

Е.А. Кузнецова
Л.В. Черепнина

**ФЕРМЕНТЫ: СТРУКТУРА,
СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ**



МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ - УЧЕБНО-НАУЧНО-
ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ КОМПЛЕКС»

Е.А. Кузнецова, Л.В. Черепнина

ФЕРМЕНТЫ: СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ

Рекомендовано ФГБОУ ВПО «Госуниверситет - УНПК»
для использования в учебном процессе
в качестве учебно-методического пособия для
высшего профессионального образования

Орел 2013

УДК 663.15 (075)
ББК 36.87я7
К89

Рецензенты:

доктор технических наук,
доцент кафедры «Технология и товароведение продуктов питания»
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Государственный университет - учебно-научно-
производственный комплекс»
О.В. Евдокимова,

доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой «Химия»
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего профессионального образования
«Орловский государственный аграрный университет»
Н.И. Ярован

Кузнецова, Е.А.

К89 Ферменты: структура, свойства и применение: учебно-методическое пособие для высшего профессионального образования / Е.А. Кузнецова, Л.В. Черепнина. – Орел: ФГБОУ ВПО «Госуниверситет - УНПК», 2013. – 175 с.

ISBN 978-5-93932-593-6

В учебно-методическом пособии рассмотрены структура, свойства и применение ферментов в спиртовой промышленности и пивоварении, производстве крахмалопродуктов и глюкозофруктозных сиропов, в хлебопечении, производстве плодово-ягодных соков, безалкогольных напитков, вин, в кондитерском производстве.

Предназначено для бакалавров направления подготовки 240700.62 «Биотехнология», изучающих дисциплину «Ферменты: структура, свойства и применение», а также для студентов и преподавателей технических и смежных вузов.

УДК 663.15 (075)
ББК 36.87я7

ISBN 978-5-93932-593-6 © ФГБОУ ВПО «Госуниверситет - УНПК», 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
I. Структура, свойства и применение ферментов.....	7
1. Общие сведения о ферментах.....	7
2. Химическая природа ферментов.....	10
3. Особенности ферментативного катализа.....	13
4. Классы ферментов.....	17
4.1. Гидролазы.....	18
4.2. Окислительно-восстановительные ферменты.....	53
5. Ферментные препараты.....	60
5.1. Растительные ферменты.....	68
5.2. Микробные ферменты.....	72
6. Получение кормовых и пищевых продуктов путем микробиологической биоконверсии растительного сырья.....	77
6.1. Сырье.....	79
6.2. Предобработка сырья.....	84
6.3. Культивирование микроорганизмов.....	90
6.4. Получение белковых продуктов из микроорганизмов.....	99
6.5. Обезвреживание продуктов.....	108
6.6. Получение белковых продуктов из биомассы дрожжей.....	109
7. Применение ферментов в пищевых технологиях.....	113
7.1. Спиртные напитки и пивоварение.....	113
7.2. Производство крахмала и крахмалопродуктов.....	116
7.3. Хлебопечение.....	118
7.4. Производство плодово-ягодных соков, безалкогольных напитков и вин.....	120
7.5. Кондитерское производство.....	122
8. Ферментные препараты в составе кормов.....	124
9. Лечебно-профилактические свойства ферментных препаратов, применяемых в составе кормов.....	131
II. Лабораторный практикум.....	134
Правила работы в биохимической лаборатории.....	134
Правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории.....	134

Лабораторная работа № 1. Способы получения ферментов.....	136
Лабораторная работа № 2. Изучение активности α - и β -амилаз, выделенных из солода. Определение общей осахаривающей активности ферментной системы	144
Лабораторная работа № 3. Количественное определение активности амилаз по Вольгемуту	149
Лабораторная работа № 4. Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)	152
Лабораторная работа № 5. Определение активности протеолитических ферментов в единицах ферментативной активности.....	154
Лабораторная работа № 6. Изучение влияния температуры и рН среды на скорость ферментативной реакции.....	158
Лабораторная работа № 7. Изучение специфичности ферментов....	161
Лабораторная работа № 8. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.....	167
Лабораторная работа № 9. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов.....	171
Литература	173

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время многие отрасли пищевой промышленности – хлебопечение, виноделие, пивоварение, производство спирта, чая, сыроделие – основаны на использовании различных ферментативных процессов.

Наибольшее внимание технологов привлекают ферменты двух классов – гидролазы и оксидоредуктазы. Гидролитические ферменты – важнейший класс ферментов, используемых при переработке пищевого сырья.

Наибольшее применение в пищевой технологии нашли гидролазы подклассов эстераз, гликозидаз, пептидгидролаз. Рассмотрены свойства липаз, пектинэстераз, их значение при переработке растительной продукции. Описаны процессы гидролиза пектиновых веществ под действием полигалактуроназ; целлюлозы – под действием комплекса целлюллолитических ферментов, обладающего синергизмом действия.

Охарактеризована группа ферментов, гидролизующих крахмал: α -амилазы, β -амилазы, глюкоамилазы, α -глюкозидазы, изоамилазы, пуллулоназы – их строение, специфичность и механизм действия, продукты гидролиза, отношение к рН и температуре, особенности амилаз разных продуцентов.

Рассмотрены ферменты инвертаза и β -галактозидаза, гидролизующие сахарозу и лактозу, целесообразность их использования в пищевой промышленности. Дана классификация пептидгидролаз, характеристика эндопептидаз животного, растительного и микробного происхождения (сериновых, тиоловых, карбоксильных, металлосодержащих) и карбоксипептидаз. Рассмотрены растительные ингибиторы сериновых и цистеиновых протеиназ. Охарактеризованы протеазы семян растений, значение эндогенных протеиназ и их ингибиторов в процессе тестоведения.

При переработке растительного сырья наряду с гидролитическими используются реакции, катализируемые другими ферментами, в первую очередь – окислительно-восстановительными.

Среди оксидоредуктаз в пищевой технологии наибольшее значение имеет каталаза, глюкозооксидаза, пероксидаза, дифенолоксидаза (полифенолоксидаза), липоксигеназа. Описаны свойства каталазы, глюкозооксидазы, их использование в пищевой промышленности.

Рассмотрен процесс окислительного потемнения перерабатываемых плодов и овощей под действием растительной дифенолоксидазы и способы борьбы с этим явлением.

Охарактеризована липоксигеназа семян бобовых культур и зерна злаков; положительная роль липоксигеназы в процессе созревания пшеничной муки и отрицательная – в прогоркании жиров.

В пищевой промышленности широкое применение находят ферменты микробного и растительного происхождения и в меньшей степени препараты животного происхождения.

Богатейшим источником ферментов является солод. Ферментативный комплекс солода включает α - и β -амилазы, α -глюкозидазу, пуллулазу, липазу, инвертазу, целлюлазы, протеазы, каталазу, пероксидазу и многие другие. Наибольшее применение находит ячменный солод в пивоварении, ржаной – в хлебопечении.

Широкое применение находят тиоловые протеазы растений – папаин, бромелаин, фицеин.

Ферментная промышленность выпускает большой ассортимент препаратов микробного происхождения, продуцентами которых являются представители различных таксономических групп. Большую часть гидролаз производят на основе культивирования бацилл, микроскопических грибов *p.p. Aspergillus, Trichoderma*, а также актиномицетов *p.p. Actinomyces, Streptomyces*. Чаще всего используют мезофильные штаммы аэробных микроорганизмов.

Все выпускаемые ферментные препараты имеют различную степень концентрирования и очистки: Гх, Пх, ГЗх, Г10х, П10х, Г20х, П20х. Очищенные препараты применяют при производстве пищевых продуктов и лекарственных средств. Наряду с растворимыми выпускают иммобилизованные ферменты, которые получают путем связывания с носителями растворимых ферментов или клеток микроорганизмов, обладающих ферментативной активностью.

I. СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ФЕРМЕНТАХ

Применение ферментов нельзя назвать достижением современности: они использовались на протяжении веков при дублении кож, изготовлении сыра, в производстве солода для пивоварения, в заквасках для хлеба и т.д. В этих процессах ферменты применялись в составе животных и растительных тканей или целых микроорганизмов. Начало применения промышленных ферментов в виде частично очищенных препаратов относится к концу XIX столетия.

Из более чем 2000 известных в настоящее время ферментов в промышленности используется около 30. Основная часть ферментов, поступающих на мировой рынок, приходится на долю гидролаз, из которых 60 % составляют пептидогидролазы (в основном щелочные и нейтральные протеазы), используемые в качестве детергентов в производстве синтетических моющих средств, а 30 % – гликозидазы, применяющиеся в производстве кондитерских изделий, фруктовых и овощных соков. Ферменты находят применение в текстильной, кожевенной, целлюлозно-бумажной, медицинской, химической промышленности (табл. 1).

По прогнозам ученых, основным потребителем ферментов в ближайшем будущем остается пищевая промышленность. Главное место среди этих энзимов занимают гликоизомераза и глюкоамилаза, применяющиеся для приготовления обогащенных фруктозой кукурузных сиропов и составляющие около 50 % рынка пищевых энзиматических препаратов.

В настоящее время многие отрасли промышленности – хлебопечение, виноделие, пивоварение, производство спирта, сыроделие, производство органических кислот, чая, аминокислот, витаминов, антибиотиков – основано на использовании различных ферментативных процессов. В связи с этим возникла и развивается новая отрасль промышленности – производство ферментных препаратов.

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к тем её отраслям, объем продукции которых постоянно растет, а сфера применения не-

уклонно расширяется. По объему производства ферментов доминируют страны Западной Европы. Резкий рост этой индустрии наблюдается в США и Японии.

Ферменты присущи всем живым существам, однако для их выделения используют те природные продукты, в которых содержание искомого энзима составляет не менее 1 %. Для крупномасштабного получения ферментов пригодны только некоторые растительные организмы на определенной фазе их развития (проросшие зерно различных злаков и бобовых, латекс и сок зеленой массы ряда растений), а также отдельные ткани и органы животных (поджелудочная железа, слизистая оболочка желудочно-кишечного тракта, сычуг крупного рогатого скота, семенники половозрелых животных). Практически неограниченный источник ферментов – микроорганизмы (бактерии, грибы, дрожжи), содержащие набор большинства известных в настоящее время энзимов, количество которых можно повысить в десятки и сотни раз методами мутагенеза, селекции и индукции биосинтеза.

Таблица 1

Применение ферментов

Название и шифр фермента	Источники ферментов	Химический и биотехнологический процессы. Область использования
1	2	3
Амилазы (КФ3.2.1.1 КФ3.2.1.2 КФ3.2.1.3)	Бактерии, грибы (<i>Bacillus sp.</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>)	Гидролиз крахмала до декстринов, мальтозы и глюкозы. Спиртовая, пивоваренная промышленность, хлебопечение, получение патоки, глюкозы
Глюкоизомераза (КФ5.3.1.18)	Более 80 видов микроорганизмов (<i>Bacillus sp.</i> , <i>Streptomyces albus</i> , <i>S. griseus</i>)	Изомеризация D-глюкозы в D-фруктозу. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, хлебопечение
Глюкооксидаза (КФ1.11.1.6) и Каталаза (КФ1.11.1.6)	<i>Pinicillium chrysogenum</i> , <i>P.casei</i> , <i>P.nigricans</i> , <i>P.notatum</i> , <i>P.vitale</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Corynebacterium sp.</i>)	Удаление кислорода и глюкозы (из яичного порошка, мясных и других продуктов). Виноделие, пивоварение, консервная, соковая и безалкогольная промышленность

1	2	3
Липаза (КФ3.1.1.3)	Поджелудочные железы животных, семена растений, микроорганизмы (<i>Candida lipolytica</i> , <i>Streptomyces flavo-griseus</i> , <i>Aspergillus ssp.</i> , <i>Saccharoyces lipolytica</i>)	Гидролиз жиров и масел. Пищевая, легкая, медицинская промышленность, сельское хозяйство, коммунальное хозяйство, бытовая химия
Пектиназа (КФ3.2.1.15)	Многие микроорганизмы (<i>Aspergillus ssp.</i> , <i>Fusarium ssp.</i> , <i>Pinicillium ssp.</i> и др.)	Гидролиз галактуронана, осветление вина и фруктовых соков
Пептидгидролаза (КФ3.4)	Поджелудочные железы и слизистая желудка животных; плоды, побеги, отходы переработки некоторых растений (дынное дерево, инжир, ананас), микроорганизмы (<i>Bacillus sp.</i> , <i>Aspergillus ssp.</i> , <i>Pinicillium ssp.</i> , <i>Streptomyces ssp.</i> , <i>Pseudonas ssp.</i>)	Лизис белка. Получение аминокислот, производство и получение сыра, мягчение мясных и рыбных изделий, выделка кожи, активизация пищеварения. Пивоварение, виноделие, хлебопечение, пищевая промышленность, сельское хозяйство, медицина
Целлюлаза (КФ3.2.1.4)	Микроорганизмы: <i>Clostridium ssp.</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>T. viridae</i> , <i>Alternaria tenuis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Fusarium culmorum</i>	Гидролиз целлюлозы до глюкозы. Производство пищевых и кормовых белковых препаратов, этанола, глюкозо-фруктозных спиртов. Спиртовая, пивоваренная, пищевоконцентратная промышленность, хлебопечение, кормопроизводство
Фруктофуранозидаза (КФ 3.2.1.26)	Микроорганизмы: <i>Aspergillus ssp.</i> , <i>Pinicillium ssp.</i> , <i>Fusarium ssp.</i> , <i>Cercospora beticola</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>E. coil</i> , <i>Saccharoyces cerevisiae</i> , <i>Streptococcus mutans</i> .	Инверсия сахарозы. Кондитерская, ликероводочная, безалкогольная промышленность, сиропопроизводство.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Они значительно повышают скорость химической реакции, которые в отсутствии ферментов протекают очень медленно. При этом ферменты не расходуются и не претерпевают необратимых изменений.

Важнейшее биологическое свойство ферментов – специфичность. Специфичность ферментов характеризует их способность катализировать определенные типы превращений тех или иных субстратов.

Фермент может катализировать более одного типа превращений. Так, многие карбогидразы (целлюлазы, β -глюкозидазы, глюкоамилаза, β -галактозидаза) катализируют как гидролиз полисахаридов, так и перенос гликозильных остатков на углеводные субстраты.

Ряд ферментов обладает абсолютной субстратной специфичностью, то есть катализирует превращение только одного субстрата. Примеры таких ферментов – глюкозооксидаза, многие дегидрогеназы.

Известны ферменты широкой субстратной специфичности, такие как липазы, эстеразы, фосфатазы.

Распространены ферменты так называемой групповой специфичности, то есть такие, которые превращают ряд субстратов, обладающих характерным признаком. Так, α -амилаза гидролизует линейные и разветвленные полимеры α -1,4-связанной глюкозы, химотрипсин – пептидные связи в белках, образованные остатками ароматических аминокислот.

Большинство ферментов проявляют абсолютную стереоспецифичность, превращая только L- или только D-форму субстрата. Стереоспецифичность проявляется также в отношении цис- и транс-формы изомеров.

Современная классификация ферментов делит их на шесть классов по типу катализируемых реакций. Деление внутри классов основано на более подробной характеристике катализируемой реакции и её субстратной специфичности.

2. ХИМИЧЕСКАЯ ПРИРОДА ФЕРМЕНТОВ

Высокая биологическая активность ферментов, в первую очередь, определяется характерными свойствами образующих их белков. Ферментативной активностью могут обладать как простые, так и сложные белки. Первые, как рассматривалось в предыдущей главе, состоят только из полипептидных цепей и гидролизуются до аминокислот (примерами могут служить ферменты пепсин, трипсин,

уреаза и т.д.). Вторая группа ферментов представлена сложными белками, для проявления каталитической активности которых требуется присутствие веществ небелковой природы – **простетических групп**. Простетические группы ферментов, являющихся по химической природе сложными белками, называются **кофакторами**.

