



**Продуценты ферментов.**

**ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ  
ФЕРМЕНТОВ.**

**ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ  
ФЕРМЕНТОВ.**



**Применение амилолитических и  
протеолитических ферментов.**

# Ферменты

- – это катализаторы биологического происхождения.

- Наиболее ценные свойства ферментов это :

- высокая активность
    - специфичность (селективность) действия.

Живые организмы содержат сотни и тысячи ферментов, основная функция которых заключается в регуляции практически

всех химических реакций, определяющих жизнедеятельность организма.

- классификация ферментативных реакций. Это:

- 1. окисление и восстановление
      - 2. перенос функциональных групп от одних молекул на другие
      - 3. гидролиз
      - 4. реакции с участием двойных связей
      - 5. изомеризация, или структурные изменения в пределах одной молекулы
      - 6. синтез сложных соединений (обычно с энергетическими затратами).

- У ферментов сложное пространственное строение, включающее определенную комбинацию химических групп. Имеются сведения, что в природе обнаружено свыше трех тысяч разных специфических ферментов.

# Продуценты Ферментов

- В качестве продуцентов ферментов используются культуры представителей различных таксономических групп –
  - бактерий, актиномицетов,
  - микроскопических и высших базидиальных грибов.
  - К микроорганизмам – продуцентам ферментов – предъявляются следующие требования:
    - наличие высокой ферментативной активности;
    - преимущественный синтез фермента или группы ферментов, превращающих определенный субстрат;
    - генетическая стабильность по признаку синтеза фермента или ферментов;
    - достаточно высокая скорость роста; способность расти на средах с доступными и недорогими источниками питания.

# ТЕХНОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ

В зависимости от источника технология получения ферментных препаратов имеет свои особенности.

1. При извлечении ферментов из растительного сырья и животных тканей технология сводится к экстракции энзимов и очистке их от сопутствующих балластных веществ.
2. Технология ферментных препаратов микробного происхождения более сложная, так как дополнительно включает этапы культивирования микроорганизмов — продуцентов ферментов, в том числе этапы получения посевного материала и производственной культуры соответствующего микроорганизма.

- Для производства посевного материала используют исходный штамм продуцентов, получаемый из лабораторных чистых культур, который выращивают разными способами на предварительно стерилизованной твердой или жидкой питательной среде до определенного возраста.
- Посевной материал консервируют (высушиванием или хранением при низких температурах) вплоть до дальнейшего использования.
- Производственные культуры продуцента получают, выращивая посевной материал микроорганизмов как на поверхности твердых или жидких сред, так и в глубине жидких питательных сред.,

# Поверхностный метод

- выращивания продуцентов, предложенный И. Такаmine еще в 1894 г., состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, «размещенных в кюветах, к которым иногда добавляют солодовые" ростки, древесные опилки, свекловичный жом.
- Инкубацию микроорганизмов ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха

