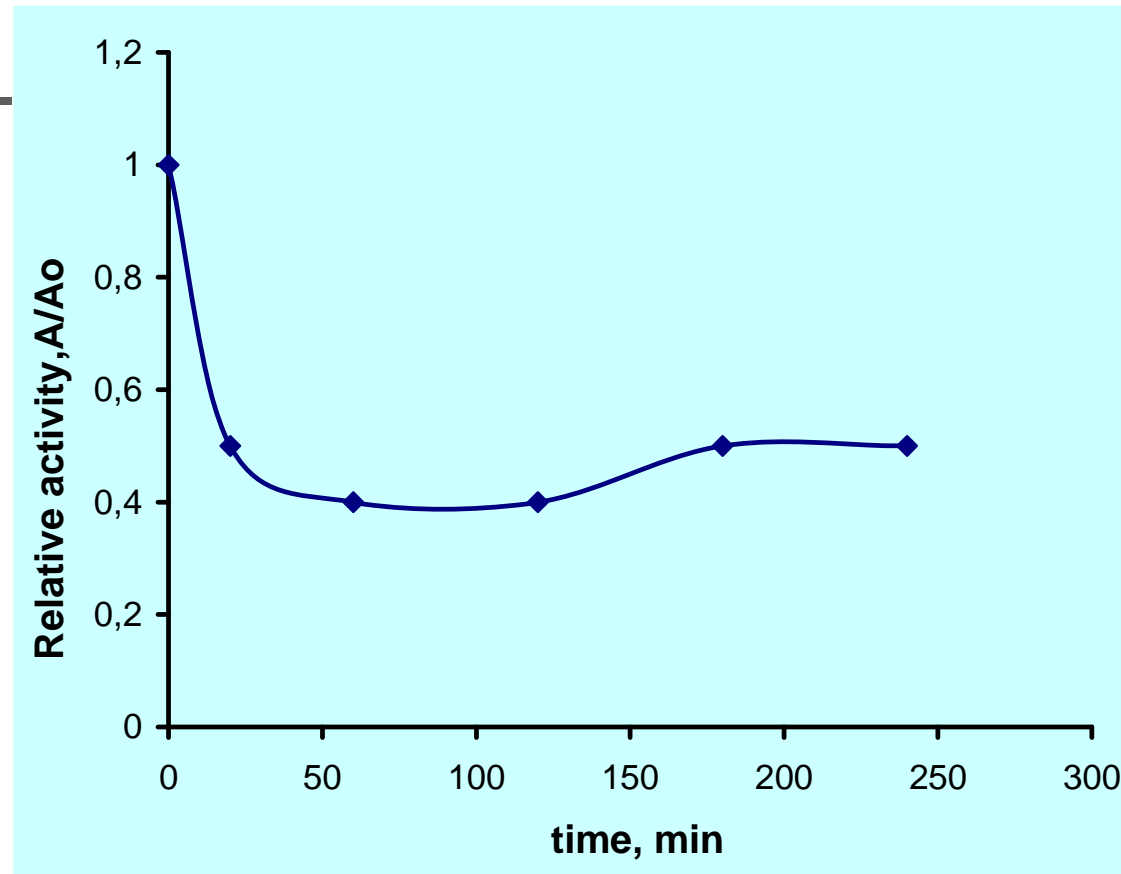
Мутант
FDH GAV



Зависимость активности PseFDH GAV от числа монослоев в LB-пленках



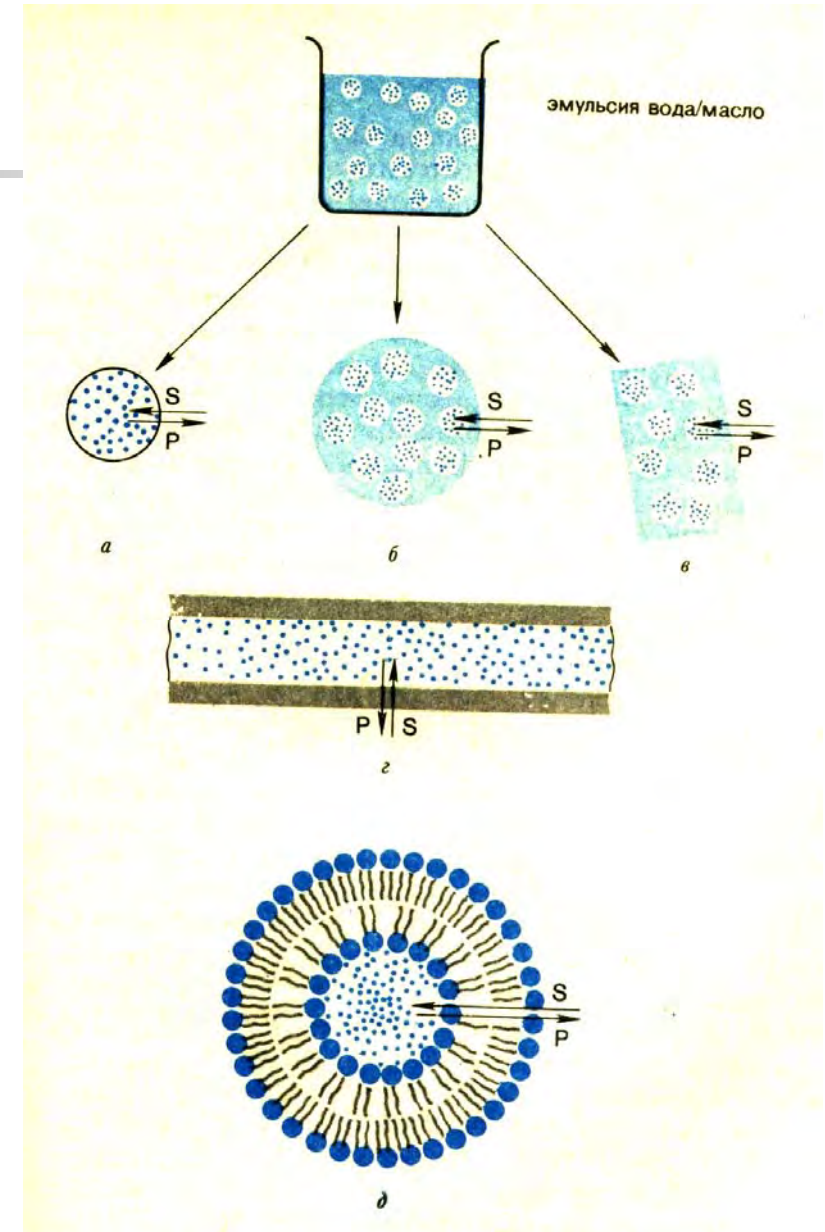
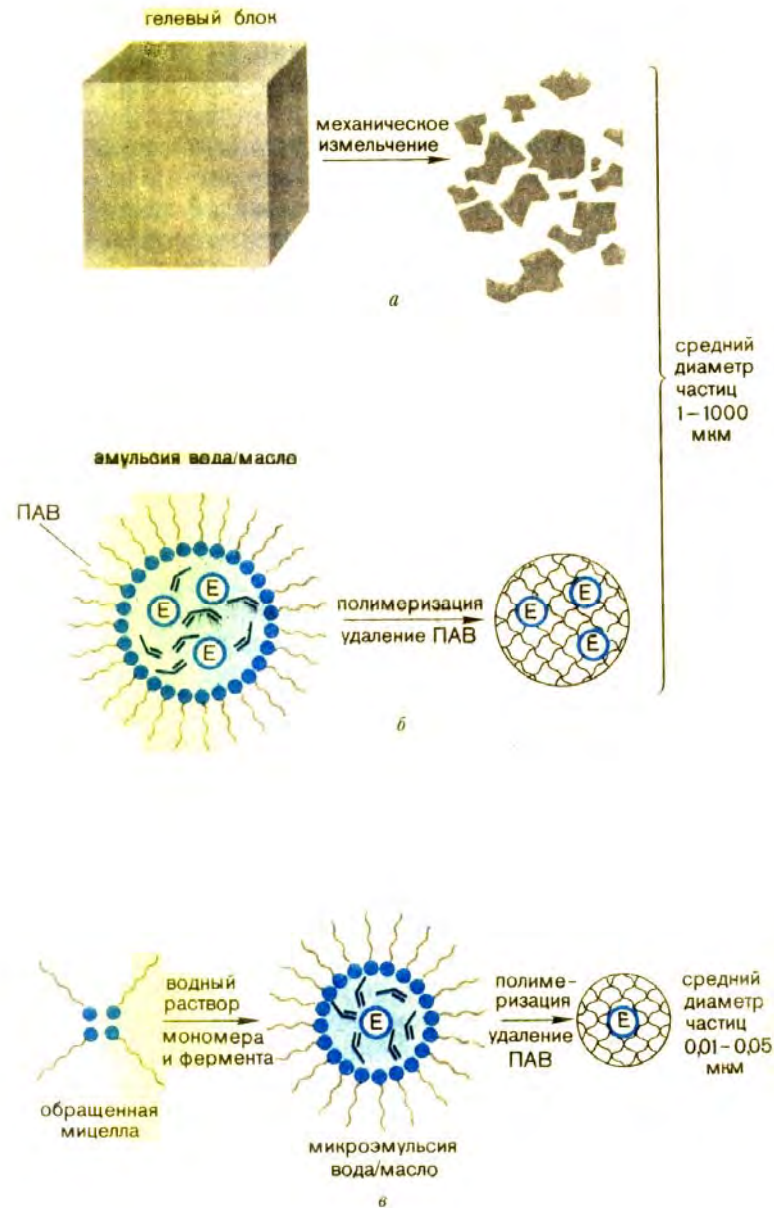
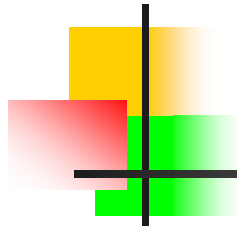
Стабильность PseFDH GAV в LB-пленках при 80 °C



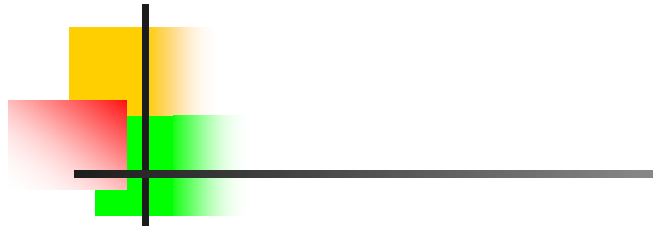
Фермент в растворе при 80 °C теряет активность ПОЛНОСТЬЮ за 15 сек



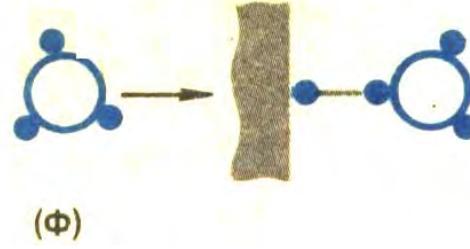
Гранулирование и капсулирование



Принципы химической иммобилизации



+



a



+



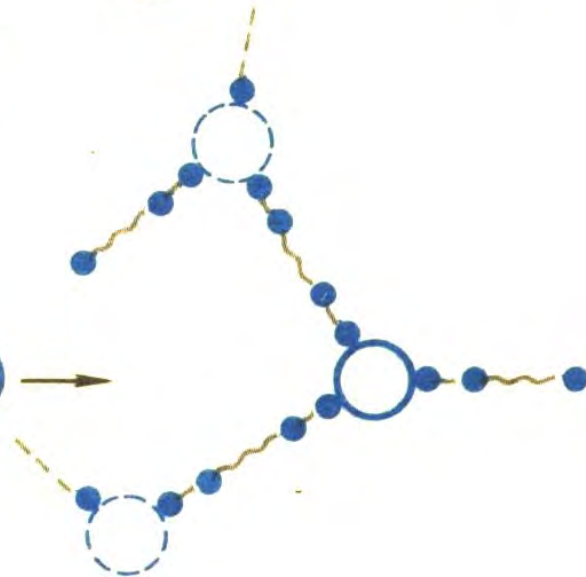
+



б



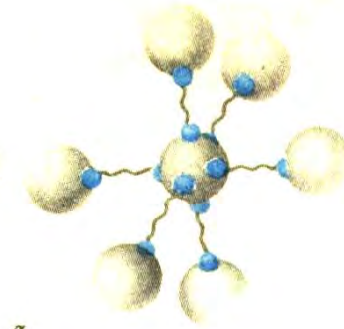
+



в

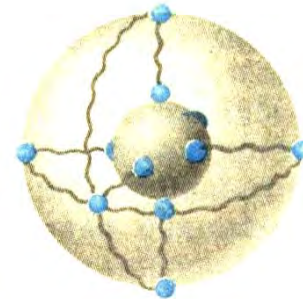
Типы ферментных сеток

сополимеризация в
однородном растворе



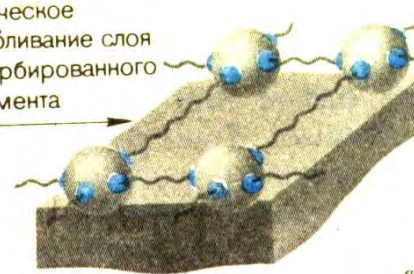
а

сополимеризация в
микроэмульсионной
системе

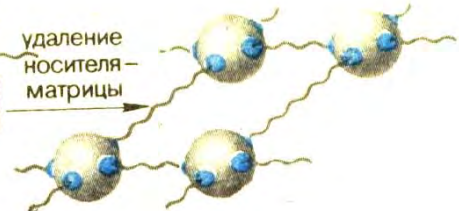


б

химическое
задубливание слоя
адсорбированного
фермента



удаление
носителя-
матрицы



в

введение в
молекулу фермента
„химических скобок“



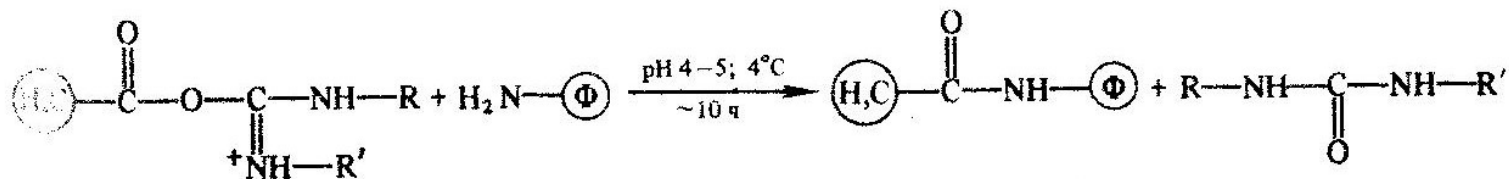
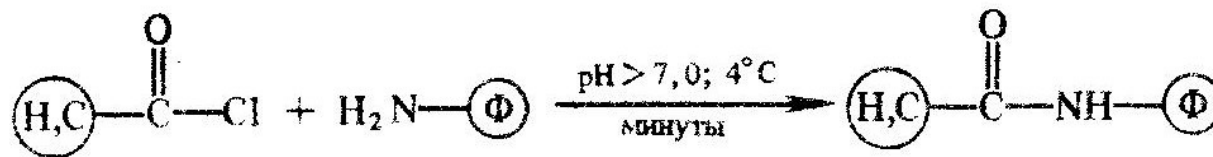
г



