

П.Б. РАЗГОВОРОВ, Е.В. КУДРИК

**БИОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТОВ
И ПОЛУЧЕНИЕ
ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Учебное пособие



**ИВАНОВО
2012**

Министерство образования и науки Российской Федерации

Ивановский государственный химико-технологический университет

П.Б. Разговоров, Е.В. Кудрик

**БИОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТОВ
И ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Учебное пособие

Иваново 2012

УДК 664.573

Разговоров, П.Б. Биосинтез ферментов и получение ферментных препаратов: учеб. пособие / П.Б. Разговоров, Е.В Кудрик; Иван. гос. хим.-технол. ун-т. – Иваново, 2012. – 124 с.

В учебном пособии представлены материалы, необходимые для изучения лекционного курса по дисциплине «Биосинтез ферментов и получение ферментных препаратов» в рамках подготовки магистрантов направлений «Продукты питания из растительного сырья» (профиль «Биокаталитические процессы в пищевых технологиях») и «Технология продуктов питания». Полезно также для обучения студентов направления 240700 – Биотехнология (профиль «Пищевая биотехнология»). Рассмотрены термины и определения, вопросы биосинтеза и метаболизма ферментов, описаны процессы получения, выделения, иммобилизации и использования ферментных препаратов.

Табл. 9. Ил. 54. Библиогр.: 12 назв.

Печатается по решению редакционно-издательского совета Ивановского государственного химико-технологического университета.

Рецензенты:

Центр семейной медицины «Мега» (г. Иваново);
доктор химических наук, профессор **Д.Б. Березин**
(Ивановский государственный химико-технологический университет)

Авторы выражают благодарность студентам группы 5-28 Матвеевой Т.А. и Родионовой Д.С. за помощь при подготовке материалов учебного пособия к печати.

© Разговоров П.Б., Кудрик Е.В., 2012
© Ивановский государственный
химико-технологический университет, 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. Активность ферментов в клетках и общие представления о регуляции их биосинтеза.....	6
1.1. Активность ферментов в клетках тканей млекопитающих.....	6
1.2. Регуляция биосинтеза ферментов.....	8
2. Воздействие на стадии биосинтеза белков и ферментов.....	11
2.1. Принципы воздействия на биосинтез ферментов.....	11
2.2. Основные классы и подклассы ферментов.....	12
3. Катализ процессов гидролитического расщепления органических соединений.....	23
4. Биосинтез первичных метаболитов и особенности регуляции по принципу обратной связи.....	31
4.1. Биосинтез первичных метаболитов.....	31
4.2. Регуляция по принципу обратной связи.....	32
4.3. Накопление конечных продуктов метаболизма.....	33
4.4. Мутанты, резистентные к воздействию по принципу обратной связи.....	35
4.5. Изменение проницаемости мембраны	37
5. Биосинтез вторичных метаболитов, специфика регуляции по принципу обратной связи и контроль вторичного метаболизма.....	40
5.1. Биосинтез вторичных метаболитов.....	40
5.2. Влияние предшественников.....	41
5.3. Зависимость трофофаза – идиофаза.....	41
5.4. Индукция ферментов при продуцировании вторичных метаболитов...43	
5.5. Регуляция по принципу обратной связи.....	43
5.6. Контроль вторичного метаболизма методом байпасирования.....	45
6. Обеспечение оптимального роста и продуцирование ферментов.....	46

6.1. Первичные факторы, которые необходимо учитывать при осуществлении процесса ферментации.....	46
6.2. Выбор индуктора	48
7. Факторы, влияющие на биосинтез ферментов в процессе культивирования.....	53
8. Организация поверхностного способа культивирования микроорганизмов.....	63
8.1. Кюветный способ.....	63
8.2. Выращивание в механизированных установках.....	64
9. Глубинное культивирование микроорганизмов	69
10. Технологические схемы получения культур микроорганизмов.....	72
10.1. Схема культивирования поверхностным способом.....	73
10.2. Схема глубинного культивирования.....	75
11. Осаждение ферментов	77
11.1. Факторы, влияющие на осаждение ферментов	77
11.2. Установка для осаждения ферментов	81
11.3. Перспективы высаливания ферментов.....	82
12. Сушка ферментных препаратов.....	83
13. Микрокапсулирование и гранулирование ферментных препаратов...	90
14. Получение амилолитических препаратов.....	93
15. Получение протеолитических препаратов.....	104
16. Получение липолитических препаратов	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

ВВЕДЕНИЕ

Учебное пособие «Биосинтез ферментов и получение ферментных препаратов» предназначено для освоения материалов одноименной дисциплины магистрантами, обучающимися по направлению «Продукты питания из растительного сырья» в рамках программы «Биокаталитические процессы в пищевых технологиях». Данная дисциплина базируется на знаниях, полученных при изучении курсов «Основы микробиологии», «Биохимия», «Пищевая химия». При этом магистранты приобретают теоретические знания, навыки и умения в области биохимии ферментов, получения и использования ферментных препаратов в современной пищевой биотехнологии.

Объектами изучения являются ферменты и препараты на их основе, пути их биосинтеза и метаболизма, а также области практического применения в производстве продуктов питания. Учебным планом по курсу предусмотрены лекции, лабораторные занятия и самостоятельная работа студентов.

В пособии представлены термины и определения, этапы и направления современной биотехнологии, показаны пути биосинтеза и биотрансформаций ферментов, достаточно подробно изложены вопросы, касающиеся их получения, выделения и иммобилизации.

1. Активность ферментов в клетках и общие представления о процессе их биосинтеза

1.1. Активность ферментов в клетках тканей млекопитающих

В клетках тканей млекопитающих, как и у простейших, индукция ферментов может осуществляться субстратами и продуктами реакции. Однако, в отличие от одноклеточных, у высших животных индукторы синтеза ферментов могут вырабатываться в клетках эндокринных желез; гормонам принадлежит важная роль в координации скоростей синтеза ферментов в клетках [1]. Выяснение механизмов регулирования активности и синтеза ферментов у высших организмов имеет огромное значение. В последнее время накопились убедительные доказательства о зависимости индукции синтеза ферментов в клетках организма не только от концентрации субстратов, метаболитов или гормонов, но также от реактивности клеток. Так, в клетках ткани, лишенных нервного контроля, реактивность регуляции синтеза ферментных белков претерпевает существенные изменения.

Аргументированные положения относительно гормональной регуляции синтеза ферментов в печени выдвинул *Weber* [1]. Он представил доказательства регуляторной интеграции синтеза ферментов гормонами в организме, согласно которым молекулярные механизмы интеграции обмена клеток следует анализировать на уровне генетической системы.

Weber разделяет все ферменты гликолиза и глюконеогенеза на три группы:

– ключевые ферменты глюконеогенеза – глюкозо-6-фосфатаза, фруктозо-1,6-дифосфатаза; синтез этих ферментов индуцируется глюкокортикоидами (структурные формулы некоторых из них представлены на рис 1.1).

– бифункциональные – фосфогексоизомераза и другие ферменты, находящиеся в избытке в клетке и участвующие как в гликолизе, так и в глюконеогенезе;

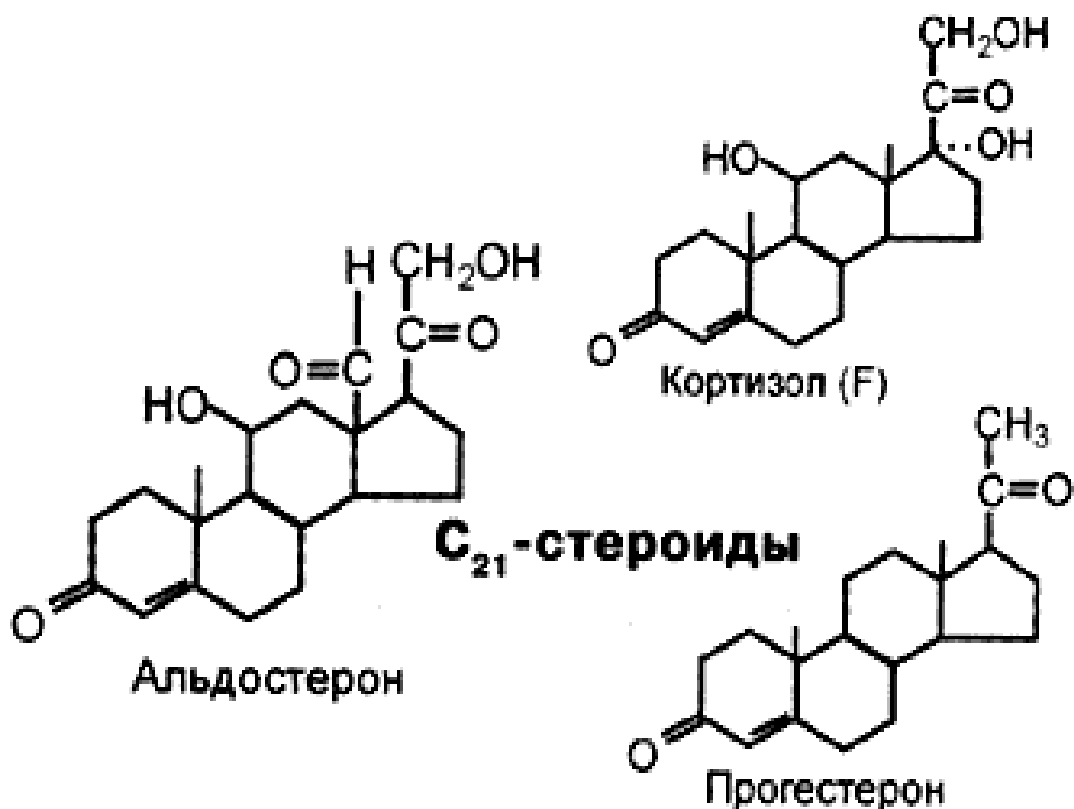


Рис. 1.1. Структурные формулы некоторых глюкокортикоидов

– ключевые ферменты гликолиза – глюкокиназа (ГЛК), 6-фосфофруктокиназа (ФФК) и фосфопируваткиназа (ФПК), определяющие скорость гликолиза; синтез их индуцируется инсулином.

Убедительные данные были получены в опытах на животных с инсулярной недостаточностью (с диабетом и голодающих).

Активность ферментов при голодании (и особенно – при диабете) резко снижена. При кормлении или введении глюкозы голодающим или введении инсулина страдающим диабетом животным восстанавливалась активность ГЛК в их печени. Так, на рис. 1.2 представлены результаты изучения активности ФПК в печени животных с диабетом. Эти данные показывают, что снижение активности ферментов в печени страдающего диабетом организма является результатом угасания их синтеза, а повышение активности ФПК вызывается процессом индукции.

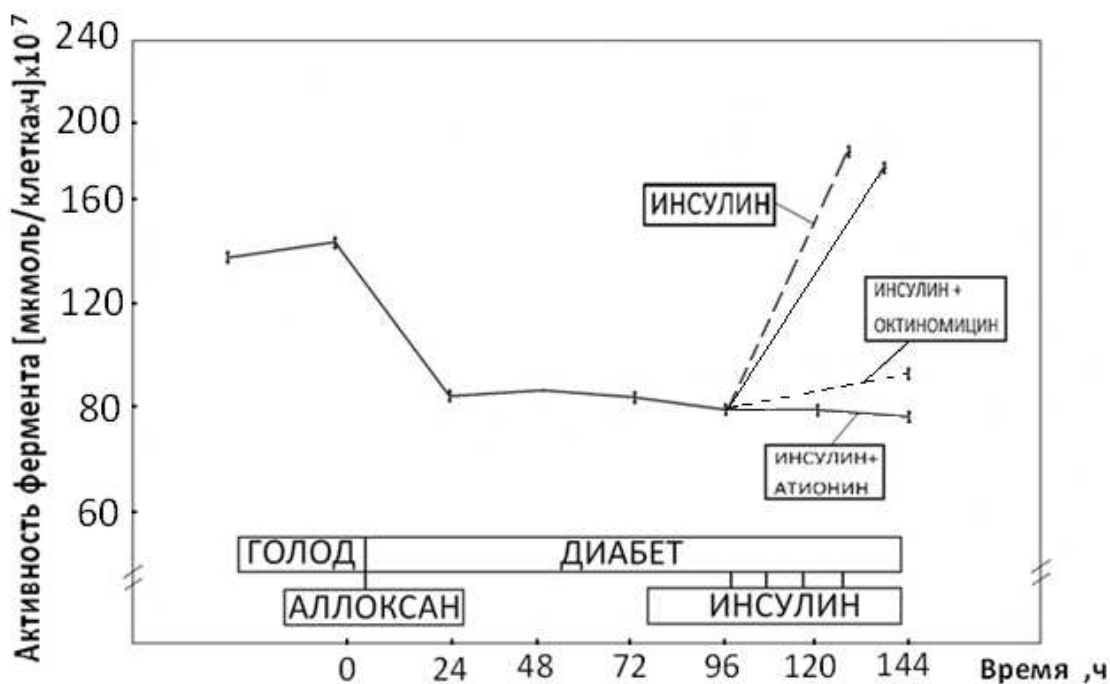


Рис. 1.2. Активность ФПК в печени крыс при диабете и индукции инсулином. Активность фермента по оси ординат – $[\mu\text{моль субстрата}/(\text{клетка} \cdot \text{ч})] \times 10^7$, по оси абсцисс – указано время в часах

Установлено, что при голодании индукция ФПК, а также ФФК вызывается откармливанием пищей, богатой углеводами. Это может быть истолковано как результат индукции синтеза указанных ферментов глюкозой или метаболитами ее обмена.

1.2. Регуляция биосинтеза ферментов

Гудвин осуществил попытку построения фундаментальной теории внутриклеточных процессов, аналогичной по своей структуре классической механике [1].

Биосинтез фермента является конечным звеном процесса выражения генетической информации. Этот многостадийный процесс может быть представлен следующим образом:

$$[\text{Транскрипция}] \rightarrow [\text{Трансляция}] \rightarrow [\text{Морфогенез}]; \quad (1.1)$$

$$[\text{Образование активного комплекса}] \rightarrow [\text{Инактивация}]. \quad (1.2)$$

Этапы процесса заключены в скобки. Естественно, что система управления столь сложным процессом должна быть многогранной.

Первые два этапа (*транскрипция и трансляция*) представляют матричные изменения, т.е. порядок строительных блоков задается матрицей. При этом ферменты обычно катализируют образование простой ковалентной связи индифферентно к ее месту в цепи (матричный биосинтез).

В матричном биосинтезе выделяют три фазы:

– *инициация*, при которой активная матрица и фермент объединяются, образуя активный комплекс, способный в нормальных условиях начать биосинтез;

– *рост цепи*, при котором происходит строго направленное движение фермента и ступенчатое присоединение строительных блоков к растущему полимеру;

– *терминация* (завершение), при которой осуществляется высвобождение полимера.

Все фазы могут быть объектом управления. Однако, поскольку существует предел скорости роста цепи, предполагают, что основным объектом управления является фаза инициации.

Следующим этапом в биосинтезе фермента является формирование уникальной трехмерной структуры, который приводит к морфогенетическим изменениям (*морфогенез*). Затем следуют этапы *образования активного комплекса и его инактивации*.

Проблема активации гена. Ген считается активным, если он синтезирует соответствующую мРНК. Таким образом, активация гена означает трансформацию определенного участка хромосомы, которая допускает образование активного комплекса с РНК-полимеразой.

Доказано [1], что биосинтез ферментов могут регулировать гормоны, поскольку в их присутствии (физиологические концентрации) происходит локальное ослабление прочности двойной спирали ДНК.

Также имеются данные [1], что ионы металлов способны локально «расплетать» (Cu) и «заплетать» (Na) двойную спираль ДНК, и эффект действия некоторых гормонов может быть имитирован ионами металлов.

Положения, поясняющие процесс биосинтеза ферментов, были развиты в теоретических воззрениях Кляйна и Бока, основными из которых являются следующие [1]:

- существуют регуляторные гены, кодирующие синтез полипептидов;
- многочисленные единицы белков претерпевают конформационные изменения, взаимодействуя с субстратами и метаболитами;
- растущая полипептидная цепь приобретает конформацию, допускающую специфическое взаимодействие с субстратами, метаболитами или другими полипептидами;

В процессе синтеза фермента полипептидная цепь приобретает конформацию, ингибирующую дальнейший рост цепи; индуктор (метаболит) изменяет конформацию, снимает ингибирование и индуцирует синтез фермента.

Было также показано:

- синтез фермента начинается тотчас после инфекции;
- через 6 ч после инфекции в отсутствие ингибиторов синтез фермента прекращается.

В [1] на примере регуляции биосинтеза гемоглобина было показано, что гем является регулятором. Оказалось, что гем необходим для освобождения глобина из активного комплекса, а процесс синтеза гемоглобина будет регулироваться критической концентрацией гема.

Другой пример: если в ростовой среде присутствует *преднизолон*, то через 15–24 ч активность фермента в клетках возрастает в 5–10 раз, но количество молекул фермента, скорость его синтеза и распада остаются неизменными. Таким образом, увеличивается только удельная активность фермента, а гормон или продукты, возникающие под его влиянием, влияют на морфогенез фермента, и он приобретает более активную конформацию.

В настоящее время считают, что каждый фермент в клетках животных обладает характерным периодом полураспада; эта величина для различных ферментов одной и той же клетки варьирует от 1–2 ч до нескольких суток.

В клетках высших организмов регулируется не только синтез фермента, но и скорость его распада; инактивация ферментов осуществляется специальными белками (инактиваторами), биосинтез которых строго контролируется.

Проблема регуляции биосинтеза ферментов является центральной проблемой молекулярной биологии. На всех этапах биосинтеза фермента, начиная с активации гена, эффект в одном месте вызывает цепь событий во всей системе биосинтеза.

2. Воздействие на стадии биосинтеза белков и ферментов

2.1. Принципы воздействия на биосинтез ферментов

Регуляция биосинтеза белков и ферментов осуществляется на уровнях транскрипции – трансляции. Механизм экспрессии гена был выяснен на примере лактозной системы. Лактоза действует как индуктор для синтеза *пермеазы*, *β-галактозидазы* и *транскетолазы*, делающих возможным использование необычных питательных веществ. Информация, необходимая для биосинтеза ферментов, содержится в трех структурных генах, которые вместе с ответственным за транскрипцию операторным геном образуют единый комплекс – *оперон*.

Индуктор через регуляторный ген действует на операторный ген. В отсутствие лактозы *репрессор* (аллостерический белок) вступает во взаимодействие с регуляторным геном и блокированием оперона прекращает синтез ферментов (рис. 2.1).

На специфическом подавлении отдельных стадий биосинтеза белковых веществ основано действие ряда антибиотиков. Так, *актиномицин* селективным подавлением РНК-полимеразы нарушает процесс транскрипции.

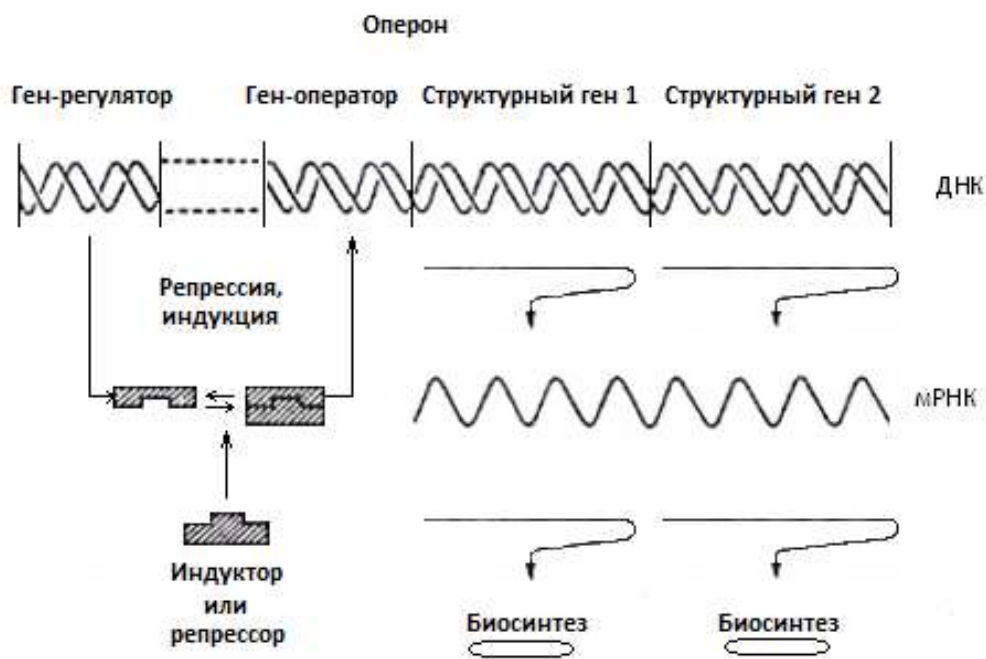


Рис. 2.1. Регуляция биосинтеза на уровнях транскрипции и трансляции

Стрептомицин ассоциирует с 30-й S-субъединицей рибосомы и ведет к ошибкам в переносе, *тиромицин* вызывает преждевременный обрыв синтезируемой цепи.

2.2. Основные классы и подклассы ферментов

Ферментами называются простые или сложные белки, состоящие из нескольких субъединиц, которые, будучи высокоспецифичными биокатализаторами, ускоряют наступление равновесия химической реакции вне или внутри клетки, снижая энергию активации соответствующей реакции. Многие ферменты для осуществления каталитического действия, помимо белкового компонента, нуждаются в *кофакторе* (например, ионе Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+}) или *коферменте* (простетическая группа). Коферменты действуют как переносчики электронов и функциональных групп (атомов водорода, ацетильных, метильных и аминогрупп). Они часто идентичны с витаминами – необходимой составной частью пищи высших организмов.

Ферментативный катализ характеризуется образованием фермент-продукта, который затем диссоциирует на фермент и продукт [2]:



В оптимальных условиях, т.е. при определенных температуре и pH, образование комплекса «фермент – продукт» происходит спонтанно, и этим процессом, как и обратной реакцией, можно пренебречь:



Существование фермент-субстратного комплекса было установлено экспериментально. При заданном количестве фермента повышение концентрации субстрата ведет к увеличению скорости реакции, максимум которой достигается при насыщении фермента субстратом.

Количественную взаимосвязь между скоростью реакции и концентрацией субстрата описывает уравнение Михаэлиса – Ментен:

$$V_0 = \frac{V_{max}S}{K_M + S}, \quad (2.3)$$

где V_0 – начальная скорость, V_{max} – максимальная скорость, S – концентрация субстрата, K_M – константа Михаэлиса.

Константа Михаэлиса соответствует концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимально возможной скорости.

В свою очередь, K_M и V_{max} можно найти графически, используя линеаризацию Лайнуивера – Берка:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_M} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2.4)$$

Для построения графика используют координаты $1/V_0$ и $1/S$.

У аллостерических ферментов, состоящих из нескольких субъединиц, кривая зависимости скорости реакции от концентрации субстрата имеет характерный сигмоидный вид. Такой фермент, независимо от наличия

субстрата, имеет две различные конформации, находящиеся в равновесии. Активность этого фермента контролируется *аллостерическими эффекторами*. При этом обычно небольшая органическая молекула контактирует с определенным участком фермента. Связывание эффектора происходит на одной из субъединиц в *аллостерическом центре*, пространственно отделенном от места связывания субстрата, и вызывает конформационные изменения других субъединиц. Фермент активируется, если эффектор является *активатором*, и ингибируется, если с аллостерическим центром связывается *ингибитор*.

Различают *конкурентные и неконкурентные ингибиторы* ферментов. *Конкурентные ингибиторы* структурно подобны субстрату и занимают его место в центре. Избытком субстрата они могут быть снова удалены. *Неконкурентные ингибиторы* реагируют с другими структурными частями фермента (например, с группой $-SH$) и не могут быть удалены избытком субстрата.

В качестве единицы ферментативной активности принята стандартная единица фермента (Е), представляющая собой такое количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин при заданных условиях.

По специфичности действия ферменты разделяют на 6 классов, которые, в свою очередь, образуют подклассы и подгруппы (табл. 2.1). В настоящее время известно около 2000 ферментов, из которых примерно десятая часть получена в кристаллическом состоянии.

В последние годы использование ферментов для технологических процессов превращения веществ, например в химической и фармацевтической промышленности, приобрело большое значение. При этом, прежде всего, используются *иммобилизованные ферменты*, что дает следующие преимущества: возможность повторного применения ферментов, непрерывное проведение процесса при низких температурах, легкое отделение продукта.

Классификация ферментов по специфичности действия

Основные классы и важнейшие подклассы	Катализируемая реакция	Примеры
1	2	3
<p><i>1. Оксидоредуктазы</i> Дегидрогеназы</p> <p>Оксидазы (с кислородом в качестве акцептора)</p> <p>Гидроксилазы</p>	Реакция окисления и восстановления	<p>Лактат-, алкоголь-, малат-дегидрогеназы</p> <p>Глюкозо- и моноаминоксидаза, оксидазы аминокислот</p> <p>Фенилаланин-4-гидроксилаза</p>
<p><i>2. Трасферазы</i></p> <p>Альдегидо- и кетотрансферазы</p> <p>Ацилтрансфераза</p> <p>Аминотрансферазы</p> <p>Фосфотрансферазы</p>	Перенос групп	<p>Метил-, гидроксиметил-, карбомилтрансферазы</p> <p>Трансальдолаза, транскетолаза</p> <p>Ацилтрансферазы, тиолаза</p> <p>Все трансаминазы</p> <p>Гексо-, глюко-, фосфофруктокиназы, РНК-полимеразы</p>
<p><i>3. Гидролазы</i></p> <p>Эстеразы</p> <p>Гликозидазы</p> <p>Экзопептидазы</p> <p>Эндопептидазы</p> <p>Амидазы</p>	<p>Гидролитическое расщепление связей</p> <p>Расщепление сложноэфирных связей</p> <p>Расщепление гликозидов</p> <p>Расщепление пептидной связи</p> <p>Расщепление амидных связей</p> <p>Расщепление ангидридных связей кислот</p>	<p>Ацетилхолинэстераза, липазы</p> <p>α-гликозидазы (α-амилаза, глюкоамилаза), β-гликозидаза (целлюлаза)</p> <p>Амино- и карбоксипептидазы</p> <p>Трипсин, химотрипсин</p> <p>Аспарагиназа, глутаминаза, уреаза, аргиназа</p> <p>АТРазы, пирофосфатаза</p>

Продолжение таблицы 2.1

1	2	3
<p>4. <i>Лиазы</i></p> <p>С–С-лиазы</p> <p>С–О-лиазы</p> <p>С–N-лиазы</p>	<p>Элиминирование и присоединение по двойной связи</p>	<p>Пируватдекарбоксилаза , альдолазы Аконитаза, карбоангидраза Енолаза, фумараза, аспартаза</p>
<p>5. <i>Изомеразы</i></p> <p>Рацемазы</p> <p>Эпимеразы</p> <p>Цис-транс-изомераза</p>	<p>Изомеризация</p>	<p>Пролинрацемаза, рацемазы других аминокислот Рибулозофосфат-3-эпимераза Изомераза малеилацетоуксусной кислоты</p>
<p>6. <i>Лигазы (синтетазы)</i></p> <p>С–О-синтетазы</p> <p>С–N-синтетазы</p> <p>С–С-синтетазы</p> <p>С–S-синтетазы</p>	<p>Соединение двух молекул субстрата с участием АТФ</p>	<p>Все тРНК-синтетазы аминокислот Аспарагин- и глутамин- синтетазы Пируваткарбоксилаза Ацетил- и сукцинат- СоА-синтетазы</p>

В соответствии с механизмами генетического контроля у бактерий выделяют три группы ферментов:

- *конститутивные*, синтез которых происходит постоянно;
- *индуцибельные*, синтез которых индуцируется наличием субстрата;
- *репрессибельные*, синтез которых подавляется избытком продукта реакции.

Ферменты бактерий делят на *экзо- и эндоферменты*. *Экзоферменты* выделяются во внешнюю среду, осуществляют процессы расщепления высокомолекулярных органических соединений. Способность к образованию

экзоферментов во многом определяет *инвазивность* бактерий – способность проникать через слизистые, соединительнотканые и другие тканевые барьеры. Например, *гиалуронидаза* расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, что повышает проницаемость тканей (кlostридии, стрептококки, стафилококки и многие другие микроорганизмы); *нейраминидаза* облегчает преодоление слоя слизи, проникновение внутрь клеток и распространение в межклеточном пространстве (холерный вибрион, дифтерийная палочка, вирус гриппа и многие другие). К этой же группе относятся энзимы, разлагающие антибиотики.

В бактериологии для дифференциации микроорганизмов по биохимическим свойствам основное значение часто имеют конечные продукты и результаты действия ферментов.

В соответствии с этим существует микробиологическая (рабочая) классификация ферментов:

- 1) *сахаролитические*;
- 2) *протеолитические*;
- 3) *аутолитические*;
- 4) *окислительно-восстановительные*;
- 5) *ферменты патогенности*.

Ферментный состав клетки определяется геномом и является достаточно постоянным признаком. Знание биохимических свойств микроорганизмов позволяет идентифицировать их по набору ферментов. Основные продукты превращений углеводов и белков – кислота, газ, индол, сероводород, хотя реальный спектр для различных микроорганизмов более широк.

В настоящее время практическое значение приобретают иммобилизованные ферментные препараты. Способы иммобилизации ферментов представлены на рис. 2.2.

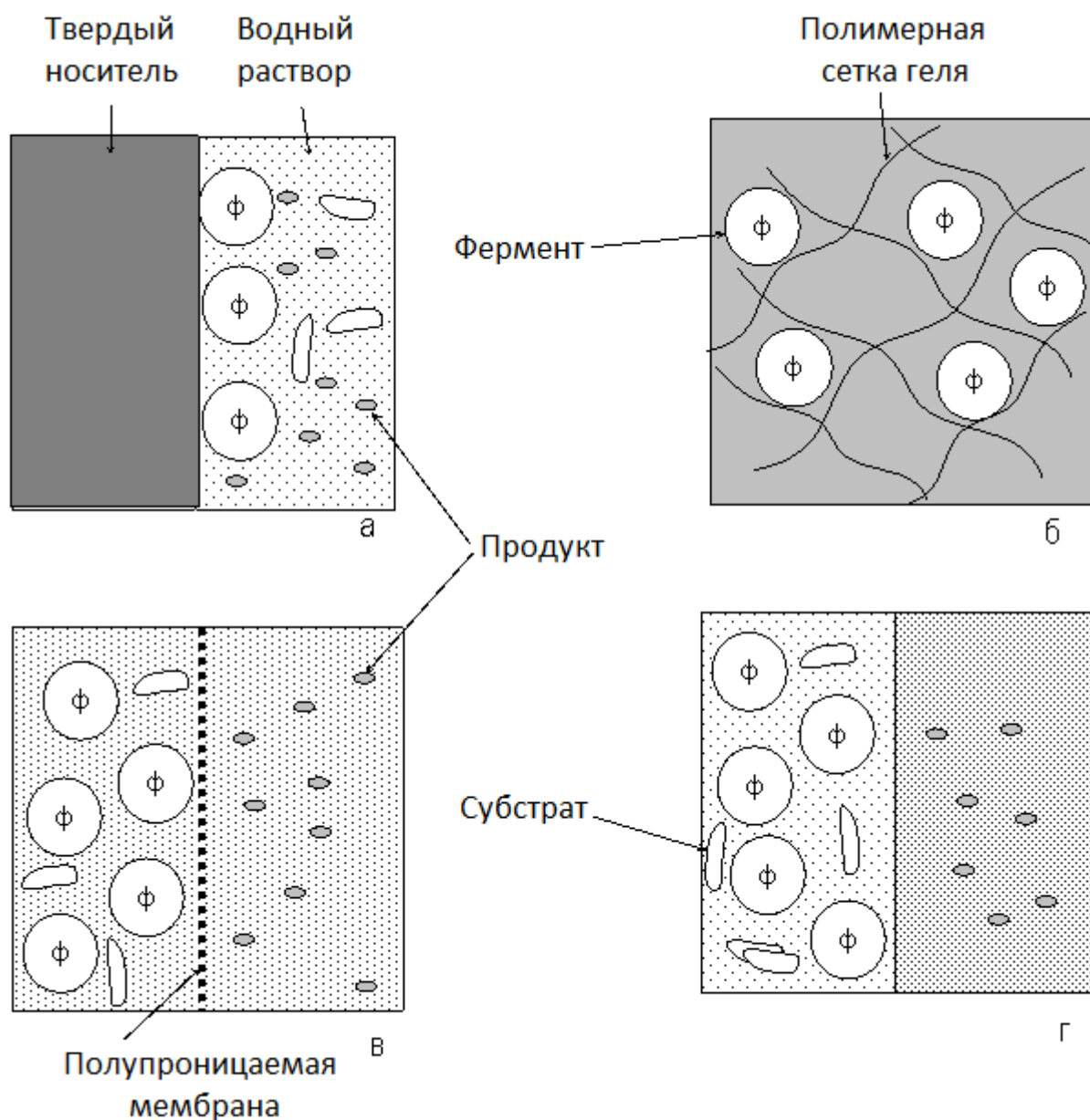


Рис. 2.2. Способы иммобилизации ферментов:

а – адсорбция на нерастворимых носителях; б – включение в поры геля;

в – отделение фермента с помощью полупроницаемой мембраны;

г – использование двухфазной реакционной среды

Адсорбционная иммобилизация является наиболее старым из существующих способов иммобилизации ферментов, начало ей было положено еще в 1916 г. Этот способ достаточно прост и достигается при контакте водного раствора фермента с носителем. После отмывки неадсорбированного белка иммобилизованный фермент пригоден к использованию. Удерживание

адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий между носителем и поверхностными группами белка. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности молекулы фермента. Взаимодействия с носителем могут оказаться настолько сильными, что сорбция биокатализатора может сопровождаться разрушением его структуры. Например, при адсорбции некоторых растительных клеток на гранулах цитодекса клеточная стенка деформируется, повторяя рельеф поверхности частиц носителя. Преимуществом метода адсорбционной иммобилизации является доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в роли носителей. Им также можно придать любую конфигурацию и обеспечить требуемую пористость; важный фактор – простота применяемых методик. При адсорбционном связывании можно решить и проблему очистки фермента, так как связывание белка с носителем во многих случаях достаточно специфично. К сожалению, прочность связывания фермента с носителем не всегда достаточно высока, что ограничивает применение метода. К недостаткам адсорбционной иммобилизации следует отнести отсутствие общих рекомендаций, позволяющих сделать правильный выбор носителя и оптимальных условий иммобилизации конкретного фермента.