Различают две группы кофакторов – *ионы металлов* (а также некоторые неорганические анионы) и *коферменты*, представляющие собой органические вещества. Примерно треть из всех известных в настоящее время ферментов активируются ионами металлов. Прочность связи ионов металлов с белковой частью фермента колеблется в широких пределах. Некоторые металлокомплексы ферментов в процессе их выделения из биологических материалов вследствие достаточной лабильности теряют ион металла. Эти особенности приходится учитывать при исследовании физико- и биохимических характеристик таких ферментов, восстанавливая их активность путем добавления в среду соответствующих ионов. Такие белки образуют группу *ферментов, активируемых ионами металлов*. Другие металлоферментные комплексы отличаются большей стабильностью, т.е. сохраняют ион металла при выделении и очистке (*металлоферменты*). В роли кофакторов ферментов могут выступать различные по природе ионы металлов.

Ион металла может участвовать в присоединении субстрата, собственно в катализе, в стабилизации оптимальной конформации молекулы фермента и т.д. (табл. 2). Подробнее о роли ионов различных металлов в ферментативных превращениях см. главу 4 настоящего пособия.

Если в качестве кофермента выступает органическое соединение, то фермент называют **холоферментом**, а его белковую часть – **апоферментом**. Реакция образования холофермента обратима:



Если равновесие данной реакции в условиях живой клетки сильно смещено влево, то кофермент присоединяется к апоферменту вместе с субстратом в момент реакции.

Таблица 2

Некоторые металлозависимые ферменты

Фермент	Ион металла	Функция иона металла
<i>Гексокиназа</i>	Mg^{2+}	Связывание субстрата
<i>Пируваткиназа</i>	Mg^{2+}, K^+	Связывание субстрата и катализ
<i>Аргиназа</i>	$4Mn^{2+}$	То же
<i>Транскетолаза</i>	Ca^{2+}	Стабилизация четвертичной структуры фермента
<i>Щелочная фосфатаза</i>	$2Zn^{2+}$	Связывание субстрата и катализ
<i>Тирозиназа</i>	$2Cu^{2+}$	Катализ
<i>Моноаминоксидаза</i>	$4Cu^{2+}$	То же
<i>Церулоплазмин</i>	$8Cu^{2+}$	То же

Другой крайний случай – стабильные холоферменты, содержащие прочно связанный кофермент. Они представлены сложными белками. Многие коферменты являются производными **витаминов** – незаменимых пищевых факторов (табл. 3), речь о которых пойдет в следующей главе.

Таблица 3

Некоторые коферменты – производные витаминов

Кофермент	Витамин	Функция
<i>Коферменты дегидрогеназ: НАД, НАДФ, ФАД, ФМН</i>	Никотиновая кислота Витамин В ₂ (рибофлавин)	Перенос водорода
<i>Тиаминдифосфат (ТДФ)</i>	Витамин В ₁ (тиамин)	Декарбоксилирование α-кетокислот
<i>Кофермент ацилирования (КоА)</i>	Витамин В ₃ (пантотеновая кислота)	Перенос ацильных групп
<i>Пиридоксальфосфат</i>	Витамин В ₆	Перенос аминокислотных групп
<i>Биоцин</i>	Витамин Н (биотин)	Перенос CO ₂
<i>Кобаламины</i>	Витамин В ₁₂	Перенос алкильных групп

Витамины и другие коферменты в качестве жизненно необходимых соединений входят в состав компонентов пищи и, как правило, не синтезируются (или синтезируются в недостаточных количествах) в организмах, по крайней мере, высших животных. К настоящему времени, кроме витаминов, обнаружены коферменты, являющиеся производными нуклеотидов, пептидов, порфиринов и углеводов.

3. ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Механизмы действия ферментов

Большую роль в развитии представлений о механизме действия ферментов сыграли классические работы Л. Михаэлиса и М. Ментен, развивших положение о фермент-субстратных комплексах.

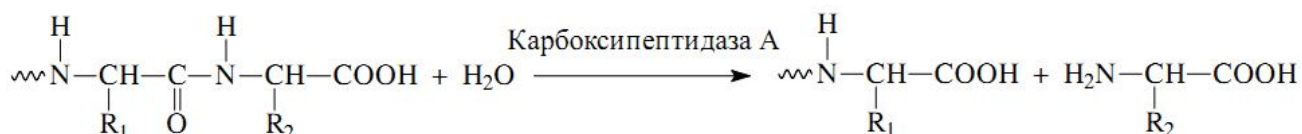
Фермент-субстратные комплексы. В результате многочисленных исследований физико-химических закономерностей реакций ферментативного катализа было показано, что первым этапом любой ферментативной реакции является образование *фермент-субстратного комплекса (ES)*. Такой комплекс образуется за счет присоединения субстрата (S) к специфическому участку фермента (E), называемому *активным центром*. В сущности, высокая селективность каталитического действия ферментов в основном зависит от степени комплементарности связывания фермента с субстратом.

Фермент-субстратные комплексы идентифицируют и выделяют в чистом виде различными физико-химическими методами, что служит прямым доказательством их существования. Например, подробная информация о связывании *карбоксипептидазы А* с ее субстратом глицил- β -тирозином была получена с помощью рентгеноструктурного анализа. Для этих целей широко используется метод электронной микроскопии. При образовании E5-комплекса проявляется высокая степень стереоспецифичности фермента и субстрата. Например, Б-серин, в отличие от β -серина, не может служить субстратом для *триптофансинтетазы*. Более того, Б-изомер даже не связывается с ферментом из-за отсутствия соответствующих параметров у центров связывания. Из этого следует, что участок связывания субстрата имеет строго определенную конформацию, которая как нельзя лучше соответствует форме биосубстрата (принцип «ключ-замок»).

Карбоксипептидаза А. Рассмотрим молекулярные события, лежащие в основе механизма действия хорошо изученного пищеварительного фермента *карбоксипептидазы А*. Механизм действия данного фермента исследован методом рентгенографии на комплексах фермента с различными ингибиторами и модельными субстратами.

Карбоксипептидаза А синтезируется клетками поджелудочной железы и в составе сока этой железы поступает в кишечник, где

катализирует отщепление С-концевых аминокислотных остатков от пептидов:



Карбоксипептидаза А состоит всего из одной полипептидной цепи, содержащей 307 аминокислотных остатков (К-концевым служит аланин) и является цинкзависимым ферментом (ион $2n^{2+}$ расположен в активном центре фермента). Молекулярная масса карбоксипептидазы А составляет 34 600. Активный центр фермента расположен в нише, глубина которой составляет приблизительно 1 нм. Размеры самой молекулы карбоксипептидазы А составляют $5 \times 4,2 \times 3,8$ нм.

На рис. 1 показаны два аминокислотных остатка, принадлежащих С-концевой части пептида в активном центре карбоксипептидазы А. В связывании субстрата и, собственно, в катализе принимают участие аминокислотные остатки тирозина, аргинина, глутаминовой кислоты и ион $2n^{2+}$, который ковалентно связан с атомом кислорода депротонированной карбоксильной группы глутаминовой кислоты и за счет двух донорно-акцепторных связей – с электронодонорными атомами азота имидазольных циклов 69-го и 198-го аминокислотных остатков гистидина.

Активный центр карбоксипептидазы А образован гидрофобными радикалами аминокислотных остатков (так называемый гидрофобный «карман»), поэтому наибольшим сродством к активному центру карбоксипептидазы А обладают пептиды с гидрофобной С-концевой аминокислотой.

Взаимодействие субстрата с карбоксипептидазой А начинается с электростатического взаимодействия депротонированной карбоксильной группы субстрата с протонированной аминогруппой гуанидиновой группировки аргинина фермента. В результате пептидная цепь карбоксипептидазы А в области аргинина подтягивается к карбоксильной группе субстрата примерно на 0,2 нм. Это приводит к конформационным перестройкам в других частях активного центра: в сторону субстрата примерно на 1,2 нм перемещаются аминокислотные остатки глутаминовой кислоты и тирозина.

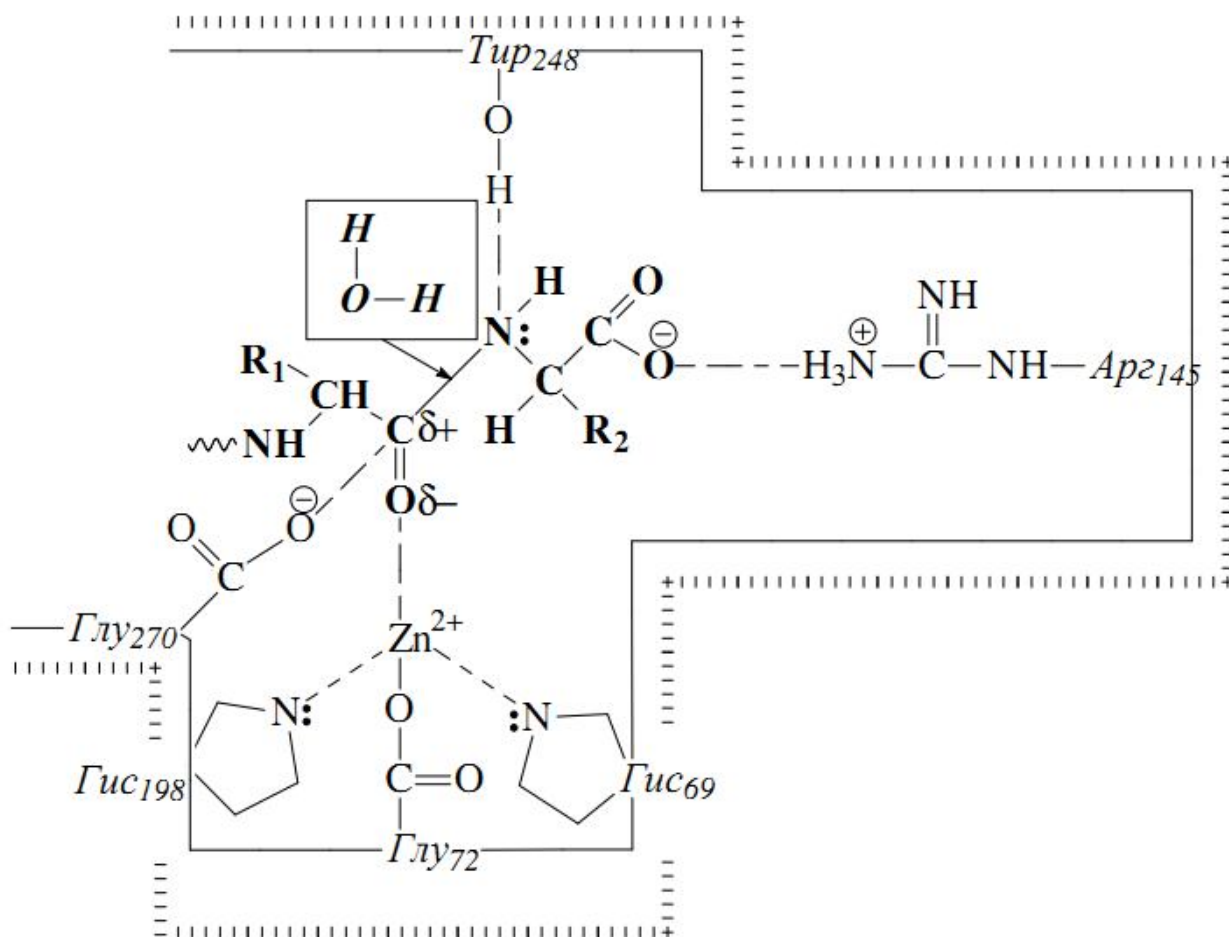


Рис. 1. Расположение субстрата в активном центре карбоксипептидазы А

Затем электрононенасыщенный атом углерода пептидной группы субстрата взаимодействует с депротонированной карбоксильной группой глутаминовой кислоты и ионом цинка. Параллельно атом азота пептидной связи субстрата образует водородную связь с ОН-группой тирозина. В результате за счет ослабления пептидной связи происходит ее гидролиз. Продукты гидролиза покидают активный центр, а фермент восстанавливает исходную конформацию.

Более подробная информация о строении активных центров и механизмах действия ферментов изложена в специальной литературе по ферментативному катализу.

Характерные стадии ферментативного катализа

Строение активных центров и механизмы действия разных ферментов очень специфичны, но, несмотря на это, можно выделить основные и наиболее характерные стадии ферментативного катализа, каждая из которых имеет свои особенности, присущие большинству ферментативных реакций. Дадим характеристику основным стадиям ферментативного катализа.

1. **Диффузия субстрата к ферменту.** Эта стадия обычно непродолжительна, ее скорость определяется концентрацией субстрата и эффективностью его диффузии к активному центру фермента.

2. **Комплементарное связывание субстрата с активным центром фермента.** Активный центр фермента формируется из отдельных аминокислотных остатков полипептидной цепи, содержащих разные функциональные группы. Субстрат соединяется с активным центром в нескольких местах: это обеспечивает высокую избирательность связывания (комплементарность субстрата и активного центра) и пространственную ориентацию субстрата, необходимую для катализа. В активном центре фермента различают **контактный** или **якорный** участок, связывающий субстрат, и **каталитический** участок, где происходит превращение субстрата после его связывания. Контактные участки активного центра фермента специфически связывают субстраты и обеспечивают их взаимную ориентацию и сближение. Упорядоченное расположение субстратов приводит к снижению энтропии, а значит и энергии активации процесса. Функциональные группы аминокислотных остатков, входящих в активный центр фермента, могут проявлять кислотно-основные свойства, т.е. фермент может играть роль акцептора или донора протонов, что невозможно для обычных катализаторов. После закрепления субстрата в активном центре на его молекулу воздействуют электрофильные и нуклеофильные группы каталитического участка. Это вызывает перераспределение электронной плотности и разрыв связей в молекуле субстрата, атакуемого кислотно-основными группами. До присоединения к ферменту субстрат имеет «расслабленную» конфигурацию. После связывания с активным центром молекула субстрата как бы растягивается («напряженная» или «деформированная» конфигурация). Места деформации легче атакуются реагентами.

3. **Образование *ES*-комплекса.** Это наиболее быстрая стадия ферментативного катализа, в результате которой молекула субстрата химически модифицируется, что приводит к образованию переходных форм комплекса.

4. **Преобразование *ES*-комплекса в один или несколько активированных фермент-субстратных переходных комплексов.** Эта стадия самая медленная и обычно лимитирует скорость всего ферментативного катализа; она связана с ослаблением химических

связей в субстрате, их разрывом и образованием новых связей в результате взаимодействия с каталитическими группами фермента. Именно благодаря образованию активированных переходных комплексов снижается энергия активации процесса.

Если для ферментов характерен ковалентный тип катализа, который протекает за счет образования ковалентных связей между каталитическими группами активного центра и группами субстрата, то соответствующие промежуточные ковалентные фермент-субстратные комплексы очень неустойчивы и легко распадаются, освобождая при этом продукты реакции.

5. Отделение продуктов реакции от активного центра и диффузия их в окружающее пространство. Эта стадия непродолжительная, как и первая, и определяется скоростью диффузии продуктов реакции в окружающую среду.

Нужно отметить, что физико-химические механизмы действия ферментов еще во многом не ясны, поэтому исследование этих механизмов – одна из важнейших задач энзимологии.

4. КЛАССЫ ФЕРМЕНТОВ

1 класс – оксидоредуктазы – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции (присоединение O_2 , отнятие и перенос H_2 , перенос электролитов);

2 класс – трансферазы – ферменты переноса. Катализируют перенос целых атомных группировок с одного соединения на другое (например, остатков моносахаридов, аминокислот, остатков фосфорной кислоты, метильных и аминных групп и т.д.);

3 класс – гидролазы – ферменты, катализирующие реакции гидролиза, то есть расщепления сложных органических соединений на более простые с участием воды.