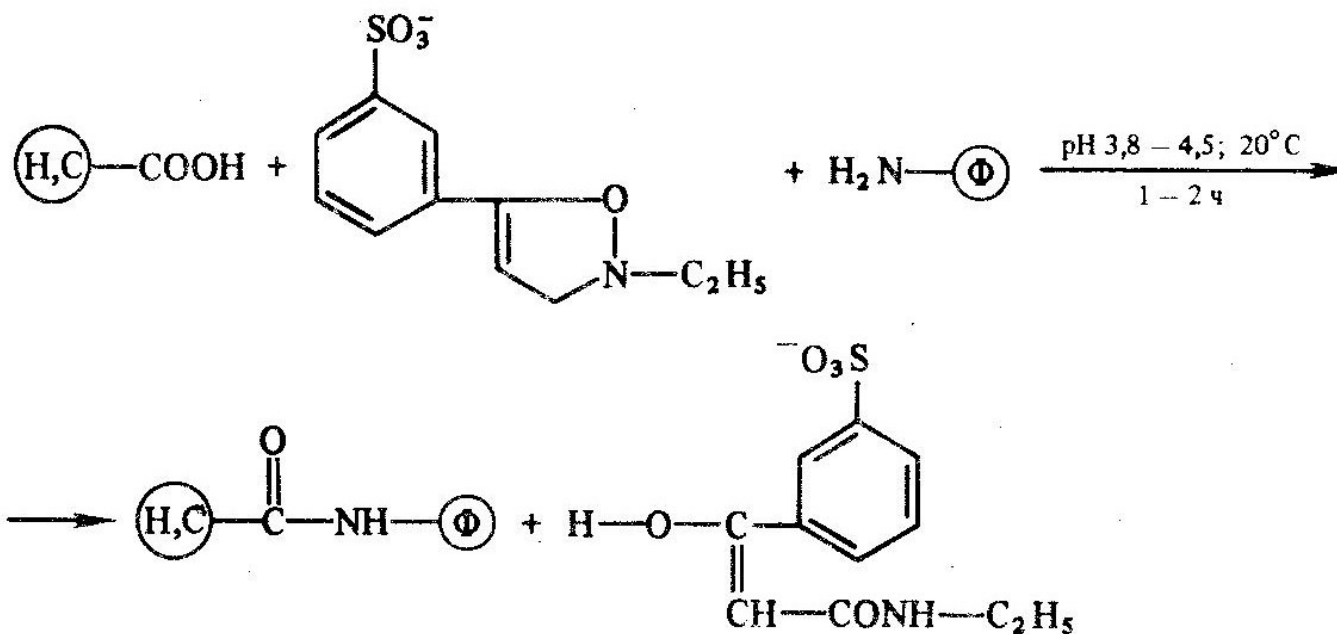
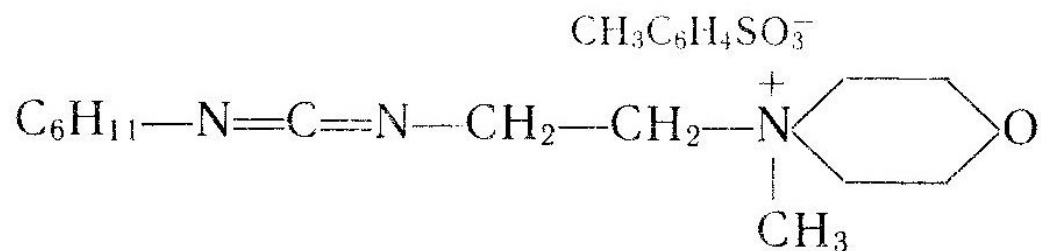
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов

- реакции образования амидной связи
- реакции образования карбамидной связи
- реакции образования оснований Шиффа и вторичных аминов
- реакции азосочетания
- реакции тиол-дисульфидного обмена

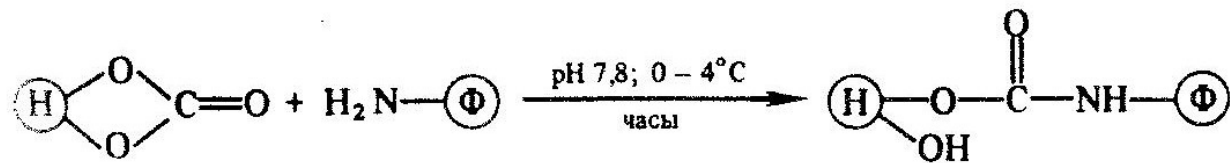
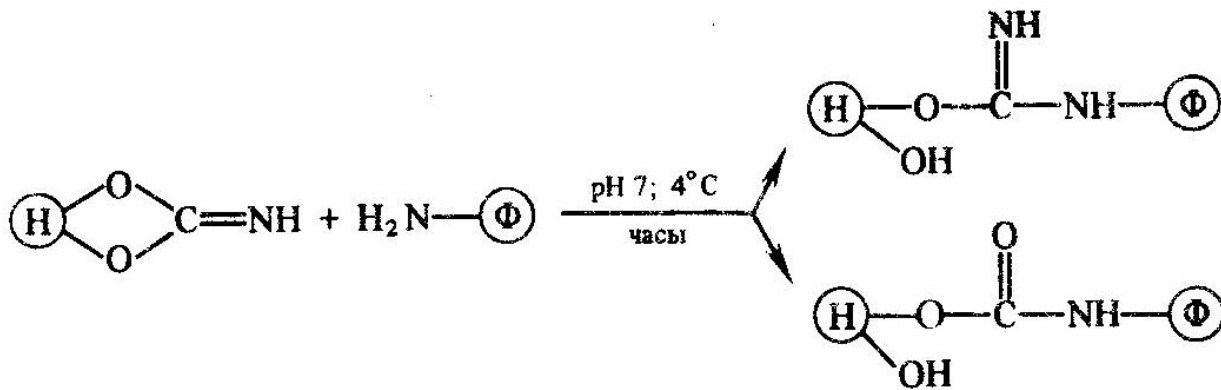
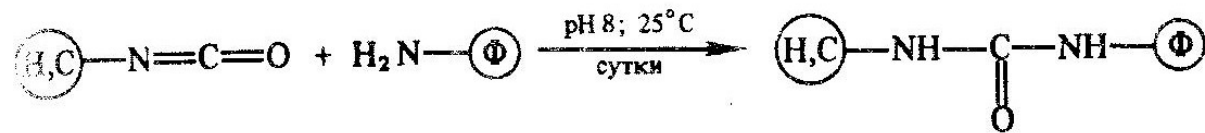
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



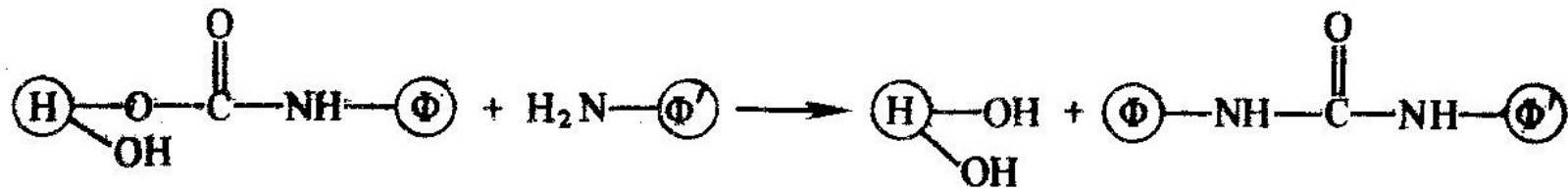
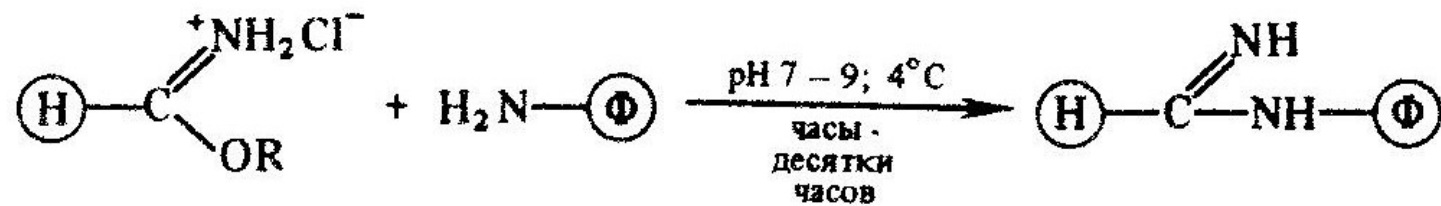
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



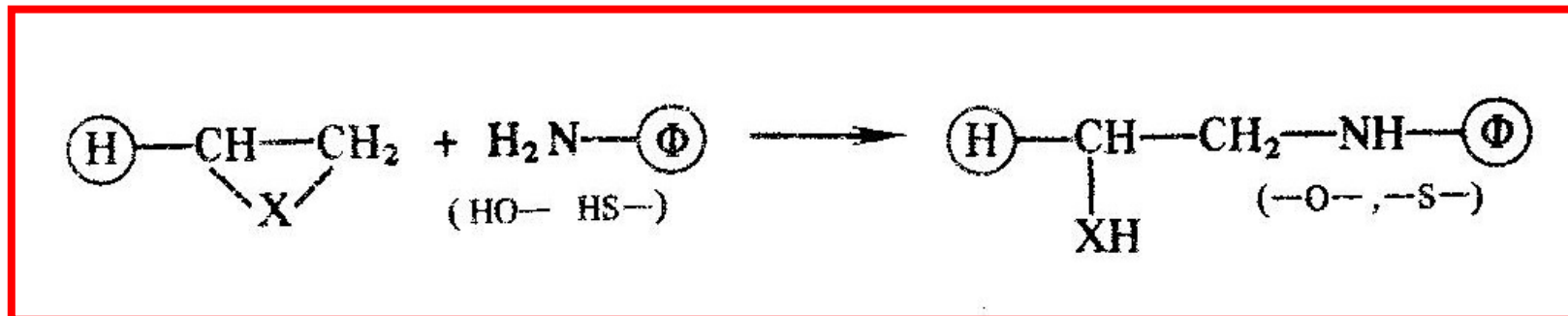
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



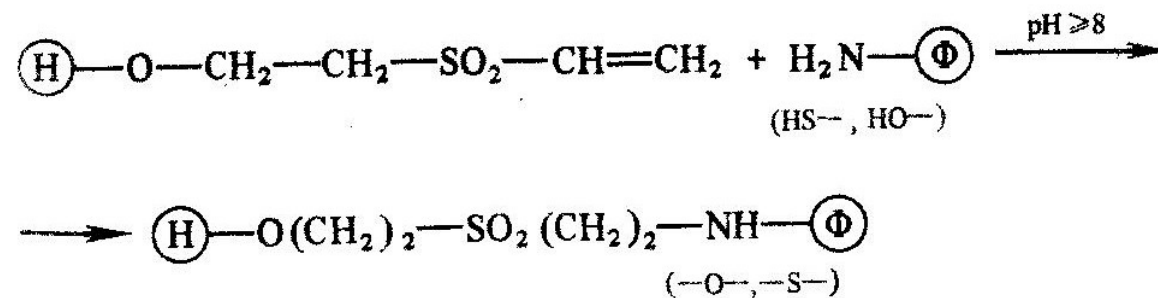
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