Некоторых из перечисленных затруднений можно избежать при иммобилизации ферментов путем включения их в гели. Суть этого метода состоит в том, что молекулы фермента включаются в трехмерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить

также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено водой, на долю которой приходится значительная часть всего объема геля. Например, широко применяемые гели полимеров акриловой кислоты, в зависимости от концентрации полимера и его природы, содержат от 50 до 90 % воды.

Для иммобилизации ферментов в геле существует два основных способа. При одном из них фермент помещают в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. В реакционную смесь часто добавляют также *бифункциональные* (содержащие две двойные связи) *сшивающие агенты*, которые придают образуемому полимеру структуру трехмерной сетки. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем переводят в гелеобразное состояние. Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя. Метод универсален и используется для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и клеток. Фермент, включенный в гель, стабилен и надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу. В то же время эта матрица может создавать значительные препятствия для диффузии субстрата к ферменту, снижая каталитическую эффективность иммобилизованного препарата, поэтому для высокомолекулярных субстратов данный метод иммобилизации не пригоден.

Общий принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран заключается в том, что водный раствор фермента отделяется от водного раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая

мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но является преградой для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Водный раствор фермента можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (*микрокапсулирование*). При двойном эмульгировании получается водная эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащих, в свою очередь, еще более мелкие капли водного раствора фермента. Через некоторое время растворитель затвердевает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферментом. Если взамен водонерастворимого отвердевающего полимера используют жидкие углеводороды с высокой молекулярной массой, метод называют *иммобилизацией путем включения в жидкие мембраны*. К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек относят также *включение в волокна* (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получают нити) и *включение в липосомы*. Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента. Метод, как и предыдущий, достаточно универсален, применим к ферментам, клеткам, а также их фрагментам. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембраны удается избежать значительных диффузионных ограничений скорости ферментативных реакций. Основным недостатком мембранных систем – невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

При иммобилизации ферментов с использованием систем двухфазного типа ограничение свободы перемещения фермента достигается благодаря его способности растворяться только в одной из фаз. Субстрат и продукт ферментативного превращения распределяются между обеими фазами в соответствии с их растворимостями в каждой фазе. Природа фаз подбирается

таким образом, что продукт накапливается в той из них, где фермент отсутствует. После завершения реакции эту фазу отделяют и извлекают из нее продукт, а фазу, содержащую фермент, вновь используют для проведения очередного процесса. Одним из важнейших преимуществ систем двухфазного типа является то, что они позволяют осуществлять ферментативные превращения макромолекулярных субстратов, которые невозможны при применении жестких носителей с ограниченным размером пор.

Главным отличительным признаком химических методов иммобилизации является то, что путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи (в частности, между белком и носителем). Препараты иммобилизованных ферментов, полученные с применением химических методов, обладают, по крайней мере, двумя важными достоинствами. Во-первых, ковалентная связь фермента с носителем обеспечивает высокую прочность образуемого конъюгата. При широком варьировании таких условий, как pH и температура, фермент не десорбируется с носителя и не загрязняет целевых продуктов катализируемой им реакции. Это особенно важно при реализации процессов медицинского и пищевого назначения, а также для обеспечения воспроизводимых результатов в аналитических исследованиях. Во-вторых, химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств – субстратной специфичности, каталитической активности и стабильности. Химическая иммобилизация ферментов является искусством, уровень которого определяется, в первую очередь, умением экспериментатора, основная задача которого заключается в формировании новых ковалентных связей в молекуле фермента при использовании его функциональных групп, несущественных для проявления каталитической активности. При химической модификации фермента его активный центр желательно защищать. При сопоставлении различных приемов иммобилизации химические методы для крупномасштабных биотехнологических процессов кажутся

непривлекательными по причине их сложности и дороговизны. В промышленных процессах обычно используют те или иные методы физической иммобилизации.

3. Катализ процессов гидролитического расщепления органических соединений

Рибонуклеаза

Рибонуклеаза из поджелудочной железы телянка состоит из полипептидной цепи, включающей 124 аминокислотных остатка и сшитой четырьмя дисульфидными мостиками. Она катализирует гидролитическое расщепление молекулы РНК по фосфоэфирной связи. Продуктами гидролиза являются 3'-рибонуклеозид-монофосфаты и олигонуклеотиды, имеющие остаток пиримидин-3'-фосфата.

Фермент был выделен Дюбо в 1940 г. в кристаллической форме, а в 1963 г. Смит, Штейн и Мур опубликовали его полную первичную структуру (рис. 3.1).

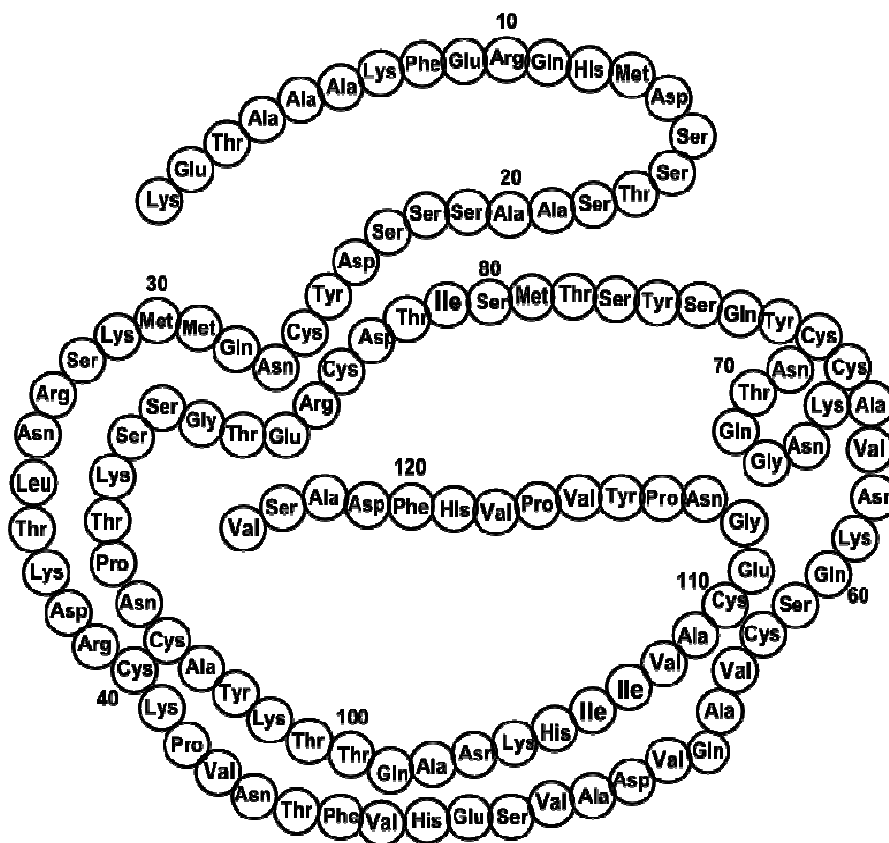


Рис. 3.1. Первичная структура рибонуклеазы из поджелудочной железы телянка

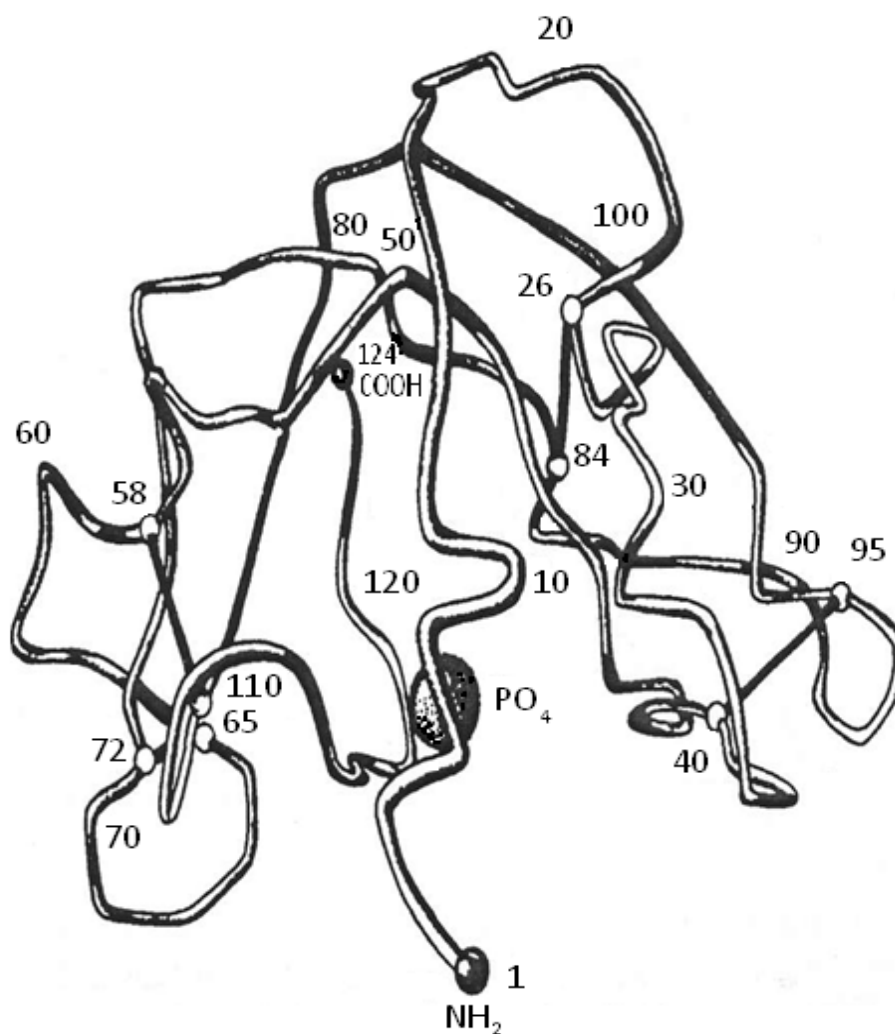


Рис. 3.2. Модель пространственной структуры рибонуклеазы А

Третичная структура была установлена с помощью рентгеноструктурного анализа (с разрешением 0,55 нм), а также в лаборатории Карты [2].

Рибонуклеаза представляет собой молекулу почкообразной формы размером $3,8 \times 2,8 \times 2,2$ нм (рис. 3.2). Активный центр фермента находится в «почечной борозде» – характерной щели, разделяющей молекулу на две половины и содержащей ответственные за каталитическую активность остатки гистидина и лизина. При восстановлении меркаптоэтанолом в растворе мочевины молекула рибонуклеазы разворачивается в биологически неактивную неупорядоченную структуру. Большое значение имело открытие, что при реокислении восстанавливается полная биологическая активность фермента.

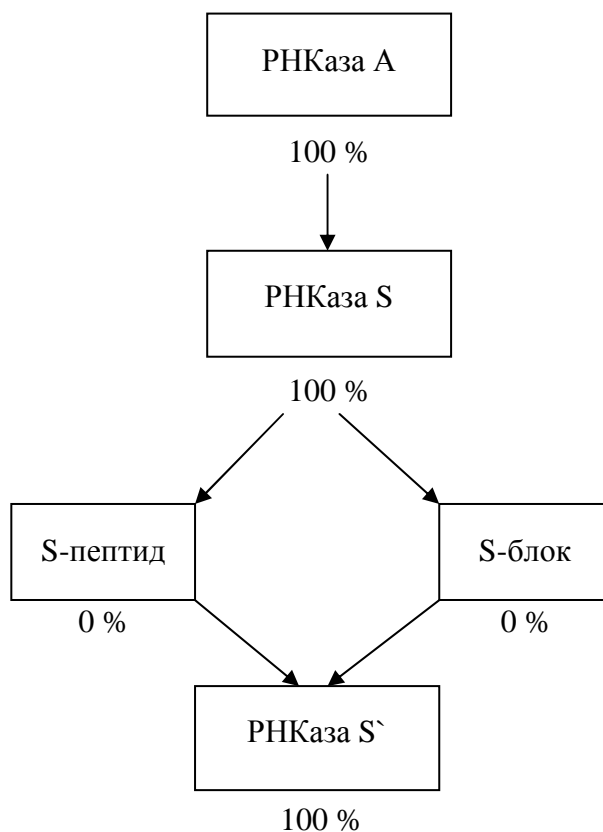


Рис. 3.3. Схема ферментативного расщепления рибонуклеазы А и рекомбинации продуктов расщепления

Рибонуклеаза А при обработке *бактериальной протеазой субтилизином* расщепляется на *S-пептид* (1–20) и *S-белок* (21–124), содержащий 4 дисульфидных мостика (рис. 3.3). Оба компонента после разделения показывают ничтожную биологическую активность. Однако, если смешать их друг с другом, биологическая активность восстанавливается, т.е. *S-пептид* и *S-белок* с помощью невалентных связей «собираются» в так называемую *рибонуклеазу S*, обладающую специфической пространственной структурой. Для рибонуклеазы найдено, что около половины *S-пептида* находится в виде α -спирали. Вся молекула содержит 15 % спиральной и 75 % β -структуры *S-пептида*, который образует *статистический клубок*. Спиральная конформация возникает лишь после соединения с *S-белком*. Для связывания *S-пептида* и *S-белка* важен остаток фенилаланина.

Рибонуклеаза была первым ферментом, который удалось получить химическим синтезом. В поджелудочной железе, помимо рибонуклеазы А, присутствуют рибонуклеазы В, С и D. Эти ферменты относятся к гликопротеинам и имеют различное содержание углеводов.

Лизоцим

Лизоцим – бактериолитическая гидролаза, широко распространенная в бактериях, растениях, позвоночных и беспозвоночных. Фермент катализирует гидролитическое расщепление пептидогликанов бактериальных мембран по β -1,4-связи между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмураминовой кислотой, выполняя тем самым важную защитную функцию против проникновения бактерий в организм.

Животные лизоцимы состоят из одной полипептидной цепи, включающей 129 аминокислотных остатков, гомологичны между собой и сворачиваются при участии 4 дисульфидных мостиков в характерные третичные структуры. Рентгеноструктурными исследованиями комплексов лизоцима с ингибиторами (например, комплекса, состоящего из лизоцима и конкурентного ингибитора N-ацетилглюкозаминтрисахарида) были получены детальные представления об активном центре фермента.

Распределение электронных плотностей на атомах лизоцима изучалось на основании данных *дифференциальной синтеза Фурье*, а связывание субстрата было рассмотрено на примере гексасахарида, построенного из N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты. Модельный субстрат фиксируется водородными связями [3]. Расщепляемая гликозидная связь субстрата встраивается между карбоксильными группами глутаминовой и аспарагиновой кислот; это позволяет закончиться синхронному процессу разрушения связи (рис. 3.4).

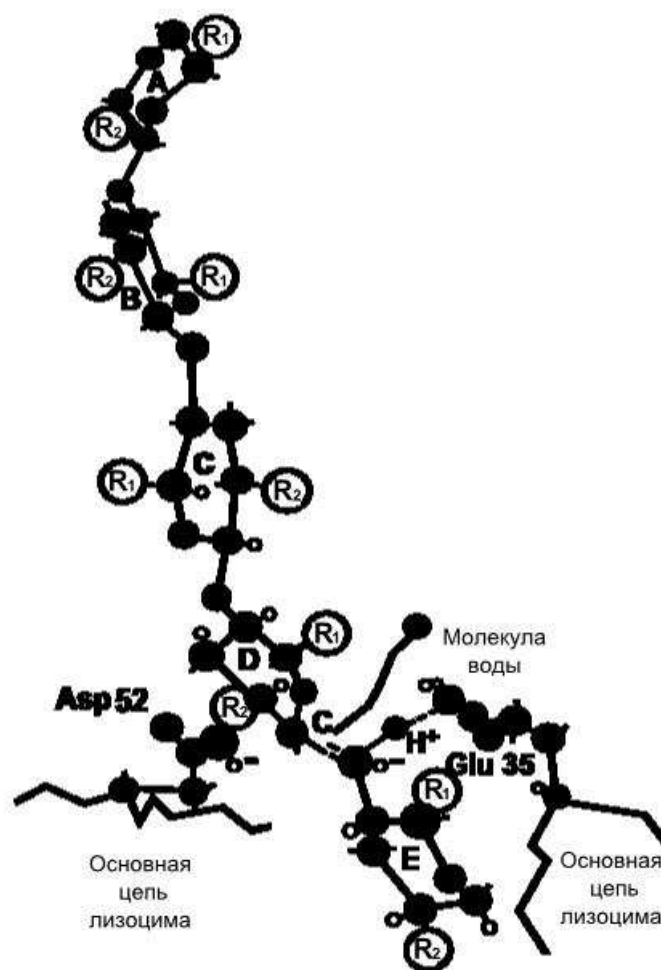


Рис. 3.4. Механизм катализа лизоцимом по Филлипсу:
 R_1 – группа связей CH_2OH ; R_2 – группа связей NH-CO-CH_3

Химотрипсин

Химотрипсин – наиболее изученный протеолитический фермент. Он катализирует гидролитическое расщепление пептидной (или сложноэфирной) связи, в образовании которой принимают участие фенилаланин, тирозин или триптофан. Образование химотрипсина происходит в поджелудочной железе. На рис. 3.5 приведена модель химотрипсина.

Ферментативное действие химотрипсина, как и других панкреатических протеаз (трипсина, эластазы), соответствует механизму общего кислотно-основного катализа, в котором в качестве «системы переноса заряда»

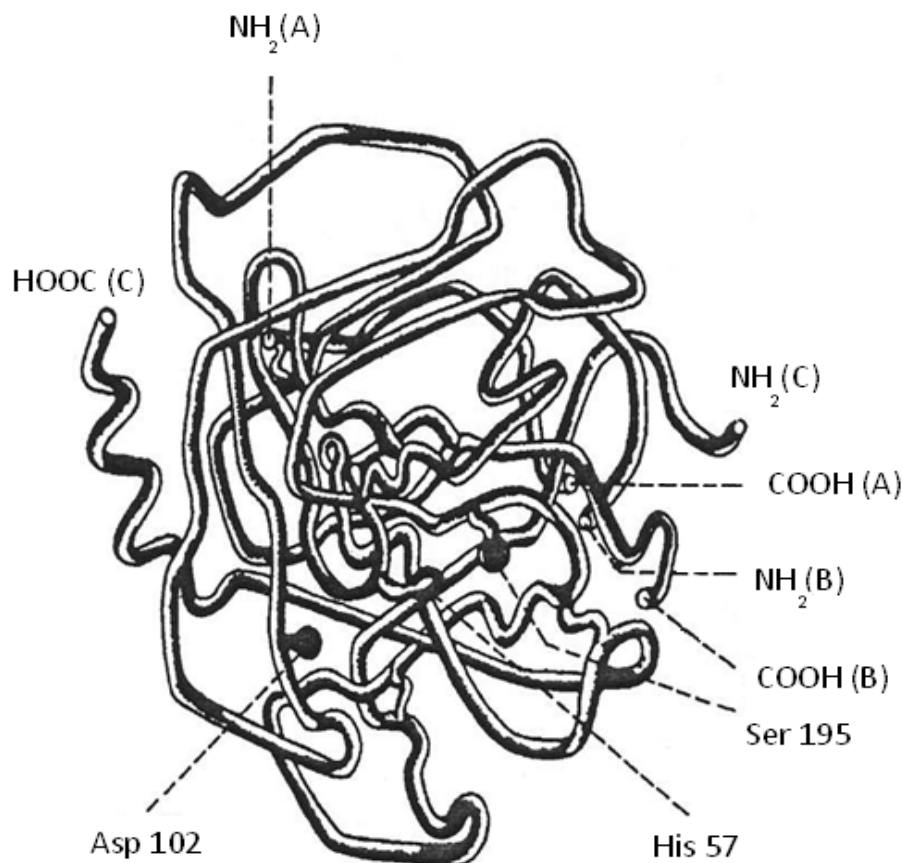


Рис. 3.5. Трехмерная структура химотрипсина

принимают участие остатки аминокислот His⁵⁷, Asp¹⁰² и Ser¹⁹⁵. Передача электронной плотности от заряженной отрицательно при рН 8 карбоксильной группы аспарагиновой кислоты через имидазольное кольцо гистидина к кислороду боковой цепи серина обуславливает повышение его нуклеофильности настолько, что может осуществляться активное воздействие на карбонильный углеродный атом пептидной связи [3].

На промежуточно образующемся О-ацильном производном серина перенос заряда обрывается, но на последующей стадии он восстанавливается снова. Гидролитическое расщепление пептидной связи может быть рассмотрено как перенос ацила, при котором осуществляется перемещение ацильного остатка с аминогруппы на молекулу воды (рис. 3.6).

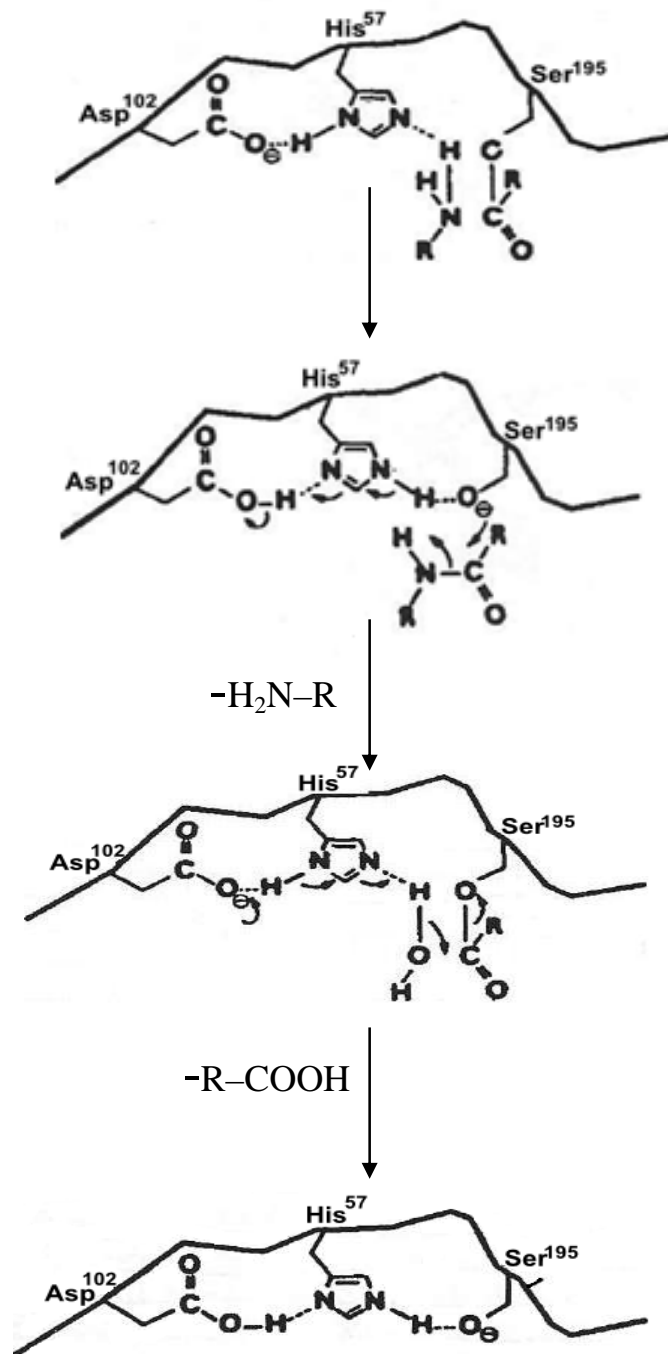


Рис. 3.6. Процесс протеолиза, катализируемый химотрипсином

Карбоксипептидаза А

Карбоксипептидаза А – металлофермент, способствующий гидролитическому отщеплению С-концевых остатков аминокислот.

Для работы фермента необходим ион Zn^{2+} , который, с некоторыми ограничениями, может быть замещен на ионы других переходных металлов.

Карбоксипептидаза А образуется под действием трипсина из неактивного предшественника – прокарбоксипептидазы. Полипептидная цепь фермента состоит из 307 аминокислот и содержит один дисульфидный мостик.

Молекула фермента имеет эллиптическую форму размером $5,2 \times 4,4 \times 4,0$ нм. Для нее характерна β -структура, состоящая из 8 параллельных и 8 антипараллельных участков и обрамленная с обеих сторон 8 спиральями.

Ион цинка лежит в одной из складок на поверхности и принимает активное участие в каталитическом процессе. Он образует координационные связи с остатками гистидина (положения 69 и 196), глутаминовой кислоты (положение 72), а также карбонильным кислородом расщепляемой пептидной связи [4].

Дисульфидный мостик связывает цистеины в положениях 138 и 168. Остаток аргинина-145 связывает С-концевой карбоксилатный анион субстрата (рис. 3.7). Одновременно благодаря тому, что позиция аргинина изменяется, остаток тирозина может принять роль донора протона для группы $-NH$ расщепляемой цепи. Остаток глутаминовой кислоты-270 благоприятствует нуклеофильной атаке молекулы воды на карбоксильную группу пептидной связи, сильно

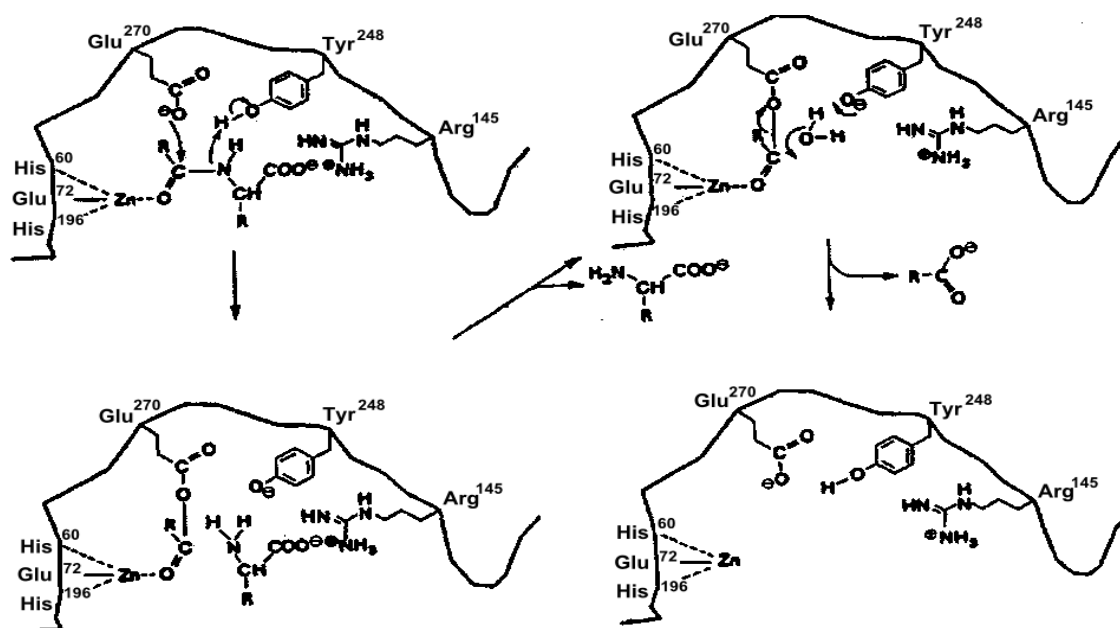


Рис. 3.7. Каталитическое отщепление С-концевой аминокислоты карбоксипептидазой А

поляризованной координацией с ионом цинка. Механизм действия карбоксипептидазы поясняет рис. 3.7.

4. Биосинтез первичных метаболитов и особенности регуляции по принципу обратной связи

4.1. Биосинтез первичных метаболитов

К первичным метаболитам относятся конечные продукты жизнедеятельности микроорганизмов, обладающие низкой молекулярной массой и используемые клеткой в качестве «строительных блоков» для жизненно важных макромолекул либо превращения в коферменты. Получаемые промежуточные продукты биосинтеза, отвечающие указанному требованию, также рассматриваются как первичные метаболиты [5].

Другая группа первичных метаболитов включает полупродукты основных путей метаболизма – в частности, пентозофосфатного пути и цикла трикарбоновых кислот. Например, такие органические кислоты, как лимонная и fumarовая, относят к первичным метаболитам. Продуцирование избыточного количества первичных метаболитов предотвращается большинством самих микроорганизмов, поскольку такой процесс истощает их и уменьшает способность к выживанию.

Микроорганизмы, способные к повышенному продуцированию, отбираются путем реализации специальных исследовательских программ по изысканию потенциальных «рабочих» культур для ферментации.

В ходе исследований с целью увеличения способности микроорганизмов к продуцированию нужных веществ и ингибирования регуляционных механизмов широко применяют генетические воздействия, а также изменяют условия окружающей среды.

4.2. Регуляция по принципу обратной связи

Регуляция по принципу обратной связи представляет собой метод контроля жизнедеятельности микроорганизмов для предотвращения чрезмерного синтеза аминокислот. Известны две методики [5], первая из которых основана на ограничении способности клетки к аккумуляции внутриклеточных ингибиторов и репрессоров, принадлежащих к конечным продуктам метаболизма, а вторая – на генетическом изменении самого фермента или системы, его образующей, до состояния менее чувствительного к влиянию по принципу обратной связи. Для простой цепи превращений ограничение способности клетки к накоплению внутриклеточных ингибиторов или репрессоров часто применяют на практике с целью получения промежуточных продуктов реакций. Принцип такого ограничения показан на рис. 4.1. Если желательно аккумулировать в клетке промежуточный продукт *C*, сначала получают *ауксотрофный* (питательный) мутант, лишенный фермента *C*. Такой мутант требуется для роста *E*. Если к клетке подводится недостаточное количество *E*, организм не в состоянии аккумулировать ингибирующие или подавляющие концентрации *E*, и тогда приводятся в действие реакции *A* и *B*, которые ингибируются регуляцией по принципу обратной связи. В клетке аккумулируются высокие концентрации *C*,

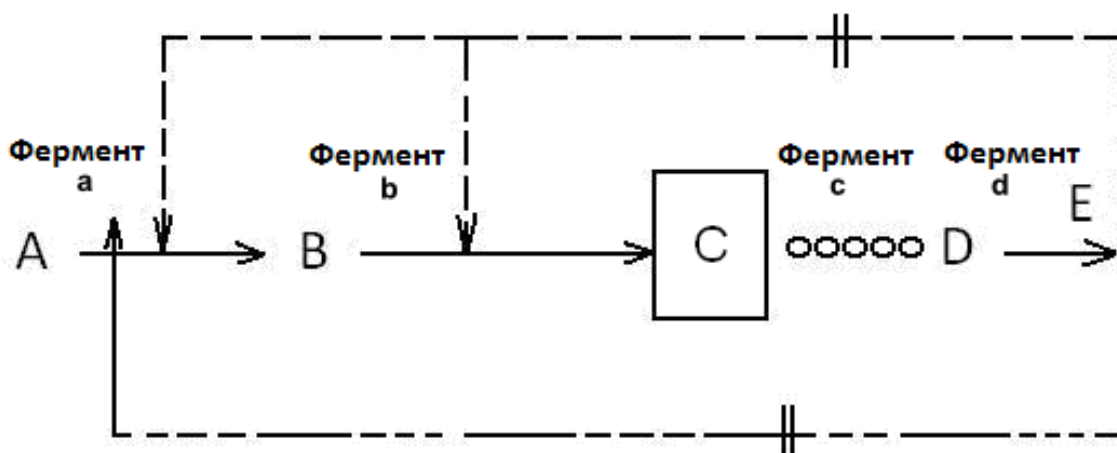


Рис. 4.1. Перепроизводство промежуточного продукта обмена в простой цепи метаболических превращений

и этот продукт выделяется в среду. Это может быть использовано для получения надлежащих выходов определенных продуктов метаболизма и при разветвленных схемах биосинтетических превращений.

4.3. Накопление конечных продуктов метаболизма

Более сложной задачей является обеспечение преимущественного накопления конечных, а не промежуточных продуктов метаболизма. Она может быть решена при наличии разветвленной схемы биосинтетических превращений. Рассмотрим именно такую схему метаболизма, приводящую к получению конечных продуктов *A* и *B*. Часто удается интенсифицировать синтез продукта *A* путем уменьшения концентрации *B*. Примером может служить *ферментация лизина* [5].

Лизин относится к аминокислотам, получаемым в промышленных масштабах ферментацией. Он важен как питательная добавка, поскольку большинство белков злаковых растений испытывают в нем острый дефицит. В бактериях лизин продуцируется по разветвленной схеме биосинтеза, в результате чего получают также *метионин*, *треонин* и *изолейцин*. После каждого разветвления первоначальные ферменты ингибируются соответствующими конечными продуктами, и «перепроизводства» ферментов не происходит.