4 класс – лиазы – ферменты, катализирующие реакции негидролитического отщепления каких-либо групп от субстрата с образованием двойной связи или присоединение группировок по месту разрыва двойной связи (например, H_2O , CO_2 , NH_3 и т.д.);

5 класс – изомеразы – ферменты, катализирующие реакции изомеризации, то есть внутримолекулярного переноса химических группировок и образования изомерных форм различных органических соединений;

6 класс – лигазы (синетазы) – ферменты, катализирующие реакции синтеза, сопряженные с разрывом высокоэнергетической связи АТФ и других нуклеозидрифосфатов (при этом возможно образование С–С-; С–S-; С–O-; и С–N- связей).

В табл. 4 представлены шифры, принятые для различных ферментов, их систематические и тривиальные названия. В таблицу включены лишь ферменты, имеющие принципиальное значение при хранении, переработке сырья и в производстве пищевых продуктов. В дальнейшем, везде где это возможно, будут применяться тривиальные названия.

Внимание технологов, перерабатывающих биологическое сырье, привлекают прежде всего ферменты первого класса – оксидоредуктазы, а также третьего класса – гидролазы, поскольку при переработке пищевого сырья происходит разрушение клеточной структуры биологического материала, повышается доступ кислорода воздуха к измельченным тканям и создаются благоприятные условия для действия ферментов типа оксигеназ, а также освобождаются гидролитические ферменты, которые активно расщепляют все основные структурные компоненты клетки (белки, липиды, полисахариды), в связи с чем процессы клеточного содержимого (процессы автолиза, самопереваривания) становятся преобладающими.

Остановимся на рассмотрении отдельных представителей этих важнейших для пищевой промышленности классов ферментов.

4.1. Гидролазы

Гидролитические ферменты – важнейший класс ферментов, используемых при переработке пищевого сырья. Основной продукцией ферментной промышленности являются препараты гидролаз, таких как амилазы, протеазы, пектиназы, целлюлазы. Гидролитические ферменты используются преимущественно в начальной, наиболее трудоемкой стадии переработки органического сырья, когда необходимо расщепить структурные или запасные полимеры, фрагменты которых далее подвергаются трансформации под действием ферментов других классов.

Таблица 4

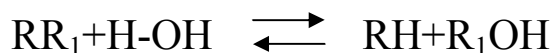
Номенклатура ферментов, имеющих значение в пищевой промышленности

Шифр	Систематическое название	Тривиальное название
Оксидоредуктазы		
1.1.3.4	β -D-глюкоза: O ₂ -оксидоредуктаза	Глюкозооксидаза
1.11.1.6	H ₂ O ₂ : H ₂ O ₂ -оксидоредуктаза	Каталаза
1.14.18.1	Монофенол, дигидрооксифенилаланин: O ₂ -оксидоредуктаза	Монофенолоксидаза, полифенолоксидаза, тирозиназа, фенолаза
Гидролазы		
3.1.1.3.	Триацилглицерол – ацилгидролаза	Липаза, триацилглицероллипаза
3.1.1.11	Пектин – пектилгидролаза	Пектинэстераза
3.2.1.1	1,4- α -D-глюкан глюканогидролаза	α -амилаза
3.2.1.2	1,4- α -D-глюкан мальтогидролаза	β -амилаза
3.2.1.3	1,4- α -D-глюкан глюкогидролаза	γ -амилаза, глюкоамилаза
3.2.1.4	1,4- β -D-глюкан-4-глюкангидролаза	Целлюлаза
3.2.1.15	Поли- α -1,4-галактуронид-гликаногидролаза	Полигалактуроназа
3.2.1.20	α -D-глюкозид глюкогидролаза	α -гликозидаза
3.2.1.21	D-глюкозид глюкогидролаза	β -гликозидаза
3.2.1.23	β -D-глюкозид галактогидролаза	Лактаза, β -галактозидаза
3.4.23.1	–	Пепсин
3.4.23.4	–	Химозин (реннин)
3.4.21.4	–	Трипсин
3.4.21.1	–	Химотрипсин
3.4.22.5	–	Эластаза
3.4.21.1	–	Папаин
3.4.21.6	–	Химопапаин
3.4.22.6	–	Фицин
3.4.22.3	–	Бромелаин
3.4.22.14	–	Субтилизин
3.4.23.6	–	Кислая протеиназа
3.4.24.3	–	Коллагеназа
Изомеразы		
5.3.1.9	D-глюкозо-6-фосфат-кетозоизомераза	Глюкозоизомераза, глюкозофосфат-изомераза

Субстраты гидролитических ферментов – полисахариды, белки, липиды, нуклеиновые кислоты и другие природные соединения, содержащие «ангидридные» связи.

Составляют основную массу органической материи на планете. Гидролиз – необходимая стадия круговорота этих соединений в природе, поэтому гидролитические реакции, как химические, так и ферментативные, происходят в больших масштабах в естественных условиях. Они имеют первостепенное значение и в решении многих прикладных задач.

Реакция гидролиза протекает по следующему уравнению:



В процессе ферментативного гидролиза происходит образование фермент-субстратного комплекса, который претерпевает внутримолекулярную перегруппировку под влиянием активного центра фермента. Катализированный разрыв ангидридной связи субстрата приводит к выделению из фермент-субстратного комплекса одного из продуктов реакции. Вторым продуктом выделяется после перегруппировки, связанных с присоединением молекулы воды.

Класс гидролаз – третий класс в номенклатуре ферментов – включает 11 подклассов. Ферменты подкласса 3.1 расщепляют сложноэфирные связи; 3.2 – гликозидные связи; 3.3 – эфирные связи; 3.4 – пептидные связи; 3.5 – связи С–N, отличные от пептидных; 3.6 – кислотнoангидридные связи; 3.7 связи С–С; 3.8 – галоидалкильные связи; 3.9 – связи Р–N; 3.10 связи S–N; 3.11 – связи С–Р.

Наибольшее применение в процессах промышленного биокатализа нашли гидролазы подклассов 3.1, 3.2 и 3.4.

Эстеразы (К.Ф.3.1)

Этот подкласс включает большое число ферментов (около 150), которые разделены на 7 подклассов. Ферменты подкласса 3.1 расщепляют сложноэфирные связи.

Для эстераз характерна относительная групповая субстратная специфичность, то есть способность гидролизовать сложноэфирные связи между радикалами различного типа. Эстеразы расщепляют моно-, ди-, триглицеролы и другие соединения, содержащие сложноэфирную связь. Скорость расщепления зависит от структуры субстрата.

Наиболее важными с точки зрения участия в различных биохимических процессах, имеющих место при хранении и переработки пищевого сырья, являются ферменты подкласса 3.1.1, действующие на эфиры карбоновых кислот.

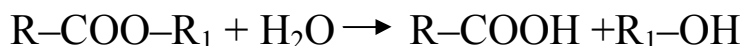
Липазы (К.Ф.3.1.1.3)

Липаза или триацилглицероллипаза широко распространена в природе и играет важную роль в процессах, протекающих при переработке и хранении пищевых продуктов. В настоящее время выделе-

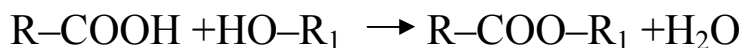
ны и охарактеризованы липазы растительного происхождения (липаза клещевины, пшеницы и других злаков), животного (панкреатическая липаза, липаза молока) и микробного (бактериальные и грибные липазы).

Липазы являются универсальными ферментами, используемыми для преобразования липидов. Субстратами липаз являются глицериды и другие сложные эфиры. Липазы более других представителей класса гидролаз обладают способностью катализировать различные типы реакций. Эти типы следующие:

1) Гидролиз эфиров

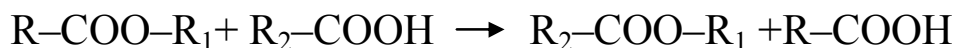


2) Синтез эфиров

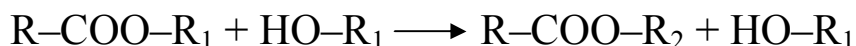


3) Трансэтерификация

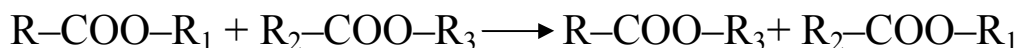
3.1 Ацидолиз



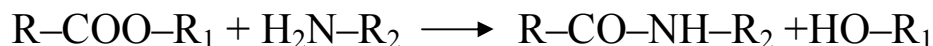
3.2 Алкоголиз



3.3 Интерэтерификация

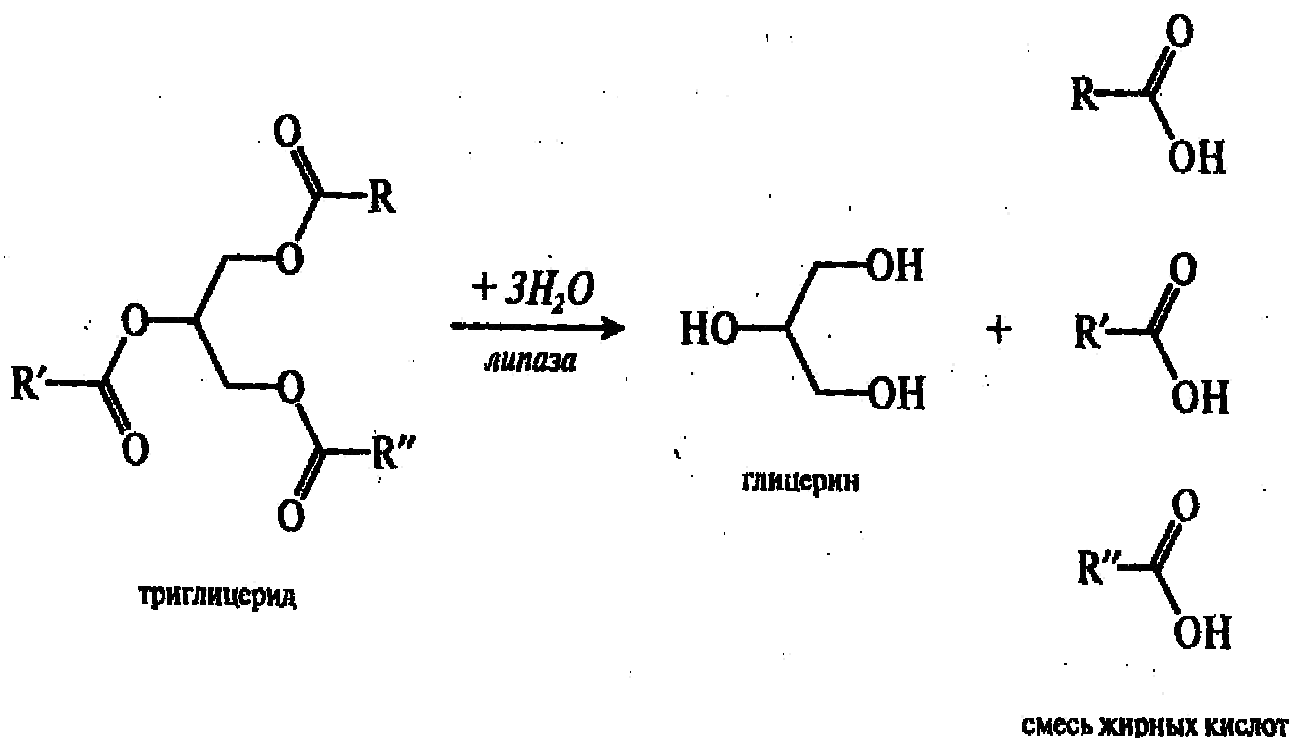


3.4 Аминолиз



Гидролитическое расщепление жиров липазами протекает с заметной скоростью в средах с концентрацией воды не менее 1 %. Реакция происходит в гетерогенной среде на границе раздела фаз липиды – вода, скорость её зависит от степени дисперсности субстрата.

Обычно липазы катализируют реакцию расщепления триглицеридов согласно приведенному ниже суммарному уравнению:



Липазы проявляют специфичность в отношении оптических изомеров эфиров (стереоспецифичность), позиционную, глицеридную и жирокислотную специфичность.

По позиционной специфичности липазы делят на две группы: позиционно неспецифичные, освобождающие при гидролизе триглицеридов жирные кислоты из всех трех позиций, и 1,3-специфичные.

Большинство известных липаз предпочтительно гидролизуют сложноэфирную связь при C₁ и C₃ глицерола.

При длительном гидролизе глицеридов 1,3-специфичные липазы способны отщепить жирные кислоты из всех положений, поскольку 2-моноглицериды и 1,2-диглицериды, как менее конформационно стабильные, самопроизвольно изомеризуются в 1-моноглицериды и 1,3-диглицериды.

Жирнокислотная специфичность липаз выражается в предпочтении к жирным кислотам определенной длины цепи. В целом липазы легко отделяют жирные кислоты средней длины.

Глицеридная специфичность выражена не у всех липаз. Фермент из *Pen. suclorium* гидролизует моноглицериды и диглицериды и практически не действует на триглицериды.

Липазы различного происхождения сильно отличаются друг от друга по специфичности действия, сродству к различным субстратам, растворимости, оптимуму рН и другим свойствам. Так, например, липаза семян клещевины нерастворима в воде, имеет оптимум рН 4,7–5,0; панкреатическая липаза растворима, и оптимум рН ее действия лежит в слабощелочной среде. Липаза пшеничных зародышей также отличается от липазы клещевины. Она растворима в воде и имеет рН оптимум при 8,0.

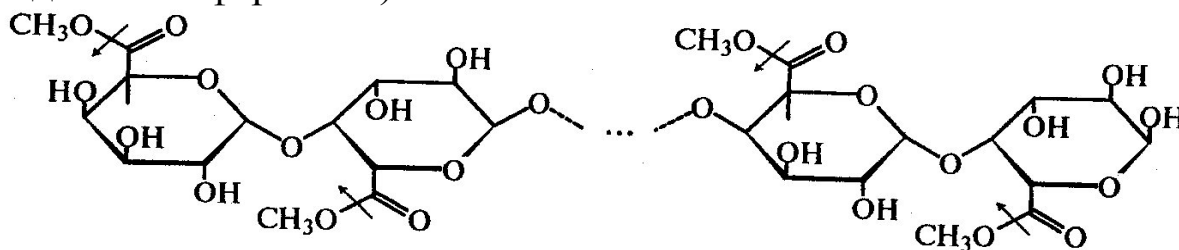
Микробные липазы-ферменты с молекулярной массой 30–55 кДа, оптимальная температура действия не превышает 65 °С, оптимальный рН большинства исследованных липаз лежит в слабокислой и нейтральной зоне. Бактерии рода *Pseudomonas* продуцируют щелочные липазы и липазы с широкой зоной рН-оптимума.

Зерновая липаза участвует в процессе порчи зерновых продуктов при хранении. Особенно это касается продуктов, содержащих повышенное количество жира, например, овсяной муки или крупы, пшена. Накопление свободных жирных кислот под действием липазы (рост кислотного числа жира) – признак ухудшения качества продукта. Свободные жирные кислоты, особенно ненасыщенные, легко подвергаются окислению под воздействием разных факторов: липоксигеназы, тепловой обработки, кислорода воздуха, солнечного света и др. Таким образом, липазы могут инициировать процесс прогоркания и ограничивать сроки хранения пищевых продуктов.

Пектинэстеразы (К.Ф.3.1.1.11)

Пектинметилэстеразы, ПЭ (К.Ф.3.1.11) катализируют отщепление метильных групп от полиметилгалактуроновой кислоты с образованием метанола и частично деметоксилированной полигалактуроновой кислоты.

Процесс протекает согласно следующей схеме (стрелками показано действие фермента):



ПЭ деэтерифицирует пектины на 60–70 %. По мере снижения степени этерификации субстратов уменьшается сродство фермента

к ним, и процесс гидролиза не проходит до конца. ПЭ предпочтительно действует на крупные молекулы, метоксилированные олигоурони́ды расщепляются медленнее.

Пектинэстеразы синтезируются высшими растениями, микроскопическими грибами, дрожжами и бактериями.

Пектинэстеразы проявляют максимальную активность в интервале рН 4,4–8,0, у некоторых микроскопических грибов при рН 2,5. Оптимальная температура действия 30–40 °С. Пектинэстераза входит в комплексы пектолитических ферментных препаратов микробного происхождения.