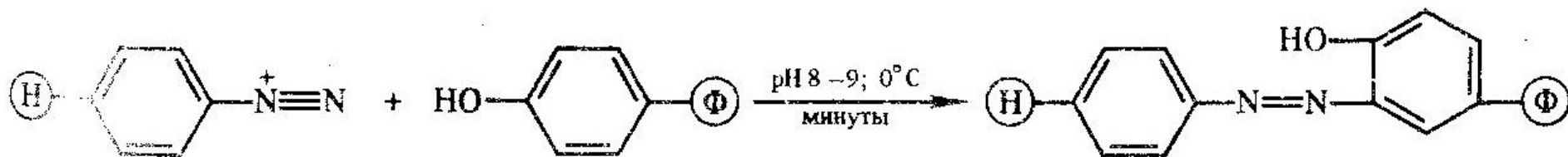
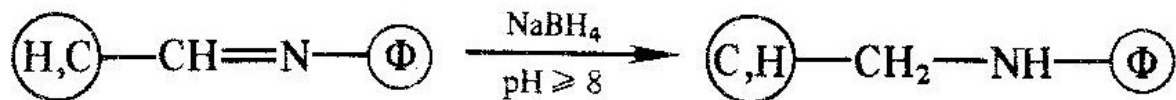
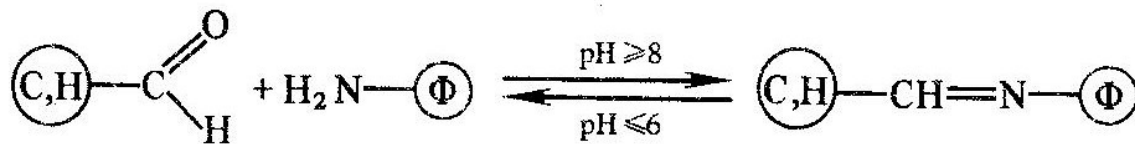
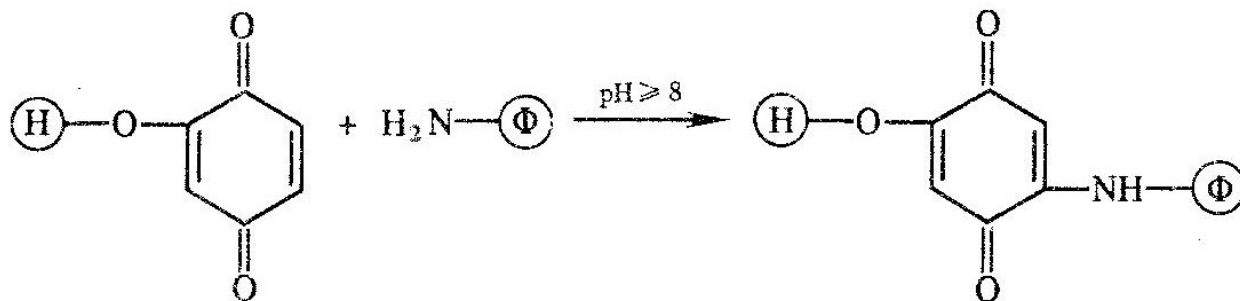
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



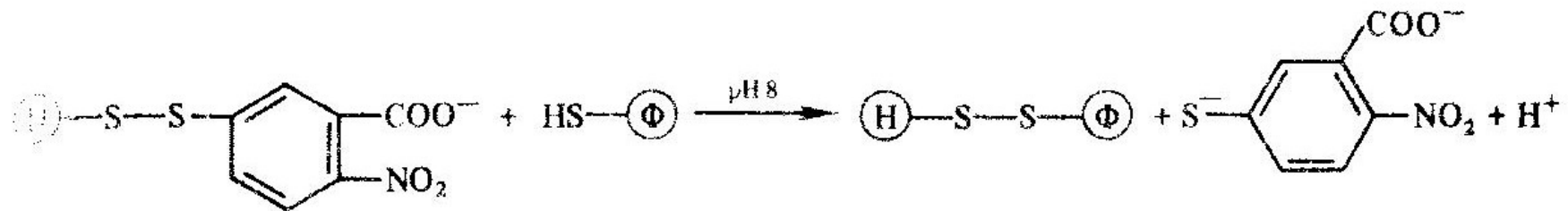
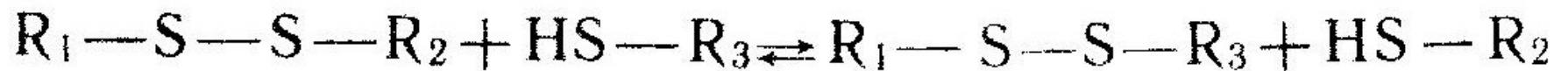
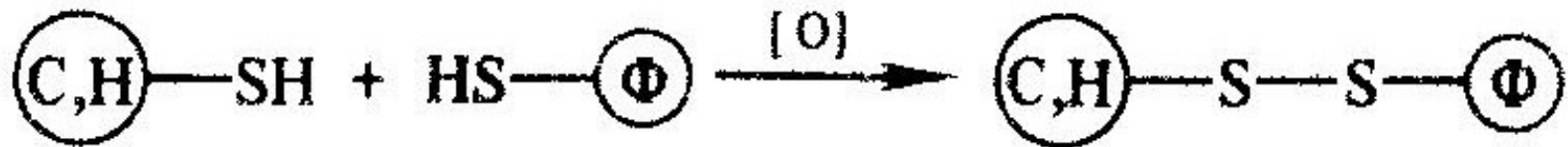
где X = >NH, >O, >S



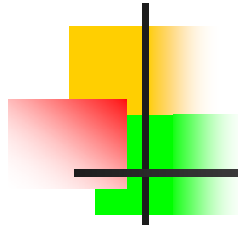
Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



Методы химической (ковалентной) модификации ферментов



Преимущества иммобилизованных ферментов



- **ТЕХНОЛОГИЧНОСТЬ**
- **ПРОСТОТА МАНИПУЛЯЦИЙ**
- **ПОВЫШЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ** (термостабильность и стабильность при хранении)
- **СОЗДАНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ КАТАЛИЗА** (создание оптимального локального pH на поверхности)
- **ПОВЫШЕННАЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ В МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ РЕАКЦИЯХ** (сближение на поверхности активных центров разных ферментов)

Недостатки иммобилизованных ферментов

- **ПОНИЖЕННАЯ КАТАЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ**
- **ИЗМЕНЕННАЯ СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧЕОСТЬ**
- **ДИФФУЗИОННЫЕ ОГРАНИЧЕНИЯ**
- **КАК ПРАВИЛО, ДОРОГОЕ УДОВОЛЬСТВИЕ, ПРОБЛЕМЫ ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ И МАСШТАБИРОВАНИЯ**



Инженерная энзимология

- **Ферменты в бытовой химии, в стиральных и моющих средствах.**
- **Ферменты в пищевой промышленности**
 - пищевые добавки
 - производство продуктов питания
 - кормовые добавки
- **Тонкий органический синтез (фармацевтическое производство)**
- **Ферменты в медицине**
 - Лекарственные препараты на основе ферментов
 - диагностические наборы и устройства
- **Аналитические системы и устройства. Биосенсоры.**
- **Ферменты в конверсии вещества и энергии**
- **Мониторинг окружающей среды и биоремедиация.**

Ферментативный катализ в ХИМИИ

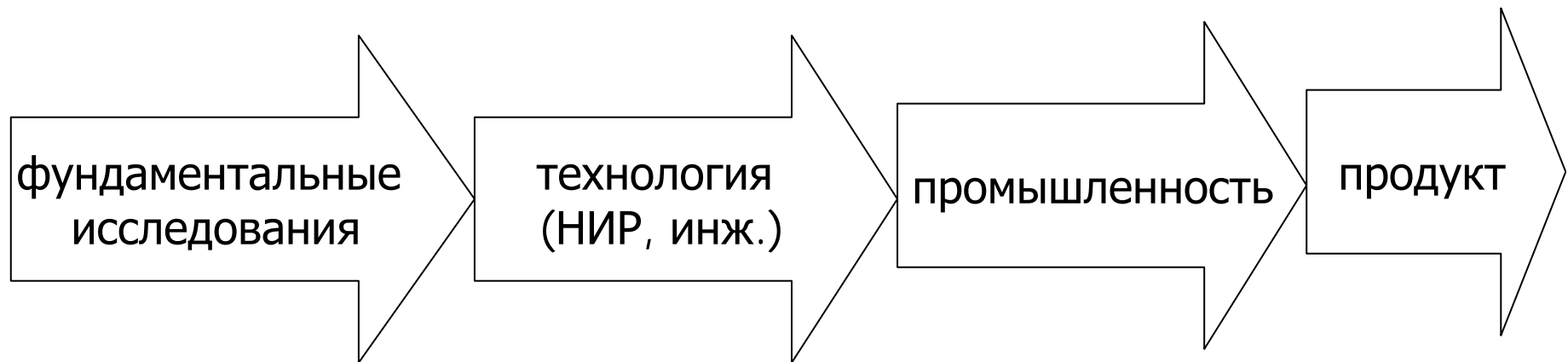
СЫРЬЕ (невозобн., возобн.) → ПРОДУКТЫ + ОТХОДЫ

```
graph LR; A[СЫРЬЕ (невозобн., возобн.)] --> B[ПРОДУКТЫ + ОТХОДЫ]; B --> A;
```

НЕТРАДИЦИОННОЕ
сырье

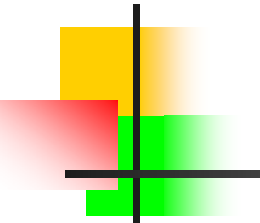
Ферментативный катализ В ХИМИИ

- стратегия производства



Ферментативный катализ

В ХИМИИ

- 
- **ГИДРОЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ**
(ПОЛИСАХАРИДЫ, БЕЛКИ)
 - **ГИДРОЛИЗ И ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИЯ**
ЖИРОВ
 - **ОКИСЛЕНИЕ, БИОДЕГРАДАЦИЯ**
УГЛЕВОДОРОДОВ (СИНТЕЗ?)
 - **СИНТЕЗ ОПТИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ**
СОЕДИНЕНИЙ (СТЕРЕОСПЕЦИФИЧЕСКИЙ
СИНТЕЗ, ВВЕДЕНИЕ МЕТКИ)



Получение аминокислот

1. Микробиологический синтез
2. Разделение рацематов
3. Биокаталитический синтез из простых соединений

SOS

Science of
Synthesis

Biocatalysis in Organic Synthesis 1

Volume Editors
Kurt Faber
Wolf-Dieter Fessner
Nicholas J. Turner



Thieme

Biocatalysis in Organic Synthesis 1, Workbench Edition 1st Edition

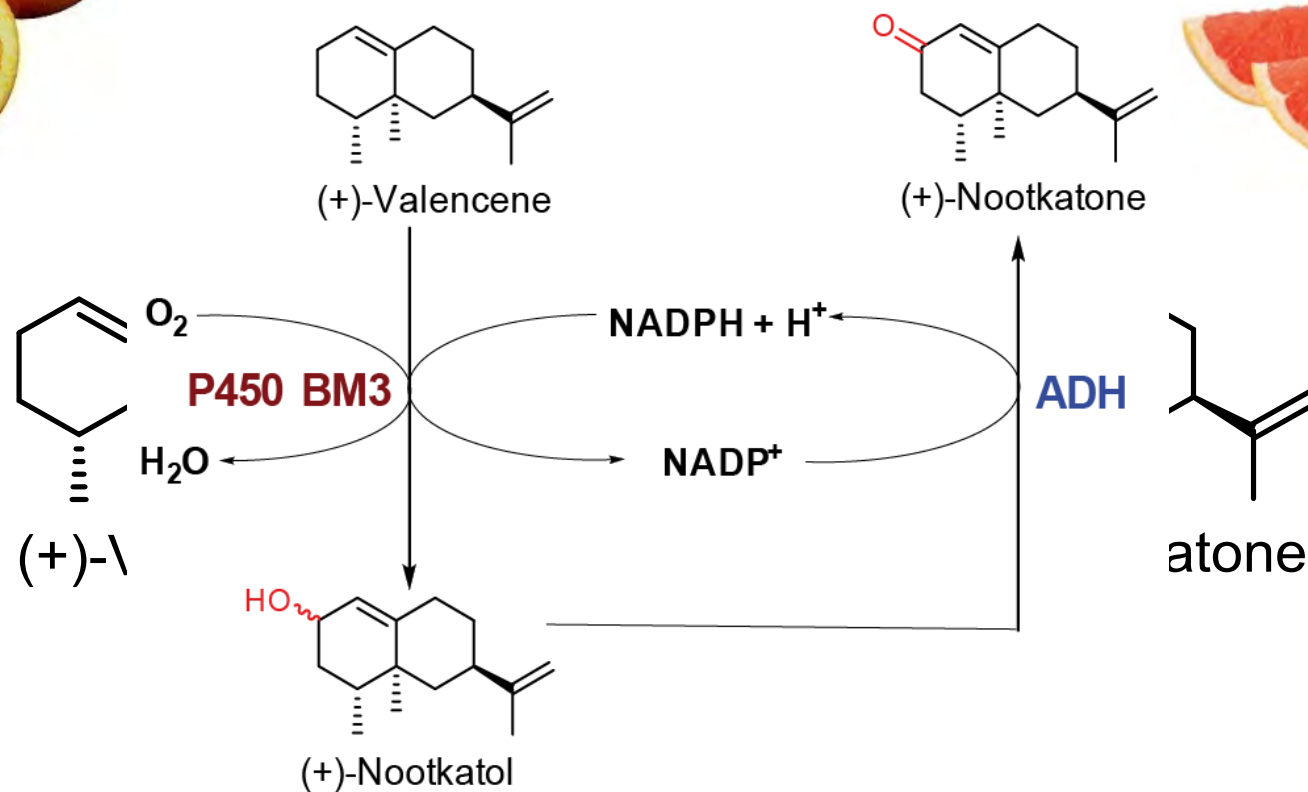
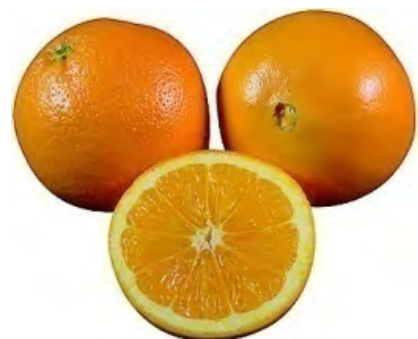
by Kurt Faber (Author)