Однако организмы, применяемые при ферментации лизина (*Corynebacterium glutamicum* и *Brevibacterium flavum*), имеют, как показано на рис. 4.2, единственную *аспартокиназу*, получение которой регулируется путем согласованного ингибирования по принципу обратной связи *треонином* и *лизином*. При генетическом удалении *гомосериндегидрогеназы* образуется мутант, который не может расти, пока к среде добавляется *метионин* и

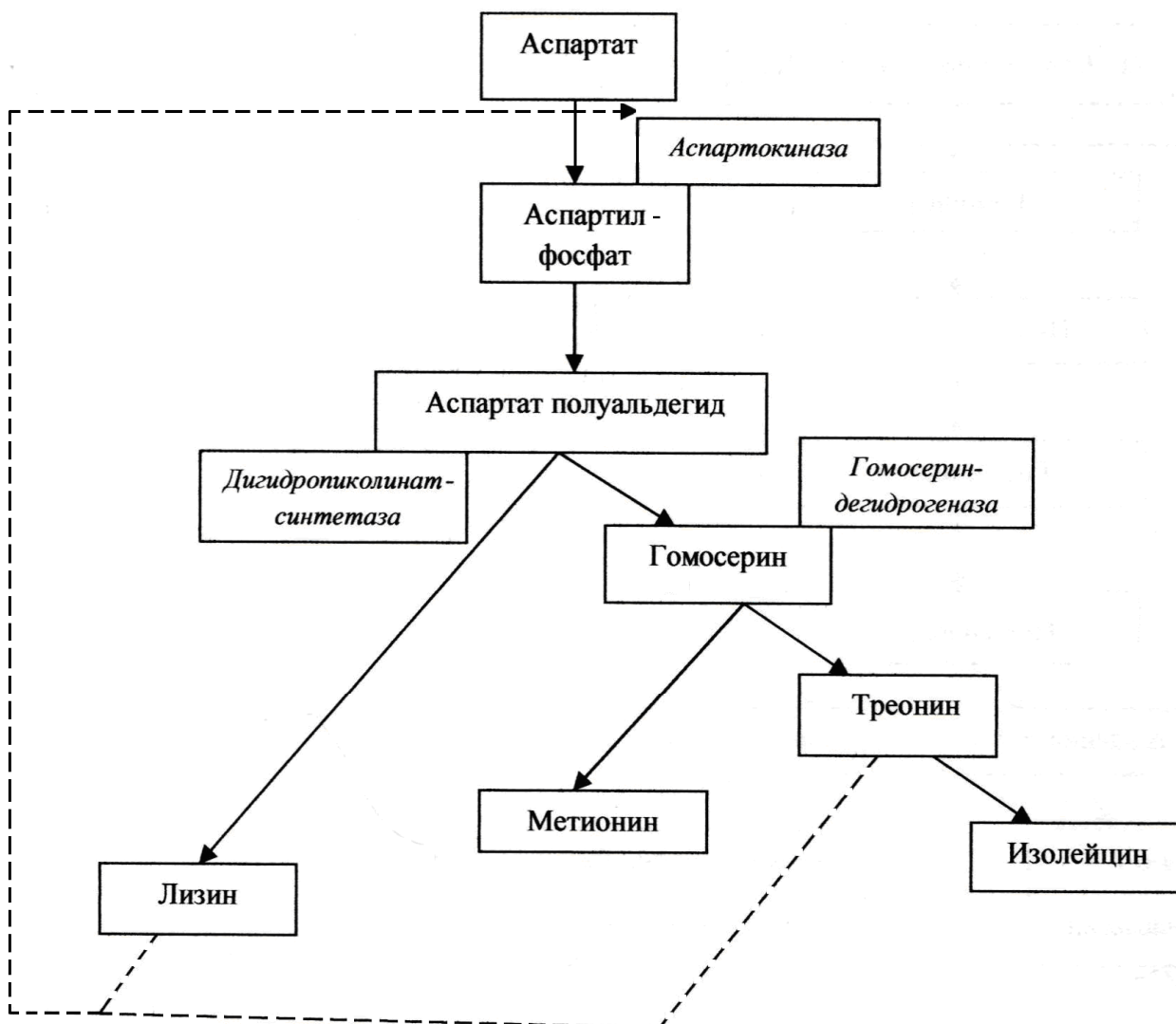


Рис. 4.2. Ферментация лизина

треонин. Пока добавки треонина поддерживаются на низком уровне, внутриклеточная его концентрация является ограниченной и ингибирование аспартокиназы по принципу обратной связи байпассируется. По этой причине промежуточные продукты метаболизма отводятся в направлении лизиновой ответвления схемы.

Можно отметить, что высокопродуктивные лизиновые штаммы отличаются следующими показателями:

- не наблюдается подавления аспартокиназы или аспартат-полуальдегиддегидрогеназы по принципу обратной связи;

– первый и второй ферменты лизинового ответвления не ингибируются и не подавляются лизином;

– отсутствует L-лизиндекарбоксилаза.

Такая специфичность позволяет этим мутантам продуцировать лизин в количестве не менее 50 г/л.

4.4. Мутанты, резистентные к воздействию по принципу обратной связи

Самым легким путем выделения мутантов, резистентных к ингибированию или подавлению по принципу обратной связи, служит отбор по показателю устойчивости к токсическим аналогам целевых соединений.

Механизм отбора может быть объяснен на примере мутанта для повышенного продуцирования аминокислоты. *Аминокислота А* обычно ингибирует и подавляет собственные биосинтетические ферменты и входит также в состав белка. В то время как подавляющее большинство клеток, экспонированных к *А*, отмирает по причине голодания в отношении *А*, мутанты, нечувствительные к *А*, могут оставаться способными производить *А* и расти в виде колоний.

Благодаря указанным явлениям, эти мутанты обладают повышенной продуктивностью по *А*. В табл. 4.1 перечислены аналоги, которые были применены для селекции мутантов с повышенным выходом в отношении аминокислот, пуринов и витаминов.

Хорошим примером использования данного метода является разработка биохимического синтеза треонина – аминокислоты, незаменимой для полноценного питания людей и животных. Процесс осуществляют с помощью мутанта *Brevibacterium flavum*, который способен продуцировать L-треонин в количестве 14 г/л.

Примеры аналогов для селекции мутантов,
способных к повышенной продуцируемости метаболитов

Аккумулируемый продукт	Аналоги для селекции
Фенилаланин	n-фторфенилаланин; тиенилаланин
Тирозин	D-тирозин
Триптофан	5-метилтриптофан; 6-метилтриптофан; 5-фтортриптофан
Гистидин	2-тиазолаланин; 1,2,4-триазол-3-аланин
Пролин	3,4-дегидропролин
Валин	α -аминомасляная кислота
Изолейцин	Валин; изолейцингидроксамат; α -амино- масляная кислота; α -амино- β -гидрокси- валериановая кислота; O-метилтреонин
Лейцин	Трифторлейцин; 4-азалейцин
Треонин	α -амино- β -гидроксивалериановая кислота
Метионин	Этионин; норлейцин; α -метилметионин; L-метионин-D, L-сульфоксимин
Аргинин	Канаванин; аргинингидроксамат, D-аргинин
Аденин	2,6-диаминопурин
Урацил	5-фторурацил
Гипоксантинн, инозин	5-фторурацил, 8-азагуанин
Гуанозин	8-азаксантин
Никотиновая кислота	3-ацетилпиридин
Пиридоксин	Изониазид
n-аминобензойная кислота	Сульфонамид
Тиамин	Пиритиамин

Мутации в направлении достижения резистентности к ингибированию и подавлению по принципу обратной связи, будучи объединенными в одном штамме, часто имеют результатом синергизм в отношении продуктивности. Практическим приложением является попытка увеличить содержание метионина в дрожжевых клетках. Эта попытка предпринята, поскольку содержание незаменимой аминокислоты метионина в дрожжевом белке чрезвычайно низкое. Микроб *Candida petrophilum* был мутирован в направлении придания ему резистентности к метионину. В результате внутриклеточная концентрация свободного метионина в пуле аминокислот

увеличилась. Это привело к повышению на 40 % полного содержания его в клетке (с 9 до 13 мг/г по СВ клеток).

Если культура по своей природе резистентна к аналогам, ее можно превратить в чувствительную к этим факторам культуру посредством изменения питательной среды. Так, культура *Pseudomonas aeruginosa* при выращивании на глюкозе резистентна ко многим аналогам, но становится чувствительной к ним при выращивании на фруктозе.

Отсутствие ферментов, чувствительных к воздействию конечных продуктов по принципу обратной связи, вследствие восстановления их с помощью вторичных мутаций, часто приводит к возникновению ревертантов, которые выделяют важные конечные продукты. В результате получают ферменты с измененной последовательностью чередования аминокислот, которые, пусть и сохраняют каталитическую активность, но не связывают уже ингибитор, работающий по принципу обратной связи.

4.5. Изменение проницаемости мембраны

Повышенная продуктивность микроорганизмов по глутаминовой кислоте обусловлена увеличенной проницаемостью их мембраны. Эта кислота является одним из важнейших промышленных продуктов (в виде глутамата натрия ее применяют для улучшения вкуса пищевых продуктов). Фактически всю производимую глутаминовую кислоту получают биосинтетическим путем.

Основным направлением продуцирования глутамата из глюкозы являются путь *Эмбдена – Мейергофа* (рис. 4.3). Молярный выход глутамата достигает 50 % общих сахаров, а концентрация его в культуральной жидкости (КЖ) – 90 г/л.

Модификация проницаемости осуществляется благодаря ограничению роста путем добавления *биотина* (см. рис. 4.4) *либо пенициллина*, а также *производных жирных кислот*.

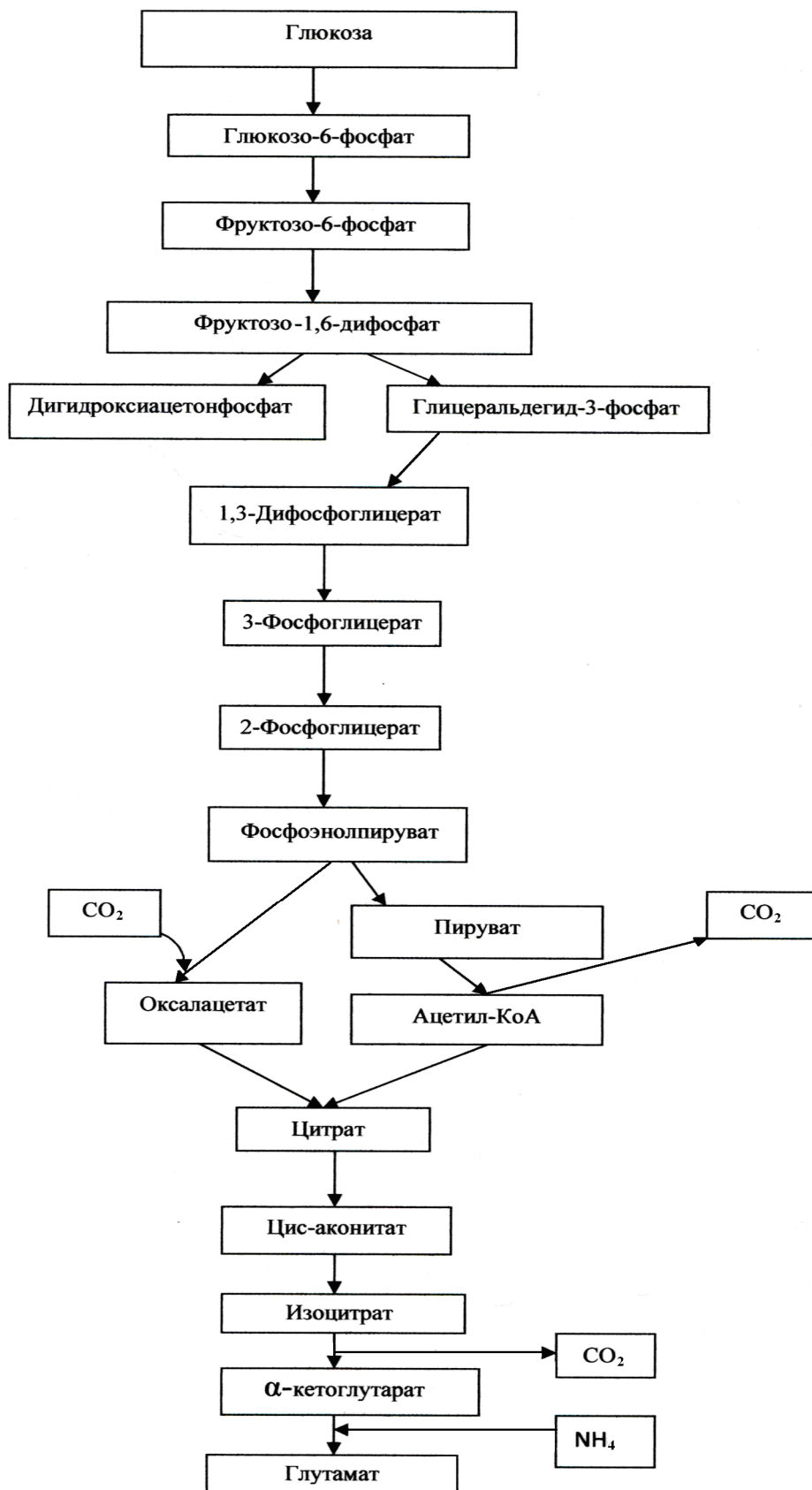


Рис. 4.3. Метаболические пути превращений при производстве глутамата из глюкозы

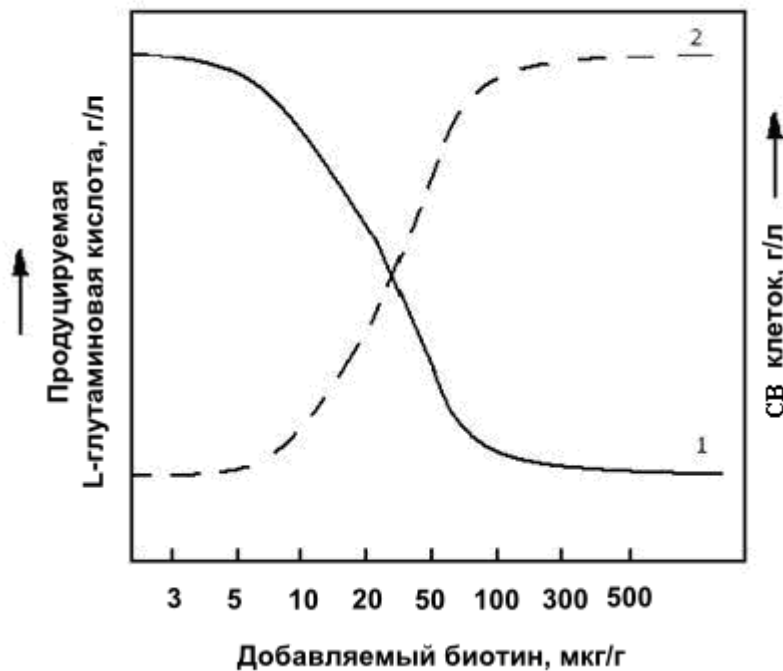


Рис. 4.4. Рост и продуцирование глутамата при различных уровнях биотина:

1 – кривая продуцирования глутамата; 2 – кривая роста

Добавление к среде выращивания пенициллина во время логарифмической фазы роста позволяет глутамату выходить из клетки, вследствие чего внутриклеточный уровень аминокислоты быстро снижается до 5 мг/г клеток. Клетки продолжают выделять глутамат в течение 40–50 ч.

К клеточным изменениям, сопровождающим выделение глутамата, относят: изменение сферической формы до очертаний набухших палочек; проявление активности внутриклеточного фермента при измерении на интактных клетках; потерю аминокислотного клеточного пула при промывании клеток и уменьшение «упакованного» объема клеток, несмотря на отсутствие их лизиса.

Биотин контролирует проницаемость посредством выполнения своей роли в синтезе жирных кислот. Дефицит биотина (так же, как добавление производных жирных кислот или пенициллина) вызывает значительные изменения в липидном составе оболочек микроорганизмов, обладающих повышенной продуктивностью по глутамату.

Ключевым результатом такого дефицита является образование мембран, обедненных фосфолипидами. Для успешной ферментации аминокислоты критическое содержание в среде биотина выбирают так, чтобы оно соответствовало концентрации 1–5 мкг/л.

Пенициллин или производные жирных кислот следует добавлять в среду в качестве тормозящего фактора – в логарифмической фазе роста. Хотя пенициллин не ингибирует синтез фосфолипидов, введение его приводит к немедленному выделению фосфолипидов.

С помощью специальных штаммов глутамат можно получать не только из глюкозы, но и других источников углерода. Так, концентрация глутамата в культуральной жидкости при использовании этанола составляет ~ 60 г/л.

Когда механизм проницаемости клеточной мембраны изменяется под воздействием ограничения роста микроба биотином или добавления пенициллина, глутамат выходит из клетки и не может служить внутриклеточным предшественником других аминокислот.

5. Биосинтез вторичных метаболитов, специфика регуляции по принципу обратной связи и контроль вторичного метаболизма

5.1. Биосинтез вторичных метаболитов

Вторичные метаболиты представляют собой молекулы веществ, синтезируемые микроорганизмами обычно на последних фазах ростового цикла. Хотя эти метаболиты для роста не требуются, они могут играть важную роль в жизнедеятельности производящего их организма. Среди вторичных метаболитов широко известны *антибиотики, микотоксины и пигменты*.

5.2. Влияние предшественников

При реализации программ по получению вторичных метаболитов часто изучается возможность изменения состава среды путем введения различных добавок в качестве возможных предшественников целевых продуктов.

Примерами предшественников продуктов направленного биосинтеза могут служить *фенилуксусная кислота* при получении *бензилпенициллина*, специфические аминокислоты в производстве *актиномицинов* и др. Во многих случаях предшественники не проявляют активности, поскольку их синтез не лимитирует скорости всего процесса. При этом «экранирование» примесей оказывает стимулирующее или ингибирующее действие на молекулы непредшественников и влияет на ход образования вторичных метаболитов.

5.3. Зависимость трофофаза – идиофаза

Для вторичного метаболизма характерно, что соответствующие метаболиты обычно не продуцируются в фазе интенсивного роста (*трофофазе*), а образуются на последующей стадии продуцирования (*в идиофазе*), как это показано на рис. 5.1.

Этот феномен впервые наблюдался еще при разработке процесса синтеза пенициллина, но продуцирование в идиофазе, как теперь установлено, является характерной чертой многих биотехнологических процессов.

В начале трофофазы большинство микроорганизмов чувствительны к собственным антибиотикам, и только для идиофазы характерно, что они становятся физиологически резистентными к антибиотикам, которые сами продуцируют.

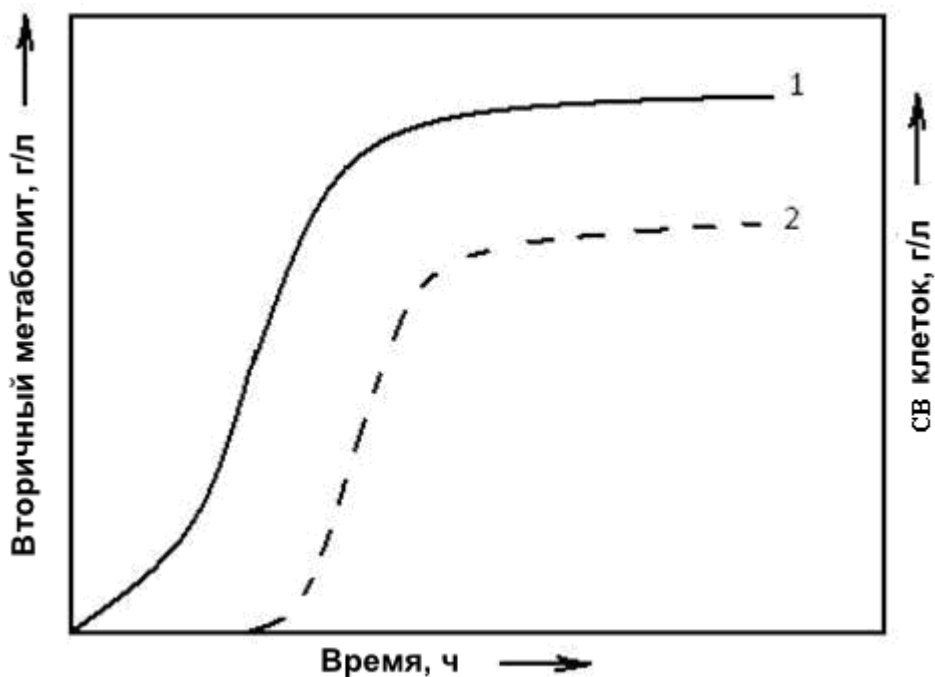


Рис. 5.1. Образование вторичного метаболита на стадии идиофазы, следующей за трофофазой: 1 – рост; 2 – продукт

Отдельные ключевые ферменты, вступающие в действие в конце трофофазы, указаны в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Ферменты, вступающие в действие в конце трофофазы, при вторичном биосинтезе

Фермент	Метаболит
Амидинотрансфераза	Стрептомицин
Ацилтрансфераза	Пенициллин
Фенилацетатактивирующий фермент	Пенициллин
Оксидоредуктаза	Тилозин
Трансметилаза	Тилозин
Синтетазы I и II	Грамицидин S
Феноксазион синтетаза	Актиномицин
Диметилаллилтрансфераза	Эрготные алкалоиды
Чаноклавин-I-циклаза	Эрготные алкалоиды
ГТФ-8-формилгидролаза	Пирролопиримидиннуклеозиды

Возможно, эти ограничения при поступлении к микроорганизмам недостающих питательных веществ обуславливают то, что индукторы ферментов вторичного метаболизма аккумулируют или высвобождают гены вторичного метаболизма из-под влияния катаболитного подавления.

5.4. Индукция ферментов при продуцировании вторичных метаболитов

Доказательства того, что индукция ферментов играет определенную роль в продуцировании вторичных метаболитов, получены при исследовании роли триптофана как стимулятора биосинтеза алкалоидов у *Claviceps* (грибов семейства спорыньевых). Полагают, что его стимулирующее действие связано с индукцией *алкалоидобразующих ферментов*. Это заключение сделано на основании следующего [5]:

- аналоги триптофана, которые не включаются в структуру алкалоидов, тоже стимулируют их продуцирование;
- триптофан должен добавляться во время трофофазы, так как добавление его во время идиофазы приводит к незначительному эффекту;
- добавленный триптофан удаляется из среды во время роста микроорганизма, и его концентрация внутри микробных клеток перед продуцированием алкалоида в 2–3 раза выше нормальной внутриклеточной концентрации.

Индукция играет важную роль в определении соотношения связанных друг с другом антибиотиков в ферментационном бульоне.

5.5. Регуляция по принципу обратной связи

Во вторичном метаболизме определенную роль играет регуляция по принципу обратной связи. Например, *хлорамфеникол* ингибирует свой собственный биосинтез. Это же свойство также присуще, например, *пенициллину*, *ристомицину* и *вирджиниамицину*.

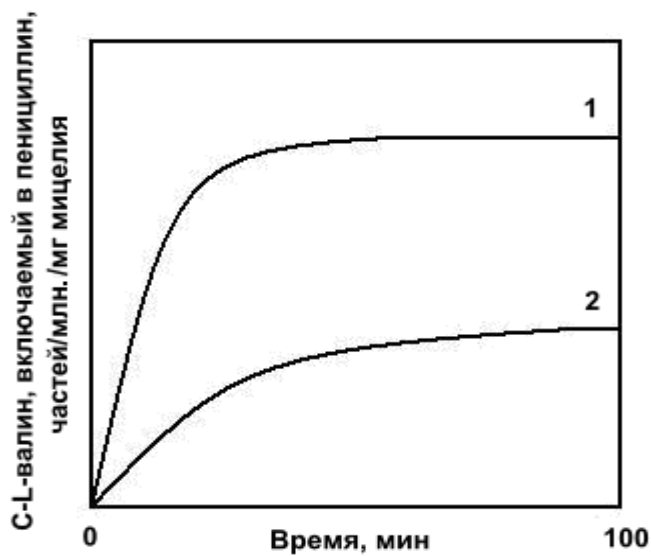


Рис. 5.2. Ингибирование L-лизином C-L-валина, включаемого в пенициллин у *Penicillium chrysogenum*: 1 – контроль; 2 – L-лизин

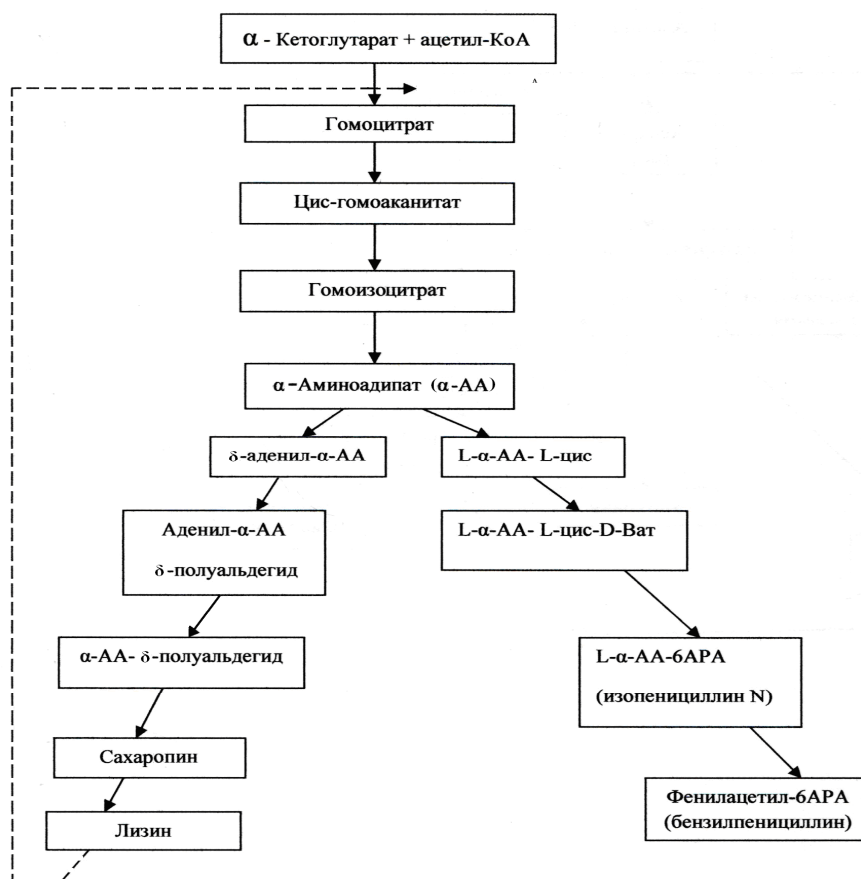


Рис. 5.3. Разветвленная цепь метаболических превращений, ведущих к образованию лизина и пенициллина у *Penicillium chrysogenum*

Биосинтез пенициллина микроорганизмом *Penicillium chrysogenum* подвергается ингибированию по принципу обратной связи со стороны *L*-лизина (рис. 5.2). Причину такого эффекта можно установить, если детально рассмотреть разветвленный процесс, представленный на рис. 5.3.

Один из промежуточных продуктов биосинтеза лизина, а именно α -аминоадипат, также вовлекается в биосинтез пенициллина. По принципу обратной связи, ингибирование лизином первого фермента его собственного биосинтеза ограничивает продуцирование α -аминоадипата и косвенным путем ингибирует биосинтез пенициллина. Следовательно, если в процессе ферментации пенициллина добавляют α -аминоадипат, ингибирующее влияние лизина нейтрализуется.

Другой способ, с помощью которого регуляция по принципу обратной связи контролирует образование вторичных метаболитов, заключается в ингибировании и подавлении фосфатаз фосфатами. Многие ферментации ингибируются такими концентрациями фосфата, которые для роста являются неингибирующими. Схема биосинтеза должна включать действие фосфатазы.

5.6. Контроль вторичного метаболизма методом байпасирования

Многие методы метаболического контроля и регулирования основаны на принципе байпасирования или изменения состава среды, в которой проводятся те или иные процессы.

Именно поэтому в процессе алкалоидных ферментаций добавляют индуктор *триптофан*; ограничивают количество фосфатов при получении стрептомицина во избежание ингибирования по принципу обратной связи вовлекаемых в биосинтез фосфатаз. Такие быстро метаболизируемые сахара, как глюкоза, вообще устраняют из среды или (при получении, например, пенициллина) медленно вводят в реакционную среду во избежание подавления

биосинтетических ферментов. При этом важнейшее влияние на продуцирование вторичных метаболитов оказывают мутации.

В отношении вторичного метаболизма мутации были использованы для того, чтобы получить высокоэффективные *продуценты хлортетрациклина*. Организм подвергали мутации до состояния, при котором способность к продуцированию антибиотика вообще исчезала, после чего организм возвращали в состояние активного продуцирования.

Когда вторичный метаболит сам является ингибитором роста продуцента (это имеет место при получении антибиотиков), для селекции резистентных культур с повышенной продуктивностью может быть использован сам антибиотик [5].

6. Обеспечение оптимального роста и продуцирование ферментов

6.1. Первичные факторы, которые необходимо учитывать при осуществлении процесса ферментации

Основная причина интереса, проявляемого к микроорганизмам – потенциальным источникам ферментов, состоит в легкости, с которой уровни накопления ферментов в клетках могут быть повышены путем генетических манипуляций и подбора питательной среды. Чем выше удельная активность ферментов, тем проще добиться их выделения.

Другие причины использования микробных клеток в качестве источников ферментов таковы:

– ферментации, если они проводятся в аппаратуре большой емкости, являются экономичными благодаря коротким циклам и дешевым питательным средам;

– легкость фракционирования; при этом культуры можно исследовать за короткий промежуток времени;

– различные виды микроорганизмов продуцируют неодинаковые ферменты, катализирующие определенные реакции, что позволяет им быстро приспособиться к условиям процессов.

При разработке метода и режима производства ферментов важно начать с правильного выбора активного штамма. Штаммы, продуцирующие тот или иной фермент, могут быть приобретены в других лабораториях, работающих в аналогичной области, либо их берут из музейных коллекций. При отсутствии необходимых микробных культур следует разработать программу их выделения из природных источников. Основным требованием к отбору является простота осуществления процедур, что обеспечивает испытание большого количества штаммов за относительно короткое время.

Если получен хороший штамм, то для того, чтобы вывести на максимальный уровень его рост, необходимо оптимизировать параметры ферментационного процесса. Важно правильно учесть влияние температуры, рН и подачи кислорода. Необходимо также правильно выбрать питание микроорганизма, особенно в отношении источников углерода, азота, фосфора, серы и минеральных солей. Часто, особенно в случае внеклеточных ферментов, большое значение имеет добавление в среду поверхностно-активных агентов. Обычно неионогенные поверхностно-активные вещества предпочитают анионным и катионным агентам, являющимся во многих случаях токсичными для микроорганизмов.

При проведении ферментации должна быть установлена стадия ростового цикла, для которой характерно наивысшее содержание накопившегося фермента. Во многих случаях ферменты, достигающие максимальной активности, быстро исчезают из ферментационной системы. С другой стороны, для получения ферментов пригоден *хемостат*, так как образование многих ферментов регулируется скоростью роста микроорганизмов, которая в непрерывной культуре может поддерживаться постоянной.

В дополнение к указанным факторам чрезвычайно важно использовать генетическую регуляцию процессов биосинтеза ферментов.

6.2. Выбор индуктора

Структурные гены, закодированные на продуцирование многих ферментов, в отсутствие субстратов этих ферментов являются обычно неактивными, т.е., иначе говоря, образование ферментов подавлено. Однако, когда в систему введен соответствующий субстрат, структурные гены включаются в работу, и происходит образование ферментов (рис. 6.1). Такой процесс называют *индукцией* [5], а образующиеся ферменты – *индуцибельными*.

Типичными индукторами являются такие субстраты, как крахмал и декстрин (для амилазы), сахароза (для инвертазы) и мочевины (для уреазы).



Рис. 6.1. Дифференциальный график индукции фермента при введении индуктора



Рис. 6.2. Сравнение потенции субстрата в отношении индукции амидазы при добавлении N-метилацетамида (1) и ацетамида (2)

Часто наиболее сильные индукторы являются аналогами субстратов, которые выступают малоактивными или вообще неактивными субстратами ферментов (рис. 6.2, табл. 6.1).

Индукция ферментов иногда происходит при добавлении в среду выращивания коферментов.

Для устранения зависимости образования ферментов от добавления индуктора могут применяться мутации, именуемые *регуляционными*, т.к. в основе их лежат не структурные, а регуляторные гены [5].

Таблица 6.1

Аналоги субстратов – активные индукторы ферментов

Фермент	Субстрат	Аналог-индуктор
β -галактозидаза	Лактоза	Изопропил- β -D-тиогалактозид
Пенициллин β -лактамаза	Бензилпенициллин	Метициллин
Малеат цис-трансизомеразы	Малеиновая кислота	Малоновая кислота
Алифатическая амидаза	Ацетамид	N-метилацетамид
Тирозиназа	L-тирозин	D-тирозин, D-фенилаланин
Целлюлаза	Целлюлоза	Софороза

Мутанты, которые в обычных условиях продуцируют ферменты без индукторов, называют *конститутивными*. Они могут быть получены различными методами. Один из таких методов состоит в выращивании микроорганизмов в хемостате с лимитирующей концентрацией субстратного индуктора. Другой метод селекции заключается в нанесении популяции мутагенизированных источников углерода на субстрат, который не служит индуктором. В этих условиях могут расти только конститутивные мутанты.