Желирующая способность пектина зависит от степени метоксилирования или степени этерификации, поэтому действие пектинэстеразы по отщеплению метоксильных групп приводит к снижению желирующей способности и сопровождается падением вязкости. На этом, очевидно, и основывается применение этого фермента для осветления плодовых соков и вина.

Обычно комплексные препараты пектолитических ферментов применяемые для этих целей, получают из различных плесневых грибов, и прежде всего из *A. Niger*.

Гликозидазы (К.Ф.3.2)

Этот подкласс включает около ста ферментов с разной специфичностью действия, осуществляющих гидролиз олиго- и полисахаридов; некоторые ферменты этого типа способны осуществлять трансферазные реакции – переносить гликозидные остатки на олиго- и полисахариды, наращивать полисахаридные цепочки. Представители гликозидаз были одними из первых ферментов, обратимость действия которых *in vitro* была экспериментально доказана.

Гликозидазы стереоспецифичны. Они гидролизуют гликозидные связи определенной пространственной конфигурации (α или β), но не обеих одновременно. Примерами могут служить α -амилаза, α -глюкозидаза, глюкоамилаза, гидролизующие исключительно α -гликозидные связи, и β -глюканаза, целлобиза, лизоцим – гидролизующие β -связи.

Менее строгая избирательность проявляется к различным видам α - или β -гликозидных связей. Так, глюкоамилаза расщепляет α -1,4 и α -1,6-связи; глюканаза бацилл – β -1,3- и β -1,4-связи;

Гликозидазы специфичны в отношении длины цепи гидролизуемых полимерных субстратов. Так, глюкоамилаза плесневых грибов

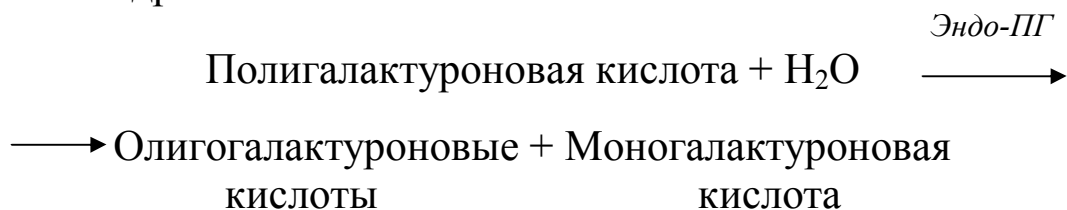
предпочтительно гидролизует высокомолекулярные полимеры α -1,4-связанной глюкозы, а аналогичный фермент – α -глюкозидаза дрожжей катализирует гидролиз той же связи в олигосахаридах, но не в крахмале.

Эндополигалактуроназа (К.Ф.3.2.1.15) и Экзопполигалактуроназа (К.Ф.3.2.1.67)

Эти ферменты, наряду с пектинэстеразой осуществляют гидролиз пектиновых веществ.

Эндополигалактуроназа, эндо-ПГ (К.Ф.3.2.1.15) катализирует гидролиз α -1,4-гликозидных связей между неэстерифицированными остатками галактуроновой кислоты в различных пектиновых полисахаридах. Гидролиз происходит неупорядоченным способом, предпочтительно расщепляются внутренние связи полимеров. При гидролизе 1 – 10 % связей вязкость растворов галактуронанов снижается не менее чем на 50 %.

Схема гидролиза:



Фермент расщепляет в пектинах фрагменты полигалактуроновой кислоты различной молекулярной массы и степени этерификации. С наибольшей скоростью гидролизуются низкоэтерифицированные субстраты, такие как пектовая кислота, полипектат натрия, свекловичный пектин. Более медленно – лимонный и яблочный пектин, а пектин Линка (степень этерификации 99 %) совсем не гидролизуются. При действии на олигоуриды предпочтительно расщепляются субстраты большей степени полимеризации. Основным конечным продуктом гидролиза пектинов, в зависимости от источника фермента, может быть моно-, ди-, три- или тетрагалактуроновая кислота.

Действие эндо-ПГ на растительные ткани вызывает их мацерацию в результате расщепления пектиновых веществ срединных пластинок. В комплексе полигалактуроназ гриба *Asp. alliaceus* только эндо-ПГ практически полностью мацерировала до состояния изолированных клеток ткани картофеля, кабачка, тыквы, яблока, сливы, груши, персика.

Большинство исследованных эндополигалактуроназ – ферменты молекулярной массы 30–80 кДа с оптимумом действия при рН от 3,5 до 6,5 и температуре около 50 °С. Эндо-ПП некоторых микроскопических и высших грибов ингибируют ионы щелочноземельных и тяжелых металлов.

Экзополигалактуроназа экзо-ПП (К.Ф.3.2.1.67) катализирует расщепление конечных α -1,4-глюкозидных связей между остатками неэстерифицированной галактуроновой кислоты в различных пектиновых полисахаридах (полигалактуроновой кислоте, пектатах, пектинах) с образованием моногалактуроновой кислоты. Гидролиз сопровождается незначительным снижением вязкости растворов субстратов. Фермент расщепляет пектаты неполностью, примерно на 50 %.

Частично деградированные субстраты, как правило, гидролизуются экзо-ПП быстрее высокополимерных. Предпочтительна низкая степень метоксилирования галактуронанов. Так, относительная скорость гидролиза субстратов разной степени этерификации двумя формами экзо-ПП *Asp. alliaceus* составила: пектовой кислоты – 98–100, свекловичного пектина – 92–100, лимонного – 20–24, яблочного 1,3–7,5, сливового – 0,3–2,0.

Экзополигалактуроназы имеют оптимум действия при рН от 3,4 до 6,0 и температуре 30–50 °С. Некоторые грибные экзо-ПП активируются кобальтом, ингибируются щелочноземельными, тяжелыми металлами и ЭДТА.

Экзополигалактуроназы входят в состав пектолитических и цитолитических ферментных препаратов из культур микроорганизмов (Пектаваморина, Пектофоетидина, Целлюлазы-100, Поликанесцина, Ультразима, Винфлоу и др.).

Для промышленного производства ферментных препаратов пектолитических ферментов, которые являются комплексными, в качестве продуцентов используют в основном микроскопические (плесневые) грибы, в частности, грибы рода *Aspergillus*: *A. niger*, *A. wentii*, *A. oryzae*. Бактериальные ферменты в промышленных масштабах не производятся.

Растительные полигалактуроназы, по-видимому, похожи на грибные полигалактуроназы. Они обнаружены в широком спектре плодов и овощей: помидорах, авокадо, редисе, огурцах, яблоках, грушах, цитрусовых и др. Все они проявляют активность при естественных рН плодов.

Применение препаратов пектолитических ферментов в промышленности достаточно обширно. Они используются при производстве фруктовых соковых концентратов и экстрактов, при осветлении соков и вин, при производстве фруктовых и овощных пюре и нектаров.

Целлюлолитические ферменты

Целлюлоза является одним из наиболее трудно гидролизуемых природных полимеров. В организме высших животных и человека не синтезируются ферменты, гидролизующие целлюлозу. Биodeградацию целлюлозы осуществляют ферменты микроорганизмов. Микрофлора толстого кишечника человека ферментирует целлюлозу овощей и фруктов полностью. Более грубая целлюлоза, например, входящая в препараты пищевых волокон, расщепляется на 0–70 %.

В гидролизе целлюлозы участвуют три основных вида ферментов. Эндо- β -1,4-глюканазы (КФ3.2.1.4) катализируют неупорядоченное расщепление целлюлозных молекул на крупные фрагменты. При действии экзо- β -1,4-глюканазы, или целлюлозобιοгидролазы (К.Ф.3.2.1.91) от нередуцирующего конца целлюлозных молекул или их ферментов отщепляется целлобиоза. Целлобиозы, или β -глюкозидазы (КФ.3.2.1.21) катализируют гидролиз целлобиозы и, с меньшей скоростью, небольших целлоолигосахаридов, с образованием глюкозы. Некоторые микроорганизмы синтезируют экзо- β -1,4-глюкозидазу (КФ.3.2.1.74), под действием которой от нередуцирующего конца целлюлозных субстратов отщепляется глюкоза.

Индивидуальные эндо- и экзоглюканазы способны расщеплять нативную целлюлозу, однако в природе этот процесс происходит обычно под действием комплекса ферментов.

Целлюлазные комплексы микроорганизмов и высших базидиальных грибов включают до 20 ферментных белков, среди которых, как правило, есть и эндо-, и экзоферменты.

Гидролиз целлюлозы ассоциированными бактериальными целлюлазами имеет место в рубце жвачных животных. В рубцовой жидкости лишь около 5 % целлюлаз находится в свободном состоянии, остальная часть представлена ассоциатами. В гидролизе целлюлозы участвуют различные бактерии, населяющие рубец. За 6–8 ч пребывания в этом отделе желудка целлюлоза расщепляется на 40–50 %.

Полнота гидролиза целлюлозы зависит от ряда факторов, в числе которых следующие: степень кристалличности субстрата, величина его удельной поверхности, состав ферментативного комплекса, используемого для гидролиза, и свойства его компонентов.

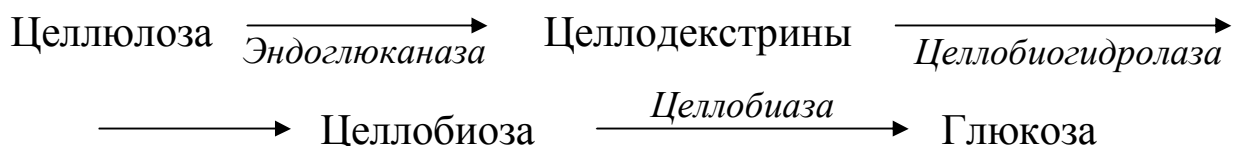
Нативная целлюлоза имеет очень прочную структуру и трудно гидролизуется. При исследовании гидролиза образцов целлюлозы различной степени кристалличности найдена обратная зависимость скорости гидролиза от процента кристалличности. Для увеличения доступности целлюлозы действию ферментов ее подвергают измельчению. При этом снижается размер частиц, увеличивается удельная поверхность субстрата и доля аморфной части. При сильном механическом воздействии может быть даже снижена степень полимеризации целлюлозы. Скорость гидролиза целлюлозы прямо пропорциональна величине удельной поверхности, она увеличивается по мере снижения размера частиц и степени полимеризации целлюлозы.

Микроорганизмы синтезируют целлюлазные комплексы, различающиеся по способности гидролизовать целлюлозу с высокой степенью кристалличности. Так называемые «неполноценные» комплексы хорошо гидролизуют аморфную целлюлозу, а в кристаллической целлюлозе расщепляют лишь ее аморфную фракцию (2–5 %). Резкое снижение активности «неполноценных» комплексов по отношению к «полноценным» наблюдается при возрастании степени кристалличности субстрата до 60–70 %.

Полноценные целлюлазные комплексы обязательно содержат эндогликоканазы, способные прочно сорбироваться на субстрате.

Чем выше коэффициент распределения, тем выше реальная концентрация фермента на поверхности субстрата и скорость гидролиза. Наблюдается прямая пропорциональная зависимость скорости гидролиза кристаллического субстрата от количества эндогликоканазы, сорбированной на его поверхности

В полноценном целлюлазном комплексе, где, как правило, присутствует эндофермент с высокой сорбционной способностью, целлобиогидролаза может и не обладать этим свойством. При этом наблюдается синергизм действия целлобиогидролазы и эндогликоканазы: активность комплекса ферментов выше суммы активностей его составляющих. Синергизм объясняется тем, что эндо фермент путем механохимического воздействия подготавливает субстрат для экзофермента, а также последовательностью реакций расщепления целлюлозы, катализируемых эндо- и экзогликоканазами, по схеме:



Синергизм действия может наблюдаться в различных комбинациях эндо- и экзоферментов (эндо-эндо, эндо-экзо, экзо-экзо), но в любом случае одна из целлюлаз значительно отличается от другой по способности адсорбироваться на субстрате. Ферменты, близкие по сорбционной способности, при соединении не проявляют синергизма. Синергический эффект целлюлаз значителен: степень расщепления субстрата увеличивается в 2,5–2,8 раза.

Для гидролиза целлюлозы используются комплексные ферментные препараты, выделяемые из культур микроскопических грибов и актиномицетов и обладающие эндоглюканазной, целлобиогидролазной и целлобиазной активностью. Отдельные компоненты целлюлазных комплексов грибов и актиномицетов проявляют наибольшую активность при рН от 3,7 до 5,5, а комплексы в целом – при рН 4,5–5,5. Оптимальная температура действия отдельных компонентов – от 45 до 80 °С, комплексов – 50–60 °С. Некоторые высшие базидиомицеты синтезируют целлюлазы с оптимумом при рН 3.

Многие целлюлазы являются углеводсодержащими белками, углеводная часть может составлять до 90 % молекулярной массы. Углеводная часть выполняет якорную функцию, способствуя сорбции фермента на субстрате. Сорбция по сродству необходима, поскольку в рН-зоне активности целлюлазы имеют незначительный заряд (рН-оптимумы близки к изоэлектрической точке (ИЭТ)). Возможно, углеводная часть обеспечивает скольжение фермента в фибриллярных структурах целлюлозы. Это существенно, поскольку целлюлазы осуществляют сотни и тысячи каталитических актов, не покидая поверхности одной целлюлозной молекулы.

Углеводная часть целлюлаз защищает белок от действия денатурирующих агентов и от протеолиза.

Конверсия целлюлозы в природных биоценозах сопряжена с деструкцией гемицеллюлозы и лигнина. При культивировании грибов на древесных субстратах в первую очередь разлагается гемицеллюлоза, после удаления ксилана увеличивается скорость гидролиза целлюлозы. Ксилазы и целлюлазы проявляют синергизм, что объясняется последовательностью их действия при гидролизе смешанного субстрата, где целлюлоза экранирована гемицеллюлозой.

Применение целлюлолитических ферментов представляет большой интерес, т.к. ферментативный гидролиз целлюлозосодержащих материалов (древесина, торф, сельскохозяйственные и городские от-

ходы) может обеспечить получение различных биотехнологических продуктов (глюкозы, этанола, ацетона, микробной биомассы).

Амилазы

Основной формой запасных углеводов в семенах и клубнях растений является крахмал. Ферментативные превращения крахмала лежат в основе многих пищевых технологий. Поэтому ферменты амилолитического комплекса растительного, животного и микробного происхождения интенсивно изучаются со времени их открытия Кирхгофом в 1814 г. и до настоящего времени.

Группа ферментов, гидролизующих крахмал (амилолитических), включает: α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу, α -глюкозидазу, изоамилазу, пуллуланазу. α -Амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, К.Ф.3.2.1.1) является ферментом эндотипа, гидролизующим α -1,4-гликозидные связи в крахмальных полисахаридах и гликогене.

α -Амилазы обнаружены у животных (в слюне и поджелудочной железе), в растениях (проросшее зерно пшеницы, ржи, ячменя), они вырабатываются плесневыми грибами и бактериями.

Действие α -амилазы на крахмал характеризуется быстрым снижением вязкости раствора и молекулярной массы олигосахаридов. Фермент имеет выраженное сродство к гликозидным связям, удаленным от конца молекулы. Расщепление гликозидной связи происходит между атомом кислорода и С1-атомом глюкозного остатка. Атака субстрата носит случайный характер и может быть как единичной, так и множественной, когда от субстрата последовательно отщепляется несколько фрагментов. Гидролизу подвергаются олигосахариды, содержащие менее 3 глюкозных единиц. При гидролизе амилопектина в продуктах гидролиза, наряду с олигосахаридами линейного строения, присутствуют α -декстрины, представляющие собой не затронутые реакцией разветвленные участки амилопектиновых молекул.