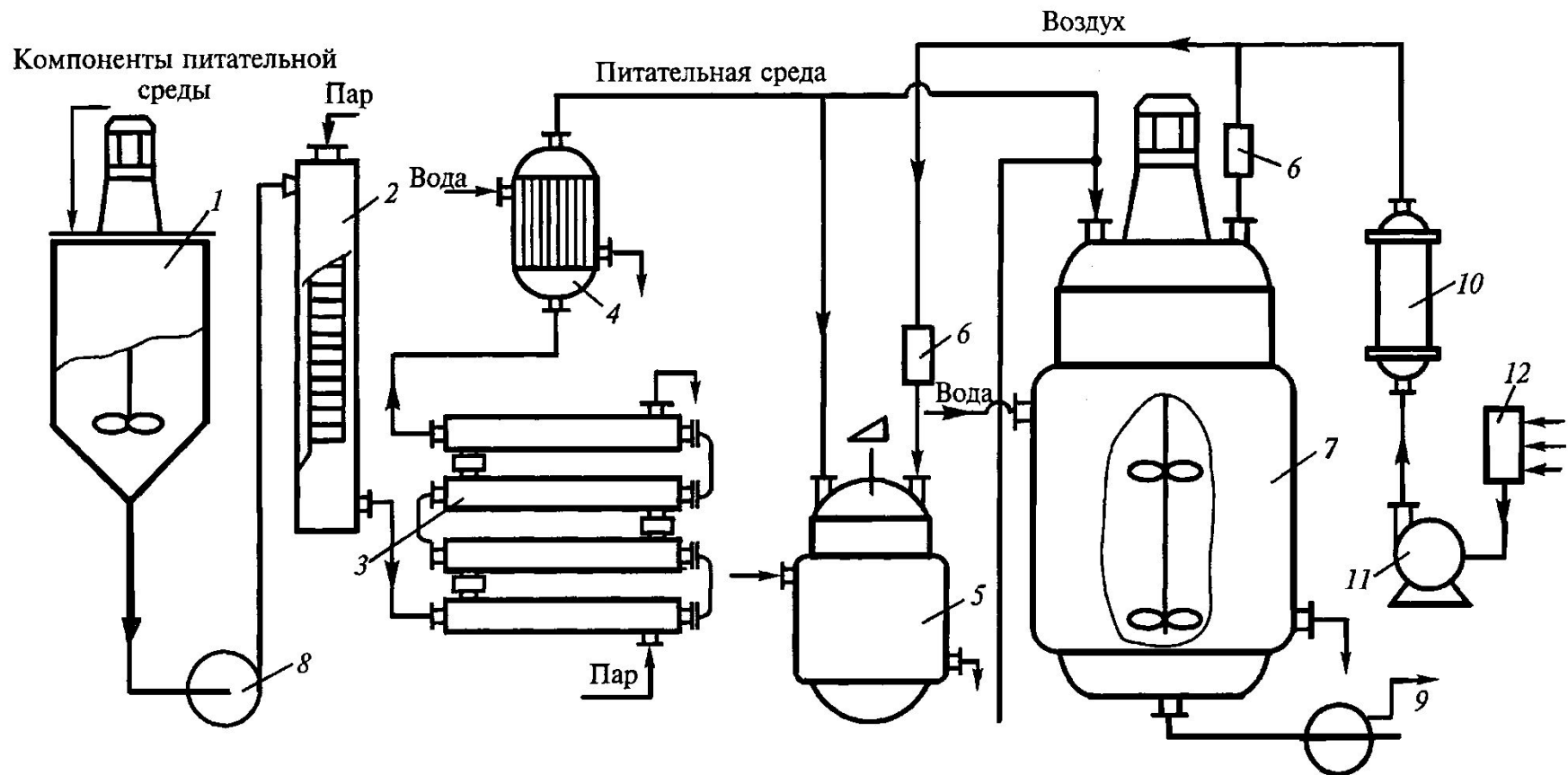
# Глубинный метод

## более экономный метод культивирования

- В промышленных условиях для этих целей применяют ферментеры из нержавеющей стали, снабженные приспособлениями для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха

### Сначала ферментер

1. заполняют питательной средой,
2. автоклавируют,
3. а затем засевают чистой культурой, подаваемой из специального генератора.
4. Для предотвращения инфекции в ферментере поддерживают повышенное давление, наряду с оптимальными значениями pH, температуры, редокс-потенциала и другими условиями культивирования.



1-смеситель питательной среды; 2 — стерилизатор в непрерывном режиме потока питательной среды; 3, 4 — теплообменники; 5 — посевные аппараты; 6, 10, 12 — фильтры для очистки воздуха; 7 — ферментер; 8, 9 — насосы; 11 — компрессор



# Проточный метод

культивирования микроорганизмов, который обеспечивает непрерывную подачу в ферментер как питательной среды, так и посевного материала.

- Размножение микроорганизмов и биосинтез фермента регулируют при использовании этого метода по мере поступления питательной смеси в ферментер.
- Такой ферментер представляет собой вращающийся трубкообразный реактор, через один конец которого в него поступает питательная среда и культура микроорганизмов, а из другого — выводятся ферменты, продукты жизнедеятельности и бактериальная масса.
- Основное достоинство метода — возможность длительное время поддерживать в автоматическом режиме рост культуры микроорганизма.

# Питательные среды

- Основное требование к качеству питательной среды состоит в полноценности ее состава, обеспечивающей рост продуцента и биосинтез целевого фермента.

## Питательные среды в зависимости от состава делятся

- синтетические
- комплексные.
- Синтетическими считают те среды, которые состоят из определенного по качественному и количественному составу набора индивидуальных веществ.
- В комплексные среды входят различные природные продукты, часто отходы пищевых производств. К их числу относятся различные жмыхи, барда спиртовых заводов, картофельная мезга, кукурузный экстракт, меласса, отруби и прочие продукты.

# ТЕХНОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

- Выделение и очистка фермента как из культуры микроорганизма (выращенного любым способом), так и из других природных источников весьма трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому, если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают.
- В промышленности широко применяют коммерческие препараты ферментов, чистота которых составляет всего 0,1 % (т.е. 99,9 % составляют примеси). К таким отраслям относятся спиртовая, кожевенная, текстильная промышленность, а также сельское хозяйство, производство бытовой химии. Например, ферментный препарат, употребляемый в пивоварении, представляет собой высушенную биомассу плесневых грибов.
- В большинстве отраслей пищевой промышленности, практике научных исследований и особенно в медицине используют только очищенные препараты ферментов, частично или полностью освобожденные от балластных веществ и полностью охарактеризованные в отношении их специфичности и физико-химических свойств.

- Исходным материалом для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизма или из тканей и органов растений и животных, из которых готовят препараты различной степени очистки.
- Неочищенные ферментные препараты получают путем высушивания в мягком режиме культуры микроорганизмов вместе с остатками питательной среды. Такие препараты получают и путем упаривания экстракта из культуры продуцента, выращенного поверхностным способом, или из фильтрата культуральной жидкости (в случае глубинного выращивания микроорганизмов)
- Распространен также метод ацетоновых порошков, состоящий в осаждении и быстром обезвоживании при температуре не выше  $-10^{\circ}\text{C}$  тканей или вытяжек из них, содержащих ферменты.