Таблица 6.2

Продукты – индукторы ферментов

Фермент	Микроорганизм	Субстрат	Продукт-индуктор
Глюкоамилаза	<i>Aspergillus niger</i>	Крахмал	Мальтоза; изомальтоза
Амилаза	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Крахмал	Мальтодекстрины
Декстраназа	<i>Penicillium</i>	Декстран	Изомальтоза
Пуллуланаза	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Пуллулан	Мальтоза
Липаза	<i>Geotrichum candidum</i>	Липиды	Жирные кислоты
Эндополигалактуроназа Экзополигалактуроназа Пектинэстераза	<i>Acrocylindrium</i>	Полигалактуроновые кислоты	Галактуроновая кислота
Триптофаноксигеназа	<i>Pseudomonas</i>	Триптофан	Кинуренин
Гистидаза	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Гистидин	Уроканиковая кислота
Мочевинкарбоксилаза	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Мочевина	Аллофановая кислота

Определенные ферменты, указанные в табл. 6.2, продуцируются во время роста клеток, но их образование подавляется в тех случаях, когда конечные продукты обмена концентрируются в культуральной жидкости (КЖ) или когда они дополнительно вводятся в среду выращивания [5]. Такие низкомолекулярные продукты обмена (*корепрессоры*) взаимодействуют с внутриклеточным белком (*апорепрессором*), закодированным регуляционными генами, с образованием репрессора. Затем репрессор выключает из работы структурные гены, кодирующие ферменты. Такие ферменты называют *подавляемыми*.

Отдельные ферменты подавляются ближайшими или отдаленными продуктами жизнедеятельности микроорганизмов.

Устранение указанных соединений из среды выращивания в ряде случаев значительно увеличивает выходы ферментов. Так, при выращивании микроорганизмов лимит по аммиаку в среде подавляет многие ферменты, которые катаболизируют азотистые соединения. К таким ферментам относят *протеазы, уреазы, рибонуклеазы, аргиназы и аллантоиназы*.

Подавление биосинтетических ферментов конечными продуктами обмена более часто происходит, чем не происходит. Посредством ограничения внутренней аккумуляции конечных репрессоров можно добиться существенного увеличения продуцирования ферментов.

Одним из путей к ограничению внутреннего накопления конечных продуктов является добавление соответствующего ингибитора. Добавление к бактериальной культуре *2-тиазолаланина* может более чем в 30 раз увеличить накопление десяти ферментов биосинтеза гистидина. Другой путь снижения накопления конечных продуктов заключается в ограничении подвода ростовых факторов питания к *ауксотрофному мутанту*. При этом частичное голодание приводит к интенсивному продуцированию ферментов, как это показано в табл. 6.3.

Перечень питательных веществ,
влияющих на биосинтез ферментных препаратов

Питательное вещество, в котором имеется аукстрофная потребность	Снимается подавление фермента	Увеличение синтеза фермента
Гистидин	10 ферментов биосинтеза гистидина	В 25 раз
Лейцин	Оксиуксуснокислая синтетаза	В 40 раз
Тиамин	4 фермента биосинтеза тиамина	До 1500 раз
Биотин	7-оксо-8-амино-пеларгонатамидотрансфераза	В 400 раз
Гуанин	Инозинмонофосфатдегидрогеназа	В 45 раз

Другим средством снятия подавления биосинтеза ферментов может служить выращивание частичных или так называемых «*leaky*» *ауксотрофов* (соединений, способных к медленному росту в среде и стимулирующихся собственными факторами роста) в условиях отсутствия конечных стимуляторов.

Можно получить и так называемые *регуляционные мутанты*, которые не подавляются конечными продуктами биосинтеза. Подобно мутантам, не требующим наличия индуктора, они тоже являются конститутивными и могут быть мутированы в гене-операторе так, что связывания репрессора происходить не будет.

7. Факторы, влияющие на биосинтез ферментов в процессе культивирования

На процесс биосинтеза ферментов оказывают существенное влияние уровень питательных веществ и их сбалансированность, отвод метаболитов, изменение кислотности среды и температуры, насыщенность среды растворенным кислородом, а также некоторые другие факторы (например, возраст и состояние культуры продуцента).

Влажность питательной среды

Влажность среды при выращивании ферментов на твердых сыпучих средах имеет большое значение; так, при влажности среды от 11 до 20 % развитие микроорганизмов почти невозможно.

Обычно некоторый рост начинается при влажности свыше 30 %. Влажность 40–45 % способствует обильному спорообразованию культуры (рис. 7.1, кривая 1). Оптимальная влажность среды зависит от вида продуцента, физического состояния среды при данной влажности и способа обработки. Так, высокая влажность способствует слипанию частиц среды, нарушению рыхлости и ухудшению условий роста культуры.

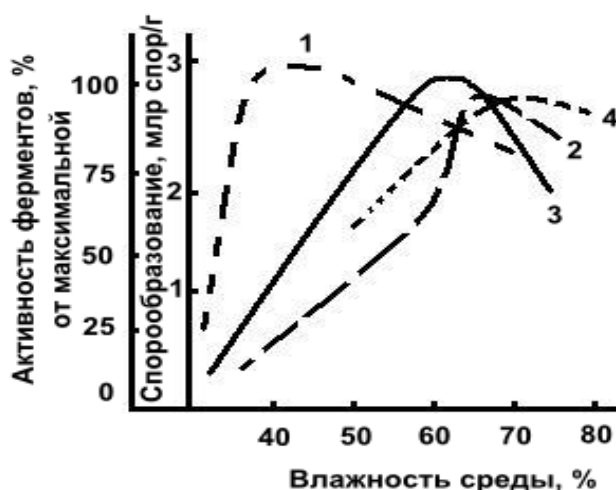


Рис. 7.1. Влияние влажности твердой питательной среды на спорообразование (1) и накопление ферментов при поверхностном культивировании (2), при проведении процесса в автоматизированных установках (3) и выращивании в открытых емкостях (4)

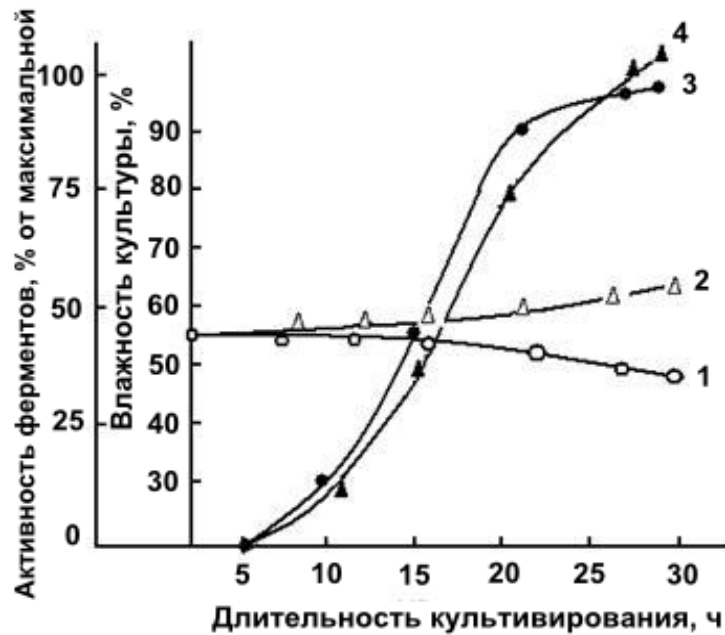


Рис. 7.2. Изменение влажности среды (1, 2) и активности

амилолитических ферментов (3, 4) в процессе роста культуры:

1, 2 – влажность; 3, 4 – амилолитическая активность; 1, 3 – выращивание в открытых кюветах; 2, 4 – выращивание в колбах под ватными пробками в термостате

При поверхностном культивировании (рис. 7.1, кривая 2) по мере роста культуры происходит заметное уменьшение содержания сухих веществ, которые превращаются в CO_2 и H_2O . Если культивирование ведут в закрытых емкостях (рис. 7.1, кривая 3), например, в колбах под ватными пробками или закрытых специализированных кюветах, где испарение влаги ограничено, то при росте культуры наблюдается некоторое увеличение влажности (см. также рис. 7.2).

Если культуру выращивают в открытых емкостях при интенсивном аэрировании, наблюдается ее подсушивание, которое при влажности $W < 50\%$ может повлечь за собой уменьшение продуцирующей способности культуры и снижение активности в готовом продукте (рис. 7.1, кривая 4).

Оптимальная влажность культуры и ее уровень во многом зависят от физиологических особенностей продуцента и способа выращивания культуры (рис. 7.2).

Аэрирование растущей культуры

Степень аэрирования определяется способом культивирования и физиологией микроорганизмов – продуцентов ферментов. Аэрирование растущей культуры преследует следующие цели: снабжение микроорганизма кислородом, необходимым для роста и развития; удаление с отходящим воздухом газообразных продуктов обмена; частичное снятие и отвод тепла, выделяемого микроорганизмом в процессе роста.

Большое значение придается вопросу отвода воздухом тепла. В связи с этим необходимо рассмотреть фазы роста микроскопических грибов, поскольку именно эту группу микроорганизмов обычно используют при поверхностном способе культивирования [5].

Первая фаза – *набухание спор и их прорастание*; длительность фазы составляет 10–12 ч. Эта стадия не сопровождается заметным тепловыделением, поэтому осуществляют умеренное аэрирование культуры (4–5 объемов воздуха на один объем камеры в час) при относительной влажности воздуха 95–96 % и оптимальной температуре.

Вторая фаза – *стадия роста*; она продолжается 12–40 ч и сопровождается интенсивным потреблением питательных веществ из среды, выделением тепла, углекислоты и воды. В это время микроорганизм нуждается в интенсивном аэрировании для удаления газообразных продуктов метаболизма и отвода выделяющегося тепла. Температурный режим в камере следует соблюдать строго и относительную влажность воздуха поддерживать около 100 %, иначе можно преждевременно подсушить культуру, и накопление ферментов в культуре приостановится (рис. 7.2). Чем интенсивнее аэрирование, тем глубже идут окислительные процессы, тем больше потребляется сухого вещества среды на дыхание и тем меньше выход готовой культуры. Процесс окисления органических веществ сопровождается значительным выделением теплоты – до 3000–4000 кДж/кг культуры (75–80 % всего выделяемого тепла); при этом потребляется до 25–30 % сухого вещества.

Для расчета необходимого воздухообмена строят график тепловыделения за все время выращивания микроорганизма. В зависимости от состава среды и вида микроорганизма кривые тепловыделения выглядят по-разному (рис. 7.3). При культивировании микроорганизмов на пшеничных отрубях, содержащих 16–25 % крахмала (кривые 1 и 2), удельное тепловыделение достигает 340–435 кДж/(кг·ч), а на среде, состоящей из шелухи крупяных культур, содержащих в 3 раза меньше крахмала (кривая 3), удельное тепловыделение составляет лишь 125 кДж/(кг·ч).

Воздух, подаваемый в камеру для активного роста культуры, имеет температуру на 2–3 °С ниже, чем в период ее прорастания.

Средняя физиологическая потребность в кислороде в фазе активного роста составляет $\approx 7,6 \text{ м}^3$ на 1 т КЖ в час.

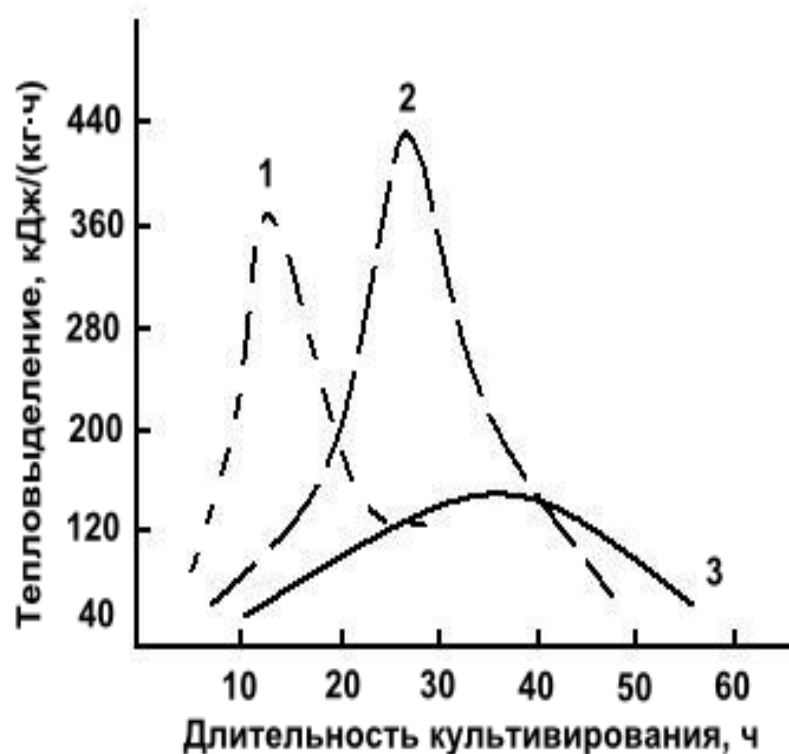


Рис. 7.3. Удельное тепловыделение в процессе поверхностного культивирования культур:

1 – *A. oryzae* 81; 2 – *A. Awamori* 16; 3 – *Triehothecium roseum*

Третья фаза (идиофаза) соответствует биохимической и морфологической специализации культуры, когда наблюдается накопление вторичных метаболитов. Это период интенсивного образования микроорганизмами внеклеточных ферментов.

Рекомендуется снизить температуру в растительных камерах на 3–4 °С и уменьшить воздухообмен в 3–5 раз по сравнению с периодом интенсивного роста. Когда накопление ферментов в культуре достигает максимума, в камеру подают сухой воздух, подогретый до 38–40 °С. Культура за 2–3 ч подсыхает на 10–15 %, что облегчает ее последующее отделение от перфорированной поверхности кюветы.

Таким образом, аэрирование глубинной культуры является весьма важным фактором; интенсивность аэрирования неодинаково влияет на продуцирующую способность различных микроорганизмов [5], что наглядно видно из сравнения данных, представленных на рис. 7.4, 7.5.



Рис. 7.4. Биосинтез глюкоизомеразы *S. Albogriseolus* 20-3 (по данным А.В. Гавристова, 1980): 1, 2, 3 – изменение pH среды; 1', 2', 3' – глюкоизомеразная активность; 1'', 2'', 3'' – накопление биомассы. Аэрация составляет соответственно 0,5 (кривые 1, 1', 1''), 1,0 (кривые 2, 2', 2'') и 1,5 (кривые 3, 3', 3'') м³/(м³·мин)

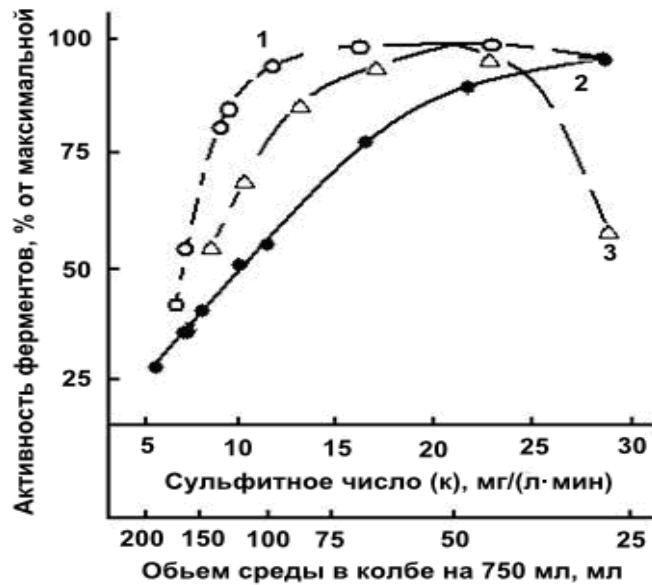


Рис. 7.5. Биосинтез ферментов микроорганизмами: 1 – α-амилазная активность (*B. mesentericus*); 2 – протеолитическая активность (*Trichoderma longibrachistum* 7-26); 3 – целлюлазная активность

Увеличение степени аэрирования среды обеспечивает интенсификацию процесса биосинтеза ферментов и в большинстве случаев приводит к сокращению длительности культивирования (рис. 7.6).



Рис. 7.6. Влияние аэрирования на длительность культивирования *Endomycopsis* sp. 20-9 и биосинтез глюкоамилазы: 1 – выращивание на круговой качалке (объем среды 100 мл, объем колбы 750 мл); 2, 3, 4 – выращивание в ферментаторе при степени аэрирования 30 л/(л·ч) (2), 50 л/(л·ч) (3) и 60 л/(л·ч) (4)

Скорость роста тех или иных штаммов неодинакова. Она зависит не только от состава среды, но и от способа ее подачи при культивировании (рис. 7.7, 7.8), степени аэрирования (рис. 7.6), от того, является фермент внеклеточным или внутриклеточным, и изменяется по ходу культивирования, как это показано на рис. 7.8.

Следует знать, что рН среды при поверхностном культивировании, в силу высокой буферности и малой влажности среды, оказывает гораздо меньшее влияние на процесс образования ферментов, чем при осуществлении схемы глубинного культивирования.

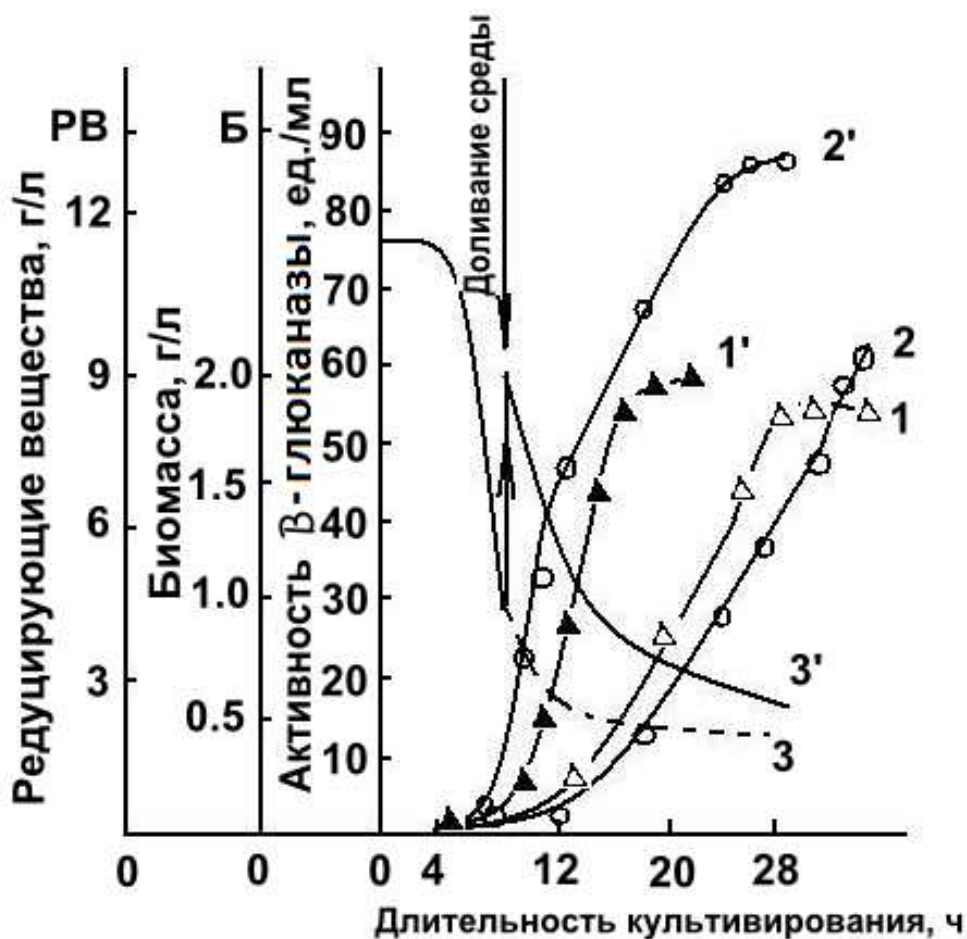


Рис. 7.7. Влияние состава среды и дробного ее введения на биосинтез β-глюканазы и накопление биомассы по ходу культивирования: 1, 1' — содержание биомассы (Б); 2, 2' — β-глюканазная активность, ед./мл (ГЛА); 3, 3' — содержание редуцирующих веществ (РВ)

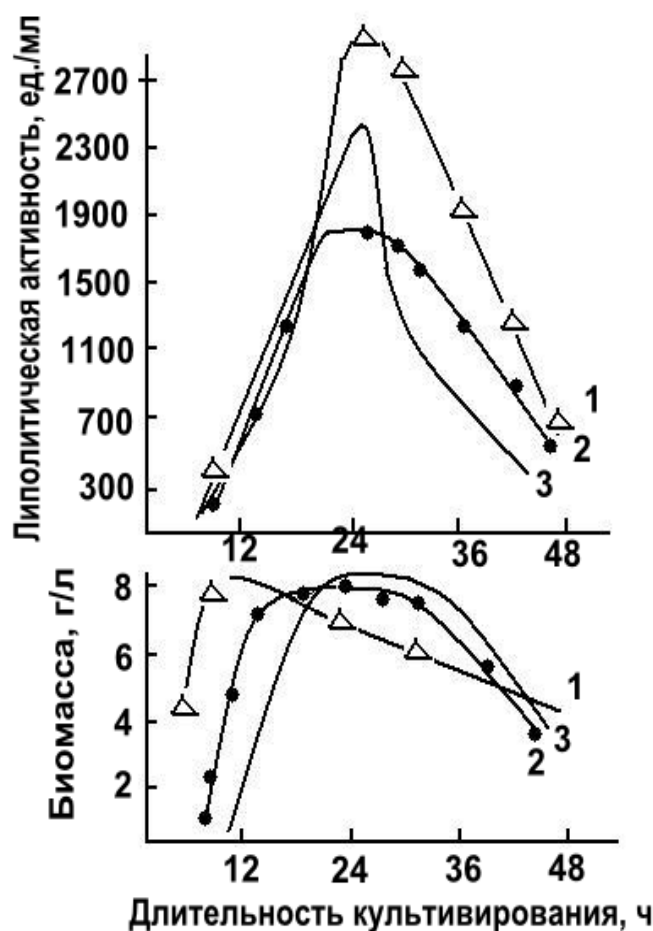


Рис. 7.8. Влияние состава среды и длительности культивирования на биосинтез и активность липазы *Rhizopus microsporus* (по данным Т.В. Зубенко, 1980): 1 – водный экстракт хлопкового шрота; 2 – кукурузный экстракт; 3 – молочная сыворотка

Так, при поверхностном культивировании для увлажнения твердой среды используется водопроводная вода; рН увлажненной среды в этом случае составляет 5,0–5,6. Если же отруби увлажняют слабыми растворами соляной, серной или молочной кислоты, рН среды будет несколько меньше (снизится до 4,5–5,0). Добавление указанных кислот способствует созданию селективных условий развития микроскопических грибов, что позволяет снизить требования к стерилизации среды и воздуха.

При глубинном же культивировании большое значение имеет не только исходная величина рН, но и изменение водородного показателя в результате потребления катионов или анионов в процессе жизнедеятельности

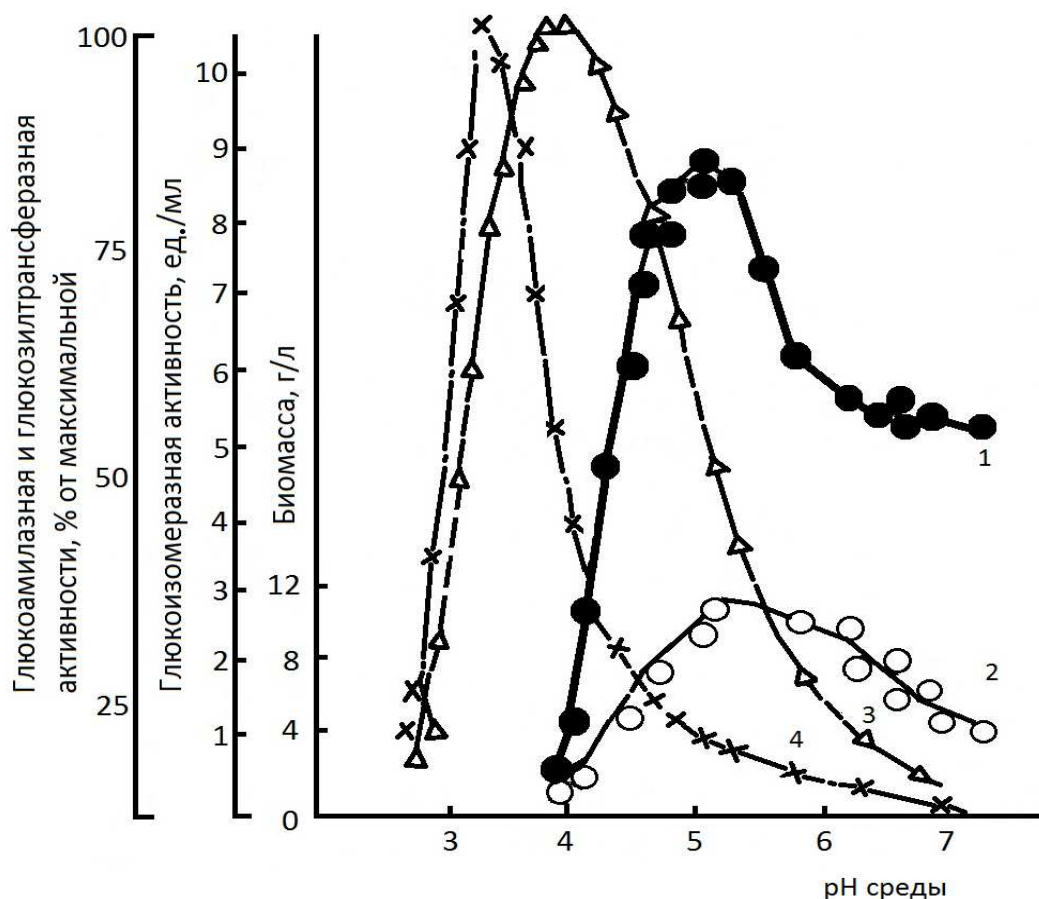


Рис. 7.9. Влияние pH среды на ферментсинтезирующую способность микроорганизмов *S. Albogriseolus* 20-3 (1, 2) и *Endomycopsis* sp. 20-9 (3):

1 – внутриклеточная глюкоизомеразная активность; 2 – биомасса;

3 – глюкоамилазная активность; 4 – мальтазная (гликозилтрансферазная) активность

микроорганизма и стерилизации среды. В зависимости от типа потребляемых ионов может происходить как подщелачивание, так и подкисление КЖ. Кроме того, известно, что грибы и дрожжеподобные организмы хорошо растут и образуют ферменты в средах, имеющих pH от 3,8 до 5,6. При изменении состава продуктов метаболизма водородный показатель тоже может смещаться как в кислую, так и в щелочную область.

В целом, справедливо говорить, что большая часть микроорганизмов чувствительна к уровню pH среды. Из рис. 7.9 хорошо видно, что отклонение от оптимального значения снижает способности микроорганизмов к образованию ферментов.

Температура культивирования

Продуценты ферментов, особенно микроскопические грибы, являются *мезофильными микроорганизмами*. Оптимальная температура их развития составляет 22–32 °С (рис. 7.10).

В то же время среди бактериальных продуцентов ферментов имеются *термофильные микроорганизмы*, для которых подходящая температура культивирования составляет 35–55 °С. Они представляют большой интерес для промышленного использования, так как культивирование при высоких температурах позволяет снизить требования к стерильности процесса. Кроме того, термофильные микроорганизмы синтезируют ферменты, обладающие повышенной термостойкостью.

В целом температура оказывает существенное влияние на скорость накопления ферментов. Последняя нарастает с повышением температуры культивирования (если микроорганизм термостабилен); при этом можно иногда ожидать, что суммарное количество синтезируемого фермента также увеличится.

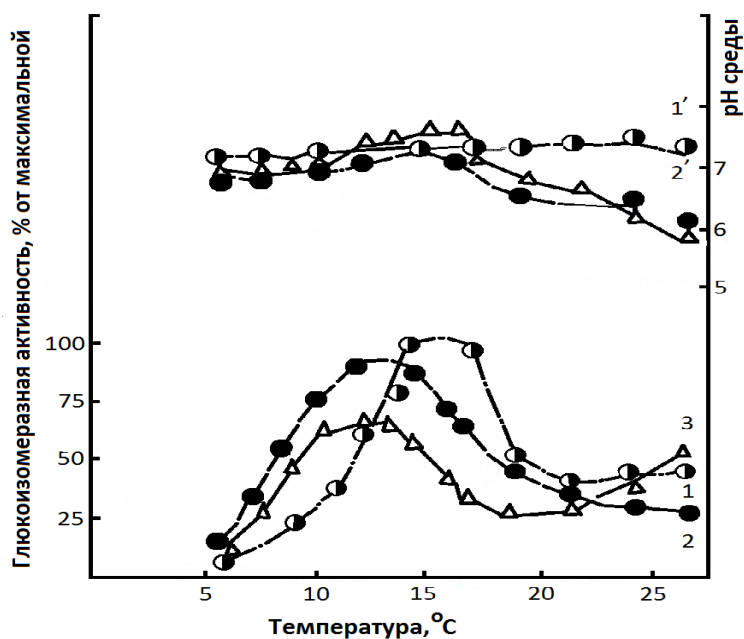


Рис. 7.10. Биосинтез глюкоизомеразы при различной температуре: 1 – 29 °С; 2 – 32 °С; 3 – 35 °С; 1', 2', 3' – изменение pH среды при соответствующей температуре

8. Организация поверхностного способа культивирования микроорганизмов

Начало выращивания микроорганизмов совпадает с процессом засева питательной среды подобранным посевным материалом. Засев проводят в специальном аппарате (стерилизаторе) и в условиях постоянного перемешивания.

Принцип поверхностного культивирования можно осуществлять различными способами. Одним из них является кюветный способ. Недостатком его являются достаточно высокие трудозатраты (ручной труд). Другой способ предусматривает выращивание в специальных механизированных установках [6].

8.1. Кюветный способ

При этом способе используют элементарную ячейку (кювету) – специальную емкость четырехугольной формы, имеющую площадь $0,3 \times 0,5 \text{ м}^2$ и высоту 20–50 мм [6]. Ее изготавливают из листа металла с перфорированным днищем, реже используют сплошной металлический лист. Применяют кюветы *открытые и с крышками*.

Для *открытых кювет* применяют оцинкованный металл; перфорации делают в виде узких продолговатых щелей размером $(1,5–2,0) \times 20,0$ мм. Отверстия располагают в шахматном порядке или подряд с зазором между отверстиями 3–5 мм; расстояние между рядами поддерживают ≈ 10 мм.

В кювету загружают слой питательной среды (2 см), и затем переносят кюветы в специальные растительные камеры. В камерах их располагают на многоярусных подвижных этажерках либо стеллажах. В последнем случае расстояние между рядами устанавливают 10 см. Число ярусов может достигать 16–18, а общая высота стеллажа – 2 м. Этажерки выполняют из металла с

антикоррозионным покрытием. В целом камера имеет форму коридора с дверями в торцах.

Работу в камере осуществляют в следующей последовательности:

- вначале проводят загрузку камеры;
- проводят культивирование (обычно в течение 1–3 сут.);
- ведут подсушивание культуры при подаче подогретого воздуха;
- выгружают камеру;
- производят мойку и уборку камеры, включая обработку специальными агентами, например, аммиаком или паром (в течение 3 ч);
- проветривают камеру (в течение 3 ч).

Преимуществом способа является относительная простота осуществления технологического цикла, а основной недостаток связывают с высокой себестоимостью выращивания культуры.

8.2. Выращивание в механизированных установках

Одним из важнейших условий успешного роста микроорганизмов является высокая аэрация среды. При этом установка должна работать так, чтобы в случае возникновения инфекции зараженную среду можно было быстро выгрузить [6].

Механизация, в первую очередь, касается загрузки среды в кюветы. Далее кювету перемещают на подвесную этажерку с помощью транспортера, а после загрузки этажерки она входит по монорельсу в растительную камеру, где создаются необходимые условия культивирования. В зависимости от вида микроорганизмов выбирают необходимую скорость перемещения этажерки по коридору. На выходе из коридора осуществляют автоматическую разгрузку.

Установки могут предусматривать использование транспортеров скребкового типа. Недостатком в этом случае является необходимость полной

остановки в случае инфицирования микроорганизмов и проведение длительной стерилизации.

Чешские установки имеют относительно невысокую производительность (до 400 кг/сут), но в эксплуатации более надежны, по сравнению со скребковыми транспортерами. Они представляют собой камеру, где располагается цепной транспортер с подвешенными к нему лотками. Когда рост микроорганизмов заканчивается, лотки поочередно опрокидываются, и цепная камера сгружается в бункер. Далее лотки моют и стерилизуют, после чего цикл повторяют.

Известны американские установки барабанного типа. Внутри барабана располагают специальные рамы для питательной среды. Загрузка в барабан допускает использование 200 кг среды. Барабан вращают со скоростью 100 мин⁻¹, при этом в него подают воздух (расход – до 20000 м³/ч), обеспечивающий необходимое перемещение и аэрирование среды.

В РФ используют установки для выращивания с использованием вертикальных кювет производительностью до 1,5 т/сут. Чертеж такой установки представлен на рис. 8.1.

Аэрирование происходит через вертикальные каналы, которые находятся между кюветами, а также через стенки кювет.