Процесс расщепления крахмала хорошо прослеживается по реакции продуктов с йодом. Синяя окраска характерна для амилодекстринов, содержащих не менее 45 глюкозных единиц (Г45), пурпурная – для декстринов Г35–Г40, красная – для эритродекстринов Г20–Г30, коричневая – для декстринов Г12–Г15. Ахроодекстрины, не окрашивающиеся йодом, имеют величину не более 12 глюкозных единиц. Образование ахроодекстринов завершает первую стадию гидролиза крахмала. Накопление низкомолекулярных сахаров происходит во второй, стационарной, медленнотекущей стадии.

Различные α -амилазы при длительном воздействии на крахмал расщепляют его на смесь олигосахаридов с преобладанием характерных сахаров. Конечный продукт расщепления крахмала – глюкоза образуется в незначительном количестве.

α -Амилазы условно делят на две группы: разжижающие и осахаривающие. К первым относят ферменты, расщепляющие в растворимом крахмале или амилозе не более 40 % гликозидных связей, ко вторым – расщепляющие до 60 %. Так, осахаривающая амилаза термофильного актиномицета гидролизует амилозу с образованием 77 % мальтозы, 17 % мальтотриозы, 3,5 % мальтопентаозы и 2,5 % глюкозы, что соответствует степени расщепления около 47 % гликозидных связей. При действии бактериальных амилаз разжижающего типа на растворимый крахмал предельная степень расщепления гликозидных связей составляет от 16 до 30 %, при этом в качестве основного продукта гидролиза может обнаруживаться мальтогексаоза, мальтопентаоза или мальтоза. Бактериальные амилазы осахаривающего типа гидролизуют крахмал с образованием до 70 % мальтозы и глюкозы. Амилаза микроскопических грибов относится к осахаривающему типу, при гидролизе крахмала образуется до 87 % мальтозы и глюкозы.

Образование продуктов расщепления крахмала под действием α -амилазы идет как по механизму гидролитической реакции, так и по механизму трансгликозилирования. Способность к трансгликозилированию более выражена у амилаз осахаривающего типа. В процессе трансгликозилирования образуются олигосахариды, являющиеся хорошим субстратом для реакции гидролиза, что способствует более глубокому расщеплению крахмала, повышению концентрации глюкозы и мальтозы в продуктах реакции.

α -Амилазы очень широко распространены в органическом мире. Их находят у низших и высших животных, растений, микроорганизмов. Наибольшее практическое применение имеют α -амилазы бактерий и микромицетов.

Микроорганизмы продуцируют α -амилазы с различными физико-химическими свойствами. Молекулярная масса фермента из различных источников составляет 16–76 кДа. Многие амилазы содержат кальций, в количестве от 1 до 30 грамм-атомов на моль белка. Кальций существен для проявления активности и стабильности амилаз. Наличие кальция более характерно для амилаз разжижающего типа.

Некоторые грибные амилазы включают углеводный компонент. Большинство исследованных амилаз проявляет активность в слабоки-

слой и нейтральной среде, в частности, производимая в крупном масштабе бактериальная α -амилаза из культуры *B. subtilis* имеет оптимум при рН около 6 (небольшие вариации в зависимости от штамма продуцента). Известны продуценты кислой α -амилазы, относящиеся к р.р. *Bacillus*, *Clostridium*. Кислые амилазы имеют оптимум при рН 2–4. Некоторые штаммы *B. licheniformis* синтезируют фермент, активный в щелочной зоне, при рН 9,5. Амилазы микроскопических грибов имеют оптимум при рН 4–5.

Оптимальная температура для действия α -амилазы мезофильных штаммов микроорганизмов обычно не превышает 70 °С. Амилазы грибов имеют оптимум при 45–60 °С. Термофильные бактерии могут синтезировать фермент с оптимумом 85–91 °С. Такие ферменты особенно ценятся в промышленном биокатализе.

Большое практическое значение имеет влияние температуры и рН на стабильность амилаз. Быстрое разрушение зерновой α -амилазы при рН 3,3–4,0, например, дает возможность выпекать ржаной хлеб из муки, которая содержит избыток α -амилазы, при низких значениях рН, чтобы предотвратить излишнее декстринирование крахмала и образование клейких веществ в мякише хлеба.

Говоря о термостабильности α -амилаз различного происхождения, можно расположить их в следующем ряду по мере снижения устойчивости к нагреванию: бактериальные амилазы – зерновые амилазы – грибные амилазы.

α -Амилаза принадлежит к числу ферментов с достаточно высокой термостабильностью. Мезофильные бактерии продуцируют фермент, стабильный при температуре до 80 °С, чаще не выше 70 °С. Амилаза термофилов может обладать поразительной стабильностью. Так α -амилаза *B. licheniformis*, выпускаемая в виде коммерческого препарата Термамил, в присутствии 1 М CaCl_2 и 31,5 % крахмала не теряет активности при 90 °С, а при 100 °С время полуинактивации составляет более 3 ч.

Амилазы кальций-независимые (так называемые «истинные»), как правило, менее термостабильны, чем кальций-зависимые.

Последними работами в области изучения амилаз показано, что в семенах растений присутствуют два типа α -амилазы: α -амилаза созревания и α -амилаза прорастания.

В созревающем зерне синтезируется α -амилаза созревания, которая затем переходит в латентную форму, локализуясь на мембранах алейронового слоя. Первый этап гидролиза крахмала при прораста-

нии осуществляется этой α -амилазой. И только на следующем этапе в работу включается вновь синтезируемый фермент α -амилаза прорастания. Ее синтез в клетках зародыша и алейронового слоя начинается при влажности зерна выше 28 %. Две формы α -амилазы семян злаков различаются по термостабильности: α -амилаза созревания при 70 °С теряет 50 % своей активности, тогда как α -амилаза прорастания при этой температуре только незначительно снижает свою активность.

Мощным механизмом регуляции скорости расщепления крахмальных гранул является система белковых ингибиторов амилаз, широко представленных в растениях. Ингибиторы белковой природы избирательно взаимодействуют с амилазами и образуют неактивные комплексы «амилаза–ингибитор». Высокой активностью обладают ингибиторы амилаз картофельного сока. Из зерна пшеницы выделен ингибитор с двумя активными центрами (двухцентровой). Один активный центр имеет сродство к протеазам и способен блокировать их действие. Другой активный центр имеет сродство к амилазам. Таким образом, один ингибитор белковой природы способен блокировать работу как протеаз, так и амилаз. В образующемся надмолекулярном комплексе ингибитор выполняет своеобразную роль связывающего звена, подавляя активность ферментов разного механизма действия.

Совершенствование технологии микробных α -амилаз идет по двум основным направлениям: создания препаратов высокой термостабильности для гидролиза клейстеризованного крахмала и препаратов, пригодных для гидролиза сырого, неклеястеризованного крахмала. Второй путь обещает в будущем переход к низкотемпературному расщеплению крахмала, что существенно сократит энергозатраты и упростит аппаратное оформление процесса гидролиза.

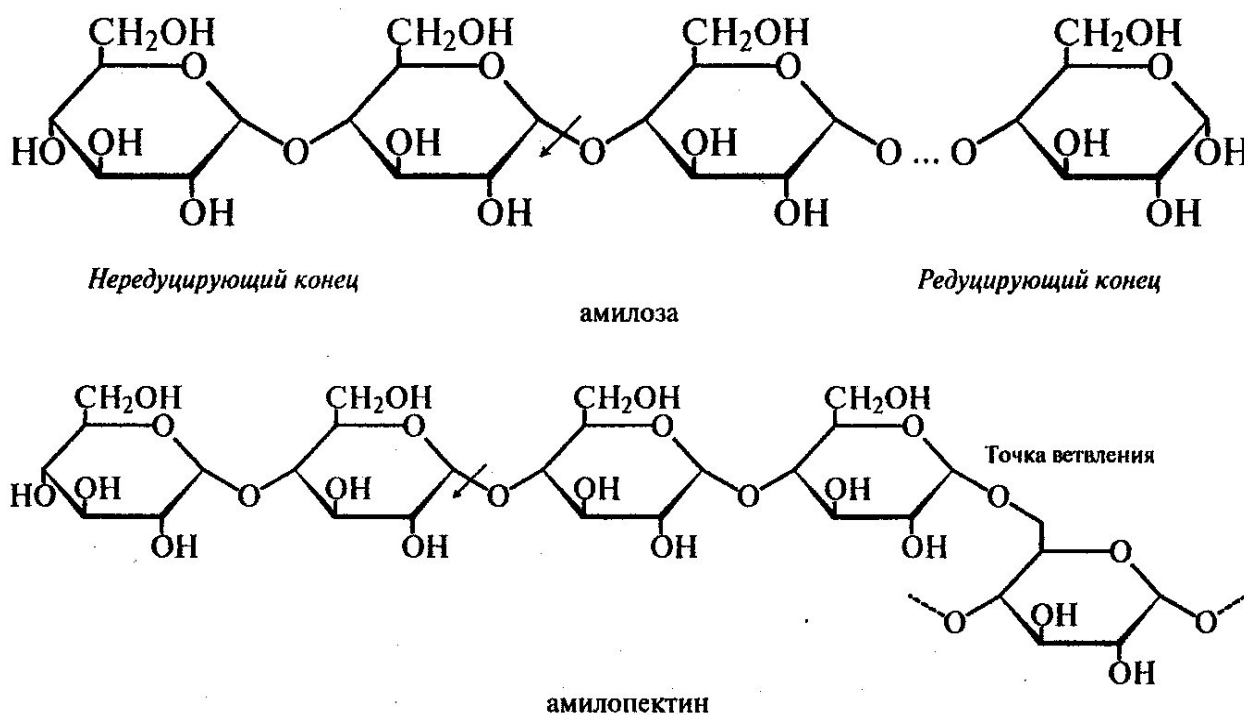
β -Амилаза (α -1,4-глюкан-мальтогидролаза, КФ.3.2.1.2) – фермент экзотипа, катализирующий последовательное отщепление мальтозы нередуцирующего конца молекул амилозы, амилопектина, амилодекстринов. Фермент расщепляет в крахмале только α -1,4-гликозидные связи. Сырой крахмал не гидролизует.

Амилоза гидролизует полностью. Минимальный расщепляемый фрагмент – Г4. От ветвей амилопектина отщепляется по 10–12 мальтозных остатков. Гидролиз амилопектина может идти до предпоследней связи, граничащей с точкой ветвления. Нерасщепленные фрагменты амилопектина носят название β -предельных декстринов. В результате гидролиза крахмала β -амилазой образуется 54–58 %

мальтозы и 42-46 % предельных декстринов. Мальтоза при отщеплении переходит в β -форму, что объясняет название фермента.

На представленной ниже схеме действие β -амилазы на амилозу и амилопектин показано стрелками.

β -Амилазу продуцируют высшие растения, микроорганизмы. Фермент содержится в непроросшем зерне и солоде злаковых культур. Солод злаков долгое время был единственным источником β -амилазы, используемым в практике. Зерновые β -амилазы наиболее активны при pH 4–6, стабильны при pH 4–8. Оптимальная температура действия 40–50 °С, температура стабильности – не выше 60 °С. Зерновые β -амилазы – сульфогидрильные ферменты, их активность подавляют тяжелые металлы и окислительные агенты.



В зерне β -амилаза присутствует в активной и латентной форме. При прорастании латентная форма активируется под действием протеаз, осуществляющих процессинг фермента.

Многие бактерии, в частности, бациллы синтезируют β -амилазу в значительных количествах. Фермент бацилл активен при pH 6–7,5, оптимальная температура действия фермента из разных культур колеблется в пределах 30–60 °С. Бактериальная β -амилаза стабильна при pH 5–9 и температуре не выше 55 °С.

β -Амилаза редко используется как индивидуальный фермент. Ее осахаривающая способность существенно увеличивается при сочета-

нии с α -амилазой. Комплекс этих ферментов позволяет расщеплять крахмал на 94–96 % до мальтозы, помимо которой в гидролизате присутствует небольшое количество глюкозы и низкомолекулярные α -1,6-декстрины.

Глюкоамилаза (α -1,4-глюкан-глюкогидролаза, К.Ф.3.2.1.3) – экзофермент, катализирующий отщепление β -глюкозы от нередуцирующего конца амилозы и амилопектина. Глюкоамилаза расщепляет α -1,4, α -1,6 и α -1,3-гликозидные связи, с наибольшей скоростью – α -1,4. Механизм гидролиза – множественная атака, то есть последовательный гидролиз нескольких гликозидных связей в одной молекуле субстрата. Возможен и одноцепочечный механизм, когда фермент расщепляет все связи в одной молекуле.

Глюкоамилаза гидролизует предпочтительно высокомолекулярный субстрат. Низкомолекулярные олигосахариды расщепляются медленно.

Фермент имеет выраженную трансфертную способность, которая проявляется тем более, чем выше степень гидролиза субстрата и концентрация глюкозы в реакционной среде. В результате трансферазных реакций накапливаются такие сахара, как изомальтоза, паноза, нигероза, изомальтотриоза и другие. Появление этих продуктов снижает выход глюкозы. Поэтому в закрытой гидролитической системе, где глюкоза не удаляется из сферы реакции, теоретически невозможно достичь полного превращения крахмала в глюкозу под действием глюкоамилазы. В открытой системе, при удалении глюкозы, снижается интенсивность трансферазных реакций, повышается скорость гидролиза за счет снятия ингибирования продуктом реакции. В таких условиях можно достичь практически полного гидролиза крахмала до глюкозы с помощью одного фермента. На практике предпочитают использовать глюкоамилазу для осахаривания частично декстринизированного крахмала.

Глюкоамилазы широко распространены у животных и микроорганизмов. Большинство глюкоамилаз – гликопротеины, содержание углеводов – до 35 %.

В промышленном биокатализе используют глюкоамилазы, продуцируемые микроскопическими грибами рода *Aspergillus*: *A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori* и некоторыми другими, например, *Rhizopus delamarn* и *Rhizopus niveus*.

Грибные глюкоамилазы – белки молекулярной массы от 48 до 112 кДа. Максимальная активность проявляется при pH 4,3–5,9

и температуре 40–70 °С. Фермент из *Asp. terreus* активен в зоне рН 2–8. Глюкоамилазы имеют низкую термостабильность, что не препятствует их применению для осахаривания декстринизированного крахмала. Глюкоамилазы мукоровых грибов способны гидролизовать крахмал на 95–100 %, фермент из пенициллов и аспергиллов – на 88–95 %.

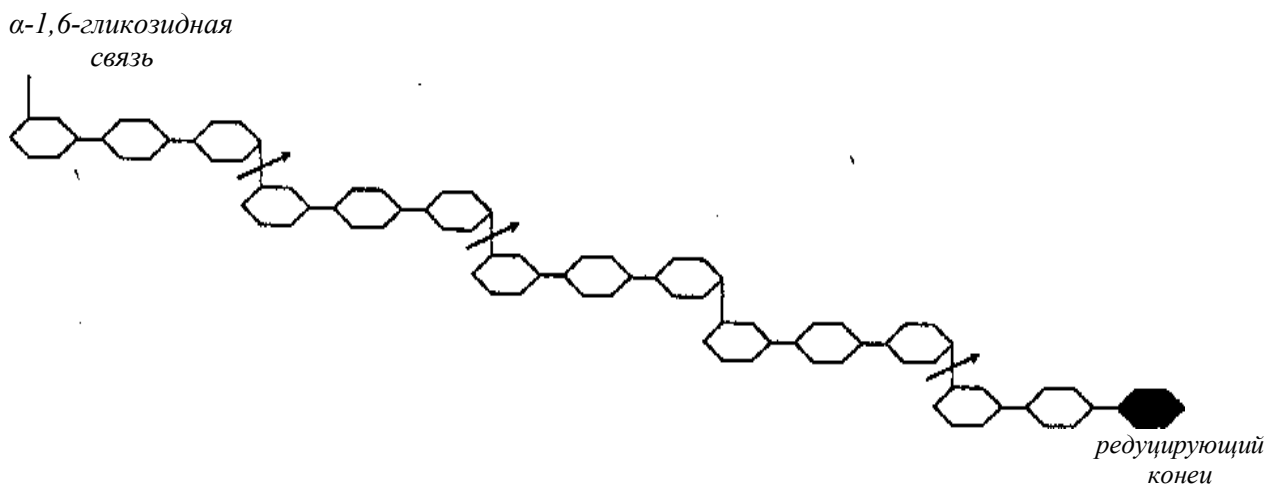
α -Глюкозидаза (α -D-глюкозид-глюкогидролаза, К.Ф.3.2.1.20), часто называемая мальтазой, является экзоферментом. Глюкозидаза гидролизует α -1,4-связи на нередуцирующем конце α -1,4-глюканов, отщепляя глюкозу в α -форме. Субстратами α -глюкозидазы могут служить мальтоза, мальтоолигосахариды, сахароза, амилодекстрины, амилоза, амилопектин, гликоген. В отличие от глюкоамилазы, мальтаза предпочтительно гидролизует низкомолекулярные субстраты. Крахмал и гликоген расщепляют не все α -глюкозидазы.