- Для успешного выделения ферментов из клеточного содержимого необходимо очень тонкое измельчение исходного материала вплоть до разрушения субклеточных структур: лизосом, митохондрий, ядер и др., которые имеют в своем составе многие индивидуальные ферменты.
- Для этого используют специальные мельницы и гомогенизаторы, а также ультразвук, метод попеременного замораживания и оттаивания ткани. Для высвобождения ферментов из мембранных структур клетки к гомогенатам добавляют небольшие количества детергентов (твин, тритон X-100) или обрабатывают их энзимами — лизоцимом, целлюлазой, лецитиназой С.
- Особое внимание при выделении ферментов уделяют проведению всех операций в условиях, исключающих денатурацию белка (нейтральные значения pH, стабилизирующие добавки в виде белков, солей и специальных соединений).

- В зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующих ему балластных веществ при получении очищенных препаратов ферментов комбинируют различные приемы и методы такие, как:

1. термическое фракционирование,
2. осаждение органическими растворителями,
3. солями и тяжелыми металлами,
4. фильтрация на молекулярных ситах,
5. ионообменная хроматография,
6. электрофорез,
7. Изоэлектрофокусирование

На заключительных этапах очистки часто используют аффинную хроматографию (биоспецифическая хроматография, хроматография по сродству), которая основана на способности ферментов избирательно связывать те или иные лиганды — субстраты, коферменты, конкурентные ингибиторы, аллостерические эффекторы и т.п.

# Амилолитические ферменты (амилазы)

- **Амилазы** (от лат. *amylum*, что в переводе означает «крахмал») — ферменты класса гликозил-гидролаз, катализирующие гидролиз крахмала, гликогена и других родственных полисахаридов главным образом по  $\alpha$ -(1→4)-гликозидной связи с образованием олиго- и моносахаридов. Амилазы также называют ферментами пищеварения.

## *Применение амилолитических ферментов :*

-

Производство	Применение
Производство глюкозы и патоки	Крупномасштабное производство сахара путем полного или частичного гидролиза крахмала $\alpha$ -амилазой
Пивоварение	Превращение размолотых зерен крахмала в мальтозу – субстрат, пригодный для дальнейшего брожения
Производство фруктовых соков	Осветление путем гидролиза нерастворимых фракций крахмала
Бумажная промышленность	Снижение вязкости раствора крахмала под действием $\alpha$ -амилазы, предшествующее нанесению раствора на целлюлозную основу
Кондитерская промышленность	Производство кондитерских изделий необходимой консистенции
Производство стиральных порошков, моющих средств	Удаление крахмала, присутствующего в белье и на поверхности загрязненной посуды, под действием бактериальных амилаз



# Протеолитические ферменты (синоним: протеазы)

- белки, пептид-гидролазы, ферменты класса гидролаз, расщепляющие пептидные связи между аминокислотами в белках и пептидах.

## Основные области применения протеаз

### ▪ Пищевая промышленность

- В сочетании с амилазой протеиназы, выделяемые из грибов, относящихся к роду *Aspergillus*, применяют в хлебопекарной промышленности. Будучи добавлены в количестве 20-50 г на 1 т муки, они улучшают качество и аромат хлеба, ускоряют созревание теста на 30%, сокращают расход сахара на производство высших сортов булочных изделий вдвое, увеличивают пористость мякиша и объем хлеба на 20%.
- В кулинарии применение пептид-гидролаз (протелин и проназа) для обработки мяса перед его приготовлением резко улучшает качество мясных блюд.
- В мясной промышленности протеолитические ферменты применяют для ускорения созревания мяса и повышения выхода мяса 1-го сорта с 15% до 40%.
- В молочной промышленности использование протеаз ускоряет созревание сыров вдвое и снижает их себестоимость на 10%.

## ■ **Легкая промышленность**

- В кожевенном и меховом производстве для ускорения снятия волоса со шкур и размягчения кожевенного сырья применяют препараты протеиназ (протелин и протофрадин), являющихся внеклеточными протеазами стрептомицетов. При этом время, необходимое на осуществление необходимых процессов сокращается в несколько раз, сортность и качество шерсти и кож повышается, а условия труда в этой отрасли производства резко улучшаются.

- В текстильной промышленности процесс расшлихтовки тканей ферментными препаратами класса протеаз грибного происхождения ускоряется в 7-10 раз; эти же препараты служат для удаления серицина при размотке коконов тутового шелкопряда в производстве натурального шелка.

## ■ **Применение в бытовой химии**

- Протеазы растительного происхождения, выдерживающие нагревание до 90°C без заметной потери активности, являются компонентами стиральных порошков и моющих средств. Некоторые протеазы вместе с глюкозооксидазой и каталазой добавляют в зубную пасту - они обеспечивают их антимикробное действие и предохранение зубов от кариеса.