<https://www.youtube.com/watch?v=OQRE8thrZBE>



Two-step oxidation of valencene to nootkatone



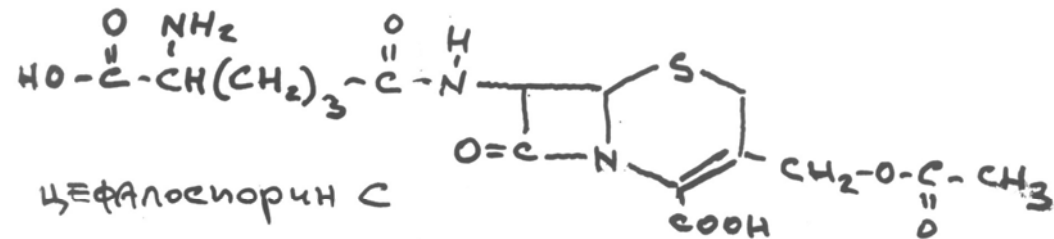
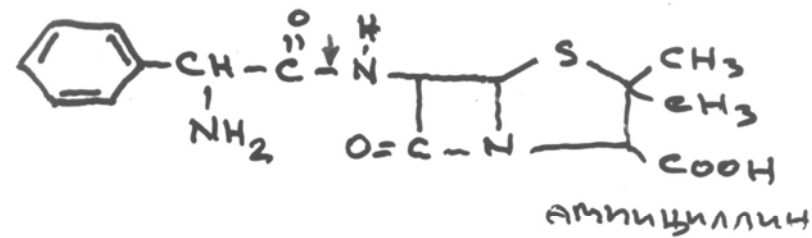
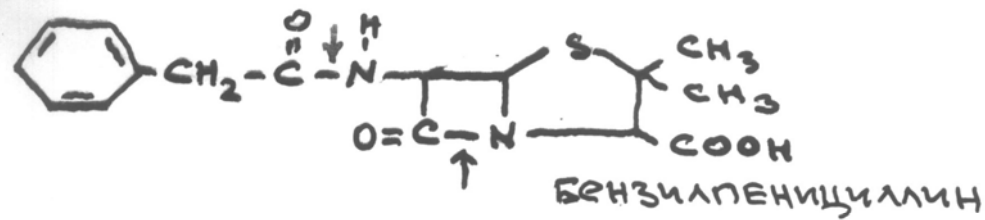
S. Schulz *et al.* *ChemCatChem* 2015, 7, 601-604.



ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ФАРМАЦЕВТИКЕ

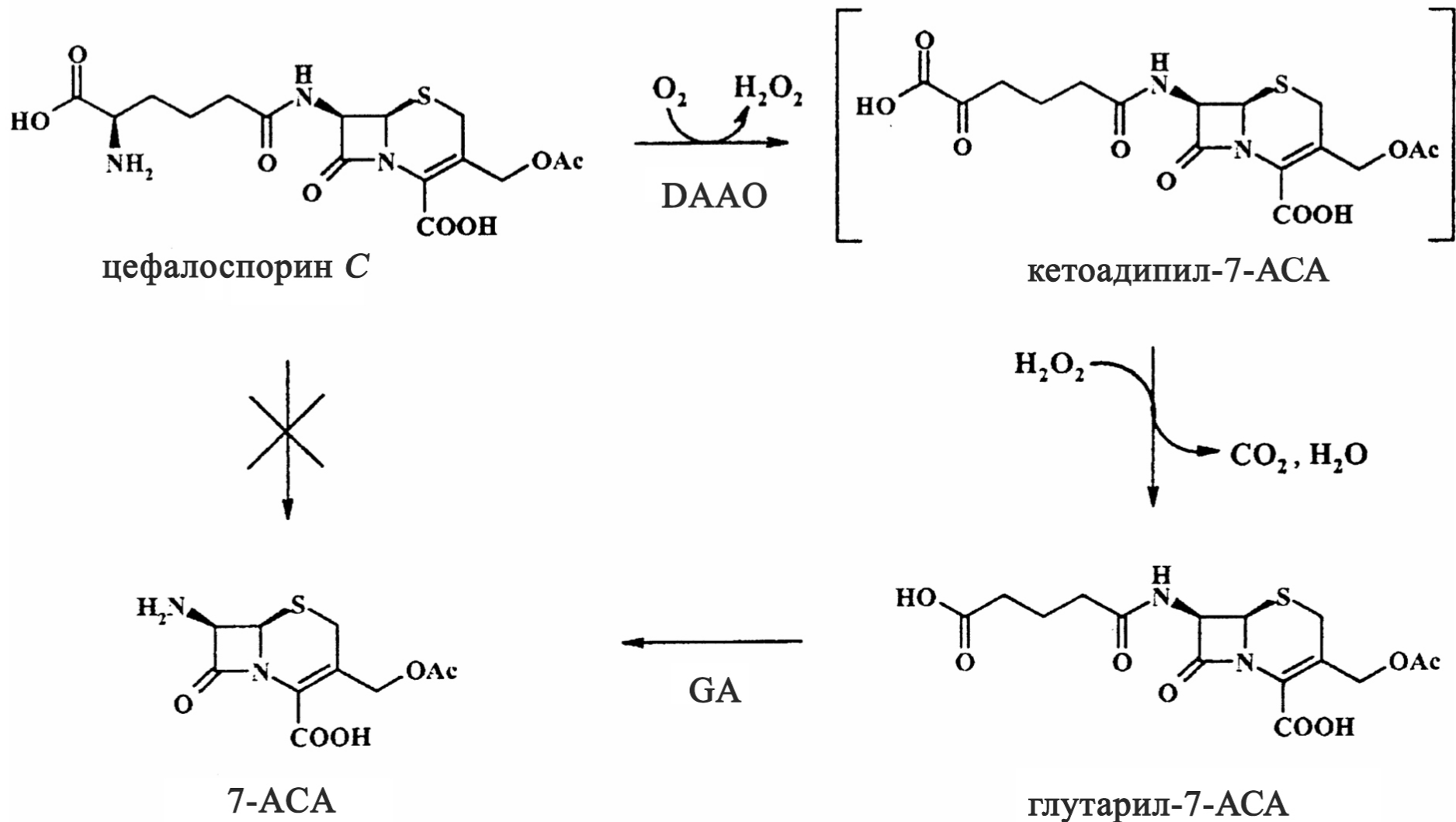
1. **Рекомбинантные ферменты**
2. **«Улучшенные» ферменты (клетки)**
3. Различные типы ферментов для синтеза одного соединения
4. Применение ферментов практически на каждой стадии синтеза
5. **Комбинация целых клеток и отдельных ферментов в одной реакции**
6. Ко-экспрессия ферментов в одной клетке
7. Ферменты используются в реакциях, требующих регио- и стереоселективности

Трансформация антибиотиков



ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ
АНТИБИОТИКИ

Синтез 7-аминоцефалоспоровановой кислоты (7-АСА) из цефалоспорина С



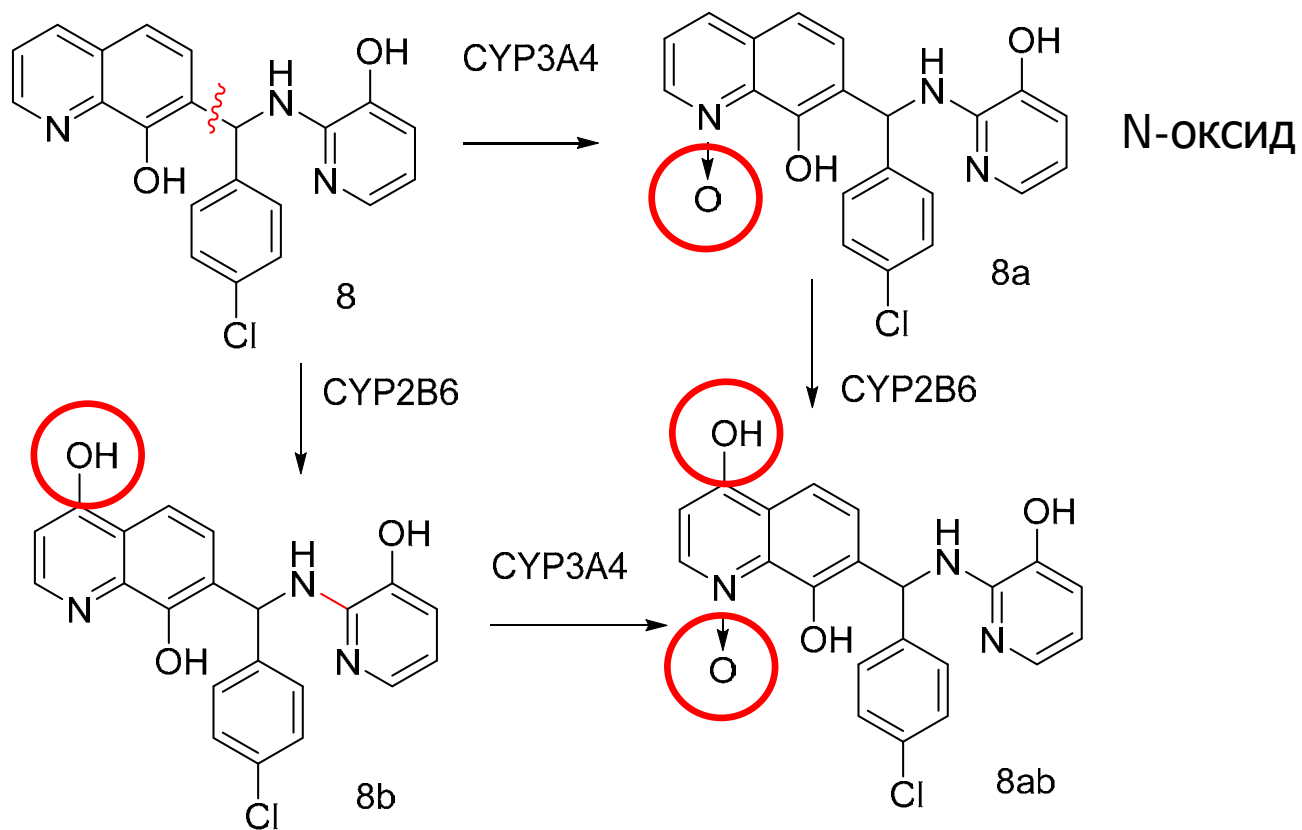
СИНТЕЗ ХИРАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ



- **Стереоселективное окисление**
- **Стереоселективное восстановление**
- **Стереоконверсия (изомеризация)**
- **Стереоразделение (гидролазы)**
- **Стереоразделение (хроматография)**

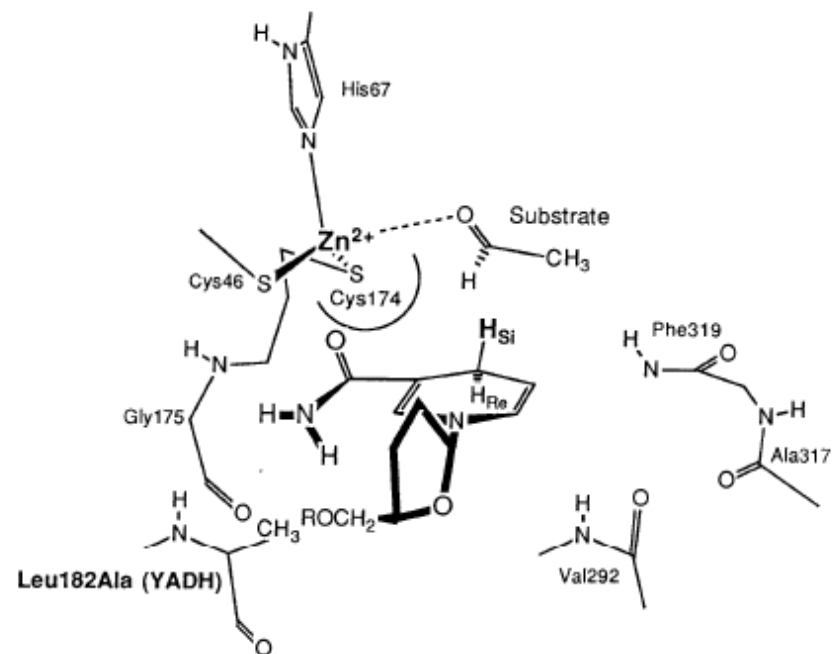
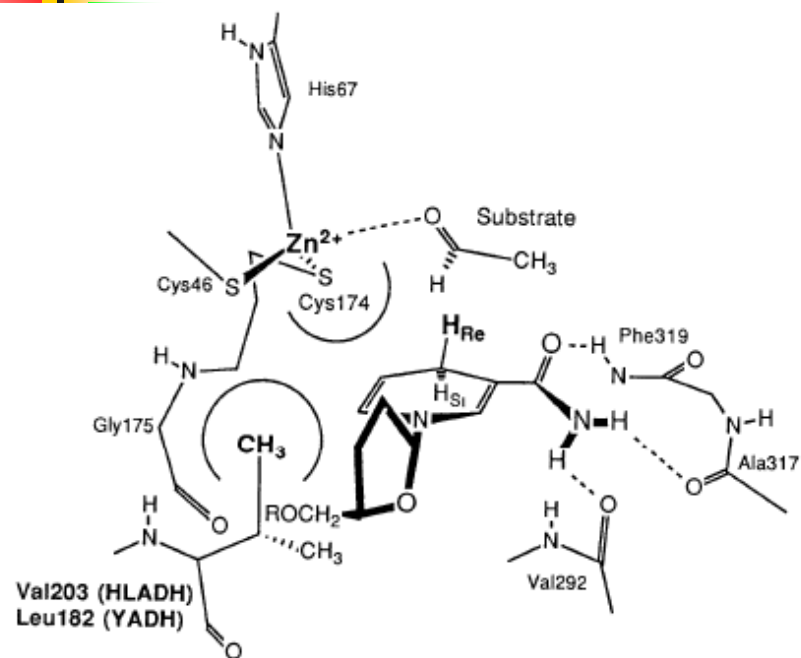