Культура в растительной камере 9 практически не подсыхает, поскольку происходит некоторое увлажнение ее влагой, выделяемой микроорганизмами в ходе роста. Растительная камера представлена на рис. 8.1, б. Как видно из рис. 8.1, б, она представляет собой ящик прямоугольной формы, изготовленный из алюминиевого сплава. Перегородки с круглыми отверстиями диаметром 3 мм образуют внутри ящика вертикальные кюветы, а просветы между кюветами (40 мм) играют роль воздушных каналов. Затем культура поступает в сушилку, где она обрабатывается до влажности 10–12 %, фасуется и идет на склад. Свободная от культуры растительная камера по рельсовому пути 10 поступает в моечное отделение, где под действием мощных

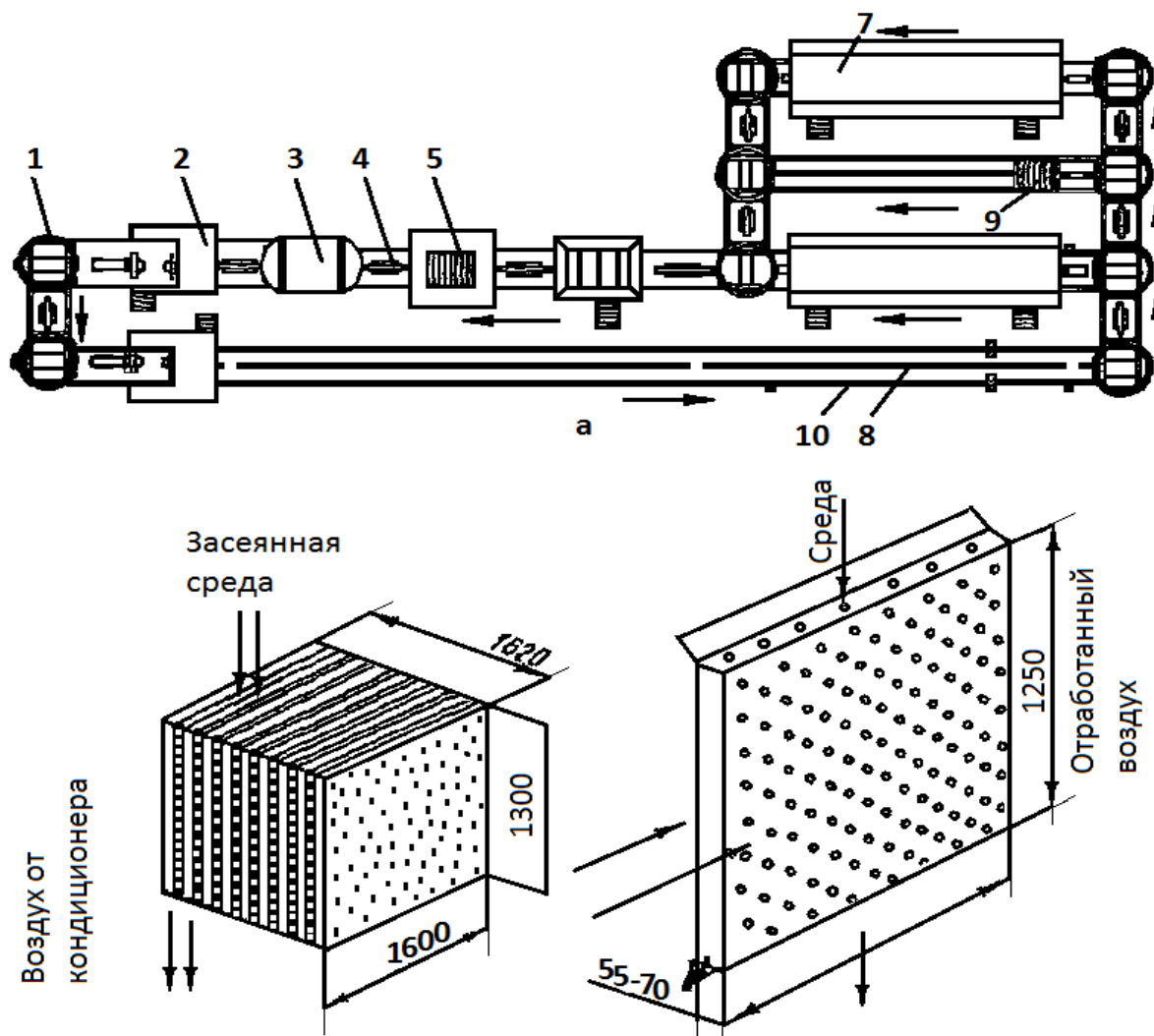


Рис. 8.1. Установка с вертикальными кюветами для выращивания поверхностной культуры:
a – общая схема; 1 – поворотный круг; 2 – вибрационный стол для загрузки; 3 – стерилизатор камер; 4 – толкатель; 5 – устройство для мойки камер; 6 – стол для разгрузки; 7 – коридор с кондиционерами для выращивания; 8 – транспортер; 9 – растительная камера; 10 – рельсовый путь; *б* – растительная камера; *в* – кювета

струй воды из форсунок она промывается и стерилизуется. Культура наиболее интенсивно растет вблизи отверстий в стенках кювет; в результате здесь образуются «коржи» микроорганизмов. Эти «коржи» трудно отделяются от кюветы при разгрузке, поэтому вертикальную стенку кюветы по окончании культивирования отодвигают и затем удаляют их на вибрационном столе *б*.

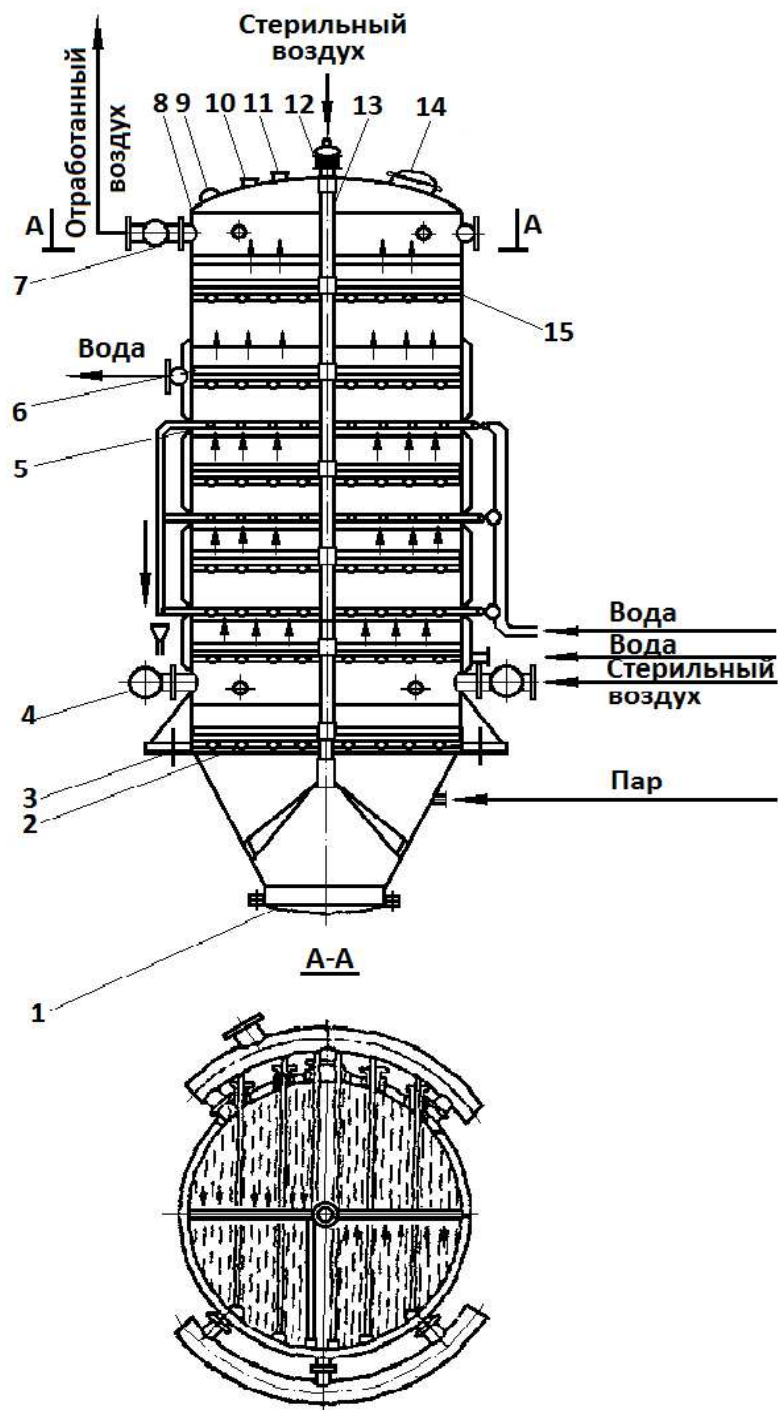


Рис. 8.2. Аппарат для механизированного выращивания микроорганизмов в слое среды:

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

Далее «коржи» разрезают, и частично измельченная культура попадает в бункер со шнеками.

Стерилизованную же камеру подают на вибрационный стол для загрузки, и цикл повторяют.

Преимуществом этого способа является возможность изоляции растительных камер в случае возникновения инфекции.

Механизированная установка для выращивания микроорганизмов в толстом слое среды представлена на рис. 8.2. Специфика работы такой установки заключается в том, что происходит перегрев внутри слоев, и аэрирование камеры затрудняется. При выращивании в закрытом аппарате возникает режим объемной аэрации, когда высоту слоя удается увеличить в 10 и более раз.

Аппарат представляет собой вертикальный цилиндр, который разделен на секции специальными перфорированными пластинами. Работа аппарата обеспечивает снижение застойных зон внутри каждой секции – за счет хорошего распределения воздуха. Так, верхняя часть аппарата соединена со стерилизатором. Стерильный воздух поступает через специальный штуцер в нижнюю часть аппарата, попадает под пластины в каждой секции, а перед выходом в атмосферу подвергается специальной бактериальной очистке. Отвод тепла также производится воздухом. В аппарате предусматривается установка рубашки и змеевиков. Интенсивность перемещения в каждой секции может различаться в зависимости от режима работы камеры. Перемещение среды с верхней секции обеспечивается автоматическим поворотом пластин на 90°. Выращенная культура попадает в нижнюю коническую часть и затем – в бункер сушилки или экстрактора.

Процесс выращивания можно осуществлять в слое высотой не менее 30 мм в абсолютно герметичных условиях. При этом ферментативная активность культуры соответствует той, которая получается при культивировании в кювете.

9. Глубинное культивирование микроорганизмов

Этот способ имеет ряд преимуществ по сравнению с поверхностным способом, так как позволяет значительно сократить производственные площади, исключить тяжелый ручной труд, улучшить гигиену. Он упрощает механизацию и автоматизацию производства, делает возможным переход на непрерывный способ культивирования. При глубинном способе культивирования питательные вещества сред используются более рационально, что дает возможность значительно сократить отходы производства, получать ферментные препараты с меньшим содержанием примесей и большей удельной активностью. Глубинное культивирование проводят в вертикальных емкостях различного размера, называемых *ферментаторами*. Основное требование к ферментатору – возможность культивирования продуцента в асептических условиях, при интенсивном аэрировании среды. В процессе культивирования приходится иметь дело со сложной трехфазной системой «жидкость – твердая взвесь – газ», в которой усложняются массообменные процессы и, соответственно, аппаратное оформление на стадии выращивания. Существующие промышленные ферментаторы по способу подвода энергии на аэрирование и перемешивание подразделяют на группы: *аппараты с механическим перемешиванием и барботажем* (комбинированные); *аппараты с эжекционной системой аэрирования*, а также *барботажные аппараты* (с подводом энергии к газовой фазе).

Большой интерес представляет первая группа аппаратов, предназначенная для асептических процессов. Эти аппараты имеют цилиндрическую форму и отличаются по объему, а также по конструкции отбойников, перемешивающих устройств, уплотнений вала и теплообменников.

В нашей стране часто используют герметизированные установки с механическим перемешиванием и барботажем воздуха (рис. 9.1). Кроме этих

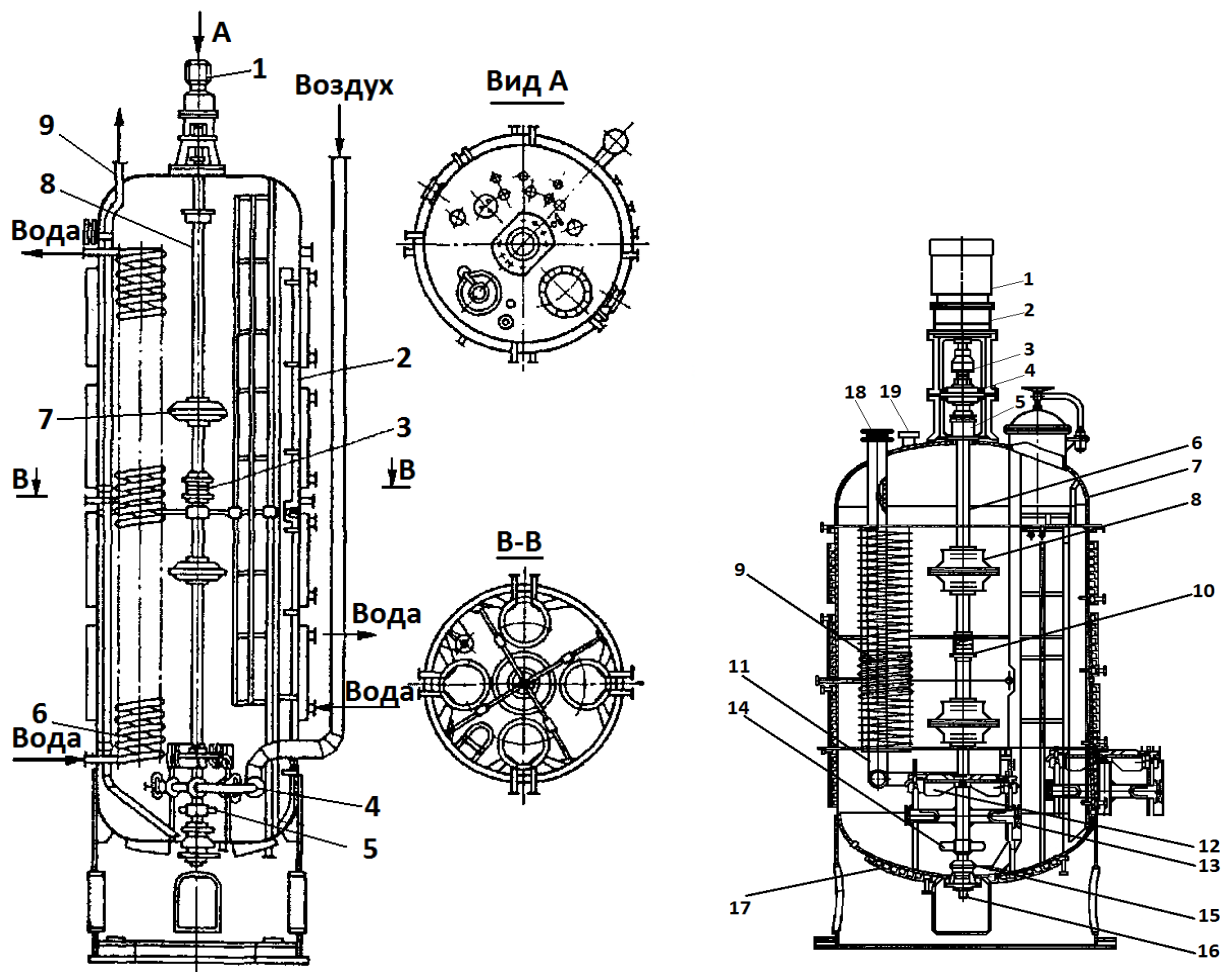


Рис. 9.1. Ферментатор барботажного типа объемом 100 м^3 :

1 – привод; 2 – корпус; 3 – муфта; 4 – барботер; 5 – крыльчатка; 6 – змеевик; 7 – турбина;
 8 – вал; 9 – труба для вывода жидкости под избыточным давлением

Рис. 9.2. Ферментатор объемом 63 м^3 производства Германии:

1 – электродвигатель; 2 – редуктор; 3, 10 – муфты; 4 – подшипник; 5 – сальник; 6 – вал;
 7 – корпус; 8 – турбинная мешалка; 9 – эмеєвиковый теплообменник;
 11 – труба для подвода воздуха; 12 – лопастная мешалка; 13 – барботер;
 14 – винтовая мешалка; 15 – опорный подшипник; 16 – штуцер для спуска;
 17 – рубашка; 18 – люк для загрузки; 19 – патрубок для выхода воздуха

ферментаторов, на некоторых предприятиях работают аппараты вместимостью 63 м³ производства Германии (рис. 9.2). Эти аппараты рассчитаны для работы под давлением 2,5–3,0 атм. при 130–140 °С. Во избежание инфицирования культуры предусмотрены торцовые уплотнения вала перемешивающего устройства с паровой защитой. Торцовые уплотнения позволяют практически полностью предотвратить утечку среды или попадание воздуха в полость аппарата в месте выхода вала, что важно для обеспечения асептических условий процесса.

Также важным фактором является правильная *обвязка ферментатора*. Под *обвязкой* подразумевают подвод всех коммуникаций с учетом возможности стерилизации острым паром участков, которые могут явиться источником заражения.

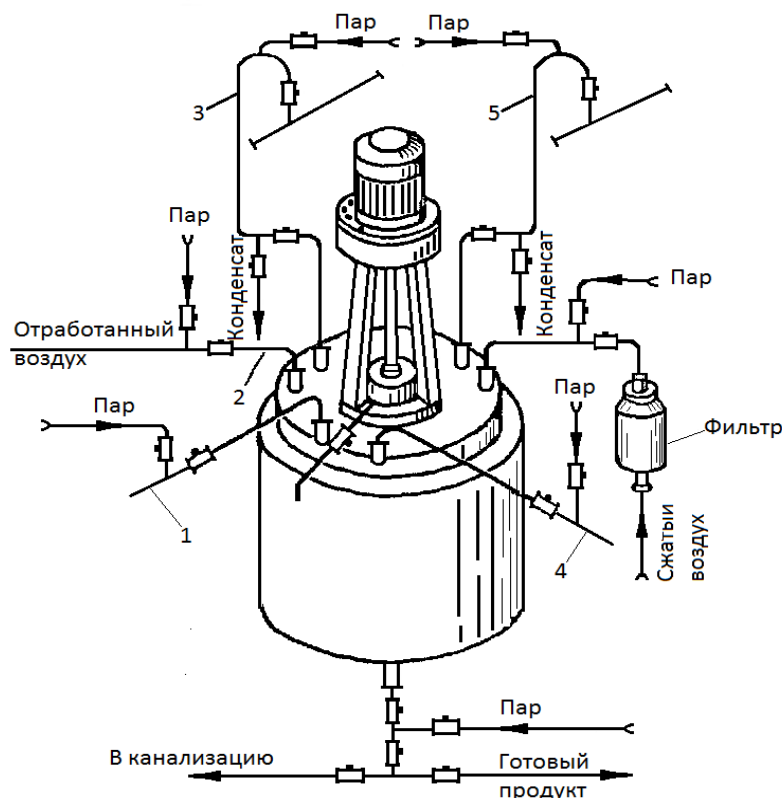


Рис. 9.3. Монтажная схема ферментатора с нижним спуском среды:
 1 – посевной материал; 2 – отработанный технологический воздух;
 3, 5 – термические затворы; 4 – пробник

Рассмотрим пример обвязки ферментатора для микробиологических производств, представленного на рис. 9.3. Характерной особенностью такой обвязки является установка термических затворов 3 и 5 для предупреждения проникновения посторонней микрофлоры в аппарат по коммуникациям через уплотнения типа «седло – клапан» запорной арматуры [6].

В материальные трубопроводы, соединенные с внутренней полостью аппарата, постоянно подается пар, а образующаяся паро-конденсатная смесь отводится в канализацию или специальное устройство. В монтажной схеме предусмотрен свободный доступ пара во все точки стерилизуемых внутренних полостей аппарата. Такая схема коммуникации предусматривает стерилизацию коллекторов питательной среды. Следует также уделять внимание процессу пенообразования при культивировании и организации установок для пеногашения. Потому все ферментаторы снабжают специальными устройствами для введения пеногасителя и контроля чистоты пены в аппарате.

В процессе культивирования ведут постоянный контроль за накоплением ферментов, состоянием биомассы и pH среды.

10. Технологические схемы получения культур микроорганизмов

Последовательность процесса получения культуры микроорганизма является общей для поверхностного и глубинного способа культивирования. Она включает стадии приготовления посевного материала, приготовления питательной среды, стерилизации, охлаждения, засева посевным материалом и выращивания [6].

Однако, в зависимости от способа культивирования, аппаратное оформление технологических схем существенно различается.

10.1. Схема культивирования поверхностным способом

Особенностью процесса поверхностного культивирования является большое количество сыпучих компонентов среды. Поэтому при поверхностном культивировании значительные площади производственного здания или рядом с ним отводятся цеху хранения сырья (отруби, свекловичный жом, ростки солода, опилки и т.д.). В зависимости от вида сырья запас может быть разным, но всегда – не менее месячного.

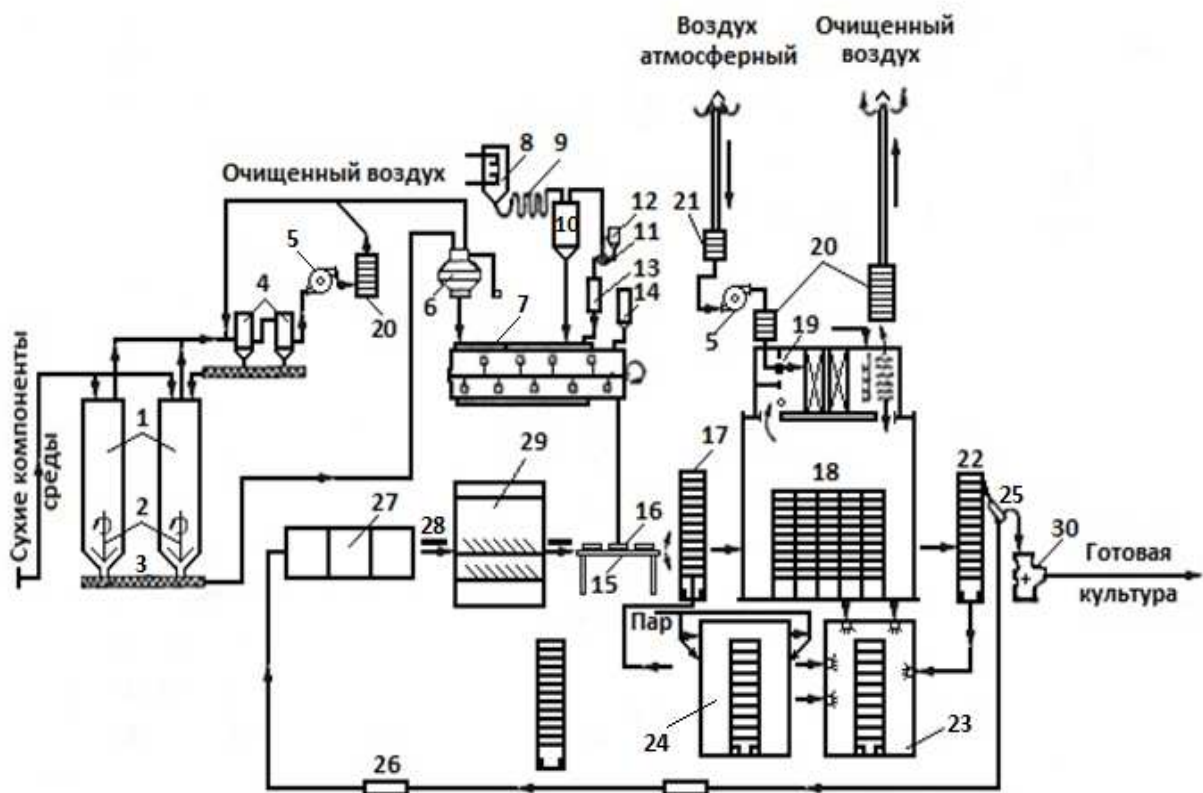


Рис. 10.1. Технологическая схема получения культуры микроорганизма поверхностным способом: 1 – бункеры; 2 – воршители; 3 – шнек; 4 – циклоны; 5 – вентиляторы; 6, 11 – дозаторы сыпучего сырья и кислоты; 7, 8 – стерилизаторы; 9 – теплообменник; 10, 12 – мерники; 13, 14 – емкости для кислоты и посевного материала; 15 – стол; 16, 26, 28 – стерильные, грязные и промытые кюветы соответственно; 17 – этажерка; 18 – растительная камера; 19 – кондиционеры; 20 – фильтры тонкой очистки; 21 – фильтр грубой очистки; 22 – этажерка; 23, 24 – камеры мойки этажерок; 25 – разгрузка кюветы; 27 – отделение мойки кюветы; 29 – камера стерилизации кюветы; 30 – дробилка

Сыпучие компоненты хранятся в бункерах и поступают на переработку пневмотранспортом. На рис. 10.1 приведена технологическая схема получения культур микроорганизмов при поверхностном культивировании кюветным способом. Отруби или другие сыпучие компоненты из основного склада по пневмотранспорту направляют в бункеры 1, снабженные ворошителями 2. Пневмотранспортирующая система подачи сырья снабжена циклонами 4 для очистки от грубой пыли, вентилятором 5 и фильтром 20 для тонкой очистки воздуха, выбрасываемого в атмосферу. Из бункера сыпучие компоненты по распределительному шнеку 3 с помощью пневмотранспорта поступают в дозирующее устройство 6, а затем в стерилизатор 7, снабженный мешалкой, паровой рубашкой и линиями подвода стерильного воздуха и пара. По окончании стерилизации среда увлажняется водой, стерилизуемой в устройстве 8 и охлаждаемой в теплообменнике 9. Вода поступает в 7 через мерник 10; с помощью дозатора 11 и мерника 12 из емкости 13 сюда же подают 9 %-й раствор соляной кислоты, полученный из 37 %-го раствора, а также суспензию посевного материала из емкости 14.

Засеянная среда поступает на раскладочный стол 15 в стерильные кюветы 16. Кюветы помещают на передвижную этажерку 17 и транспортируют в растительную камеру 18, где с помощью кондиционеров 19 поддерживают необходимую температуру и относительную влажность. Воздух из атмосферы поступает через фильтр 21 для грубой очистки, а тонкую очистку отработанного воздуха от микроорганизмов осуществляют на фильтрах 20. Выросшую культуру в кювете на этажерках-тележках 22 транспортируют к дробилке 30 и подают в приемный бункер. Из приемного бункера готовая культура может быть направлена на сушку (для получения технического препарата в виде сухой культуры) или переработку (для получения очищенных ферментных препаратов). Далее этажерку направляют в камеры 23 и 24 на мойку, грязную же кювету 26 промывают в отделении 27.

Промытую кювету 28 стерилизуют в камере 29 и снова направляют на загрузку. После этого цикл повторяют снова.

10.2. Схема глубинного культивирования

Технологические схемы культивирования глубинным методом отличаются друг от друга незначительно. Следует отметить лишь тот факт, что при культивировании анаэробных микроорганизмов не требуется подготовка воздуха (рис. 10.2).

Сухие компоненты подают в циклон 1, в затем с помощью трубоконвейера 2 – в бункеры 3. Из бункеров 3 с помощью трубоконвейера 4 эти компоненты

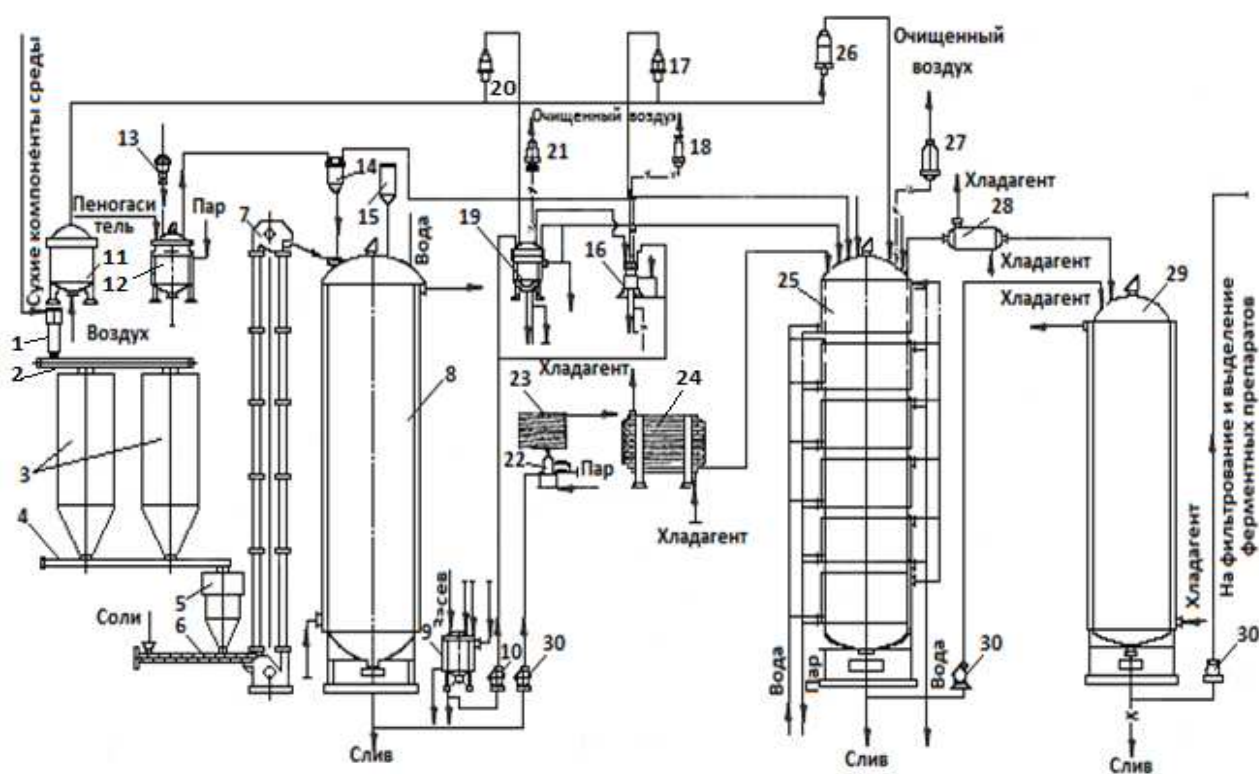


Рис. 10.2. Технологическая схема получения ферментных препаратов глубинным способом: 1 – циклон; 2, 4 – трубоконвейеры; 3 – бункеры; 5 – весы; 6 – шнек; 7 – нория; 8 – смеситель; 9 – емкость; 10, 30 – насосы; 11 – головной фильтр; 12 – стерилизатор для пеногасителя; 13, 15, 17, 20, 26 – индивидуальные фильтры; 14 – мерник; 16, 19 – инокуляторы; 18, 21, 27 – фильтры для очистки воздуха; 22, 23 – нагреватель и спиральный теплообменник; 24, 28 – охладители; 25 – ферментатор; 29 – сборник культуральной жидкости

поступают на автоматические весы 5 и с помощью шнекового устройства 6 транспортируются в норию 7. Если требуется введение в состав среды солей, последние поступают в норию 7 с помощью того же шнека 6. Норией 7 компоненты подают в смеситель 8, где создают условия для приготовления питательной среды. При необходимости в аппарат 8 загружают также необходимое количество воды и жидких компонентов, для чего используют мерник 14 и фильтр 15. Для растворения солей и подготовки клейстера крахмала необходимо осуществлять подогрев смеси компонентов. Подогретая питательная среда с помощью насоса 30 поступает в нагреватель 22 и теплообменник 23 спирального типа. Далее происходит ее охлаждение в теплообменнике 24, а затем массу подают в стерильный ферментатор 25, где происходит окончательное ее охлаждение. Посевной материал готовят в специальном отделении. В емкости 9 его перемешивают и с помощью насоса 10 направляют в специальные установки (инокуляторы) 16 и 19, где проводят стерилизацию, охлаждение и засев среды. Суспензию культуры выращивают в инокуляторе первой ступени 16, а затем перекачивают в инокулятор второй ступени 19, где функционирует система стерилизации среды, после чего готовый посевной материал подают в ферментатор 25. Из рис. 10.1 видно, что в ходе процесса используется система пеногашения. В аппарате периодического действия 12 пеногаситель стерилизуется и с помощью мерника 14 попадает в ферментатор. Растущая культура аэрируется стерильным воздухом. Воздух нагревается от 80 до 220 °С и поступает в фильтр 11, заполненный стекловатой. Далее воздух поступает в фильтры тонкой очистки 13, 15, 17, 20, 26 и подается для охлаждения пеногасителя и аэрирования культуры в инокуляторы 16 и 19 и ферментатор 25. Отходящий воздух очищают на фильтрах 18, 21 и 27. Культуральная жидкость после ферментатора с помощью насоса 30 поступает на охлаждение в аппарат 28 и затем идет в сборник культуральной жидкости 29. Необходимость охлаждения связана с тем, что КЖ невозможно сразу обработать, а при долгом хранении в сборнике может произойти инактивация

ферментов. Из сборника 29 охлажденная КЖ передается на фильтрование и выделение ферментативных препаратов.

Экстракт из поверхностной культуры или фильтрат КЖ при глубинном методе является исходным материалом для получения ферментов заданной степени очистки.

Получение ферментных препаратов различной степени очистки определяется заданной технологической задачей. Известно [6], что неочищенные ферментативные препараты включают культуру микроорганизмов и остатки питательной среды, при этом глубинная культура может быть очищена перед сушкой от нерастворимых примесей либо высушена вместе с ними.

11. Осаждение ферментов

11.1. Факторы, влияющие на осаждение ферментов

подавляющее большинство промышленно важных ферментов являются водорастворимыми белками. Растворы ферментов неоднородны и содержат, помимо ферментов, большое количество растворимых в воде соединений и веществ коллоидной природы. Выделение ферментов из этой сложной смеси представляет определенные трудности, так как система весьма чувствительна к внешним воздействиям.

В промышленности используют осаждение ферментов солями и органическими растворителями. Эти способы различаются по механизму осаждения.