α -Глюкозидаза имеет высокую глюкозилтрансферазную способность. В процессе трансгликозилирования происходит разрыв и замыкание α -1,3; 1,4; 1,6; 2,1 и 2,6-гликозидных связей, так что наряду с линейными образуются разветвленные сахара. α -Глюкозидаза из различных источников имеет разное соотношение гидролитической и трансферазной способности. Ферменты животного происхождения, а также выделенные из некоторых штаммов пекарских дрожжей, имеют очень низкую трансферазную способность. Глюкозидаза большинства аспергиллов, дрожжеподобных грибов р.р. *Candida* и *Endo-mycopsis* характеризуется высокой глюкозилтрансферазной способностью. Реакции переноса проходят с разной интенсивностью в зависимости от концентрации субстрата. Так, мальтаза штамма *Endo-mycopsis* sp. 20-9 проявляет гидролитическое действие при концентрации мальтозы от 1 до 10 %, а в 20–30 % растворах наряду с гидролизом мальтозы осуществляется синтез продуктов с α -1,4- и α -1,6-гликозидными связями, в результате чего образуются изо-мальтоза и изомальториоза. При концентрации мальтозы 40–50 % отмечается высокая скорость трансферазных реакций. Аналогичная закономерность имеет место при действии мальтазы на крахмал.

α -Глюкозидазу активно синтезируют многие микроорганизмы, в том числе различные виды бацилл, дрожжи, сахаромицеты, микроскопические грибы – аспергиллы, пенициллы, мукоры. Фермент имеет молекулярную массу 35–85 кДа, максимальная активность проявляется у бактериальных глюкозидаз при рН 6–7, у большинства грибных – при рН 3–6. Оптимальная температура для действия фермента 35–55 °С.

Пуллуланаза (пуллулан-6-глюканогидролаза, К.Ф.3.2.1.41) гидролизует α -1,6-гликозидные связи в пуллулане, гликогене, амилопектине и предельных декстринах, образующихся при действии на амилопектин α - и β -амилаз. Гидролиз происходит по эндотипу, основной продукт расщепления пуллулана – мальтотриоза.

На представленной ниже схеме действие пуллуланы на пуллулан показано стрелками.



Пуллуланаза выделена из различных видов бактерий, преимущественно из бацилл, и из актиномицетов. Фермент проявляет максимальную активность при рН 5–7, некоторые штаммы бацилл продуцируют щелочную пуллуланазу с оптимумом действия при рН 8,5–9. Оптимальная температура – 45–60 °С. Стабильность пуллуланы повышается в присутствии ионов кальция.

Пуллуланаза наряду с другими амилолитическими ферментами применяется в технологии сахаристых продуктов, получаемых из крахмала.

Изоамилаза (гликоген-6-глюканогидролаза, К.Ф.3.2.1.68) гидролизует α -1,6-гликозидные связи в ветвящихся субстратах, за исключением пуллулана. Слабо гидролизует α -предельные декстрины. Полностью расщепляет гликозидные связи в точках ветвления гликогена.

Изоамилаза выделена из дрожжей, грибов, бактерий. Фермент наиболее активен при рН 3–6 и температуре 25–50 °С. Используется в сочетании с другими амилазами при получении сахаристых продуктов из крахмала.

Инулин накапливается как запасной полисахарид в клубнях и корнях растений, в том числе у многих сложноцветных. Содержа-

ние инулина в % к сухой массе составляет: в клубнях топинамбура – 80, корнях цикория – 75, георгина – 72, колокольчика – 45, одуванчика и выюнка – 40. Промышленное значение имеет топинамбур, который дает урожай 200–300 ц/га. Сырое вещество клубней топинамбура содержит около 18 % инулина, что превышает содержание сахарозы в сахарной свекле (11 %). Клубни топинамбура содержат фруктозаны различной молекулярной массы, от сахарозы до инулина со степенью полимеризации 40.

Инулин представляет собой полимер β -1,2-связанной фруктозы, у которого на нередуцирующем конце имеется один остаток глюкопиранозы, присоединенный 1,1-гликозидной связью. Среднее число фруктозных остатков 30–40, молекулярная масса 5–6,5 кДа.

Ферментативный гидролиз инулина катализируют инулиназы (К.Ф.3.2.1.7). Деграция происходит путем последовательного отщепления фруктозных остатков со стороны фруктозного конца полимера, глюкоза появляется в продуктах реакции только при степени гидролиза около 90 %. Механизм реакции – многоцепочечная или множественная атака. Помимо инулина, инулиназы гидролизуют сахарозу, инуло- и фруктоолигосахариды. Сродство к инулоолигосахаридам возрастает с увеличением степени полимеризации. В растворах с высокой концентрацией сахарозы и фруктоолигосахаридов инулиназы проявляют фруктозил-трансферазную способность, катализируя образование новых фруктозанов. Поэтому в концентрированных растворах субстратов гидролиз не достигает полноты.

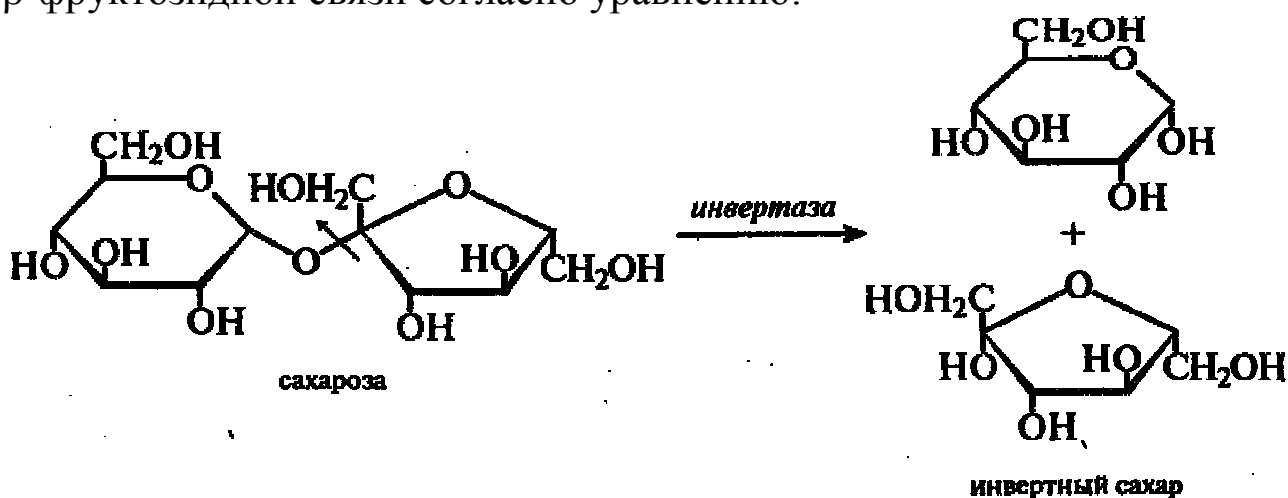
Биосинтез инулина широко распространен у микроорганизмов различных таксономических групп. Исследованы инулиназы бактерий микроскопических грибов (аспергиллов, пенициллов), различных видов дрожжей. Пенициллы и аспергиллы синтезируют инулиназу как внеклеточный фермент, бактерии *V. licheniformis* и дрожжи р. *Kluveromyces* как внутриклеточный.

Большинство инулиназ проявляет максимальную активность и стабильность в слабокислой и нейтральной среде (рН 4–7), фермент из *Agthrobacter ureafaciens* стабилен в интервале рН 4–11. Оптимальная температура действия инулиназ 45–60 °С. Инулиназы – ферменты относительно невысокой термостабильности, лишь немногие выдерживают 1 ч при 50–60 °С без потери активности (это ферменты из культур *Pen. cyclospium*, *Pen. petitions*, дрожжей рода *Kluveromyces*). Стабилизаторы инулиназ – ионы калия, натрия, кальция, магния, марганца, кобальта. Ингибиторы – ионы свинца, серебра, ртути.

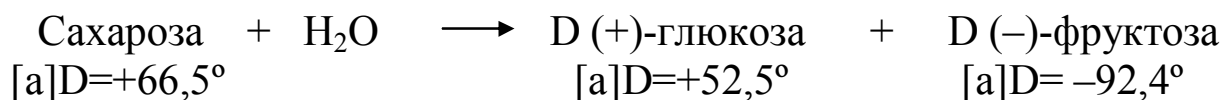
Инулиназы внутриклеточной локализации, продуцируемые дрожжами *Kluuyveromyces marxianus*, используются для получения фруктозоглюкозного сиропа. Клетки дрожжей иммобилизуют путем химической сшивки. Фермент иммобилизованных клеток имеет более высокий температурный оптимум и стабильность, чем его растворимая форма, извлеченная из автолизированных клеток.

β -Фруктофуранозидаза (К.Ф.3.2.1.26). Другие названия этого фермента – инвертаза или сахараза.

Для промышленного производства имеют значения ферменты из *S. cerevisiae* и *S. carlsbergensis*. β -Фруктофуранозидазу выделяют из дрожжей путем автолиза. Этот фермент гидролизует сахарозу по β -фруктозидной связи согласно уравнению:



В результате действия фермента на сахарозу получается смесь эквимольных количеств α -глюкозы и β -фруктозы, получившая название «инвертного сахара». Термин «инверсия» обозначает изменения, происходящие в способности сахара вращать плоскость поляризованного света. Это можно выразить следующей схемой:



Инвертаза отщепляет концевой невосстанавливающий β -1,2-связанный остаток фруктозы не только от сахарозы, но и от других олигосахаридов, частично гидролизует инулин. При гидролизе рафинозы из одной ее молекулы образуется по одной молекуле лактозы и фруктозы.

Инвертаза имеет трансгликозилазную способность и может переносить фруктозил с сахарозы на другие олигосахариды. Единичная

реакция переноса приводит к образованию нового сахара с фруктозильным остатком на конце и одной молекулы глюкозы, освобождающейся из сахарозы при отделении фруктозила. Из сахарозы по механизму трансгликозилирования могут синтезироваться полифруктозиды, например, леван.

Инвертазу выделяют из культур дрожжей и микроскопических грибов. У дрожжей инвертаза локализована в клеточной стенке, где связана с маннаном. Фермент освобождается из клетки в процессе автолиза. Грибы продуцируют внеклеточную инвертазу. Активными продуцентами инвертазы являются грибы р. р. *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Malbranchea*, *Thermomyces*. Некоторые штаммы этих грибов осмофильны и сахарозотолерантны, они способны расти и развиваться на средах с концентрацией сахарозы 20–40 %.

Инвертаза – гликопротеин, молекулярная масса 47–270 кДа. Углеводная часть молекулы составляет у инвертазы дрожжей 30–80 %, мицелиальных грибов – 10–12 %. Некоторые инвертазы имеют четвертичную структуру и состоят из двух или четырех субъединиц молекулярной массы около 50 кДа.

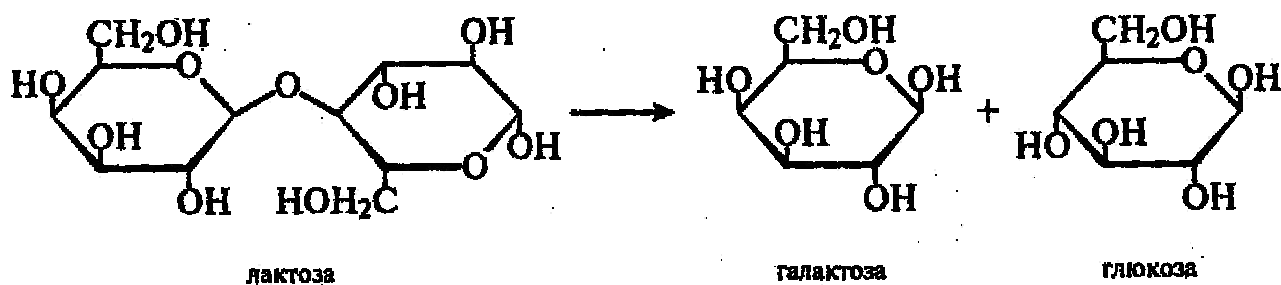
Инвертаза дрожжей сахаромицетов, грибов аспергиллов и пенициллов проявляет максимальную активность при рН 4,0–4,5 и температуре 45–55 °С, стабильна при температуре до 60 °С. Дрожжевая инвертаза требует для стабилизации присутствия сахарозы или глицерина. Необходимость в стабилизаторах объясняется тем, что внутриклеточные ферменты при переходе в свободное состояние утрачивают стабильность, которая внутри клетки обеспечивалась естественной иммобилизацией на соответствующих структурах.

Инвертаза находит широкое применение в пищевой промышленности. Гидролиз концентрированных растворов сахарозы приводит к образованию более сладких сиропов. Точка кипения инвертированных сиропов выше, а точка замерзания ниже, т. к. при инверсии повышается осмотическое давление. Образовавшиеся при действии инвертазы моносахариды более растворимы, не так легко выкристаллизуются из высококонцентрированных сиропов.

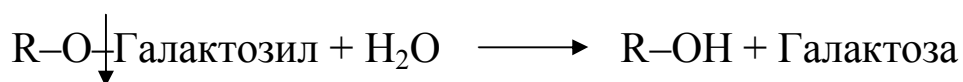
Необходимость гидролиза (инверсии) сахарозы возникает при приготовлении концентрированных сахарных сиропов, мороженого, начинок для конфет.

β-Галактозидаза (Н.Ф.3.2.1.23). Фермент, который часто называют лактазой, катализирует реакцию гидролитического отщепления нере-

дуцирующих остатков β -D-галактозы в β -галактозидах, в частности, в молочном сахаре – дисахариде лактозы:



β -Галактозидаза, отщепляет остаток галактозы от нередуцирующего конца галактозидов: олигосахаридов, полисахаридов, гликолипидов, гликопептидов, мукополисахаридов. Расщепляется связь между C1-атомом остатка галактозы и гликозидным атомом кислорода:



Гидролиз протекает с сохранением конфигурации субстрата.

β -Галактозидаза относится к числу ферментов с выраженной трансгликозилазной способностью. Фермент катализирует перенос остатка галактозы с сохранением конфигурации на различные сахара и спирты.

β -Галактозидазу продуцируют растения, животные, микроорганизмы разных таксономических групп. Способность синтезировать фермент присуща многим, но не всем молочнокислым бактериям. Микроорганизмы, лишенные этой способности, не сбразивают лактозу.

Многие люди страдают лактазной недостаточностью, в том числе негроиды и монголоиды на 75–100 %.

Препараты β -галактозидазы выделяют из культур микроорганизмов. Дрожжи и бактерии синтезируют внутриклеточный фермент высокой молекулярной массы (200–600 кДа), имеющий субъединичную структуру. Оптимальный pH 6,9–7,2. Фермент теряет активность при температуре 40 °С. Активаторы фермента – ионы магния и марганца.

Грибы синтезируют как внутриклеточную, так и внеклеточную форму β -галактозидазы. Вторая преобладает, что облегчает выделение ферментных препаратов. Внеклеточная β -галактозидаза грибов – гликопротеин молекулярной массы 115–176 кДа, субъединичной

структуры не имеет. Не активируется металлами. Оптимальный pH действия 3,6–5,3. Грибная β-галактозидаза более стабильна, чем внутриклеточный фермент дрожжей и бактерий.