Региоселективность Гидроксилирование ингибитора HIF PDH в печени человека



4-гидроксипроизводное

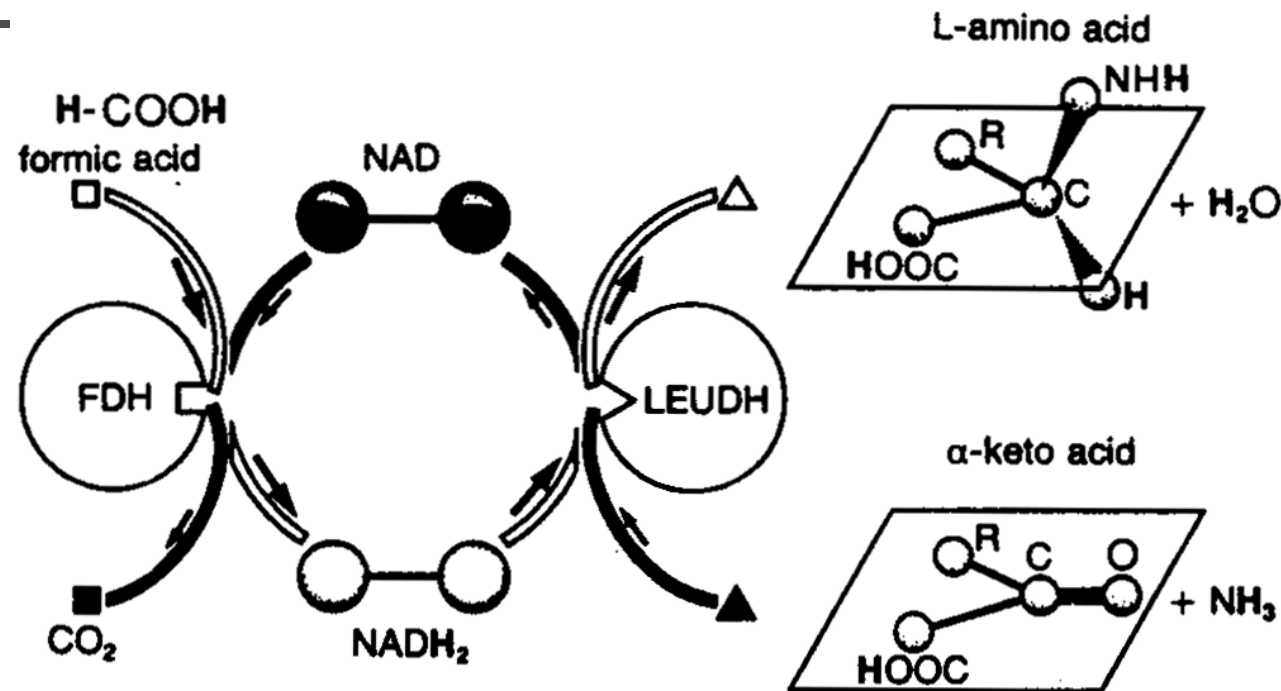
СТЕРЕОСЕЛЕКТИВНОСТЬ. АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА (АДГ)



Природная АДГ дрожжей делает 1 стереохимическую “ошибку” на 7,000,000,000 каталитических циклов при использовании 4- H_{si} водорода NADH вместо of 4- H_{re}
!!!! (PNAS, 1991, 88, 8420)



Получение неприродного *трет*-L-лейцина с помощью лейциндегидрогеназы и регенерацией NADH с помощью формиатдегидрогеназы *C. boidinii*



Hummel W., Kula M.-R., Eur.J.Biochem. 1989, 184, 13

Используется в качестве аналога лейцина и изолейцина для повышения стабильности пептидных антибиотиков в крови.

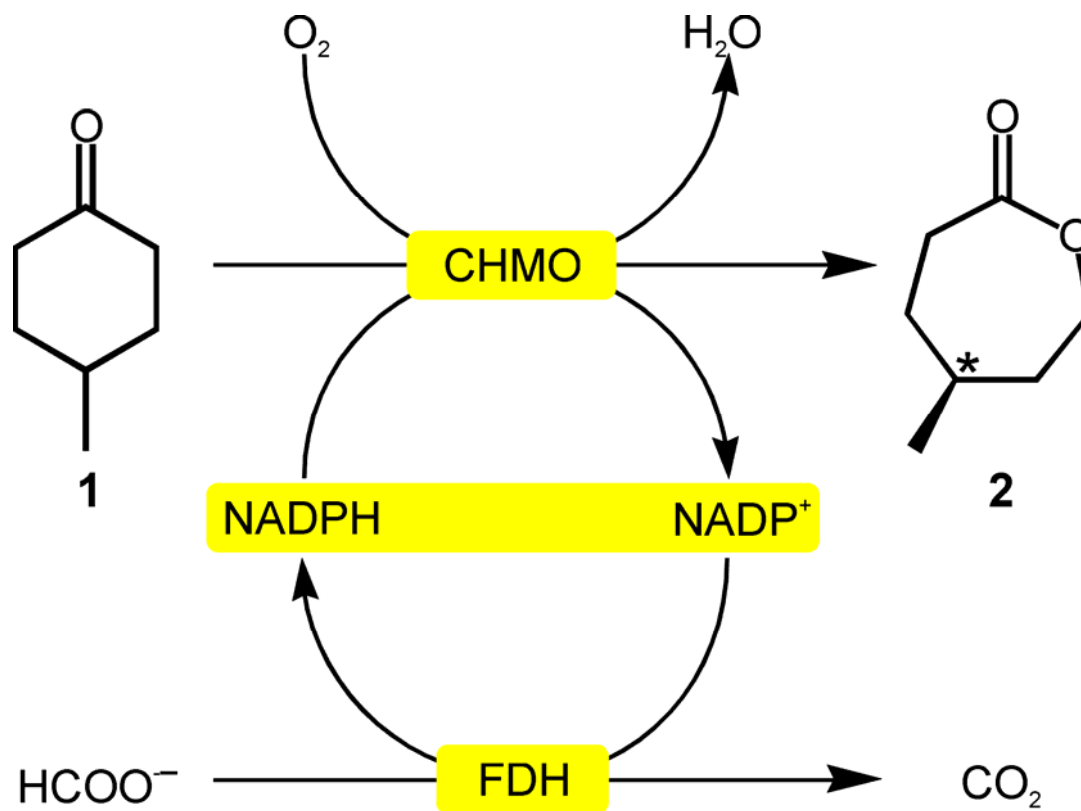
Самый крупнотоннажный процесс хирального синтеза с помощью отдельных ферментов

Реализован фирмой Evonik (Degussa) в 1999 г. Проводится в проточном мембранном реакторе

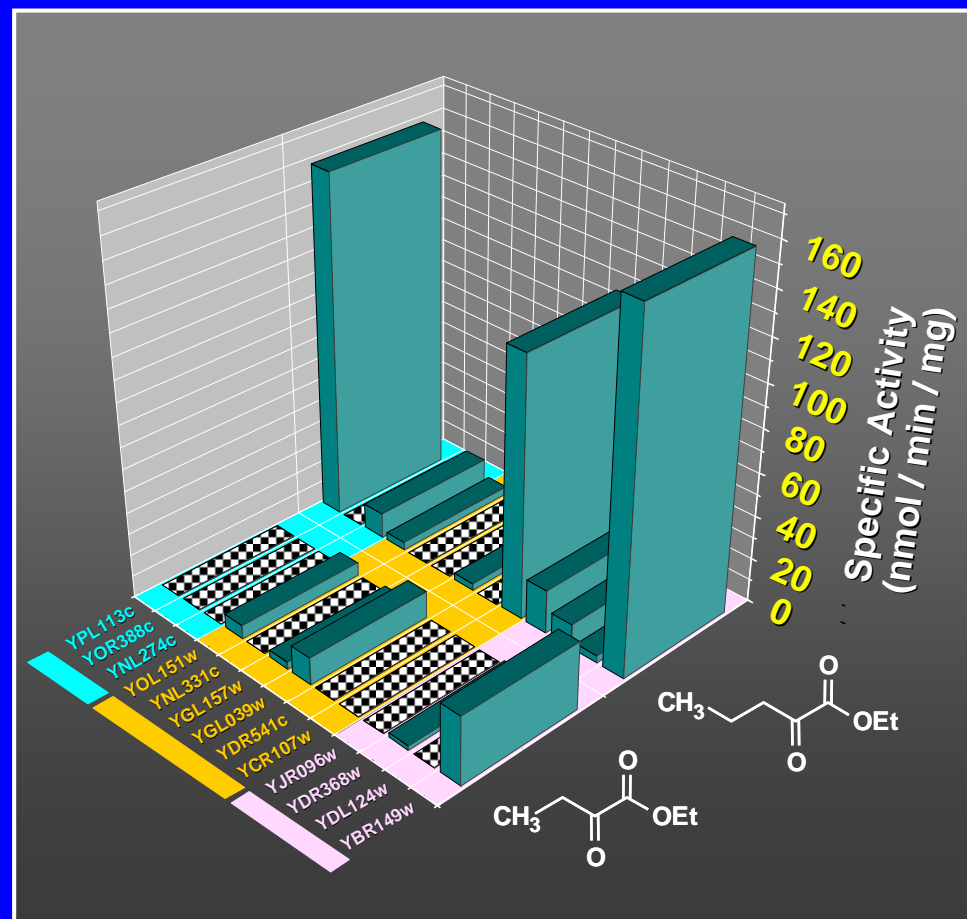
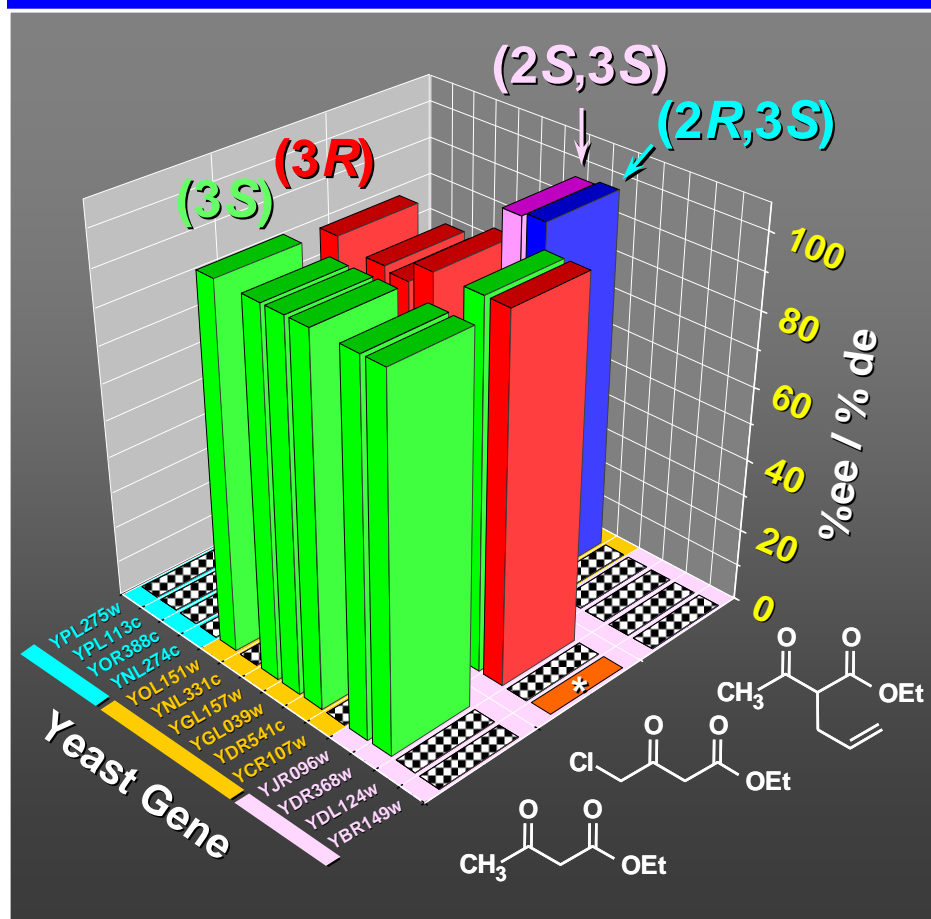


Регио- и стереоселективное окисление производных циклогексанонона по реакции Байера-Виллигера