Эффект осаждения белков связан с тем, что в присутствии гидрофильного органического растворителя активность воды снижается. Молекулы воды, расположенные на гидрофобных участках поверхности белка, замещаются на молекулы органического растворителя. При этом растворимость белков падает,

происходит их агрегирование под действием электростатических и ван-дер-ваальсовых сил (возникают между отдельными молекулами белков) и затем – осаднение.

Размер молекулы белка. Чем больше молекула фермента, тем ниже критическая концентрация растворителя, при которой происходит осаднение (рис. 11.1). Крупные молекулы осаждаются быстрее, чем мелкие, поскольку в этом случае выше вероятность того, что на их поверхности находится заряженный участок, комплементарный другому белку.

Концентрация и природа растворителя. Органический растворитель должен смешиваться с водой и не связываться с ферментом. Наиболее широко для осаднения ферментов используют ацетон, этиловый и изопропиловый спирты, реже – кетоны, эфиры и их смеси. С учетом возможной токсичности, взрывоопасности и регенерации, для производства наиболее пригодны



Рис. 11.1. Агрегирование белков в водном растворе с органическим растворителем

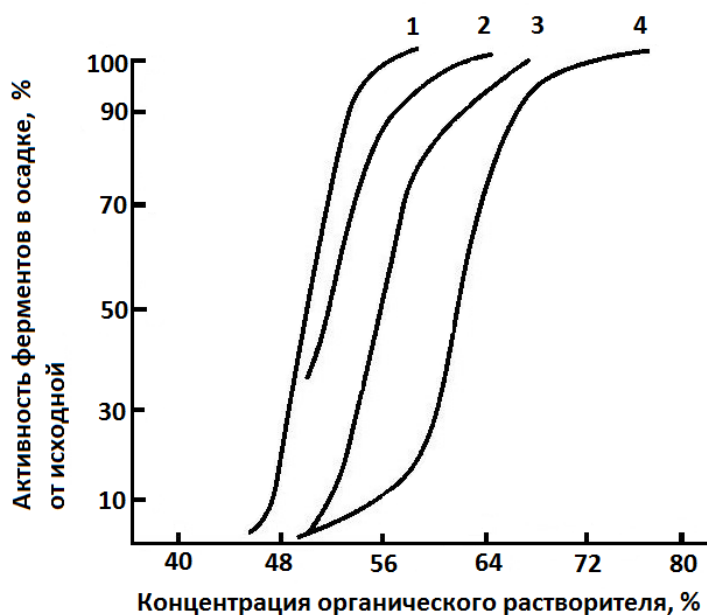


Рис. 11.2. Осаждение амилолитических ферментов из экстракта культуры *A. oryzae* органическими растворителями: 1 – изопропанол; 2 – ацетон; 3 – диоксан; 4 – этанол

этанол и изопропанол, в меньшей степени – ацетон. Довольно часто используют осаждение ферментов изопропанолом (рис. 11.2). Процесс протекает при сравнительно низкой концентрации (52–53 %), и готовые препараты содержат на 40–45 % меньше балластных веществ, чем при осаждении ацетоном и этанолом.

Присутствие электролитов. Наличие в растворе некоторых катионов может оказывать стабилизирующее влияние на фермент. Например, ионы Ca^{2+} способствуют сохранению активности α -амилаз, протеиназ, глюкоамилаз; защитным действием обладают также ионы магния, марганца, кобальта. В то же время ряд ионов (Fe^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} и др.) действует в плане активности, наоборот, отрицательно, и присутствие их нежелательно.

Температура раствора и растворителя. При осаждении ферментов следует стремиться, чтобы температура, по возможности, была низкой. Смешивание спирта и водного раствора фермента сопровождается выделением тепла, и, если спирт не охлажден, происходит инактивация ферментов. Для большинства ферментов, получаемых в промышленных условиях, оптимальная температура

осаждения равна 3–5 °С. Для достижения этой температуры раствор фермента охлаждают до 1–3 °С, а растворитель – до 8–12 °С.

pH среды. Ферменты наиболее полно осаждаются в изоэлектрической точке. Использование органических растворителей при pH, близком к изоэлектрической точке, позволяет ускорить осаждение ферментов и использовать меньшее количество растворителя.

Концентрация сухого вещества в исходном растворе. Максимальный выход активного фермента в препарат и наиболее стабильная структура осадка наблюдаются при содержании сухого вещества не более 10 % (рис. 11.3).

Продолжительность контакта с растворителем. Время контакта с растворителем, по возможности, следует сократить до минимума, чтобы предотвратить инактивацию ферментов.

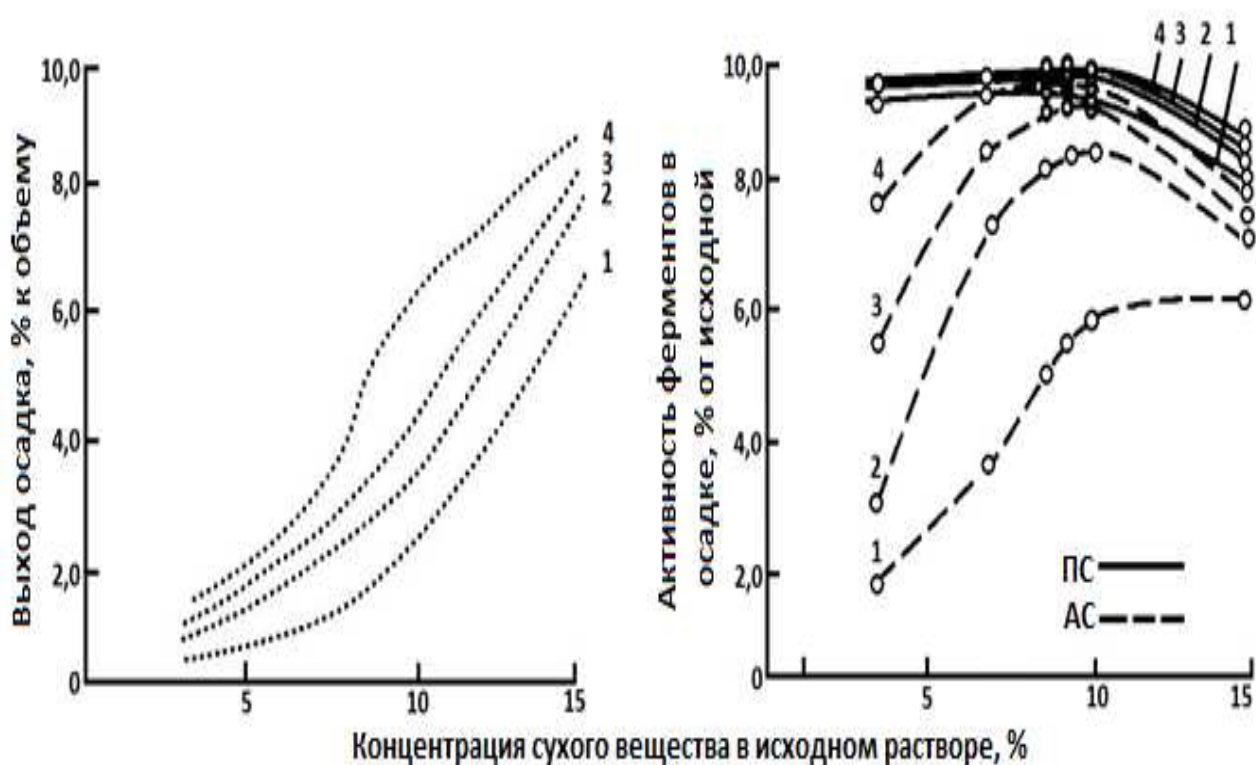


Рис. 11.3. Влияние исходной концентрации сухого вещества в ферментном растворе на полноту осаждения ферментов при концентрации спирта 63 (1), 72 (2), 79 (3) и 82 % (4).

ПС – пропиловый спирт, АС – ацетон и этиловый спирт (1:1)

11.2. Установка для осаждения ферментов

Схема установки для осаждения ферментов приведена на рис. 11.4, *а*. Установка состоит из сборника 1 для ферментного раствора, смесителя 5 непрерывного действия, сепаратора 6, а также включает контуры непрерывной подачи ферментного раствора и растворителя и систему автоматизации. Смеситель (рис. 11.4, *б*) представляет собой вертикальный цилиндрический сосуд 1, внутри которого расположен шток 2. На штоке установлены распорные втулки 3, чередующиеся с перегородками 4, не достоящими с одной стороны до стенок цилиндра. На боковой верхней части цилиндра имеются патрубки для подачи ферментного раствора и растворителя, а в нижней части цилиндра расположен патрубок для выхода смеси [7].

Жидкости перемещаются сверху вниз по сложной траектории и полностью смешиваются за короткое время. Образующийся осадок непрерывно отделяется в сепараторе. При таком способе осаждения продолжительность

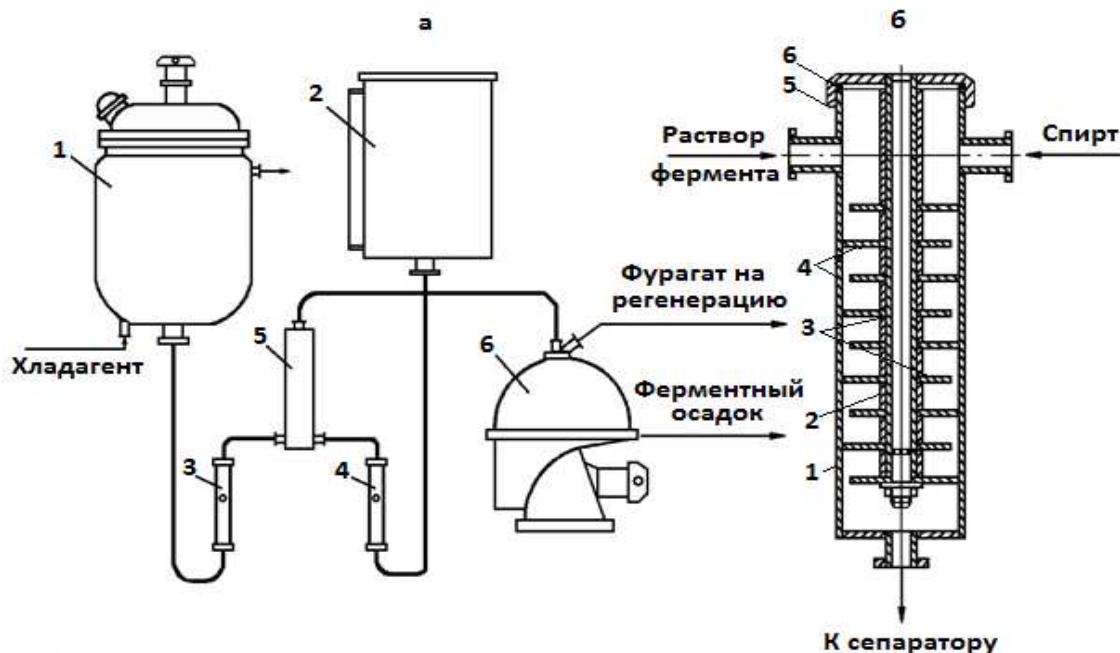


Рис. 11.4. Установка для непрерывного осаждения ферментов:

- а* – общая схема: 1 – сборник для ферментного раствора; 2 – мерник для спирта;
3, 4 – ротаметры; 5 – смеситель; 6 – сепаратор; *б* – смеситель непрерывного действия

контакта ферментов и растворителя сокращается в десятки раз, а выход ферментов повышается на 15–20 %.

Отделенный на сепараторе осадок может быть высушен в вакуум-сушильном шкафу, а также на сублимационной либо распылительной сушилке (после растворения в малом количестве воды). Сепарированную надосадочную жидкость, содержащую 50–75 % растворителя, направляют на регенерацию (в ректификационное отделение). После регенерации растворитель вновь поступает на стадию осаждения, а кубовый остаток, содержащий почти все сухое вещество из поверхностной культуры, может быть использован для приготовления комбикормов.

11.3. Перспективы высаливания ферментов

Известно, что ионы солей склонны к гидратации; при добавлении значительного количества соли происходит связывание воды. В то же время происходит дегидратация неполярных участков белка, которые стремятся образовать агрегаты, взаимодействуя друг с другом. Растворимость белка резко падает, и он выпадает в осадок. Чем выше концентрация соли, тем быстрее образуется осадка.

Различные белки реагируют на процесс высаливания неодинаково. Это зависит, в первую очередь, от количества и размеров гидрофобных участков на поверхности молекулы белка. Чем больше таких участков, тем легче протекает высаливание белков.

Растворимость белков в солевых растворах подчиняется уравнению Кона [8]:

$$\lg S = \lg S_0 - k_s \mu, \quad (11.1)$$

где S , S_0 – растворимость белка в растворе соли и чистой воде соответственно;

k_s – константа высаливания (зависит от природы соли и не зависит от рН среды);

μ – ионная сила раствора.

Для успешного высаливания необходимо, чтобы величина $k_s\mu$ была как можно больше. Усилить эффект высаливания можно путем увеличения ионной силы раствора.

На процесс высаливания влияют также рН среды, температура, длительность процесса и др. Наименьшую растворимость в солевых растворах белки имеют вблизи изоэлектрической точки. С повышением температуры растворимость белков обычно падает.

Для высаливания используют нейтральные соли щелочных металлов – сульфат аммония или хлористый натрий. Процесс ведут при температуре 20–30 °С.

Осадки, полученные при высаливании, имеют однородную структуру, содержат меньше балластных веществ, их легко сушить и измельчать, они слабо окрашены и хорошо растворяются. Если удалить из этих препаратов соль путем диализа или последующего осаждения органическим растворителем, можно получить сравнительно чистые ферментные препараты с минимальными потерями.

12. Сушка ферментных препаратов

Сушка ферментных препаратов имеет целью получить стабильные при хранении вещества. Для обезвоживания ферментных растворов и осадков применяют сушку в вакуум-сушильных шкафах, распылительных и сублимационных установках.

В вакуум-сушильных шкафах высушивание осадков производят в тонком (до 0,5 см) слое при температуре ≈ 30 °С и остаточном давлении не более 136 Па. Длительность высушивания зависит от давления в камерах, толщины слоя, структуры осадка и температуры теплоносителя. Процесс сушки протекает в 2 периода:

- удаляется поверхностная влага;
- удаляется влага из глубинных слоев материала.

Подогрев осуществляется водой, имеющей температуру 80–85 °С на первой стадии и 40–50 °С на второй стадии сушки. Потери активности препарата не превышают 6–10 %. Длительность процесса, в зависимости от лабильности фермента и режима, составляет от 8 до 16 ч. Сушку проводят на листах целлофана, поскольку достаточно смять целлофан – и высушенный препарат легко отлетает [9].

Высушивание пастообразных материалов можно осуществлять на контактных вальцовых сушилках, работающих под атмосферным давлением либо под вакуумом. Использовать такое оборудование целесообразно на предприятиях с небольшой производительностью. Однако в таких сушилках возможна инактивация ферментов из-за того, что вальцы обогреваются паром с температурой до 150 °С, и даже малая продолжительность контакта пасты с вальцами чревата потерей активности фермента (на 12–15 %). Толщина слоя на вальцах составляет 0,1–1,0 мм. Осадок высыхает за один оборот барабана и снимается с его поверхности ножом.

Производительность таких сушилок зависит от диаметра барабана (600, 800, 1000, 2000 мм), на который наносится паста, и от вида высушиваемого продукта, достигая в среднем 10–50 кг/ (м² · ч).

Также используют двухвальцовые атмосферные или вакуумные сушилки. Вальцы вращаются навстречу друг другу с частотой 2–10 мин⁻¹; зазор между ними составляет 0,5–2,0 мм, что определяет толщину высушиваемого слоя. Высушенный препарат снимают ножами. Если же препарат после этого имеет повышенную влажность, его обрабатывают в специальных шнековых доосушителях. Преимуществом последних является небольшая длительность сушки, а в качестве главного недостатка следует отметить относительно большую потерю активности ферментов при доосушивании.

Сублимационную сушку ферментных препаратов ведут в глубоком вакууме [9]. Материал на начальных стадиях сушки отдает часть влаги, охлаждается и самозамораживается. Затем в сушилку подают тепло, и лед возгоняется, минуя жидкое агрегатное состояние. При сублимационной сушке влага в продукте перемещается в виде пара, не захватывая частицы экстрактивных веществ.

Обычно процесс сублимационной сушки начинают с замораживания поверхности продукта при температуре $-20\dots-30$ °С и остаточном давлении порядка 130 Па. Скорость замораживания материалов существенно влияет на активность ферментов и других биологически активных веществ.

Все биологические материалы, в том числе ферментные препараты, имеют различную исходную влажность и поэтому обладают различными тройными эвтектическими точками (определяются экспериментально), при которых возможно равновесие льда, жидкой части и пара. Процесс сублимации происходит при давлении паров над поверхностью высушиваемого препарата и температуре ниже тройной точки фазового равновесия растворителя (воды).

Когда влажность продукта уменьшается до минимальных значений, температуру высушиваемого материала поднимают до $+30\dots+40$ °С. Из-за незначительного содержания кислорода в газовой среде сушильной камеры окислительные процессы минимальны, что создает благоприятные условия для сохранения активности фермента.

Процесс высушивания включает три стадии: замораживание осадка (удаляется 12–18 % от общего содержания влаги в продукте), возгонка льда (удаляется 50–65 % влаги) и удаление остаточной влаги при $30–32$ °С (конечное содержание влаги составляет 6–8 %). В таких сушилках ферменты практически не инактивируются. Длительность сублимационной сушки зависит от температуры и толщины слоя замороженного материала, разрежения в камере, температуры теплоносителя и физико-химических свойств высушиваемого материала. Сушку проводят при температурах замораживания $-50\dots-60$ °С и хладагента $-70\dots-80$ °С в течение 1,5 ч, затем в течение 1,5 ч температуру

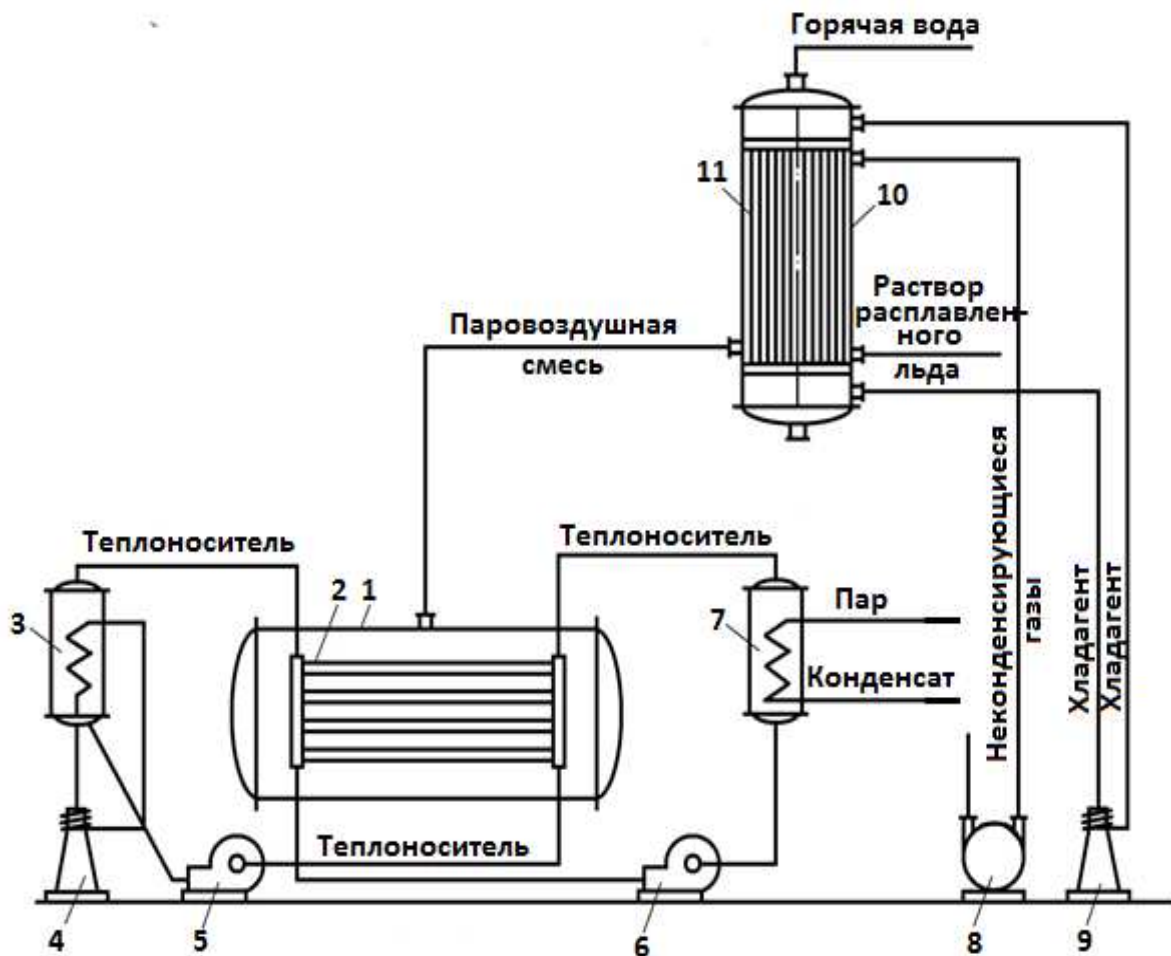


Рис. 12.1. Схема сублимационной сушильной установки периодического действия:

1 – закрытая сушильная камера (сублиматор); 2 – этажерка для загрузки высушиваемого материала; 3 – охлаждающий теплообменник; 4 – холодильная установка; 5, 6 – насосы; 7 – подогревающий теплообменник; 8 – вакуум-насос для неконденсирующихся газов; 9 – холодильная установка; 10 – конденсатор-десублиматор; 11 – трубы с хладагентом

повышают до $-20...-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, а окончательное высушивание происходит при температуре $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3–4 ч.

Схема сублимационной сушильной установки периодического действия представлена на рис. 12.1.

На предприятиях используют также сублимационные сушилки непрерывного действия. Они имеют по два сублиматора и десублиматора, которые работают попеременно. Производительность установки по испаренной влаге составляет не менее 200 кг/ч при продолжительности сушки 40–110 мин;

максимальная температура препарата в конце сушки – около 27 °С; потери активности при этом незначительны. Высушенный препарат измельчают до размера частиц 50–100 мкм. При измельчении нельзя допускать разогрева препарата, так как это способствует инаktivации фермента и пылеобразованию, при котором теряется до 5–7 % препарата.

С помощью *распылительной сушки* можно быстро обрабатывать большие массы ферментных растворов и получать измельченный сухой препарат [9]. При высушивании таким методом на сушку можно направлять как непосредственно КЖ, так и экстракт из поверхностной культуры или его концентрат, полученный любым способом. Для этого осадки перед высушиванием растворяют в воде до содержания сухого вещества 18–22 %. Пребывание препарата в сушильной башне составляет лишь 5–8 с. При соприкосновении массы с теплоносителем влага мгновенно испаряется, частицы охлаждаются, и поэтому, несмотря на довольно высокие температуры теплоносителя на входе и выходе, препарат не нагревается выше 35–40 °С; потери активности ферментов при этом не превышают 7–8 %.

На рис. 12.2 представлена принципиальная технологическая схема распылительной сушильной установки ОСС-500 для ферментных растворов с пневматическим подборщиком порошка ферментного препарата. Такая установка функционирует следующим образом.

Из бачка 1 раствор насосом 2 подается на распылительный диск 4 сушильной камеры 3, вращающийся со скоростью 240 мин⁻¹. При этом мельчайшие частицы жидкости в виде тумана образуют «веер» по поперечному сечению камеры. Одновременно в верхнюю часть сушильной камеры 3 поступает горячий воздух, подогретый в калориферах 6 паром при избыточном давлении в пределах 0,15–1,01 МПа.

Горячий воздух при прохождении через коллектор и распределитель по спирали попадает в нижнюю часть камеры. Воздух, проходя через туман распыленной жидкости, увлекает за собой взвешенные частицы жидкости. В

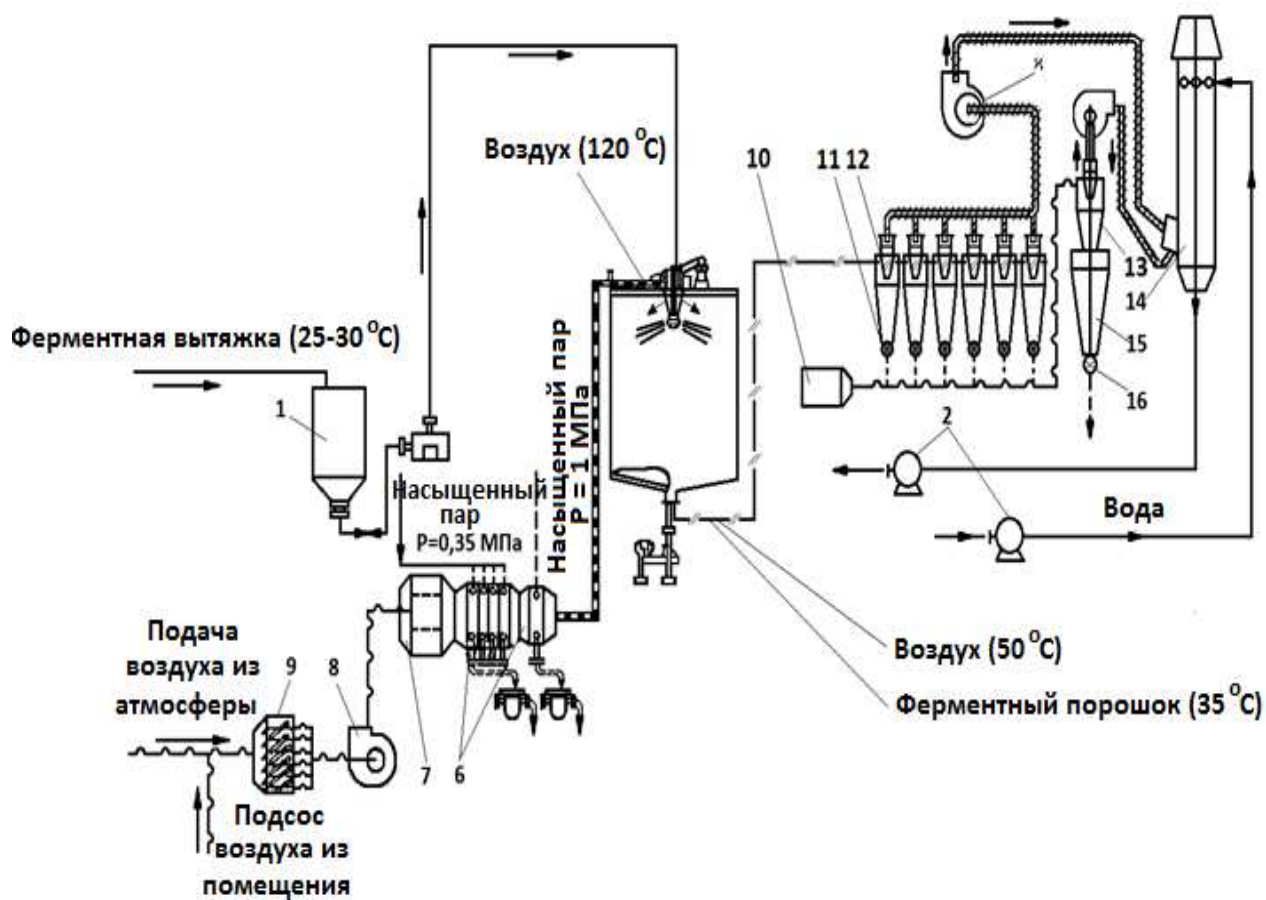


Рис. 12.2. Распылительная сушильная установка для ферментных растворов ОСС-500: 1 – бачок; 2 – насосы; 3 – сушильная камера; 4 – распылительный диск; 5 – пневматический подборщик; 6 – калорифер; 7 – подборщик; 8 – вентиляторы; 9 – фильтр; 10 – мерник; 11, 16 – затворы; 12 – циклоны-осадители; 13 – дозатор; 14 – скруббер; 15 – сборник для раствора

полете влага быстро испаряется, а сухие мельчайшие твердые частицы выпадают на дно сушильной камеры. Со дна камеры осадок собирается пневматическим подборщиком 5, работающим по принципу всасывания.

Воздух, поступающий в сушильную камеру, очищается. Аэрозоль воздуха, отработанного в сушилке, с порошком высушенного ферментного препарата, собранным пневматическим подборщиком, поступает по воздуховоду в батарею циклонов-осадителей 12. Батарея состоит из шести циклонов,

соединенных в две секции, работающие параллельно. В циклонах осаждается основное количество порошка ферментного препарата. Очищенный воздух вентилятором 8 подается в скруббер 14 для окончательного осаждения мельчайших частиц препарата, не улавливаемых циклонами.

Скруббер центробежного типа орошается первичным ферментным раствором, подаваемым насосом. При движении воздуха в скруббере (снизу вверх, по винтовой траектории) находящиеся в нем взвешенные частицы прижимаются к стенке аппарата, где смачиваются жидкостью, движущейся по стенке, и вместе с ней опускаются в нижнюю часть скруббера. Отсюда обогащенный раствор перекачивают насосом в сборник 15 и затем подают в сушилку. Очищенный влажный воздух удаляют из скруббера в атмосферу.

Осевший в циклонах порошок подается через шлюзовые затворы 16 в систему пневматического транспорта и затем направляется в бункер. При транспортировании воздухом одновременно происходит быстрое охлаждение ферментного препарата.

Снижение температуры позволяет сразу проводить расфасовку продукта в тару. Сушильная установка типа ОСС-500 имеет производительность 0,2 кг/с (по испаренной влаге).

Влажность исходного раствора ферментов составляет 97 %, а для высушенного препарата – 9–10 %; удельное напряжение по влаге на единицу объема сушильной камеры равно $2,5 \text{ кг}/(\text{м}^3 \cdot \text{ч})$.

Для уменьшения потерь при сушке распылением часто используют стабилизаторы или наполнители, обладающие защитным действием. С одной стороны, они призваны повысить устойчивость фермента к температурной инактивации; с другой стороны, с их помощью можно повысить концентрацию балластного сухого вещества в высушиваемом растворе, что важно для снижения механических потерь готового препарата с отработанным воздухом.

13. Микрокапсулирование и гранулирование ферментных препаратов

Неблагоприятные условия применения ферментных препаратов приводят к быстрому их инактивированию, увеличению расхода и снижают экономический эффект процесса. Поэтому заключение фермента в полупроницаемую оболочку в ряде случаев позволяет защитить его от воздействия внешних факторов.

Микрокапсулирование дает возможность многократного использования фермента, а также вывода из процесса в случае, если дальнейшее его пребывание в субстрате нежелательно. Заключение ферментного препарата в капсулу устраняет контакт рабочего персонала с ферментами, что важно с точки зрения повышения безопасности труда [10].

Полупроницаемая оболочка капсулы должна иметь небольшой размер пор, иначе фермент будет вымываться. В свою очередь, субстрат должен быть низкомолекулярным, чтобы проникнуть в капсулу, где он подвергается каталитическому воздействию фермента и удаляется во внешнюю среду. Это основной недостаток, ограничивающий применение микрокапсулирования для многих ферментных препаратов. Тем не менее к ряду ферментов (*каталаза, глюкозоизомераза, β -фруктофуранозидаза, β -галактозидаза*) этот метод вполне применим.

Размеры капсул составляют от нескольких нанометров до нескольких миллиметров. Толщина полупроницаемой оболочки, ее механические и физико-химические свойства зависят от вида полимера, способа микрокапсулирования и условия применения капсул.

Оболочки микрокапсул представляют собой полимеры животного (*казеин, желатин, альбумин*) или растительного происхождения (*КМЦ, метилцеллюлоза, ацетатцеллюлоза, нитроцеллюлоза*), синтетические полимеры (*поливинилацетат, полиакриламид, поливиниловый спирт*). Поскольку многие соединения токсичны, область их применения, к сожалению,

ограничена. Сам процесс микрокапсулирования осуществляют двумя способами – химическим или физическим.

Химическое микрокапсулирование – образование пленки на границе раздела фаз при реакциях полимеризации и поликонденсации.

Физическое микрокапсулирование – вакуум-напыление, микрокапсулирование в псевдоожигенном слое, а также процесс при взаимодействии аэрозолей, имеющих различный электрический заряд.

Наиболее часто используют химический способ. Используют органический растворитель, частично смешивающийся с водой, но хорошо растворяющий полимер, добавляют к нему ферментный препарат и интенсивно диспергируют смесь в среде насыщенного водного раствора хлорида, сульфата, нитрата или фосфата натрия, калия, аммония или кальция до получения частиц размером 5–20 мкм. Затем из смеси под вакуумом удаляют органический растворитель, и ферментный препарат оказывается заключенным в полупроницаемые полимерные оболочки. Этот процесс является дорогим и используется лишь в тех случаях, когда без него невозможно обойтись.

Более широко, чем микрокапсулирование, используется *метод гранулирования ферментных препаратов* [10]. Гранулирование обычно связывают с необходимостью ликвидировать пыление ферментного препарата и чаще всего применяют для препаратов, предназначенных к использованию в составе синтетических моющих средств. Гранулы должны быть близки по размерам к гранулам других компонентов стиральных порошков, прочными в сухом виде и не измельчаться, однако при контакте с водой легко и полностью растворяться в реакционной среде.

Гранулы ферментных препаратов можно получить *окатыванием, прессованием, таблетированием и в псевдокипящем слое* (см. рис. 13.1). В различных грануляционных установках совмещается несколько процессов – увлажнение, смешивание, гранулирование и сушка получаемых гранул.