В качестве промышленных продуцентов β-галактозидазы используют дрожжи, микроскопические грибы и бактерии. Фермент дрожжей и бактерий в свободном состоянии недостаточно стабилен, в качестве препаратов целесообразно использовать высушенные или иммобилизованные клетки продуцентов. За рубежом выделяют препараты β-галактозидазы из культуры дрожжей *Kluveromyces fragilis*.

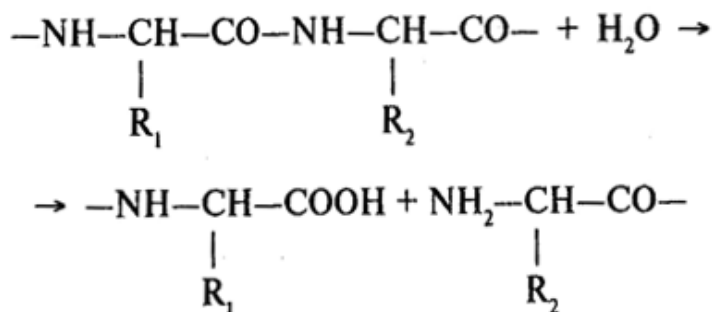
Грибная β-галактозидаза не только более стабильна, чем дрожжевая и бактериальная, но имеет также более широкую субстратную специфичность, что объясняется значительной долей фракции внеклеточного фермента у грибов. Отечественные препараты растворимой и иммобилизованной β-галактозидазы получают из культуры *Penicillium canescens*.

Гидролиз лактозы проводят при переработке продуктов растительного происхождения совместно с молочным сырьем, как это имеет место в хлебопечении, кондитерской и безалкогольной промышленности.

Протеазы (пептидгидролазы)

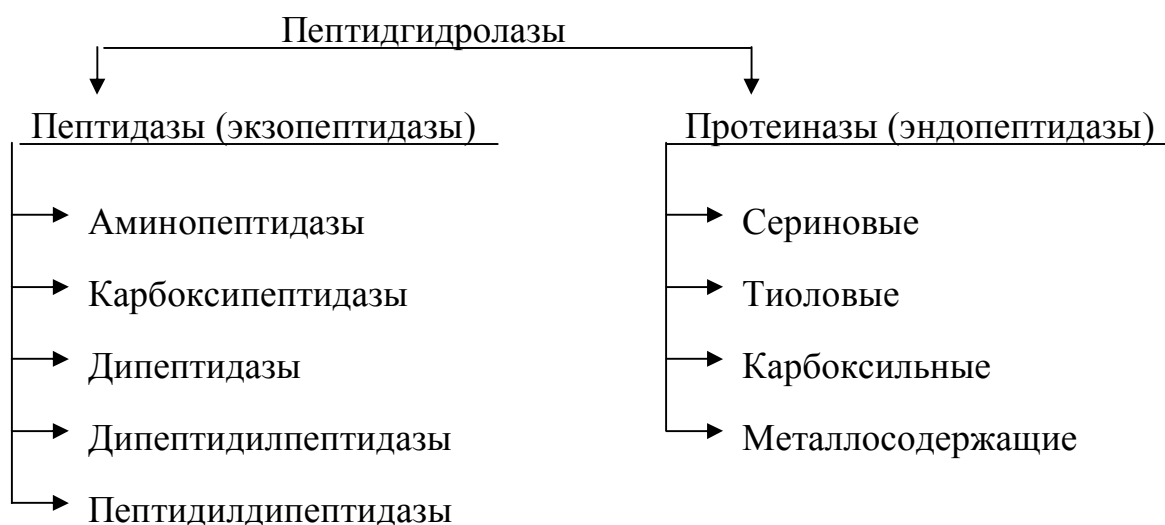
Белок и пептиды расщепляют ферменты, объединяемые в подкласс пептидгидролаз (К.Ф.3.4.). Их называют также протеазами, протеолитическими ферментами.

Основной реакцией, катализируемой протеолитическими ферментами, является гидролиз пептидной связи в молекулах белков и пептидов:



Расщепление пептидной связи в точках, удаленных от конца молекулы, катализируют эндопептидазы. Их делят на четыре группы: сериновые (К.Ф.3.4.21), тиоловые (К.Ф.3.4.22), карбоксильные (К.Ф.3.4.23) и металлосодержащие (К.Ф.3.4.24).

Отщепление концевых аминокислот и дипептидов, а также гидролиз дипептидов катализируют экзопептидазы, которые разделяют на пять групп. Аминопептидазы (К.Ф.3.4.11) катализируют отщепление единичных аминокислот от N-конца полипептидной цепи, карбоксипептидазы (К.Ф.3.4.16, 3.4.17) – от С-конца. Дипептидазы (К.Ф.3.4.13) гидролизуют дипептиды. Дипептидилпептидазы (К.Ф.3.4.14) и пептидилдипептидазы (К.Ф.3.4.15) катализируют отщепление дипептидов соответственно от N-конца и от С-конца полипептидной цепи. Схема классификации:



Существующая классификация пептидгидролаз несовершенна, поскольку в ней используются в качестве разграничительных различные признаки: деление пептидаз на группы проведено по характеру действия на субстрат, а протеиназ – по структуре каталитического центра. В настоящее время описано несколько сот пептидгидролаз различного происхождения. На основании этого обширного материала предлагаются новые варианты классификации, в частности, только по структуре каталитического центра.

Скорость ферментативного гидролиза белковых соединений определяется наличием в них пептидных связей, специфичных для действия фермента, а также пространственной структурой субстрата.

На доступность пептидных связей гидролизу влияют вторичная, третичная и четвертичная структура белков. Белки могут иметь один или два типа упорядоченных вторичных структур (α -спиральной и β -складчатой), представленных в различных сочетаниях и охватывающих более или менее значительную часть полипептидной цепи.

В упорядоченных структурах определенные участки полипептидной цепи экранированы и недоступны действию ферментов. Чем выше степень упорядоченности структуры, тем менее белок подвержен протеолизу.

Третичная структура белка, его геометрическая форма определяет соотношение экспонированной и экранированной частей молекулы (то есть доступной и недоступной протеолизу),

Наименее доступны протеолизу молекулы с наименьшей удельной поверхностью, то есть приближающиеся по форме к шару.

Четвертичную структуру имеют белковые молекулы, состоящие из субъединиц. Последние могут быть ассоциированы за счет ковалентных, ионных и водородных связей. Ассоциация субъединиц снижает относительную величину экспонированной части молекулы, увеличивает ее конформационную стабильность за счет внутримолекулярных взаимодействий. Ассоциированные молекулы менее доступны действию ферментов, чем диссоциированные.

Денатурация белков сопровождается разворачиванием полипептидной цепи, демаскированием прежде экранированных групп. Снимаются ограничения доступности субстрата, обусловленные вторичной, третичной четвертичной структурой. Денатурированные белки гидролизуются в целом быстрее и полнее нативных.

Сериновые протеиназы объединяют группу эндопептидаз, имеющих в каталитическом центре остаток серина. У большинства сериновых протеиназ в каталитическом центре находят аминокислотные остатки Асп 102, Гис 57 и Сер 195. Сериновые протеазы ингибируются агентами, взаимодействующими с остатком серина, такими как диизопропилфторфосфат (DFP), фенилметилсульфонилфторид (PMSF), сульфогалогениды, а также природными протеолитическими ингибиторами животного, растительного и микробного происхождения. Все сериновые протеиназы проявляют максимальную активность в нейтральной или щелочной среде. Молекулярная масса составляет от 12–15 кДа у ферментов с единственной полипептидной цепью, до 200–300 кДа – у ферментов с субъединичной структурой.

К группе сериновых протеиназ относятся ферменты животного, растительного и микробного происхождения, многие из которых хорошо изучены и выпускаются в виде промышленных препаратов.

В поджелудочной железе человека и млекопитающих животных синтезируются сериновые протеиназы – трипсин (К.Ф.3.4.21.4), химотрипсины А и В (К.Ф.3.4.21.1), химотрипсин С (К.Ф.3.4.21.2). Эти

ферменты образуются первоначально в виде предшественников (трипсиногена и химотрипсиногенов), которые превращаются в активные формы под действием трипсина. При протеолитическом процессинге трипсиногена от его молекулы отщепляется N-концевой гексапептид, реакция активируется кальцием.

Активная форма трипсина – однокомпонентный белок, состоящий из единственной полипептидной цепи. Фермент, выделенный из поджелудочной железы человека и различных млекопитающих, имеет молекулярную массу 22,9–25,5 кДа, оптимальный рН 7–8. Стабилен при рН не выше 6. В щелочной среде происходит самопереваривание. В организме трипсин стабилизируется с помощью ингибитора, с которым образует неактивный комплекс, устойчивый к протеолизу. Ингибитор синтезируется в поджелудочной железе. Трипсин гидролизует пептидные связи, образованные карбоксилатами аргинина или лизина. Существенно наличие свободной аминогруппы диаминокислот по соседству с расщепляемой связью. Фермент гидролизует не только амидные, но также сложноэфирные связи. Он расщепляет различные животные и растительные белки, проявляет высокую активность в отношении белковых компонентов клеточных стенок микроорганизмов. Комплекс трипсина и литической мурамидазы – лизоцима, секретлируемого слизистой кишечника, является важнейшим фактором регуляции состава микрофлоры пищеварительного тракта животных и человека.

Химотрипсины образуются из химотрипсиногенов после отщепления пептида, состоящего из 15 аминокислотных остатков. Молекулярная масса химотрипсинов составляет 24–25,8 кДа, оптимальный рН 7–9. Химотрипсины стабильны в кислой среде. Ферменты предпочтительно катализируют расщепление в белках пептидных связей, в образовании которых участвуют карбоксилы ароматических аминокислот. Гидролизуют также связи, образованные карбоксилатами лейцина, метионина, триптофана. Химотрипсины, как и трипсин, расщепляют сложные эфиры. Разнообразие типов гидролизуемых связей определяет широкую специфичность действия химотрипсинов.

В группу сериновых входят многие внеклеточные и внутриклеточные протеиназы микроорганизмов. Классическими представителями секретлируемых сериновых протеиназ бактерий являются субтилизины А, В и ВРН из культуры *B. subtilis* – белки молекулярной массы 26,3–27,5 кДа с оптимумом действия при рН 8–11. Многие бациллы продуцируют субтилизиноподобные сериновые протеиназы.

Для внеклеточных сериновых протеиназ бактерий характерен оптимум действия в щелочной зоне (рН 8–12,5), при температуре 0–50 °С. Ферменты стабильны в зоне рН от 6 до 13, при температуре не выше 50 °С. В качестве стабилизатора могут использоваться соли кальция.

Сериновые протеиназы входят в состав комплексных ферментных препаратов, выделяемых из грибов аспергиллов. У *Asp. oryzae* найдены разновидности сериновых протеиназ, которые при действии на казеин проявляют максимальную активность при рН 7–8,5 и 9–11,5.

Многие виды микроскопических грибов (р.р. *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium* и др.) синтезируют внеклеточные сериновые протеиназы. Большинство исследованных ферментов этой группы имеют молекулярную массу 18–35 кДа, оптимум действия – при рН от 5 до 12 и температуре 55–60 °С. Многие сериновые протеиназы грибов стабилизируются ионами кальция.

В соке растений присутствуют растворимые формы субтилизиноподобных сериновых протеиназ. Их выделили из плодов дыни, различных видов тыквы, из томатов, плодов маклюры (сем. тутовых), из листьев подсолнечника, корней одуванчика, клубеньков ольхи. Все исследованные растительные субтилизины – гликопротеины, фермент из маклюры содержит 25,6 % углеводов. Они синтезируются в виде препроферментов, которые после протеолитического процесса превращаются в активные формы. Молекулярная масса активных форм – 50–70 кДа, у подсолнечника – 25 кДа. Оптимальный рН действия – в интервале 7,3–11, при температуре 55–70 °С. Стабильны при температуре не выше 50–60 °С. Растительные субтилизины имеют широкую зону рН-стабильности: фермент из тыквы – 5–10, дыни – 4–12, подсолнечника – 4–10. Гидролизуют казеин, азоказеин, азоколлаген, гемоглобин и другие белки, преимущественно расщепляя связи, образованные гидрофобными аминокислотами (лейцином, фенилаланином, тирозином), с меньшей скоростью – образованные цистеином, дикарбоновыми аминокислотами и их амидами.

Растения синтезируют различные ингибиторы ферментов, среди которых наиболее широко представлены ингибиторы сериновых протеиназ, в частности, ингибиторы трипсина. Они найдены в семенах бобовых (сои, фасоли, гороха), злаков (пшеницы, ржи, кукурузы), гречихи, в клубнях картофеля, корнеплодах моркови, яблоках, листь-

ях капусты и других источниках. Ингибиторы трипсина предотвращают инфицирование растений микроорганизмами и повреждение насекомыми, поскольку большая часть патогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей синтезирует трипсиноподобные ферменты. В семенах гречихи найден медленно взаимодействующий и прочно связывающийся ингибитор трипсина, подавляющий прорастание спор и рост мицелия патогенного гриба *Alternaria alternata*. В клубнях картофеля присутствуют две разновидности ингибиторов сериновых протеиназ с молекулярной массой 21 и 22 кДа. Первый подавляет активность трипсина, химотрипсина и эластазы, второй – только двух первых ферментов. Среди ингибиторов химотрипсина, синтезирующихся в тканях картофеля, нашли высокоэффективный пептид массы всего 5 кДа. Расшифровка структуры низкомолекулярного ингибитора перспективна в целях создания синтетических аналогов для применения в качестве средств защиты растений и медицинских препаратов.

В семенах сои – две разновидности ингибиторов трипсина: ингибитор Кунитца и ингибитор Баумана-Бирк (ББИ). Второй способен одновременно и независимо связывать на одном центре – трипсин, а на другом – эластазу лейкоцитов человека и химотрипсиноподобные ферменты, за что получил название «двухголового». Показано, что ББИ обладает антиканцерогенным действием, препятствуя метастазированию и росту злокачественных опухолей, происходящему при участии лейкоцитарных ферментов химотрипсинового типа. Содержание ББИ в разных сортах сои составляет от 0,5 до 1,5 мг/г семян, в некоторых видах коммерческой соевой муки – до 1,9 мг/г. В семенах сои ББИ представлен несколькими изоформами, число которых, в зависимости от сорта сои, составляет от 2 до 7. Высокая биологическая активность ББИ побудила пересмотреть выводы об антипитательных свойствах соевых ингибиторов. Считают, что антипитательные свойства связаны с присутствием в сое большого количества таннинов – неспецифических ферментных ингибиторов широкого спектра, а также гемагглютининов.

Помимо ингибиторов собственно сериновых протеиназ, растения синтезируют бифункциональные ингибиторы, подавляющие активность α -амилазы и сериновых протеиназ. Такие ингибиторы характерны для семян злаков. В процессах гидролиза растительных белков необходимо принимать во внимание присутствие ингибиторов в растительном сырье.

Сериновые протеиназы животного и микробного происхождения прочно вошли в номенклатуру промышленных ферментных препаратов. Из животного сырья производят трипсин, химотрипсин и комплексный препарат панкреатин с активностью обоих этих ферментов. Из микробного сырья получают Проназу, Римопротелин, Протосубтилин щелочной, Амилопроторизин, Лизосубтилин и другие препараты.

Тиоловые (цистеиновые) протеиназы. В эту группу входят эндопептидазы, для проявления каталитической активности которых существенна сульфгидрильная группа цистеина. Тиоловые протеиназы ингибируются парахлормеркурибензоатом (РСМВ), монойодуксусной кислотой (МІА) и другими окислителями, а также ионами тяжелых металлов. Активируются восстановителями (2-меркаптоэтанолом, дитиотреитолом, цистеином, бисульфитом натрия и пр.).