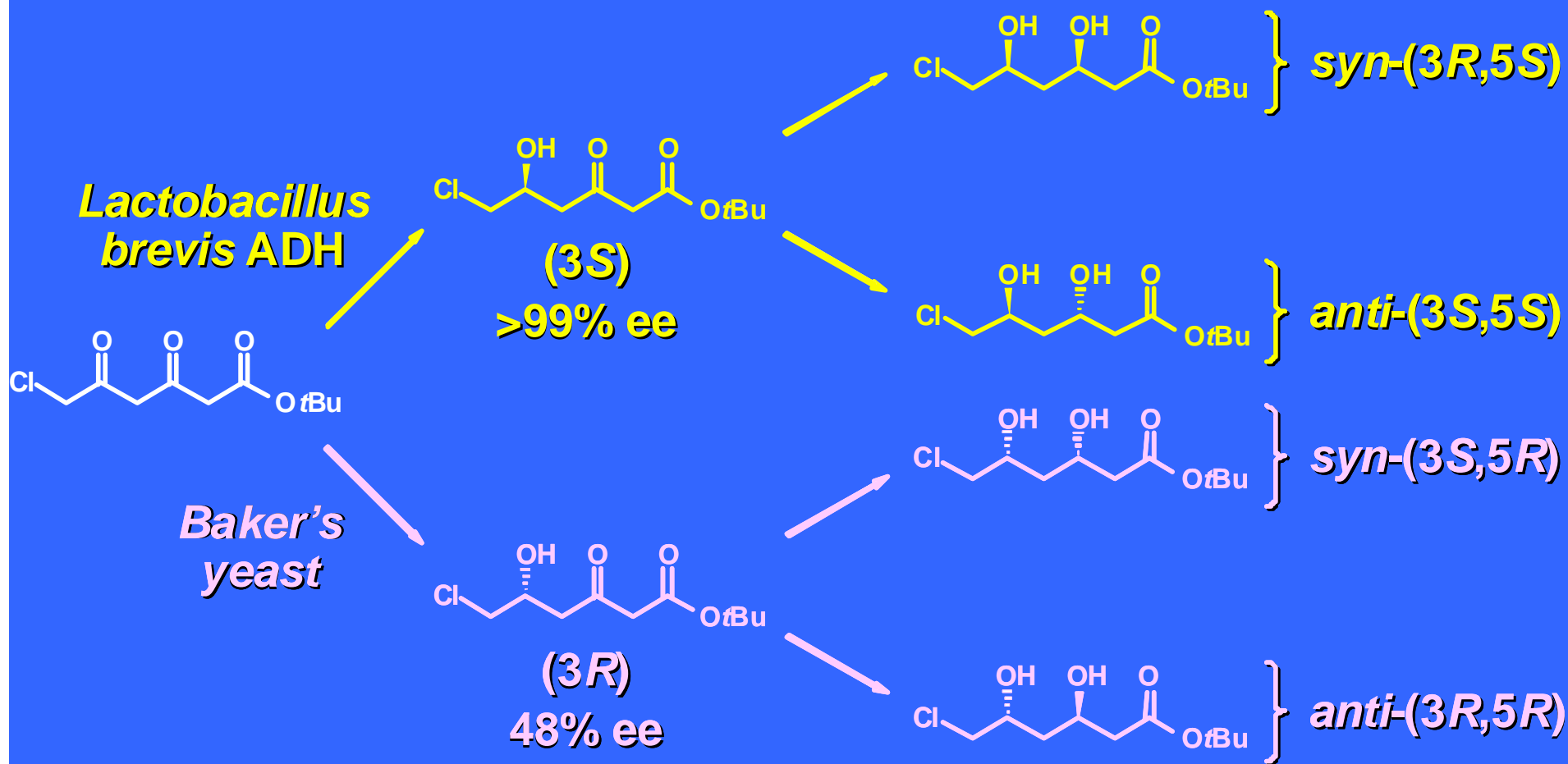
(Synthesis, 2001, 33,947)



Standard Assays of Putative Yeast Reductases

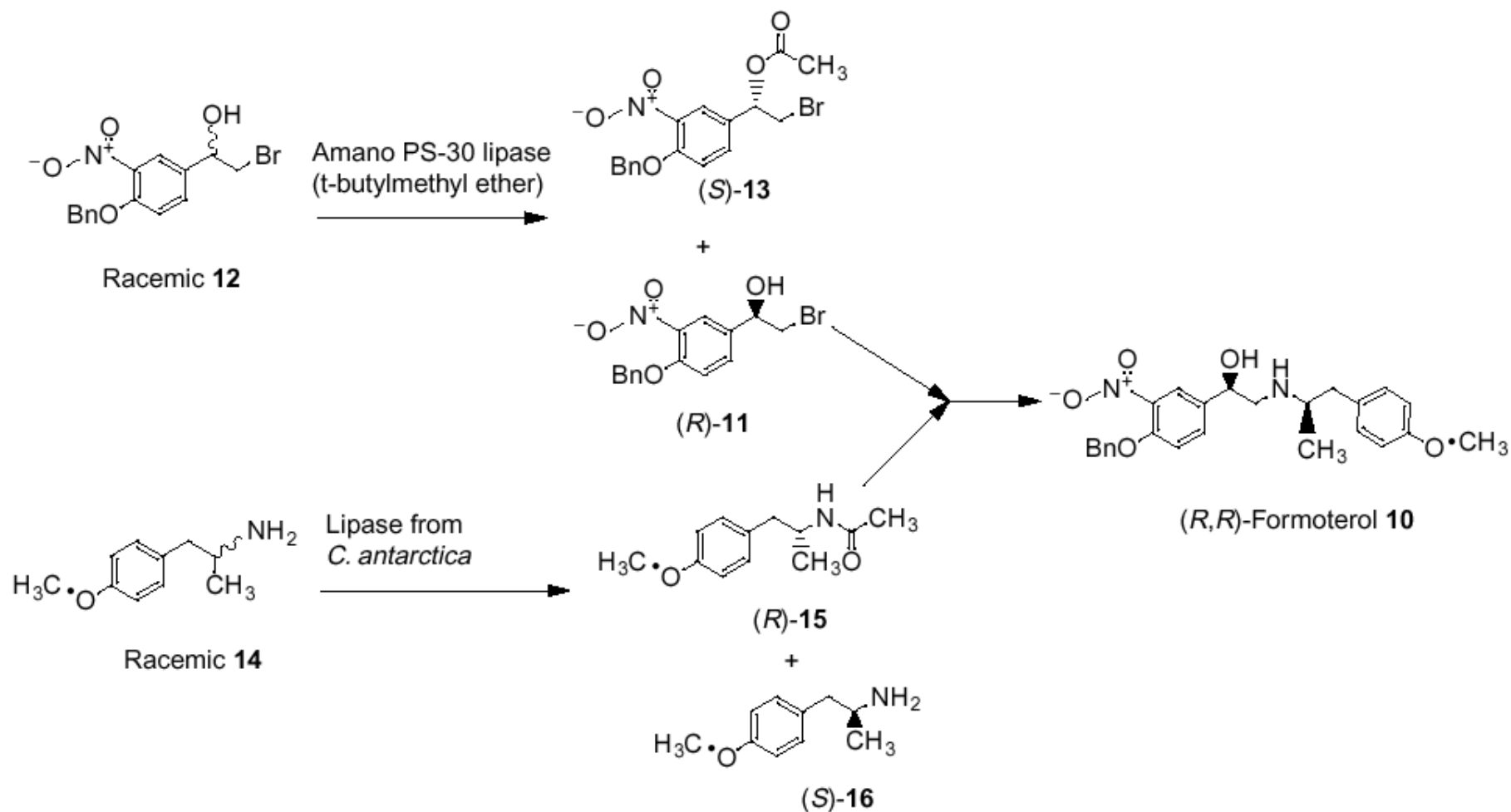


Enzymatic Route to Mono- and Dihydroxy Chiral Building Blocks



Wolberg, M.; Hummel, W.; Müller, M. *Chem. Eur J.* 2001, 7, 4562-4571.

Ферментативный синтез (*R,R*)-формотерола



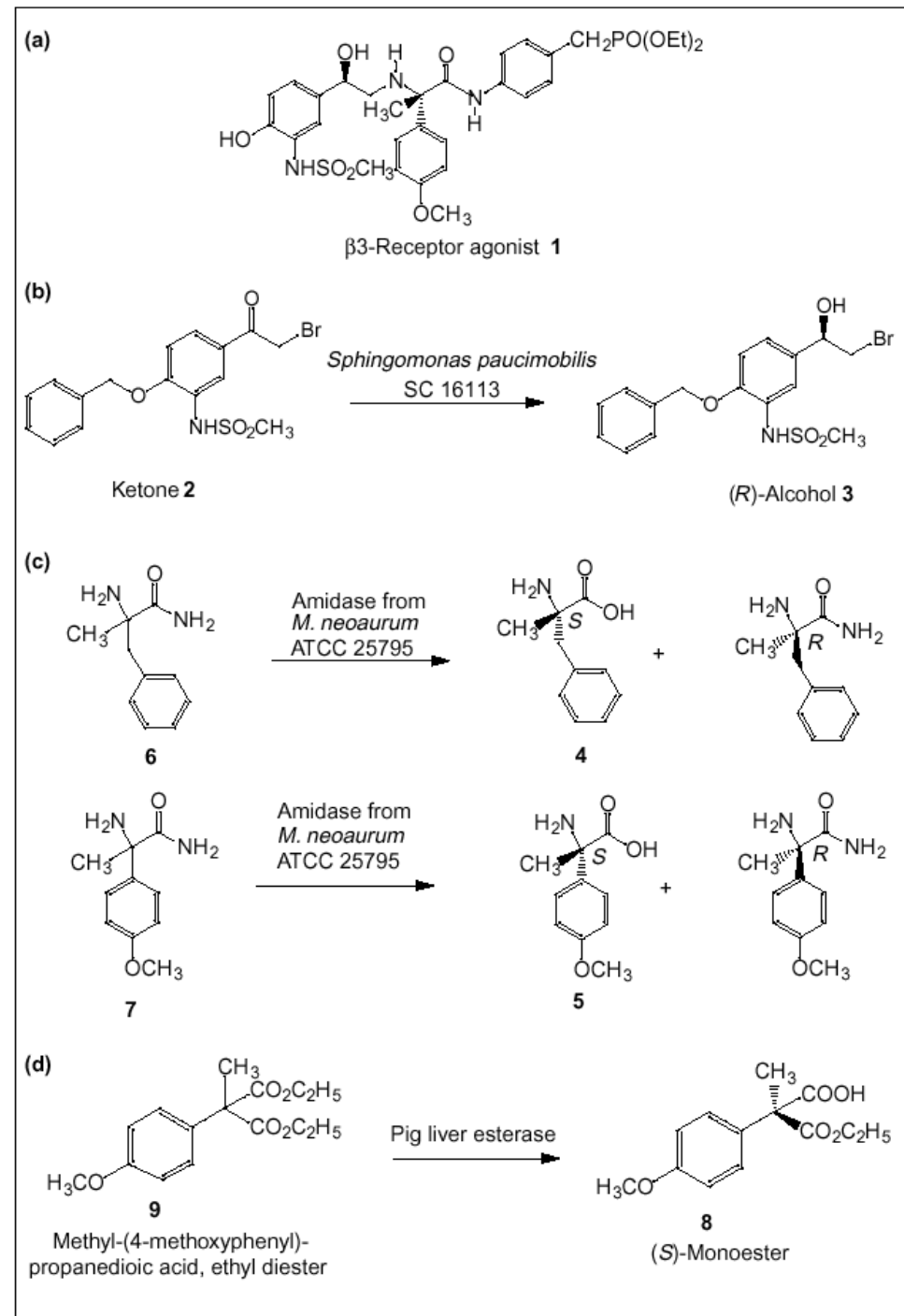
Enzymatic synthesis of (*R,R*)-formoterol 10, a β 2-receptor agonist.

Enzymatic synthesis of chiral intermediates for the production of β 3-receptor agonist.