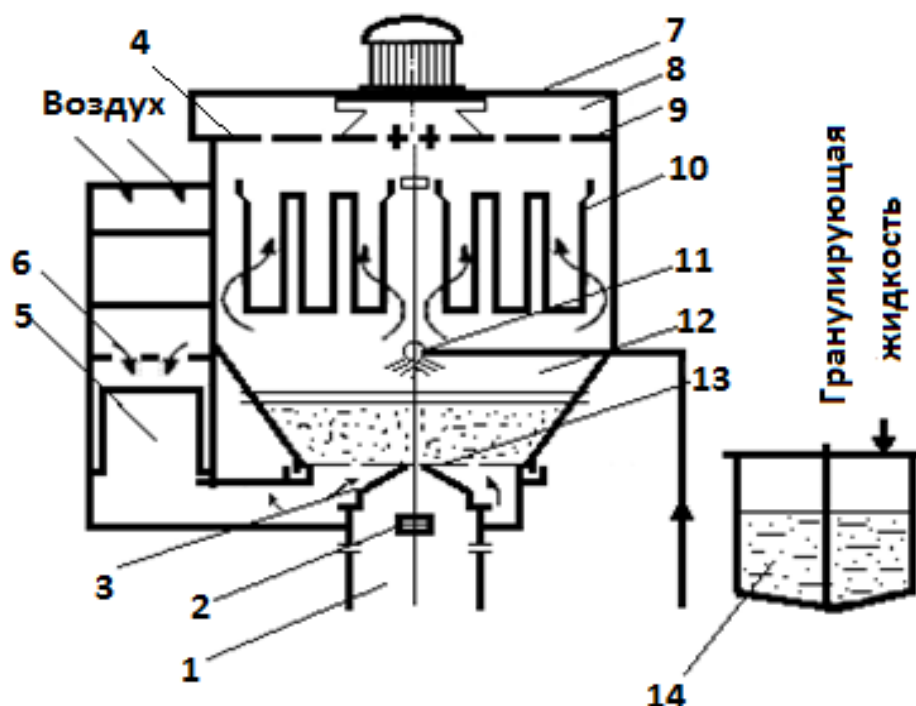


Рис. 13.1. Установка для гранулирования ферментных препаратов в псевдокипящем слое: 1 – приемная емкость; 2 – пневматический цилиндр; 3 – резиновый конус; 4, 9 – клапаны; 5 – калорифер; 6 – фильтр; 7 – вентилятор; 8 – сегментная камера; 10 – рукавный фильтр; 11 – форсунка; 12 – камера; 13 – перфорированное днище; 14 – емкость для жидкости

Недостатком метода гранулирования является возможность возникновения высоких зарядов статического электричества.

Производительность большинства грануляторов колеблется в пределах 0,2–600 кг/ч.

Для ферментных препаратов в виде гранул используют также гранулирование методом прессования. В России щелочную протеиназу (Протосубтилин Г10х) гранулируют методом экструзии с последующим окатыванием до гранул сферической формы.

Предварительно ферментный препарат смешивают с расплавленным ПАВ и затем направляют в корпус двухшнекового экструдера, где смесь прессуют и продавливают через отверстия нужных размеров. Окатывание гранул до сферической формы осуществляют в центробежном аппарате. Смесь должна

содержать не менее 37–40 % наполнителей (типа *алкилоамида*). Если подобных наполнителей не добавлять, из экструдера будет выходить неокатываемая порошкообразная масса.

14. Получение амилолитических препаратов

Амилазы объединяют большую группу ферментов, которые осуществляют гидролиз преимущественно α -(1,4)-гликозидной связи в амилозе, амилопектине, гликогене и других мальтоолигосахаридах. Они находят применение почти во всех областях, где перерабатывается крахмалсодержащее сырье [11].

К группе амилолитических ферментов относят:

- КФ 3.2.1.1** – α -амилаза;
- КФ 3.2.1.2** – β -амилаза;
- КФ 3.2.1.3** – глюкоамилаза;
- КФ 3.2.1.41** – пуллуланаза;
- КФ 3.2.1.68** – изоамилаза;
- КФ 3.2.1.20** – А-глюкозидаза;
- КФ 3.2.1.11** – декстраназа;
- КФ 2.4.1.19** – амилаза *Bacillus macerans*.

Амилазы широко распространены в природе. Их синтезируют многие микроорганизмы (бактерии, грибы, актиномицеты, дрожжи), животные и растения. До развития ферментной промышленности главным промышленным источником получения амилаз в европейских странах было проросшее зерно (солод). Для медицинских целей амилазы получали из животного сырья. В настоящее время главным источником амилаз являются бактерии, грибы и реже – дрожжи.

Механизм действия и свойства амилаз

Субстратами для амилаз являются крахмал, состоящий из амилозы и амилопектина, продукты частичного гидролиза крахмала и гликоген.

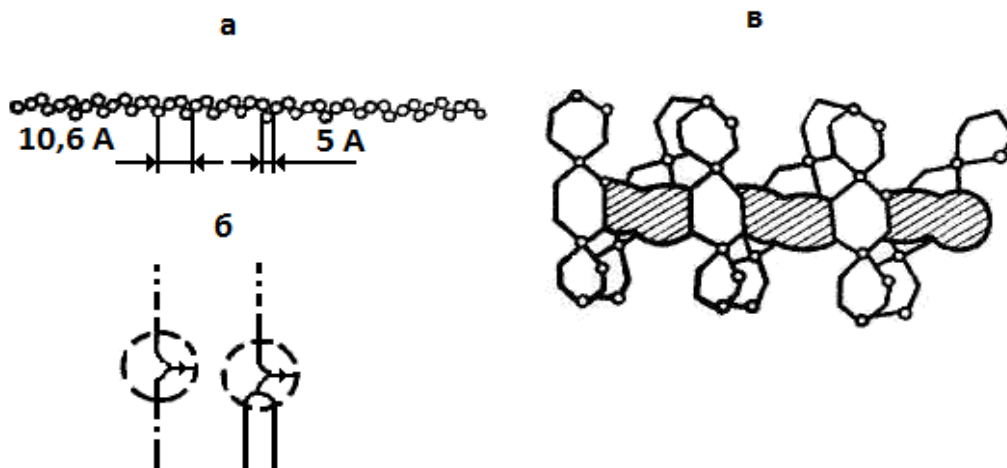


Рис. 14.1. Строение амилозы:

- а* – амилоза без аномальных отклонений; *б* – схема возможных ветвлений амилозы;
в – спираль амилозы в растворе с заключенными в ее полость молекулами йода

Амилоза практически не обладает восстанавливающей способностью, так как в каждой молекуле амилозы имеется только одна свободная альдегидная группа.

Молекула амилозы представляет собой растянутую спираль, шаг которой составляет $10,6 \text{ \AA}$ (рис. 14.1), и в каждый виток входит 3 остатка глюкозы. Максимальная длина молекулы амилозы достигает 7000 \AA . В растворе спираль сжимается за счет увеличения витка, в котором участвуют 6 остатков глюкозы.

Получение амилолитических ферментных препаратов

Амилолитические ферменты могут применяться в виде поверхностных и глубинных культур, жидких концентратов и сухих препаратов различной степени очистки [11].

При поверхностном выращивании продуцентов средой являются пшеничные отруби с добавлением до 25 % солодовых ростков, увлажненных водой, подкисленной 0,1 н. раствором серной или соляной кислоты. Выход готовой культуры составляет от 70 до 80 % массы среды. Продукентами α -амилазы и

глюкоамилазы чаще всего выступают микроскопические грибы *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. niger*, *R. delemar* и др. В Японии при твердофазном культивировании применяют бактерии *B. subtilis* и *B. amylosolvents*. Режимы выращивания зависят от физиологии продуцента.

Выращенная культура влажностью 36–50 % может быть высушена и использована как готовый препарат с индексом Гх, а также в сухом или влажном виде может быть передана на дальнейшую переработку с целью получения очищенных препаратов. Процесс очистки начинается с водной экстракции при 20–25 °С с отбором 200–220 %, средняя концентрация сухого вещества в экстрактах составляет 11–14 %. Экстракты с целью понижения уровня обсемененности микроорганизмами могут быть обработаны слабыми растворами электролитов. Далее экстракты можно сконцентрировать методом вакуум-выпаривания или ультрафильтрации.

Экстракт из поверхностной культуры может быть использован для получения очищенных амилолитических препаратов путем осаждения ферментов органическими растворителями или нейтральными солями.

Однако в настоящее время в нашей стране для получения амилолитических ферментных препаратов преимущественно используют глубинный способ культивирования продуцентов. В качестве продуцентов используют грибы рода *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. usamii*, *A. batatae*), спороносные бактерии, относящиеся к группам *B. subtilis mesentericus*, дрожжеподобные организмы родов *Endomycopsis*, *Endomyces* и многие другие микроорганизмы.

Самыми перспективными продуцентами термостабильных α -амилаз являются спороносные бактерии рода *Bacillus*. Кроме этого микроорганизма, можно назвать еще несколько активных продуцентов термостабильной амилазы: *B. acidocaldarius*; *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. diastaticus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*.

Японские ученые сконструировали новый штамм *B. brevis*, несущий ген амилазы из *B. stearothermophilus*. Этот штамм обладает уникальной способностью синтезировать внеклеточные белки, что дает возможность

получить штамм с амилалитической активностью в 100 раз большей, чем у донорной культуры.

Источники азота

Выбор сред для каждого продуцента проводится опытным путем с учетом физиологических потребностей продуцента и условий производства. Например, при изучении факторов, влияющих на биосинтез ферментов, было показано, что культура *B. subtilis* весьма чувствительна к источнику азота в среде.

Наилучшие результаты наблюдаются в присутствии *двузамещенного фосфата аммония*; органические же источники азота менее эффективны, чем неорганические. Дополнительное введение азота в виде экстрактов из растительного, животного и микробного материала к $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ позволяет на 30–40 % повысить продуцирующую способность бактерий и достичь лучшей активности.

Источники углерода

Главным источником углерода в среде для всех продуцентов α -амилазы является крахмал различного происхождения. Используют чаще всего крахмал картофельный или кукурузный, который вводится в среду в клейстеризованном состоянии. Взамен крахмала может применяться крахмалсодержащее сырье, например, ячменная или кукурузная мука. Все эти компоненты используют в нативном виде или в виде различных гидролизатов.

Установлено, что биосинтез α -амилазы протекает более интенсивно, если крахмал частично гидролизовать в процессе приготовления питательной среды, не допуская накопления в среде низкомолекулярных сахаров (например, мальтозы и особенно глюкозы). Поэтому, если состав среды предусматривает высокое содержание крахмала, целесообразно вводить его порциями по мере потребления культурой микроорганизма, что позволяет избежать явления репрессии синтеза α - или глюкоамилазы (рис. 14.2).

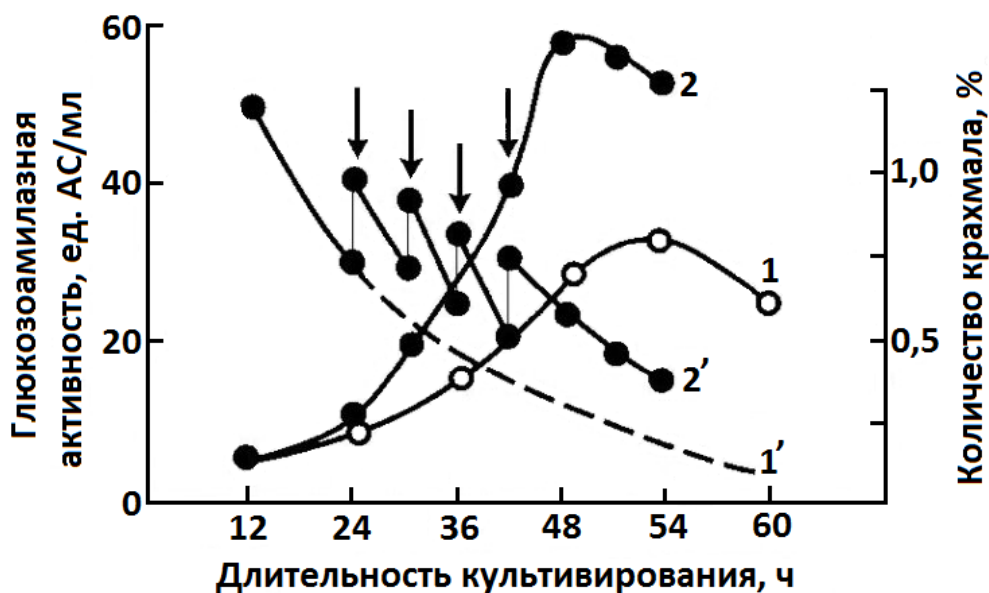


Рис. 14.2. Влияние дробного введения крахмала на биосинтез глюкоамилазы дрожжами *Endomycopsis sp. 20-9*: 1, 1' – контроль; 2, 2' – дробный режим введения крахмала (стрелка – время введения подпитки); 1, 2 – ГЛА; 1', 2' – уровень крахмала

В последнее время для увеличения секреции α -амилазы бактериальными культурами целенаправленно создают условия для интенсификации автолитических процессов под действием некоторых компонентов среды или продуктов метаболизма культуры – например, путем введения на определенной стадии роста гидролизата казеина, кислотного гидролизата кормовых дрожжей или кукурузного экстракта.

При работе с бактериальными культурами – продуцентами α -амилаз следует помнить, что вид *B. subtilis* подвержен естественной изменчивости. В процессе расщепления культуры появляются морфологические варианты с пониженной способностью к синтезу ферментов, что приводит к уменьшению выхода и снижению качества препаратов. Многолетние наблюдения за производственными штаммами *B. subtilis* показывают: такие изменения происходят не только по годам, но и месяцам (рис. 14.3), что предполагает необходимость постоянного контроля и отбора вариантов с высокой амилолитической активностью.

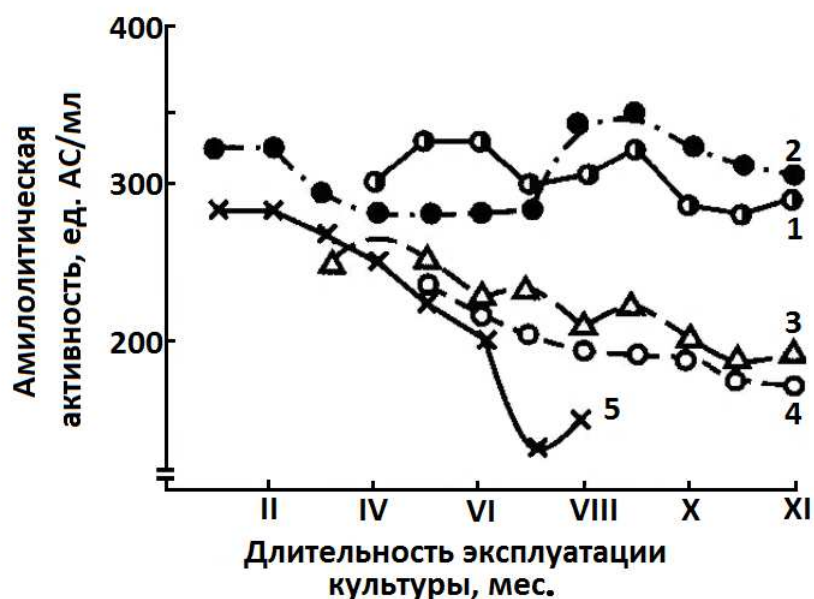


Рис. 14.3. Активность α -амилазы в культуральной жидкости различных штаммов *B. subtilis* при их длительной эксплуатации в производственных условиях: 1 – исходная культура; 2 – штамм SK-53; 3 – штамм E10N; 4 – штамм RW-355; 5 – штамм 5140

При конструировании сред как обязательный компонент используют крахмал в дозировках от 0,7 до 17 % в зависимости от продуцента. Для дрожжей процесс биосинтеза можно оптимизировать, вводя в состав среды олеиновую кислоту в качестве дополнительного источника углерода и фактора, способствующего автолизу культуры и повышению секреции глюкоамилазы во внешнюю среду.

Изучение влияния источника азота на биосинтез глюкоамилазы *Endomycopsis sp. 20-9* показало, что положительный эффект оказывает введение в состав среды солей NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ или KNO_3 . Однако лучшие результаты получаются при сочетании минерального и органического азота, например, при введении дрожжевого автолизата, кукурузного экстракта или других природных субстратов, содержащих значительные количества *аспарагиновой и глутаминовой кислоты*. С учетом перечисленных факторов для этого продуцента разработаны не только периодические, но и непрерывные режимы культивирования.

Интерес представляют разработки по производству глюкоамилазных препаратов на основе *Aspergillus awamori*. Использование сред с высоким содержанием крахмала и штаммов, у которых синтез глюкоамилазы не контролируется катаболитной репрессией, позволяет получать КЖ с активностью по глюкоамилазе свыше 300 ед./мл, что является большим достижением в технологии ферментов.

Выделение ферментов

Полученная КЖ может быть использована без дальнейшей обработки для осахаривания крахмалистого сырья в спиртовом производстве (например, *A. awamori*) или в виде фильтрата для осахаривания высококонцентрированных крахмальных клейстеров в крахмалопаточной промышленности.

Непосредственное использование КЖ в том или ином производстве требует ее немедленной реализации, так как она не может храниться из-за нестабильности растворов и инактивации ферментов.

Экономически оправдано централизованное производство стабильных, легко транспортируемых ферментных препаратов.

Для получения ферментных препаратов с индексом ГЗх фильтрат глубинной культуры непосредственно не используется, так как концентрация сухого вещества в культуральной жидкости, как правило, низкая.

Поэтому перед сушкой методом распыления фильтрат КЖ или культуру вместе с биомассой концентрируют, затем вносят наполнитель, стабилизатор, после чего направляют смесь на сушку. При сушке и концентрировании большое значение имеет правильный выбор стабилизатора фермента и температурного режима процесса (рис. 14.4).

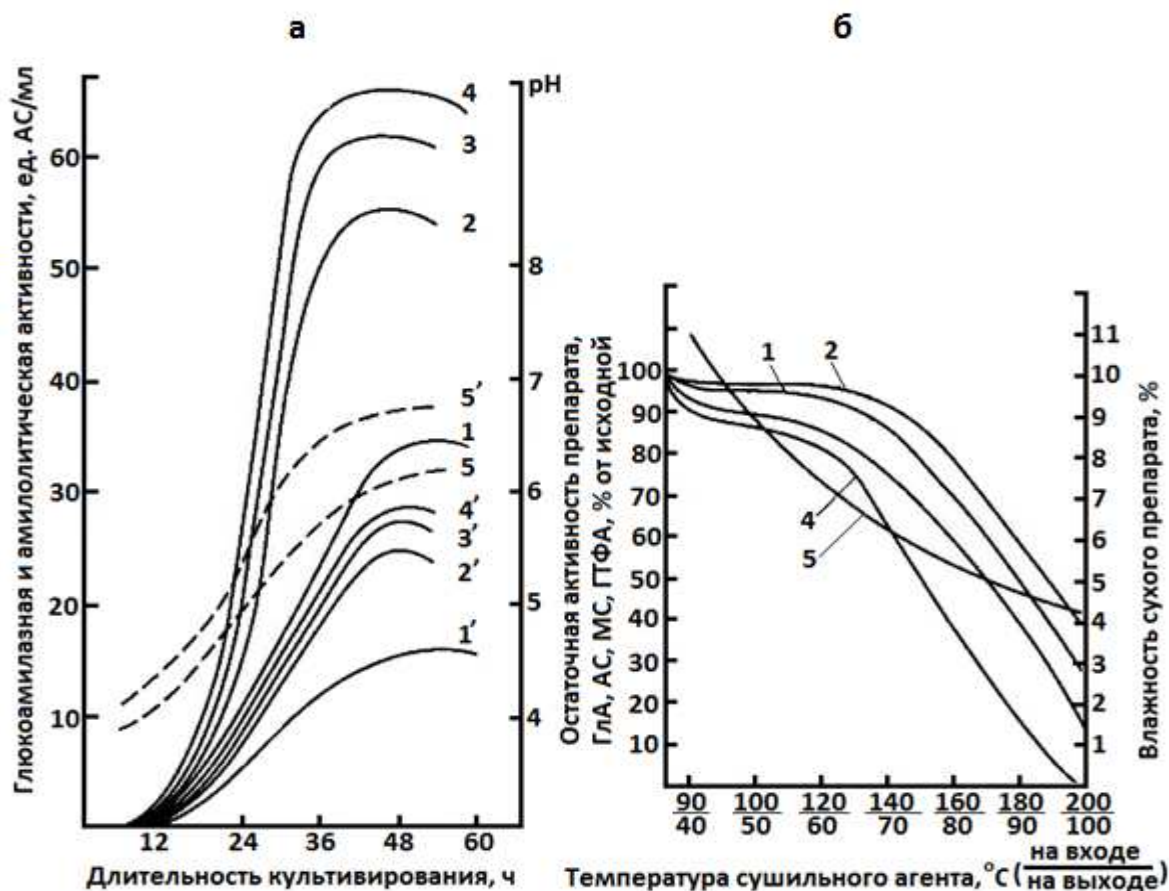


Рис. 14.4. Влияние различных факторов на биосинтез, ферментативную активность и влажность ферментных препаратов: *а* – влияние добавок ПАВ (концентрация ПАВ 0,1 %) на биосинтез глюкоамилазы культурой *Endomycopsis sp. 20-9* (кривые 1–4) и амилазы (кривые 1'–4') и изменение величины рН культуральной жидкости (5 и 5'); 1, 1', 5 – контроль; 2, 2' – добавление твина-65; 3, 3' – добавление твина-61; 4, 4', 5' – добавление твина-80; *б* – изменение ферментативных активностей и влажности препаратов при различных температурных режимах распылительной сушки КЖ *Endomycopsis sp. 20-9*: 1 – глюкоамилазная активность; 2 – амилазная активность; 3 – мальтазная активность; 4 – гликозилтрансферазная активность; 5 – влажность препарата

Присутствие стабилизаторов позволяет значительно снизить потери ферментативной активности в растворах. Введение этих же стабилизаторов в присутствии наполнителей перлита и каолина в процессе распылительной

сушки позволяет практически полностью предотвратить тепловую инактивацию ферментов.

Не менее важно определить оптимальную концентрацию сухого вещества в высушиваемом растворе и интервал рН, при котором не происходит инактивация фермента. Эти исследования следует проводить для каждого продуцента с учетом состава среды и наполнителя (рис. 14.5).

Для получения очищенных ферментных препаратов из глубинных культур используют традиционные методы концентрирования (ультрафильтрация, вакуум-выпаривание) и методы выделения органическими растворителями, солями, хроматографией и т.д.

Исследователи и производственники проявляют заметный интерес к получению *декстраназ* различной степени очистки и субстратной специфичности, особенно к *грибным декстраназам*, обладающим большей

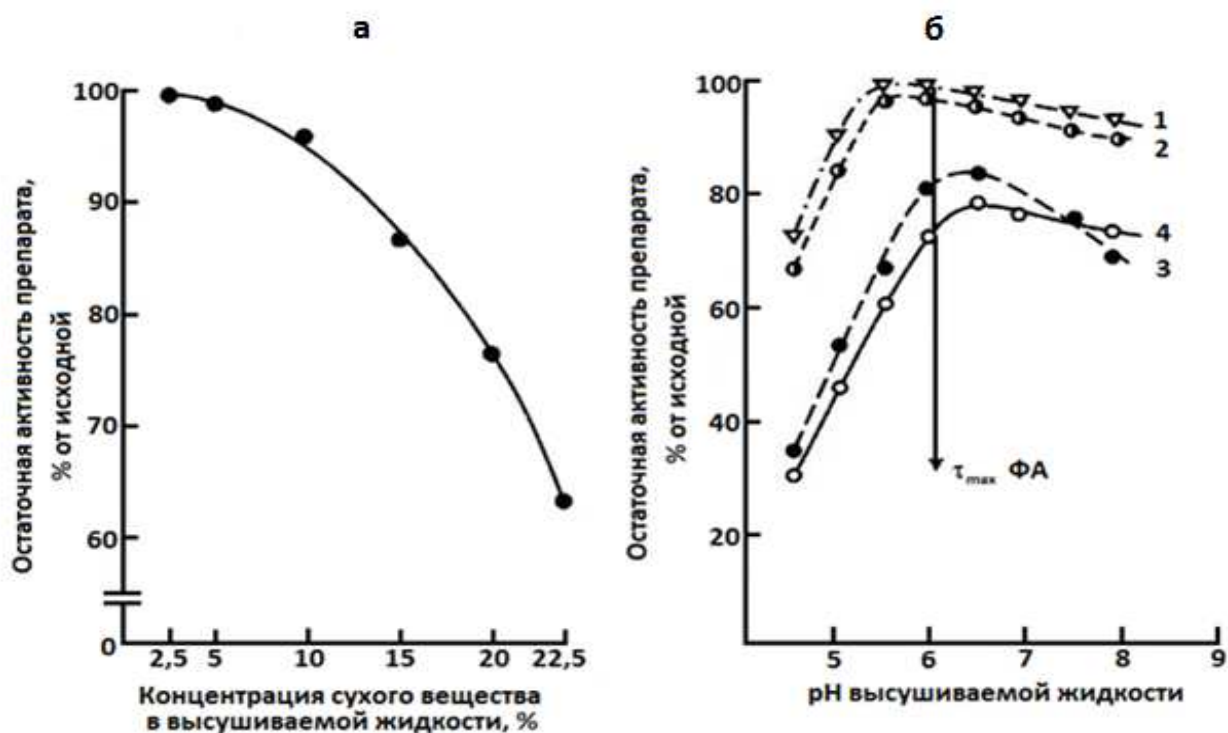


Рис. 14.5. Влияние концентрации сухого вещества (кривая *а*) и рН культуральной жидкости (кривые *б*) *Endomycopsis sp. 20-9* на ферментативную активность готового препарата:

1 – амилаза; 2 – глюкоамилаза; 3 – мальтаза; 4 – гликозилтрансфераза

предсказуемостью в поведении, чем бактериальные ферменты. Исходным материалом для получения очищенного препарата декстраназы служит фильтрат КЖ с активностью 12–15 ед. ДА/мл.

Схема выделения декстраназы включает: вакуум-выпаривание фильтрата КЖ при температуре 40 °С; осаждение этанолом; сушку препарата методом сублимации. Показано, что осаждение этанолом следует вести в соотношении 1:3 при температуре ферментного концентрата 4 °С и этанола -12 °С при рН, равном 4,3–4,7. При соблюдении этих условий выход декстраназы составляет 80–85 % от исходной активности в КЖ. Полученные препараты имеют активность 4000–5000 ед./г и удельную активность 150–200 ед. ДА/мг белка.

Для получения более чистых ферментных препаратов можно использовать фракционирование *этиловым спиртом* или *сульфатом аммония*, сорбцию и т.д. Например, с помощью фракционного осаждения этанолом можно освободиться от половины балласта и повысить активность получаемых препаратов до 10000–12000 ед. ДА/г препарата. Аналогичные результаты можно получить при высаливании декстраназы сульфатом аммония с последующим обессоливанием на *сефадексе G-15* или *акрилексах P-2* и *P-6*. Получают препараты с удельной активностью до 450 ед. ДА/мг белка, т.е. в 2,0–2,3 раза более чистый препарат, чем осажденный этиловым спиртом.

Существует реальная возможность использовать сорбцию и десорбцию для очистки декстраназ [11]. Для этого используют *каолин* и *бентонит*, обработанные особым способом. Декстраназа сорбируется на глинах из концентрата культуральной жидкости при рН 4,0–4,5 и десорбируется 0,01 н. раствором HCl при рН 8,5–8,6. Этот способ позволил на 99,4 % освободиться от углеводов, но декстраназа при такой очистке теряет стабильность, что отражается на удельной активности препарата, который не выдерживает сушки способом сублимации.

На рис. 14.6 представлена схема очистки, исключая гель-фильтрацию.

Основная сложность при реализации этой схемы – обеспечение условий



Рис. 14.6. Схема получения очищенной декстраназы из культуры *Penicillium funiculosum 15*

сорбции и десорбции декстраназы. Максимальная сорбция происходит при рН 3,0–4,0, а десорбция возрастает при росте рН от 6,5 до 8,5. Дальнейшее повышение рН до 9 вызывает инактивацию фермента. Для создания оптимального рН используют углекислый аммоний. Эта соль при лиофилизации распадается на NH_3 и CO_2 , благодаря чему удается получить лиофилизированный препарат без примесей солей, причем с удельной активностью, возросшей в 10 раз. Для предохранения высокоочищенной декстраназы от инактивации после отделения от фермента стабилизирующих углеводов примесей десорбцию декстраназы проводили в присутствии

стабилизатора в количестве 0,1 %. Стабилизатор представляет собой продукт глубокого гидролиза декстрана. В результате получают лиофилизированный препарат декстраназы, сохраняющий свою активность и хорошо растворимый в воде.

При использовании стабилизатора стало возможным использовать более глубокую очистку с целью получения гомогенного препарата декстраназы.

Взяв за основу схему, представленную на рис. 13.6, весь дальнейший процесс очистки, начиная с десорбции декстраназы с бентонита, следует проводить в присутствии стабилизатора, взятого в количестве 0,1 %. Элюированный с бентонита раствор подвергают хроматографии на целлюлозе, полученный элюат очищают совместно со стабилизатором путем гель-фильтрации, и раствор лиофилизируют. В итоге имеют гомогенный препарат декстраназы. Получаемый по данной схеме препарат обладает хорошей растворимостью, содержит 30–50 % белка, 40–60 % низкомолекулярного стабилизатора и 5,5–6,0 % связанных углеводов.

Таким образом, в России имеются предпосылки к осуществлению реальных работ по созданию амилолитических препаратов с последующим созданием соединений-включений, предназначенных для пищевой, медицинской и косметической промышленности, а также для сельского хозяйства.

15. Получение протеолитических препаратов

Ферменты, обладающие способностью гидролизовать белки, широко используют в различных отраслях промышленности [11]. Так, *протеиназы* применяют в пищевой технологии, где процесс протекает с использованием микроорганизмов (дрожжи, молочнокислые бактерии и др.). Протеолитические ферменты могут использоваться в хлебопечении; введение в тесто небольших добавок *амилаз и протеиназ* увеличивает газообразование, улучшает аромат, цвет корочки и мякиша, позволяет сократить технологическое время цикла.

Протеиназы широко применяют также для снятия различного рода белковых помутнений в пивоварении и виноделии и для ускорения фильтрационных процессов.

Протеолитические ферменты синтезируются практически всеми живыми существами. В промышленных целях как источник получения протеиназ используют животные ткани, растения и микроорганизмы.

Наиболее широким и перспективным источником протеиназ являются микроорганизмы. Активными продуцентами протеиназ являются бактерии, микроскопические грибы и актиномицеты.

Среди бактерий продуцентами протеиназ являются *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *B. mesentericus*, *B. licheniformis* 28 КА, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas salmonicida*. Богатейшие комплексы протеиназ, действующие в широком диапазоне рН, обнаружены у актиномицетов (например, *Actinomyces thermovulgaris*), проявляющих максимальную активность при рН 4,0, а также 7,5 и 11,0.

Среди микромицетов можно назвать многие продуценты протеаз и протеиназ, например, *Neurospora crassa*, *Trichoderma koningii*, представителей рода *Aspergillus* – *A. foetidus*, *A. flavus* и др. При поверхностном культивировании в качестве продуцентов чаще всего используют микроскопические грибы *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. terricola*, *A. candidus*, *R. oryzae*, *R. nigricans*, *R. cohnii*, *R. tonkiaensis*, *R. oligosporus* и др.

При этом основным компонентом среды являются пшеничные отруби. Для обогащения отрубей могут быть использованы некоторые добавки – белковый отстой, солодовые ростки (пивоваренное производство), просяная и соевая мука и т.п. Обычно рН среды составляет 5,6–6,2. Режим аэрации, температуры и длительность процесса для каждого продуцента устанавливают экспериментально. Готовую культуру либо высушивают, либо подают на последующую очистку. Водный экстракт может быть сконцентрирован или

Таблица 15.1

Основные этапы выделения протеиназы из технического препарата

Стадия выделения	Характеристика стадии	Выход протеиназы, % от исходной
Протосубтилин ГЗх	Исходный материал для выделения протеазы	100
Растворение	Растворение протосубтилина в воде с рН 7,8 до концентрации сухого вещества 10 %	92
Отделение нерастворимой части	Фильтрование	88
Концентрирование	Очистка ультрафильтрацией и концентрирование до содержания белка в концентрате 3,5-4,0%	84
Освобождение от пигмента	Обесцвечивание на ДЭАЭ-целлюлозе	82
Фракционирование ферментного комплекса	Хроматография на КМ-целлюлозе	44
Концентрирование элюата, получаемого при хроматографии	Обессоливание и концентрирование методом ультрафильтрации	38
Получение сухого препарата нейтральной протеиназы	Сублимационная сушка концентрата	22

Таблица 15.2

Некоторые свойства протеиназ, выделенных из *B. Subtilis*

Компонент протеиназ	Молекулярная масса	Изоэлектрическая точка, рI	Оптимальный рН	рК	$K_{ин}, c^{-1}$
I	44000	8,4	7,0	5,3; 8,8	$0,9 \cdot 10^{-3}$
II	40000	8,8	7,5–11,0	5,7; 9,3; 9,8;12,2	$4,0 \cdot 10^{-5}$
III	23000	9,5	6,5	5,3; 7,7	$3,3 \cdot 10^{-4}$
IV	29000	10,1	11,0	8,5	$2,0 \cdot 10^{-4}$

использован для осаждения ферментов растворителями или солями. При осаждении этанолом выход составляет до 70–73 % фермента, при осаждении изопропиловым спиртом – до 85–90 % протеиназ.