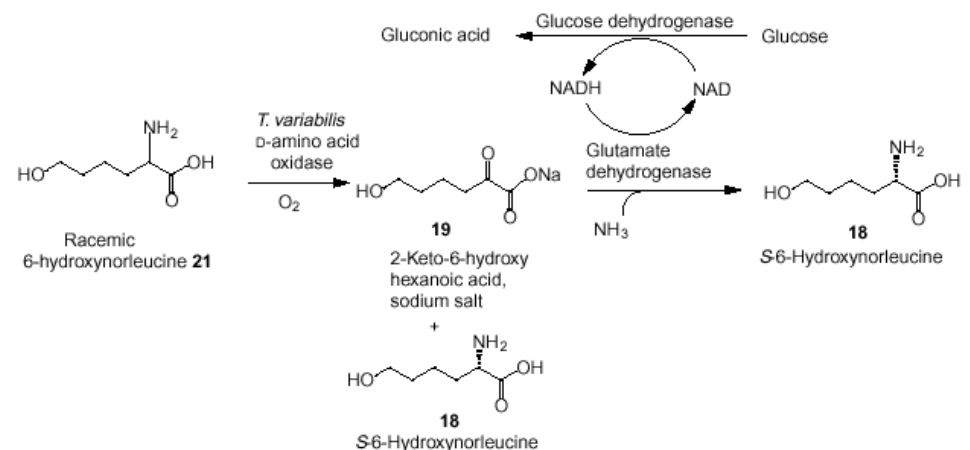
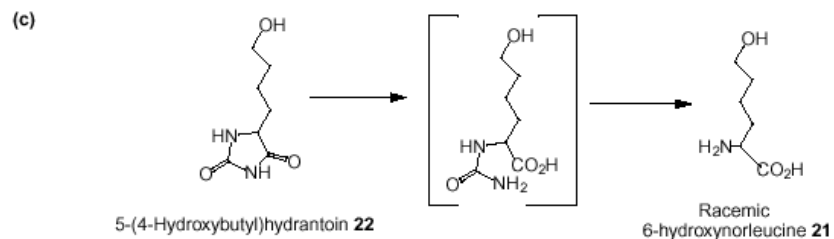
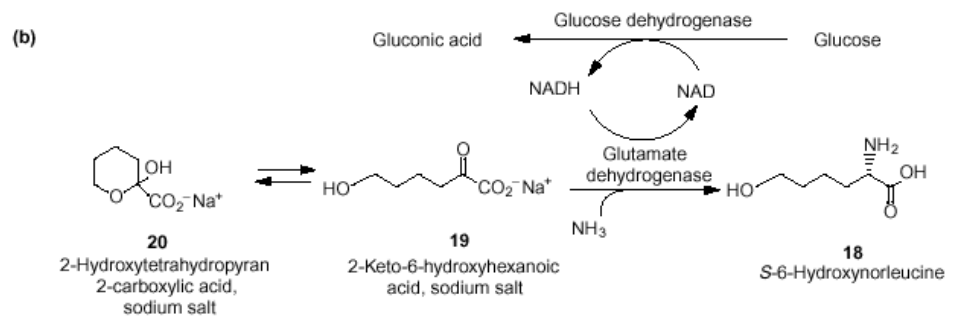
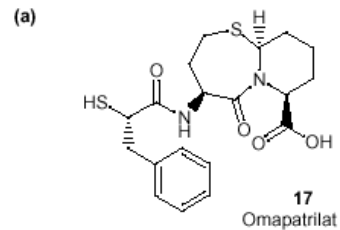
(b) Enantioselective reduction of 4-benzyloxy-3-methanesulfonylamino-2-bromoacetophenone 2 to (R)-alcohol 3.

(c) Enantioselective hydrolysis of β -methyl phenylalanine amide 6 and β -methyl-4-hydroxyphenylalanine amide 7 by amidase.

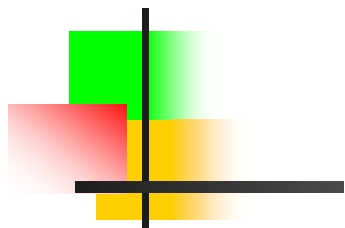
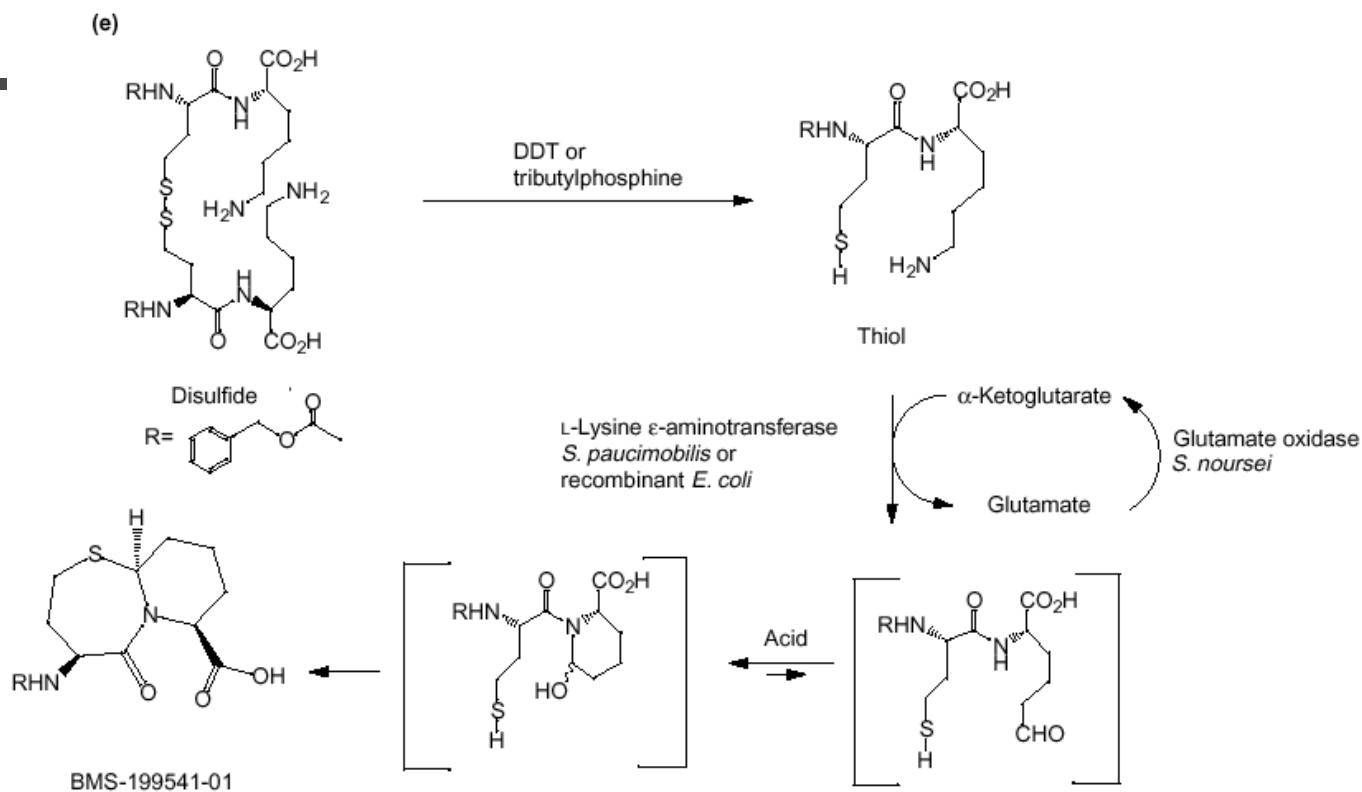
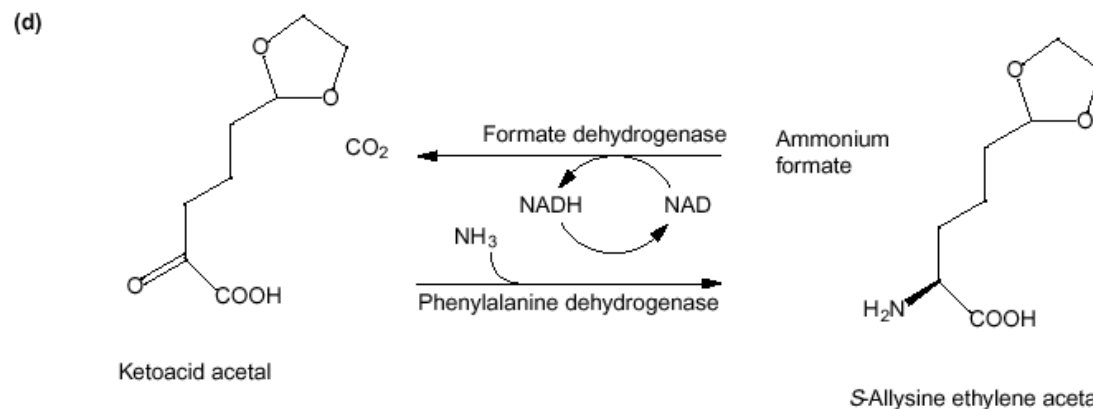
(d) Enantioselective hydrolysis of methyl-(4-methoxyphenyl)-propanedioic acid ethyl diester 9 to (S)-monoester 8.



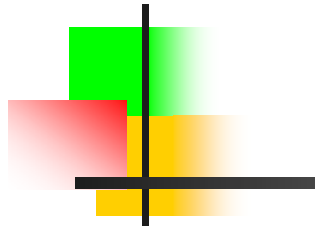
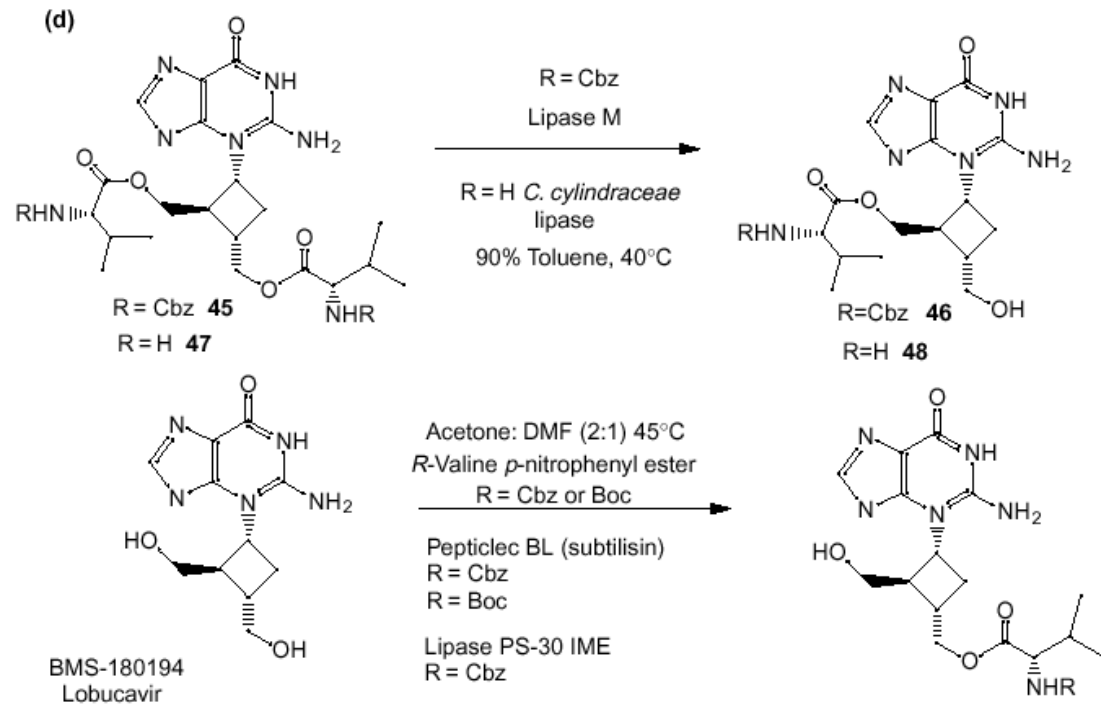
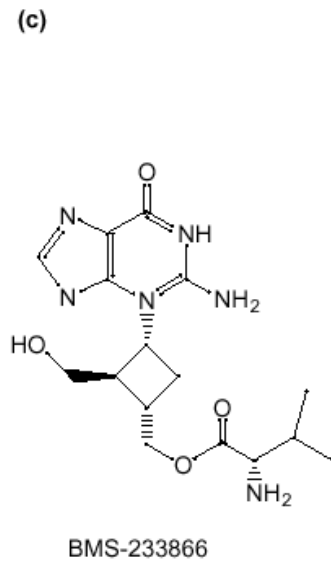
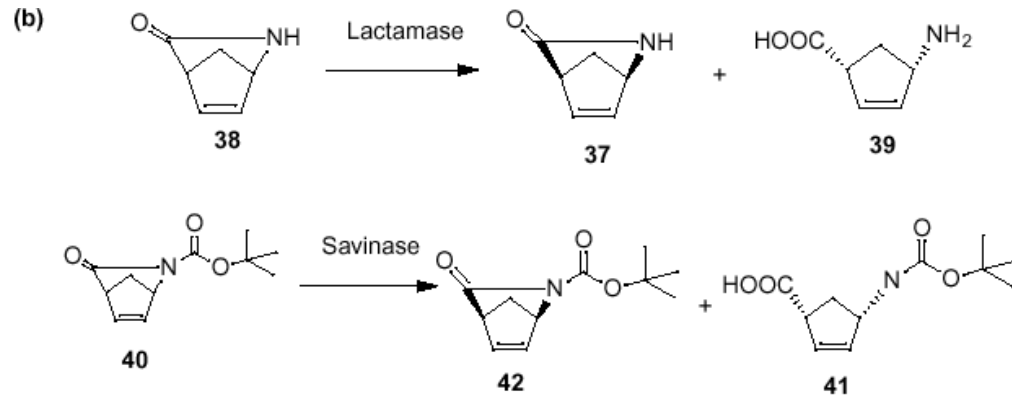
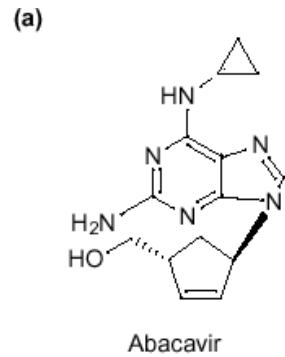
Enzymatic Synthesis of Antihypertensive drug – Omapatrilat (inhibitor of angiotensin-converting enzyme and neutral endopeptidase)



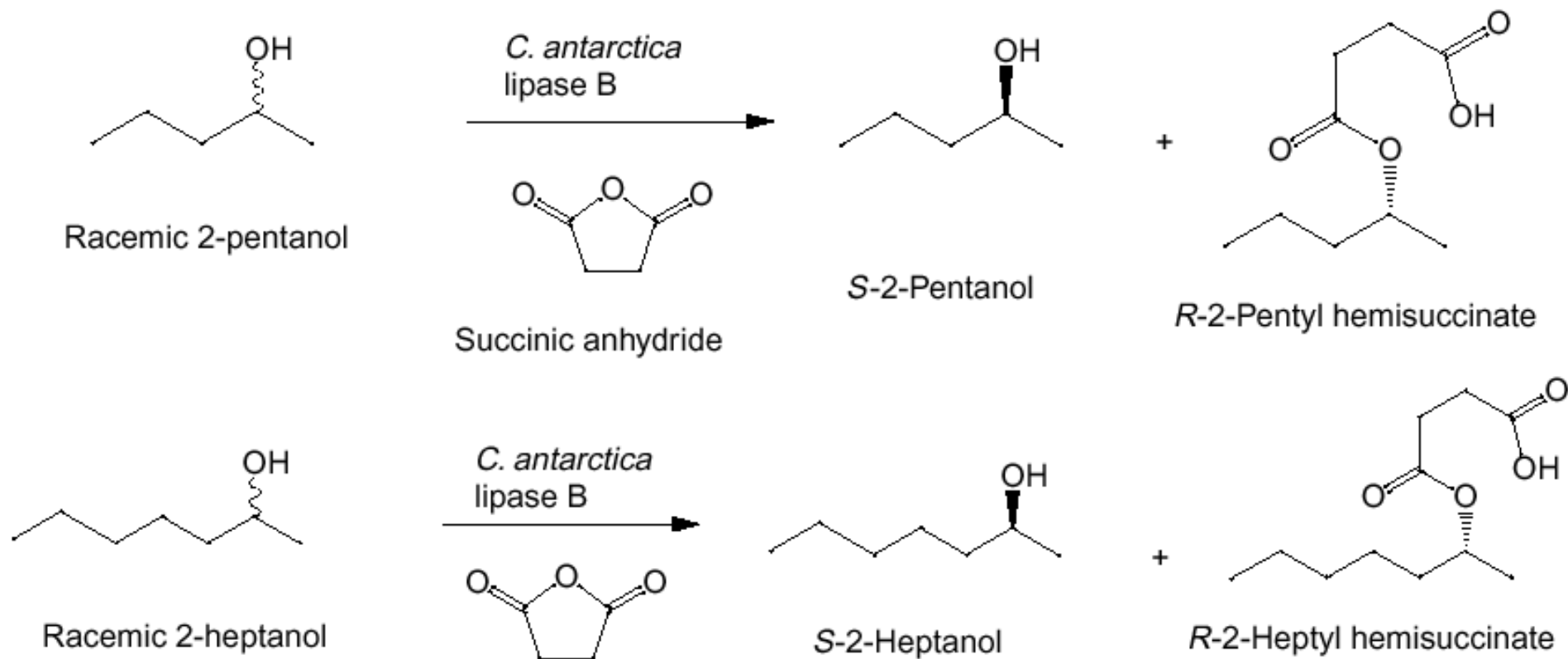
Enzymatic Synthesis of Antihypertensive drug – Omapatrilat



Enzymatic Synthesis of Antiviral Agents – Abacavir (Ziagen™ , HIV Reverse transcriptase inhibitor) and lobucavir prodrug (BMS 233866)

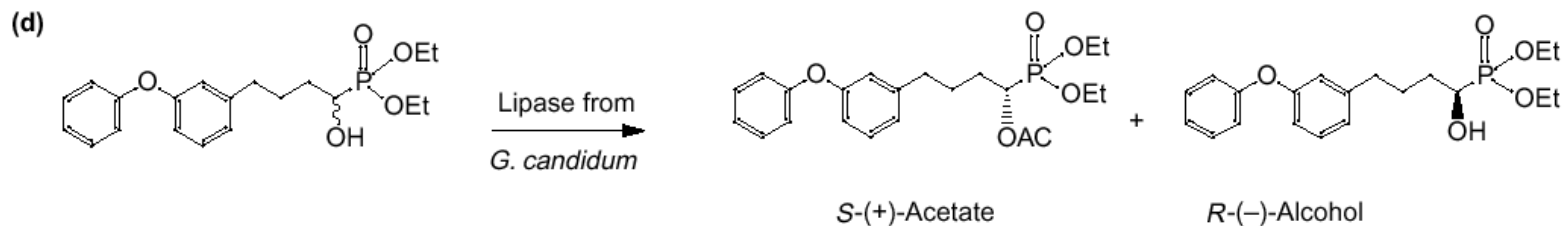
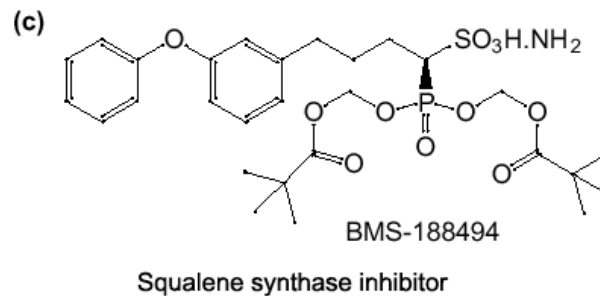
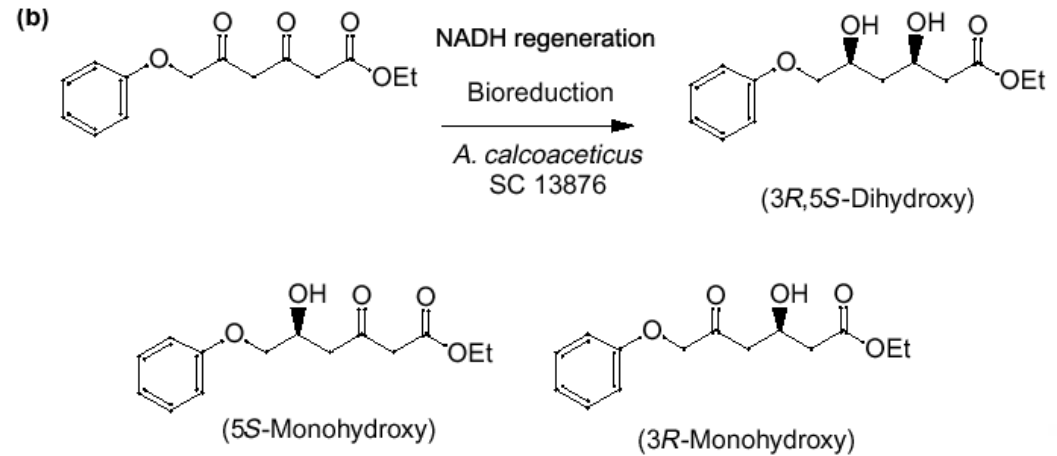
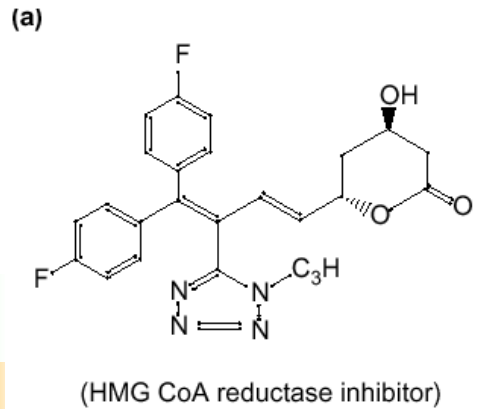


Synthesis of chiral intermediates for the production of an anti-Alzheimer's drug.



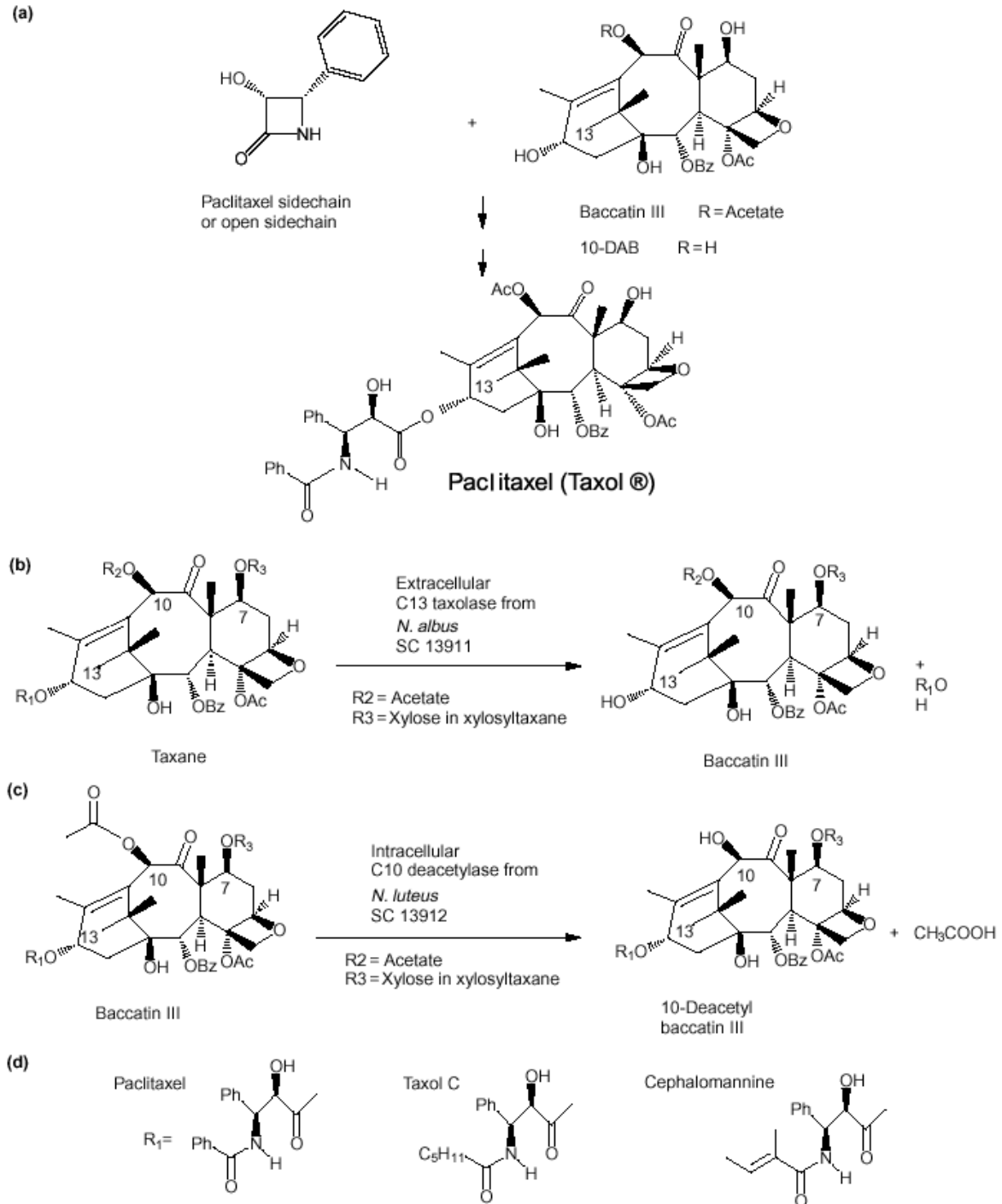
S-2-Pentanol is an intermediate in the synthesis of several potential anti-Alzheimer's drugs that inhibit β -amyloid peptide release and/or its synthesis

Preparation of chiral synthons for the production of anticholesterol drugs.

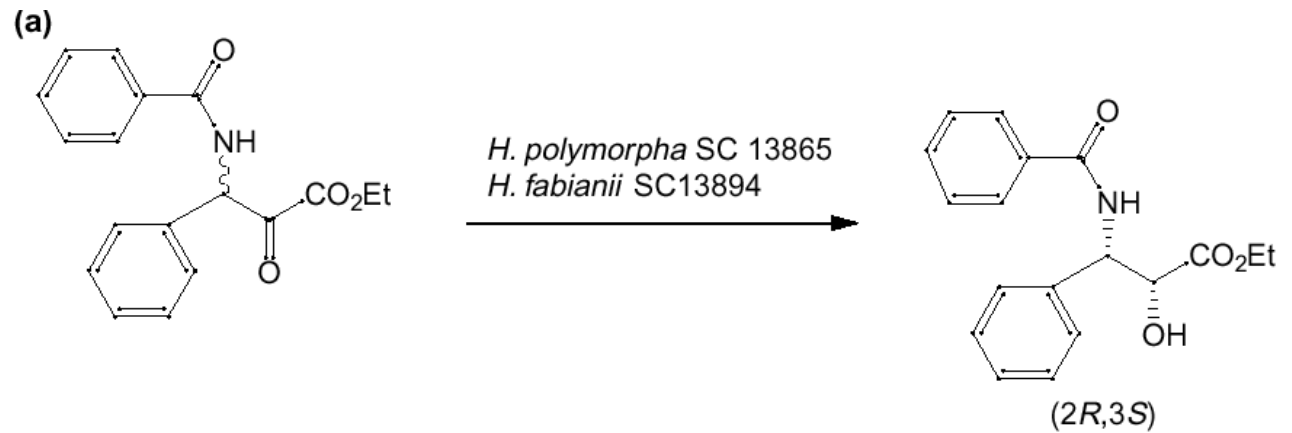


Paclitaxel semisynthesis

Paclitaxel is the only compound known to inhibit the depolymerization process of microtubulin. It was originally isolated from the bark of the yew, *Taxus brevifolia* (about 0.07% yield)



Paclitaxel semisynthesis



Enzymatic synthesis of the C13 sidechain