В качестве продуцентов протеолитических ферментов при глубинном культивировании в промышленных условиях используют бактерии рода *Bacillus*, реже – актиномицеты и микроскопические грибы.

Наиболее широко в нашей стране применяются штаммы бактерий, относящиеся к *Bacillus subtilis* и *B. mesentericus*.

На основе культуральной жидкости можно получить ферментные препараты различной степени очистки, используя разнообразные методы, начиная от высушивания распылением готовой КЖ и до методов получения высокоочищенных ферментных препаратов и кристаллических протеиназ. В табл. 15.1 представлены основные этапы выделения высокоочищенной протеиназы из технического препарата. Эта схема позволяет получить с высоким выходом (до 22 %) очищенный препарат внеклеточной нейтральной протеиназы из *B. subtilis*, которая относится к металлопротеиназам.

Дальнейшие исследования протеолитических ферментов позволили установить четыре их разновидности, которые различаются по многим физико-химическим характеристикам (табл. 15.2), особенно по оптимальным значениям pH.

Источниками ферментов животного происхождения являются слизистая оболочка свиных желудков, слизистая оболочка тонкого кишечника, поджелудочная железа, слюнные железы, семенники половозрелых быков. В производственных условиях получают ряд препаратов – пепсин пищевой, пепсин медицинский и сывороточный, желудочный сок, панкреатин для медицинских и технических целей, трипсин и др.

Рассмотрим этапы получения этих препаратов отдельно.

Пепсин пищевой

Схема получения складывается из пяти этапов:

1. *Подготовка сырья.* Замороженную слизистую оболочку в течение 12–15 ч дефростируют и измельчают на волчке.

2. *Автолиз слизистой оболочки.* К измельченной оболочке добавляют соляную кислоту и воду. рН такой смеси составляет около 2,0; обработку ведут 100 мин при температуре 43–45 °С и постоянном перемешивании. Затем смесь оставляют на 50–60 ч в покое при температуре 35–37 °С. При этом всплывает жир, прозрачный автолизат сливают, а нерастворенную часть оставляют еще на 2 сут. для дополнительного отделения пепсина.

3. *Высаливание.* Прозрачный автолизат охлаждают до 18–20 °С, устанавливают добавкой соляной кислоты рН в области 2,0–2,2 и высаливают поваренной солью. Всплывший белок оставляют для уплотнения на 1–2 ч, после чего солевой раствор удаляют.

4. *Сушка препарата.* Влажный осадок, содержащий фермент, высушивают при температуре 30–35 °С в вакуум-сушильном шкафу.

5. *Измельчение, стандартизация и расфасовка препарата.* Высушенный ферментный препарат измельчают в течение 3–4 ч, затем стандартизируют поваренной солью до активности 100 000 ед./г и осуществляют расфасовку.

Пепсин медицинский

Свежее сырье подают на измельчение. Автолиз проводят при температуре 40–42 °С в течение 8 ч при перемешивании и дополнительно 40 ч в покое. Жировая часть и неперевавшаяся слизистая оболочка всплывает. Прозрачную часть отделяют, фильтруют и охлаждают до 18–20 °С, осуществляют высаливание хлоридом натрия. Высоленная масса, содержащая фермент, всплывает на поверхность, жидкую фазу отделяют на сепараторе, а осадок направляют на сушку в вакууме при 35–40 °С (или сублимационным способом).

Высушенный пепсин измельчают на шаровой мельнице до состояния пудры и просеивают через шелковое сито.

Желудочный сок

Получают из слизистых оболочек желудка свиней по технологии, близкой к получению ферментных препаратов пепсина. Измельченное сырье подвергают автолизу при температуре 45 °С в присутствии соляной кислоты в течение 45–50 ч. Освобожденный от взвеси автолизат фактически является концентратом желудочного сока, его консервируют и стандартизируют соляной кислотой и хлороформом, растворенным в этиловом спирте. Желудочный сок готовят на основе 0,5 %-го раствора соляной кислоты. Полученную смесь выдерживают 45–50 ч при температуре 15–20 °С, затем желудочный сок фильтруют для очистки от грубой взвеси и расфасовывают в стерильные стеклянные флаконы.

Препараты из поджелудочной железы

Из поджелудочной железы можно получить разнообразные ферменты – *трипсин, химотрипсин, рибонуклеазу, дезоксирибонуклеазу, панкреатонептидазу, коллагеназу* и комплексный препарат *панкреатин*.

Трипсин – протеолитический фермент, играющий важную роль в процессе пищеварения. Процесс его получения включает три этапа:

1. *Подготовка сырья.* Поджелудочную железу измельчают на волчке, пропуская через решетку с отверстиями диаметром 2–3 мм, после чего измельченный материал выдерживают при комнатной температуре 5 ч.

2. *Экстракция поджелудочной железы.* Используют подкисленную дистиллированную воду; общая продолжительность составляет 16 ч. В течение первых 8 ч проводят периодическое перемешивание экстракционной смеси при

температуре 5 °С. После отделения жидкой фазы проводят вторую экстракцию при условиях, указанных выше.

3. *Высаливание.* Экстракт фильтруют и обрабатывают сульфатом аммония. Полученный осадок (*высол*) отбрасывают, а надосадочную жидкость вновь обрабатывают указанной солью. Полученный осадок высушивают в вакуум-сушильном шкафу, сухой порошок измельчают, просеивают и упаковывают в стеклянные банки. Препарат используют для получения однослойных культур клеток, он является комплексным препаратом, содержащим *трипсин* и *химотрипсин*.

Химотрипсин – фермент, содержащийся в поджелудочной железе в неактивном состоянии в виде *химотрипсиногена*. Отдельно химотрипсин не получают, обычно он присутствует в препарате *трипсин* или его выделяют в очищенном (иногда – в кристаллическом) виде, используя общепринятые методы – денатурацию, осаждение при изменении рН, фракционирование органическими растворителями, абсорбцию, ионообменную хроматографию, кристаллизацию.

Коллагеназа – протеолитический фермент, осуществляющий в щелочной среде гидролиз белка соединительных тканей и сухожилий (коллагена). Его выделяют из измельченной поджелудочной железы путем экстракции 20 %-м водным раствором глицерина при 20 °С в течение 24 ч.

Панкреатопептидаза (эластаза) – фермент, вырабатываемый поджелудочной железой и способный гидролизовать волокно стенок артерий. Активируется трипсином.

Панкреатин. В панкреатическом соке были обнаружены и изучены ферменты: *трипсин*, *химотрипсин*, *карбоксипептидаза*. Панкреатин – ферментный препарат, содержащий все ферменты, находящиеся в поджелудочной железе.

Панкреатин медицинский получают в промышленных условиях по схеме:

1. *Подготовка сырья.* Мороженную поджелудочную железу выдерживают при 20 °С в течение 8–10 ч и затем измельчают на волчке.

2. *Экстракция.* Осуществляют при непрерывном перемешивании с добавлением к измельченной массе воды, подкисленной уксусной кислотой. Продолжительность составляет 1 ч.

3. *Центрифугирование и сушка.* Экстракционную смесь центрифугируют на суперцентрифуге. Отделенную жидкую фазу панкреатина высушивают на распылительной сушилке при 100–110 °С на входе и при 50–55 °С на выходе.

4. *Обезжиривание.* Сухой порошок обезжиривают бензином. После обезжиривания препарат просушивают при температуре 30–35 °С до полного удаления запаха бензина.

5. *Просеивание и стандартизация наполнителем.* Полученный порошок просеивают через шелковое сито, проверяют активность и добавляют либо лактозу, либо сахарную пудру до получения стандартной активности.

Препараты из семенников

Семенники вырабатывают мужской половой гормон и фермент *гиалуронидазу*. Семенники собирают от всех видов здорового половозрелого скота. Из семенников делают два ферментных препарата – *ронидазу* и *лидазу*.

Ронидаза – белковый препарат, обеспечивающий рассасывание рубцов и снижающий негативные последствия травм. Препараты применяют наружно в виде суспензий и присыпок. Технология получения включает следующие этапы:

1. *Подготовка сырья.* Семенники измельчают на волчке, измельченную массу пропускают через решетку с отверстиями диаметром 2–3 мм.

2. *Экстракция.* Проводят из измельченного материала физиологическим раствором в течение 30 мин. Жидкую фракцию отделяют, а к мезге вновь добавляют свежий физиологический раствор и выдерживают при перемешивании 15 мин. Мезгу отделяют, получают второй экстракт и объединяют его с первым экстрактом.

3. *Сушка и измельчение.* Жидкую фракцию от первой и второй экстракции высушивают, затем сухой остаток измельчают и расфасовывают.

Лидаза – белковый препарат из семенников половозрелых быков, предназначенный для инъекций. Схема производства лидазы включает этапы:

1. *Измельчение и дефростация.* Замороженные семенники измельчают на волчке и выдерживают при комнатной температуре.

2. *Автолиз.* К измельченным семенникам добавляют 12 %-ю уксусную кислоту, выдерживают в течение 18–20 ч при pH 4,5–4,6 и температуре 39–40 °С. Затем отделяют жидкую фракцию.

3. *Стерилизующая фильтрация жидкой фракции автолизата.* Осуществляют через обеспложивающий фильтр.

4. *Осаждение фермента гиалуронидазы.* Профильтрованную часть охлаждают и вливают в 4 объема ацетона. После 3–5 ч отстаивания на холоду жидкость декантируют с осадка. Осадок с оставшейся жидкостью центрифугируют, при этом в стакане образуется три слоя: верхний – ацетон; средний – осадок; нижний – сиропобразная жидкость чайного цвета.

5. *Растворение фермента гиалуронидазы.* Осадок (средний слой) растворяют в дистиллированной воде, охлажденной до температуры 2–3 °С; раствор фильтруют и отбирают пробу на определение активности фермента.

6. *Стерильный розлив и сублимационная сушка.* Стерильный раствор разливают по 1 мл в стерильные флаконы. Жидкость подвергают сублимационной сушке под вакуумом в течение 15–24 ч; флаконы герметично закрывают.

16. Получение липолитических препаратов

По Номенклатуре ферментов, *липаза* имеет название «*триацилглицеролацилгидролаза*» (КФ 3.1.1.3), рекомендуемое рабочее название – «*триацилглицероллипаза*». Этот фермент имеет еще названия «*трибутираза*», «*липаза триглицеридов*», «*липаза*» [12].

Липазы представляют большой интерес для многих отраслей народного хозяйства, где необходим частичный или полный гидролиз жиров и масел. Они обладают способностью перераспределять жирные кислоты, находящиеся в реакционной смеси, и замещать ими другие, входящие в состав глицеридов, осуществляя модификацию последних.

Применяются в пищевой и легкой промышленности, сельском хозяйстве, медицине, бытовой химии, коммунальном хозяйстве, в аналитической практике. Довольно высоки перспективы использования липаз для очистки сточных вод от жиров, при переработке бытовых отходов, для очистки канализационных коммуникаций.

Липазы можно успешно использовать также в процессе приготовления легкоусвояемых кормов, для улучшения обмена веществ у животных. Области использования липаз в промышленности указаны в табл. 16.1.

Однако широкого применения в нашей стране микробные липазы пока не имеют. Это связано с отсутствием стабильных и высокопродуктивных микроорганизмов – продуцентов липаз, которые могли бы эффективно работать в условиях производства.

Главными субстратами для липаз являются липиды.

Наиболее перспективным источником липаз являются микроорганизмы, так как животное и растительное сырье не может удовлетворить растущую потребность в этих препаратах. Липазы образуют очень многие микроорганизмы. Бактерии, как правило, накапливают *внутриклеточную липазу*, а актиномицеты, грибы и дрожжи – в основном, *внеклеточную липазу*.

Промышленное использование микробиальных липаз

Область использования	Действие	Продукт
Продукты на основе молока	Гидролиз молочных жиров, модификация сливочного масла	Ароматизирующие агенты сыра и масла
Хлебопекарные производства	Улучшение аромата и продление срока хранения	Хлебобулочные изделия
Напитки	Улучшение аромата	Напитки
Пищевые приправы	Улучшение качества	Майонез, другие приправы
Переработка мяса и рыбы	Улучшение аромата и удаление жира	Мясные и рыбные продукты
Лечебное питание	Транс-этерификация	Диетическая пища
Жиры и масла	Разложение с получением ценных жирных кислот	Масло какао, маргарин, жирные кислоты, глицерин, ацилглицеролы
Химикаты	Синтез	Хиральные соединения и реагенты
Фармацевтические производства	Транс-этерификация, гидролиз	Препараты для нормализации пищеварения
Косметика	Синтез	Эмульгаторы, увлажняющие агенты
Производство кожи	Гидролиз	Кожаные изделия
Производство бумаги	Гидролиз	Бумажные изделия
Химчистка	Гидролиз	Удаление загрязнений

Среди бактерий найдены активные продуценты липаз, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*. Среди дрожжей лучшими продуцентами являются представители рода *Candida* (*C. lipolytica*, *C. paralipolytica*, *C. cylindraceae*). Для промышленного использования чаще всего рекомендуется использовать микроскопические грибы. Высокая липазная активность отмечается у грибов *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Humicola*. Продуценты

липаз найдены и среди актиномицетов, например, у видов *Streptomyces flavogriseus*, *Thermoactinomyces vulgaris* и ряда других.

Механизм действия липазы

Фермент производит гидролитическое расщепление триацилглицерола из диацилглицерола и остатка отщепляемой жирной кислоты. Затем идет отщепление следующих остатков жирных кислот до образования глицерина. При этом скорость отщепления кислотного остатка от триацилглицерола в несколько раз больше, чем от диацилглицерола и тем более от моноацилглицерола. Фермент проявляет наибольшее сродство к эфирной связи, расположенной на внешней части молекулы триацилглицерола. Выявлено, что липазы различного происхождения способны контактировать с определенными кислотными остатками.

Многие липазы чувствительны даже к небольшим количествам антибиотиков, которые ведут себя как конкурентные ингибиторы фермента; степень ингибирования зависит от происхождения липазы. Липолитические ферменты, выделенные из различных источников, различаются по термостабильности. Известны липазы, стабильные при 20 и 65 °С, но большинство из них стабильны в диапазоне 30–40 °С. Ряд липаз достаточно активен и при относительно низких температурах.

Стабильность фермента во многом зависит от степени его очистки. Для большинства липаз справедливо положение: чем они чище, тем ниже их стабильность. Поэтому для каждого ферментного препарата определяют оптимальную температуру и рН среды, при которых она наиболее активна (рис. 16.1). В зависимости от этого фактора липазы подразделяют:

- кислые (рН 4,0–6,0);
- нейтральные (рН 6,5–7,2),
- щелочные (рН 7,5–9,0).

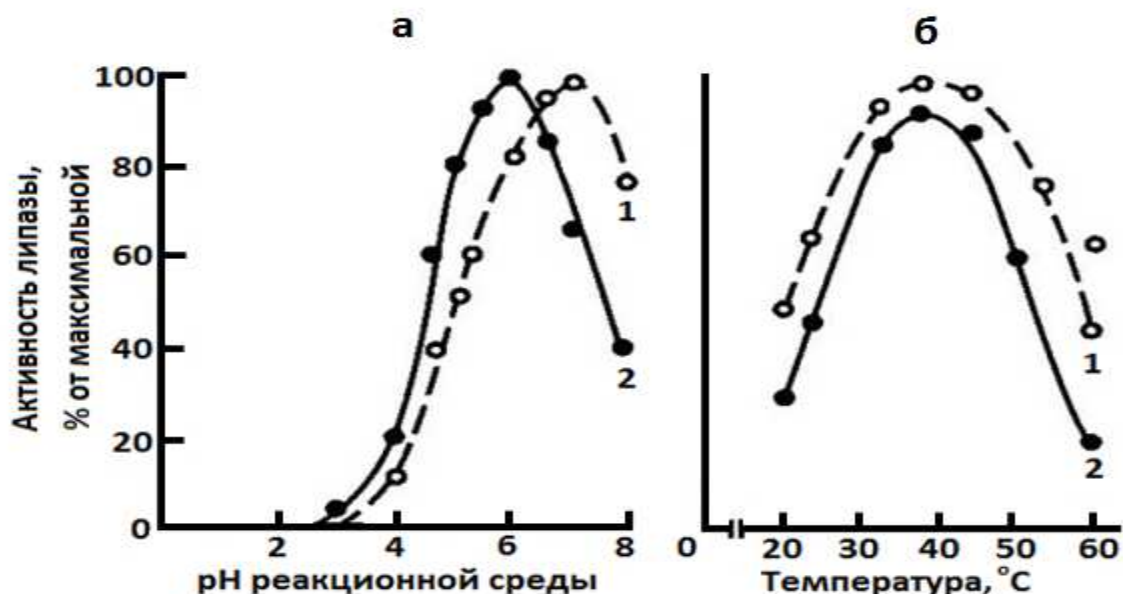


Рис. 16.1. Зависимость активности липазы *R. oryzae* от степени очистки, pH среды (а) и температуры (б): 1 – препарат, осажденный этанолом; 2 – высокоочищенная липаза

Значительный промышленный интерес вызывают микроорганизмы, продуцирующие щелочные, термостабильные липазы, особенно представители родов *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Bacillus*.

Для осуществления интенсивного биосинтеза большое значение имеет не только отбор высокопродуктивного микроорганизма, но и состав среды и условия его культивирования [12].

Источники азота

Одним из основных компонентов среды является источник азота. Используют *минеральные, органические и смешанные источники азота*. Присутствие витаминов, нуклеиновых кислот и других соединений способствует биосинтетической деятельности многих микроорганизмов. Важным компонентом является соевая мука, липидный комплекс которой оказывает стимулирующее действие на биосинтез липаз многими микроорганизмами. Отмечается, что усиление стимулирующего эффекта при применении сои и соевого лецитина происходит при совместном их

использовании с кукурузным экстрактом. В качестве источника азота в составе среды используют молочную сыворотку, экстракты хлопкового и подсолнечного шротов, кормовые дрожжи, осадочные пивные дрожжи.

Японскими учеными выдвинуто предположение о том, что для биосинтеза липаз грибными культурами необходимым условием является повышенное содержание азота в питательных средах.

Источники углерода

Источниками углерода в средах могут быть сложные органические соединения – крахмал, декстрины, а также олиго-, ди- и моносахариды.

В состав среды часто вводят компоненты липидной природы, так как, по мнению многих исследователей, липазы являются индуцибельными ферментами; при этом положительный эффект связан с природой липида и особенностями его продуцента. Чаще в составе питательных сред используют оливковое и хлопковое масла, реже – подсолнечное, рапсовое, кукурузное, касторовое, соевое или льняное масло и кашалотовый жир. Ряд продуцентов увеличивает биосинтез липаз в присутствии не только масел, но и жирных кислот.

Условия культивирования

Биосинтез ферментов определяется не только составом среды, но и условиями культивирования продуцента (температура, длительность культивирования, рН среды, посевной материал, аэрация). На примере *R. oryzae* можно видеть, насколько велика роль этих факторов при накоплении липаз в КЖ (рис. 16.2).

Так, из рис. 16.2, *а* видно, что только при рН среды, равном 5–6, и температуре 27–30 °С обеспечивается максимальное накопление фермента. Продолжительность культивирования не должна превышать 48–50 ч (рис. 16.2, *б*).

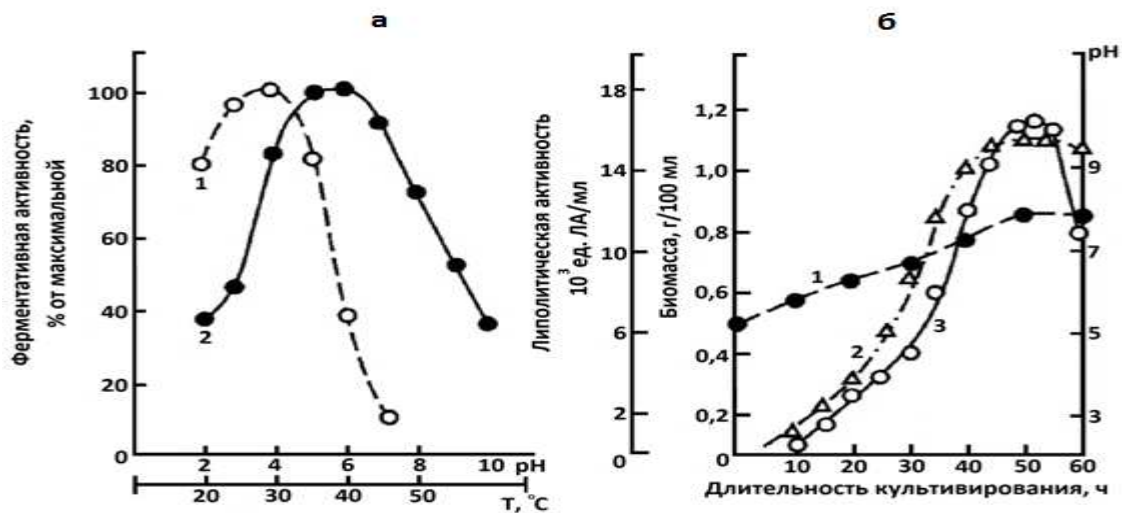


Рис. 16.2. Влияние температуры (1) и pH среды (2) на биосинтез липазы (а) и продолжительности культивирования (б) на изменение pH (1), накопление биомассы (2) и образование липазы (3). Основа культуральной жидкости – микроорганизм *R. oryzae*

Наибольшей биосинтетической способностью культура обладала при засеве среды 20-часовым материалом в количестве 2 % (по объему среды). При использовании других продуцентов условия выращивания всякий раз устанавливаются экспериментально

Выделение ферментов

Получение препаратов липаз и их очистку проводят из фильтратов КЖ. Биомассу продуцента и твердую взвесь среды отделяют центрифугированием или фильтрованием. Жидкая фаза культуры стабилизируется солями и концентрируется путем ультрафильтрации или вакуум-выпаривания. Полученный концентрат может высушиваться для получения технических препаратов с индексом ГЗх. Однако чаще проводят выделение фермента методом осаждения органическими растворителями или сульфатом аммония. Липазы весьма чувствительны к воздействию растворителей, так как при этом довольно часто наблюдается частичная денатурация белка, что может в ряде случаев привести к нарушению организации активного центра и потере

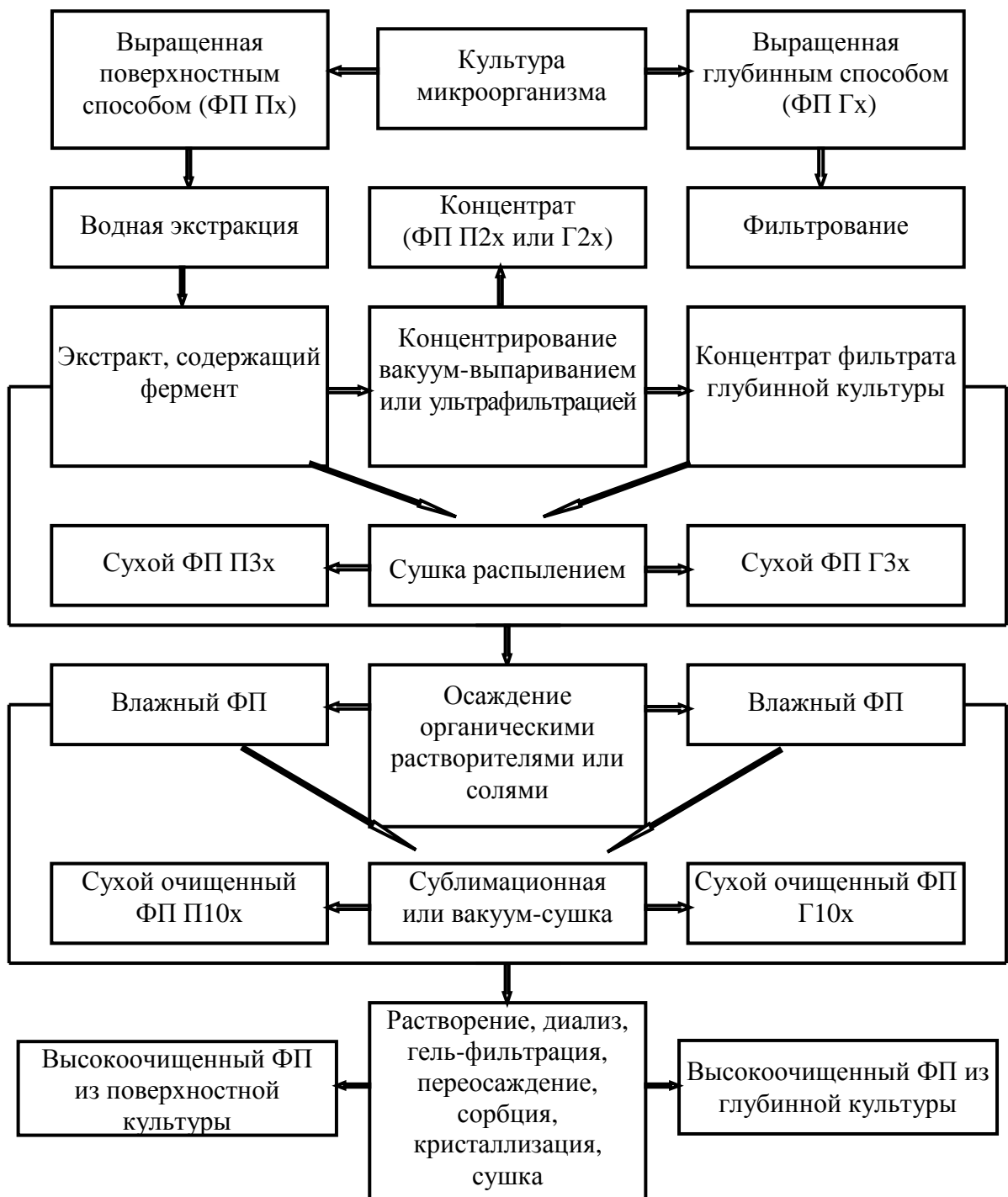


Рис. 16.3. Принципиальная схема получения ферментных препаратов.

Обозначение: ФП – ферментный препарат

активности фермента. Поэтому для выделения липаз высаливанием чаще применяют сульфат аммония.

Для получения высокоочищенных препаратов липаз широко используют методы хроматографии, электрофорез, гель-фильтрации и изофокусирования.

Принципиальная схема получения ферментных препаратов (ФП) показана на рис. 16.3.

Из фильтрата культуральной жидкости *R. oryzae* был выделен препарат высокоочищенной липазы с активностью липазы 13,3 % от исходной (289–500 ед./мг белка). Липаза *R. oryzae* довольно активно расщепляет оливковое масло (принято за 100 %), практически так же – хлопковое масло и животный жир, несколько лучше – маргарин (118 %) и особенно интенсивно – микробный жир дрожжей *S. guilliermondii* (196,2 %). Молекулярная масса фермента 108000, оптимальная температура получения 35 °С; оптимальное значение рН среды составляет 6,0 (фермент стабилен в диапазоне рН от 4 до 8).

Для промышленного использования разработан способ выделения гомогенной липазы из препарата «Липоризин Г10х», полученного из фильтрата культуральной жидкости *R. oryzae*.

Схема очистки препарата «Липоризин Г10х» представлена на рис. 16.4.

Степень очистки при получении гомогенного препарата достигла 44 (по сравнению с исходным препаратом «Липоризин Г10х»), удельная активность – $142 \cdot 10^5$ ед./г белка. Однородность фермента подтверждена методами электрофореза, гель-фильтрации, изоэлектрофокусирования и значением опытного коэффициента скорости седиментации.

Липазы в высокоочищенном и гомогенном виде выделены из многих организмов со степенью очистки 20–960 по сравнению с исходной культурой. Наблюдаемый выход активности в препарат также очень разный – от десятых долей процента до 32 % .

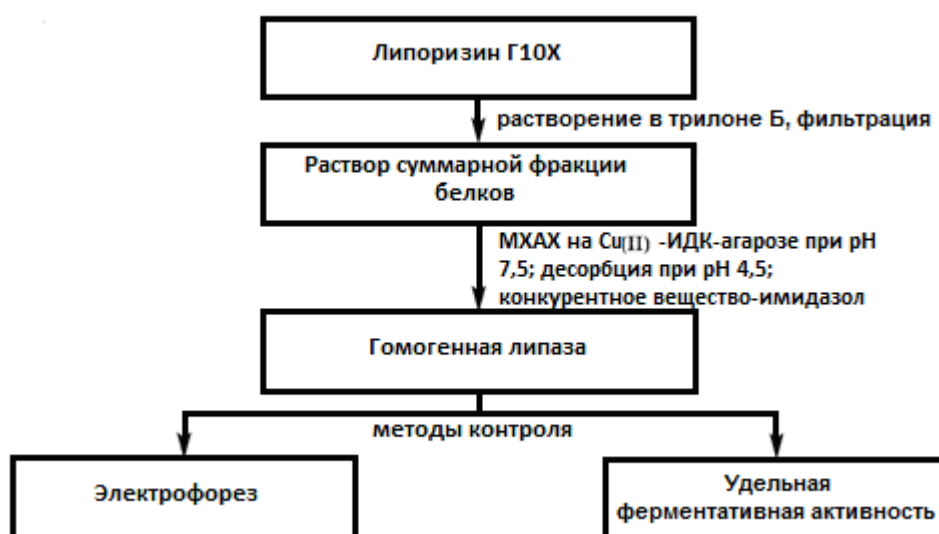


Рис. 16.4. Схема очистки препарата «Липоризин Г10х»

Так, японская фирма «Тойокодьо» запатентовала способ очистки липаз с использованием сорбентов в виде солей высших жирных кислот, которые формируют в виде гранул или микрокапсул. Фермент сорбируется в них, а затем элюируется с помощью ПАВ. Такой способ позволяет получать высокоочищенные препараты с активностью 90–95 % от исходной.

Биоспецифическая хроматография является самым перспективным методом выделения липаз. Однако широкое внедрение указанного метода в производство ферментов сопряжено с определенными трудностями, главными из которых является малая доступность веществ, используемых в качестве лигандов, небольшая емкость сорбентов и высокая стоимость последних.

Мировой выпуск высокоочищенных липолитических препаратов весьма ограничен. Чаще всего используют комплексы, содержащие, помимо липазы, также протеазу, амилазу, а иногда – целлюлазу и пектиназу. Препараты, обладающие липолитической активностью, выпускают в США (фирмы *Miles Chemical, Rohm & Haas*), Японии (*Amano, Djennihon Seikage, Sankyo, Meito, Sangys, Nagase*), Германии (*Hoechst*), Франции (*Rapidase*) и Нидерландах (*Gist Brocades*) [12].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате освоения дисциплины и ознакомления с материалами настоящего учебного пособия студенты-магистранты должны:

- знать биотехнологические способы получения ферментных препаратов, традиционные биотехнологические процессы с применением таких препаратов в пищевой промышленности;

- приобрести опыт работы с целевыми продуктами; научиться применять полученные знания на практике.

Учебное пособие включает теоретический материал, который представляет интерес и может быть весьма полезен также студентам специальности 240700 – Биотехнология (профиль «Пищевая биотехнология») при изучении дисциплин, входящих в перечень таковых из общепрофессионального блока и блока дисциплин специализации – таких как «Технология получения биологически активных веществ» и др.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Орехович, В.Н.** Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов/ В.Н. Орехович. – М.: Медицина, 1960. – 396 с.
2. **Якубке, Х.Д.** Аминокислоты, пептиды, белки/ Х.Д. Якубке, Х.Е. Ешкайт. – М.: Мир, 1985. – 456 с.
3. **Беликов, В.М.** Химия аминокислот и пептидов/ В.М. Беликов. – М.: Мир, 1973. – 372 с.
4. **Гринштейн, Дж.** Химия аминокислот и пептидов/ Дж. Гринштейн, М. Винц. – М.: Мир, 1965. – 411 с.
5. **Уонг, Д.** Ферментация и технология ферментов/ Д. Уонг, Ч. Кооней, А. Дейн [и др.] – М.: Легкая и пищ. пром-сть, 1983. – 327 с.
6. **Яровенко, В.Л.** Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий/ В.Л. Яровенко, К.А. Калунянц, Л.И. Гоглер – М.: Пищ. пром-сть, 1970. – 444 с.
7. **Грачева, И.М.** Технология ферментных препаратов/ И.М. Грачева, А.Ю. Кривова. – Изд. 3-е; перераб. и доп. – М.: Элевар, 2000. – 512 с.
8. **Диксон, М.** Ферменты: в 3 т./ М. Диксон, Э. Уэбб. – М.: Мир, 1982. – 1118 с.
9. **Сажин, Б.С.** Научные основы техники сушки/ Б.С. Сажин, В.Б. Сажин. – М.: Наука, 1997. – 448 с.
10. **Пассет, Б.В.** Основные процессы химического синтеза биологически активных веществ: учебник для вузов/ Б.В. Пассет. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 376 с.
11. **Пермякова, Л.В.** Общая технология отрасли: учеб.-метод. комплекс/ Л.В. Пермякова, Т.Ф. Киселева. – Кемеровский техн. ин-т пищ. пром-сти, Кемерово, 2004. – 79 с.
12. http://chemanalytica.com/book/novyuy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/5430 – Липолитические ферменты.

Учебное издание

РАЗГОВОРОВ Павел Борисович
КУДРИК Евгений Валентинович

БИОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТОВ И ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Учебное пособие

Редактор В.Л. Родичева

Подписано в печать 28.11.2012. Формат 60×84¹/₁₆. Бумага писчая.

Усл. печ. л. 7,21. Уч.-изд. л. 8,00. Тираж 50 экз. Заказ

ФГБОУ ВПО Ивановский государственный
химико-технологический университет

Отпечатано на полиграфическом оборудовании кафедры
экономики и финансов ФГБОУ ВПО «ИГХТУ»

153000, г. Иваново, пр. Ф. Энгельса, 7