Большинство тиоловых протеиназ имеют рН-оптимум в слабокислой или нейтральной зоне. К тиоловым принадлежат широко применяемые в практике протеиназы растительного происхождения – папаин, химопапаины А и В, бромелаин, фицин.

Папаин (К.Ф.3.4.22.2) и *химопапаины А и В* (К.Ф.3.4.22.6) выделяют из млечного сока дынного дерева. Это ферменты молекулярной массы 23,4–28 кДа с оптимумом рН 6–7. Папаин стабилен в зоне рН 3–11. Наибольшая стабильность наблюдается при рН 5. В присутствии окислителей папаин быстро теряет активность, поэтому при работе с ним необходимо следить за окислительным потенциалом среды.

Бромелаин (К.Ф.3.4.22.4) выделяют из сока зрелых стеблей ананаса, фермент имеет массу 35 кДа, оптимальный рН 5–6.

Фицин (К.Ф.3.4.22.3) получаемый из латекса тропического инжира, имеет молекулярную массу 23,8 кДа и оптимальный рН 6,5–9,5.

Папаин, бромелаин, фицин – протеиназы широкой субстратной специфичности. Они гидролизуют в белках пептидные связи, образованные лейцином или глицином. Другие типы связей, в том числе характерные для специфичности пепсина, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы, также могут расщепляться, хотя и с меньшей скоростью. Благодаря этому растительные тиоловые протеиназы более глубоко гидролизуют белки, чем сериновые и карбоксильные протеиназы животного происхождения.

В растениях найдены ингибиторы цистеиновых протеиназ. Из клубней картофеля изолирован белок молекулярной массы 23 кДа,

подавляющий активность папаина, бромелаина и фицина. В семенах тыквы – ингибитор молекулярной массы 7,5 кДа, эффективно подавляющий фицин и папаин, менее – химопапаин, на бромелаин не действует. В семенах сои содержатся две формы ингибитора цистеиновых протеиназ основная, с молекулярной массой 14 кДа, и минорная – 8,2 кДа. Основной компонент ингибирует папаин, бромелаин, фицин, химопапаин. В его молекуле три дисульфидных моста, разрыв которых под действием восстановителей (цистеина, цистамина) приводит к обратимой инаktivации. Окислители реактивируют ингибитор.

Тиоловые протеиназы продуцируют эубактерии (кlostридии, стрептококки, стафилококки) и археобактерии. У грибов их находят редко. Микробные тиоловые протеиназы наиболее активны при рН 7–8,8.

Карбоксильные протеиназы распространены у животных и эукариотических микроорганизмов. В каталитическом центре карбоксильных протеиназ – две карбоксильные группы. Активность подавляют эпоксисоединения, diaзокетоны, природные ингибиторы типа пепстатина.

Карбоксильные, или кислые, протеиназы, за малыми исключениями, проявляют активность в кислой среде.

К числу кислых протеиназ относятся пепсины млекопитающих пепсин А (К.Ф.3.4.23.1), пепсин В (К.Ф.3.4.23.2) и пепсин С (К.Ф.3.4.23.3). Это белки молекулярной массы 31–40 кДа с оптимумом действия при рН 2–4.

В слизистой желудка человека синтезируется предшественник пепсина – пепсиноген (42 кДа), который превращается в пепсин (34–35 кДа) в присутствии кислоты или автокаталитически, в результате гидролиза активным пепсином.

Пепсин проявляет специфичность в отношении связей, образованных аминокруппами тирозина или фенилаланина. Наличие свободной аминокруппы вблизи пептидной связи препятствует гидролизу белка, а карбоксильной – увеличивает скорость гидролиза. Пепсин расщепляет различные животные и растительные белки, в том числе казеин, коллаген, глютин, эластин, кератин, гистон.

Способность синтезировать кислые протеиназы широко распространена у микроскопических грибов – аспергиллов, пенициллов, мукооров, *Rhizopus*, *Trichoderma* и др. Внеклеточные кислые протеиназы грибов – ферменты молекулярной массы от 30 до 100 кДа (чаще

32–39 кДа), с оптимумом действия при рН 2–4,6. Стабильны в кислой среде (рН 2,5–6), в нейтральной среде быстро и необратимо инактивируются. Оптимальная температура действия 55–75 °С, большинство исследованных кислых протеиназ устойчивы при температуре до 55 °С, некоторые при 60–65 °С. По специфичности действия кислые протеиназы грибов сходны с пепсином.

Внеклеточные кислые протеиназы грибов, наряду с другими видами протеолитических ферментов, входят в состав комплексных ферментных препаратов, таких как Амилоризин, Амилопроторизин, Пектаваморин, Пектофоетидин, Целловиридин, Целлюлаза-100 и др. Из аспергиллов выделяют очищенные препараты кислой протеиназы, предназначенные для пищевой промышленности и медицины.

Металлосодержащие протеиназы – это ферменты, в каталитический центр которых входит ион или ионы металлов, существенные для проявления каталитической активности. Такими металлами чаще всего являются цинк, кобальт или марганец. Некоторые металлопротеиназы содержат как единственный металл кальций или магний. Кальций может входить в молекулу фермента также как ион-стабилизатор. Так в металлопротеиназе *B. subtilis* цинк является каталитически активным металлом, а кальций – стабилизатором.

Металлы играют важную роль в каталитическом акте. С их помощью образуется тройной координационный комплекс: фермент-металл-субстрат. При этом стабилизируется высшее валентное состояние металла. Ионы металлов могут образовывать координационные связи с атомами азота, серы, кислорода, имеющими неподеленные пары электронов. Отток электронов от групп $>C=O$ и $-NH-$ к иону металла облегчает разрыв пептидной связи.

Все металлопротеиназы ингибируются хелатными агентами (EDTA, EGTA, о-фенантролином и др.). Инактивация чаще всего носит обратимый характер.

Металлопротеиназы широко распространены у бактерий, встречаются и у микроскопических грибов. Бактериальные металлопротеиназы – белки с молекулярной массой 28–48 кДа, проявляющие максимальную активность при рН 6,5–9 и температуре 50–75 °С.

B. subtilis – продуцент протеолитического ферментного препарата Протосубтилина выделяет в среду две металлопротеиназы – А и Б, с молекулярной массой 44 и 40 кДа. Первая имеет оптимум при рН 7, вторая – при рН 7,5 и 11.

Микроскопические грибы синтезируют металлопротеиназы молекулярной массы 20 – 45 кДа. Среди них выделяют группу кислых

ферментов, с оптимальным рН 5–6, и нейтральных, с оптимумом рН около 7. Температурный оптимум лежит обычно в пределах 45–55 °С, у металлопротеиназы *Asp. sojae* – при 65 °С.

Среди металлопротеиназ аспергиллов и пенициллов находят цинксодержащие ферменты (один ион цинка на молекулу).

Карбоксипептидазы широко представлены у животных, растений и микроорганизмов, они играют важную роль в белковом обмене. Среди карбоксипептидаз встречаются сериновые и металлоферменты, редко – тиоловые.

В поджелудочной железе синтезируются карбоксипептидазы А и В. Предшественники этих ферментов активируются под действием трипсина. Карбоксипептидаза А – металлофермент, содержит один атом цинка на молекулу.

Молекулярная масса фермента 34,3 кДа, оптимальный рН 7,5, зона стабильности – рН 6–10,2. Карбоксипептидаза В идентична по массе и содержанию цинка, стабильна при рН 7–9. Оба фермента имеют как пептидазную, так и эстеразную активность.

Карбоксипептидазы есть у многих покрытосеменных (томата, арбуза, фасоли, шпината и др.). В клетках растений присутствуют, как связанные, так и растворимые формы карбоксипептидаз. Максимальную активность находят во фракции митохондрий.

Все растительные карбоксипептидазы – кислые белки с изоэлектрической точкой при рН 4,3–5,4. Молекулярная масса 90–175 кДа. Оптимальный рН 5–5,6, стабильны в зоне рН 4–6. Оптимальная температура действия 40–50 °С.

Большинство растительных карбоксипептидаз относится к сериновым ферментам. Из их числа – уникальная карбоксипептидаза фасоли, способная отщеплять с С-концов белков все аминокислоты, за исключением аспарагиновой. Предпочтительно наличие на С-конце аминокислоты с длинной алифатической цепью, а по соседству с ней – ароматической аминокислоты.

Карбоксипептидаза из кожуры апельсина является металлоферментом, содержащим 3,6 атома цинка на молекулу. Фермент отщепляет с С-конца белков ароматические, кислые аминокислоты и пролин. Приведенные примеры свидетельствуют о широкой субстратной специфичности растительных карбоксипептидаз.

Микробные карбоксипептидазы – белки молекулярной массы от 30 до 160 кДа. Оптимальный рН действия для грибных карбоксипептидаз – 3,0–6,8, для бактериальных – 8,0–9,8. Оптимальная температура действия карбоксипептидаз *Asp. oryzae* – 40–50 °С.

Карбоксипептидазы микроорганизмов могут иметь различную структуру активного центра. У некоторых грибов и актиномицетов они являются металлоферментами, для проявления активности которых необходимы ионы цинка, марганца, магния, кальция.

Карбоксипептидазы микроскопических грибов характеризуются широкой субстратной специфичностью, что в значительной мере определяет способность грибных ферментных препаратов катализировать глубокое расщепление растительных и животных белков. Карбоксипептидазы пенициллов отщепляют от пептидов остатки пролина, лизина, аргинина, глицина, дикарбоновых аминокислот. Кислая карбоксипептидаза *Asp. saitoi* последовательно отщепляет все аминокислоты от нативного инсулина и некоторых других пептидов. Аналогичный фермент *Asp. sojae* глубоко расщепляет соевый белок.

Протеолитические ферменты семян растений. В семенах злаковых и бобовых культур содержится целый комплекс протеолитических ферментов, участвующих в расщеплении запасных белков до аминокислот в процессе прорастания семян.

В настоящее время известно, что протеолиз белков в семенах растений осуществляется комплексом ферментов, различающихся по своим функциям, механизму действия и другим показателям. Некоторые из этих ферментов были выделены в виде высокоочищенных препаратов и подробно охарактеризованы. Так, например, из семян пшеницы были выделены несколько типов протеолитических ферментов, различающихся по оптимуму рН: кислые протеиназы с оптимумом рН 3,7–4,0; нейтральные протеиназы с оптимумом рН 6,5–7,0; щелочные протеиназы с оптимумом рН > 8,0.

Из трех групп протеиназ наибольшего внимания технологов заслуживают нейтральные протеиназы. По активности они в несколько раз превосходят кислые и в условиях теста способны эффективно расщеплять белки клейковины. Одна из особенностей нейтральных протеиназ состоит в том, что они не растворяются в водных, солевых и буферных растворах. Они прочно связаны с белками клейковинного комплекса и извлекаются при частичном растворении клейковины в щелочном растворе. Максимальное извлечение нейтральных протеиназ происходит при обработке измельченного зерна, муки или лиофилизированной клейковины 0,35 %-м раствором карбоната натрия. Нейтральные протеиназы созревших семян пшеницы и их белковые ингибиторы образуют единый неактивный комплекс, связанный с клейковиной. Соотношение активности протеиназ и их ингиби-

торов в созревшем зерне определяет стабильность белкового комплекса, его устойчивость в процессе тестирования.

Нейтральные протеиназы не активируются восстановленным глутатионом или цистеином и поэтому не могут быть отнесены к тиоловым ферментам, в отличие от кислых протеиназ. Нейтральные протеиназы ингибируются хлоридом натрия, фенольными соединениями, ароматическими аминокислотами, продуктами сахароаминной реакции (меланоидинами).

Хлорид натрия является обязательным компонентом рецептуры и, внесенный в таком количестве, снижает активность нейтральных протеиназ и соответственно интенсивность автолиза на 60–70 %.

При переработке слабой муки необходимо как можно раньше вводить соль, тогда как для муки с чрезмерно крепкой клейковиной желательнее активизировать протеолиз, и соль следует вносить на более поздних стадиях.

В связи с этим необходимо еще раз подчеркнуть важность изучения собственных эндогенных ферментных систем биологического сырья, факторов, влияющих на их активность с точки зрения их огромной роли в процессах, происходящих при созревании, хранении и переработке пищевого сырья.

4.2. Окислительно-восстановительные ферменты

В процессах переработки растительного сырья наряду с гидролитическими используются реакции, катализируемые оксидоредуктазами, трансферазами, лиазами и изомеразами.

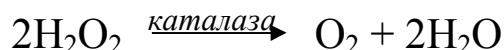
Негидролитические ферменты используются на различных стадиях технологии пищевых продуктов.

Препараты оксидоредуктаз применяются преимущественно на заключительных стадиях переработки растительных субстратов с целью сохранения пищевых и вкусовых достоинств пищевых продуктов или модификации органолептических свойств.

Следует помнить, что представители всех классов ферментов в тех или иных количествах присутствуют в перерабатываемом растительном сырье, и ферментативная активность сырья неизбежно влияет на ход технологических процессов переработки. Это влияние может быть как полезным, так и вредным. Во втором случае необходимо регулировать ферментативную активность в сырье путем его предварительной обработки или введения технологически допусти-

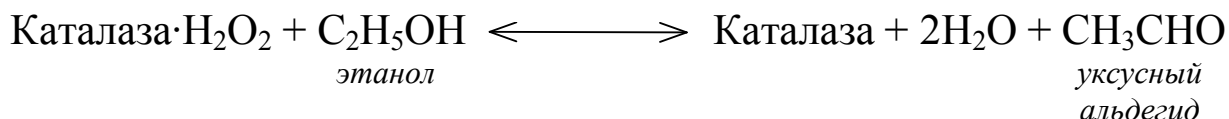
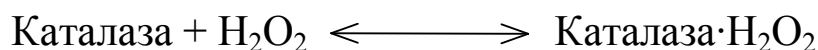
мых компонентов. Примерами нежелательных реакций являются окислительные превращения органических соединений в растительном сырье, такие как потемнение измельченных овощей и фруктов под действием тирозиназы и дифенолоксидазы, а также прогоркание жиров, провоцируемое липоксигеназой.

Каталаза – универсальный фермент органического мира, участвующий в заключительных стадиях процесса окисления. Под действием каталазы происходит расщепление перекиси водорода на воду и кислород:



Таким образом фермент окисляет одну молекулу перекиси водорода до кислорода с одновременным восстановлением другой молекулы перекиси водорода до H_2O .

Фермент способен также катализировать окисление спиртов в альдегиды, сопряженное с разложением перекиси водорода:



Такой тип реакции характерен для сред с низким содержанием перекиси водорода.

Каталаза – геминовый фермент, содержащий тетрапиррольное кольцо. В молекулу входит четыре атома трехвалентного железа. Молекулярная масса фермента 240–300 кДа, в зависимости от источника выделения. Для каталазы характерна субъединичная структура, фермент может существовать в виде тетрамера и гексамера.

Фермент ингибируется цианидом (обратимо), фенолами (обратимо лишь в слабой форме), щелочью и мочевиной (необратимо). Функцией каталазы в живом организме является защита клетки от губительного действия перекиси водорода.

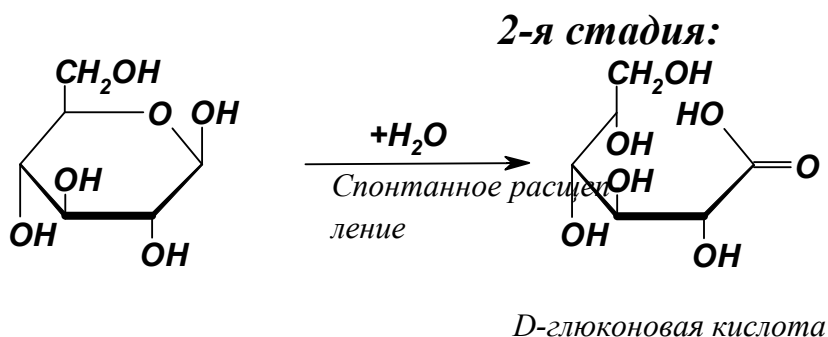
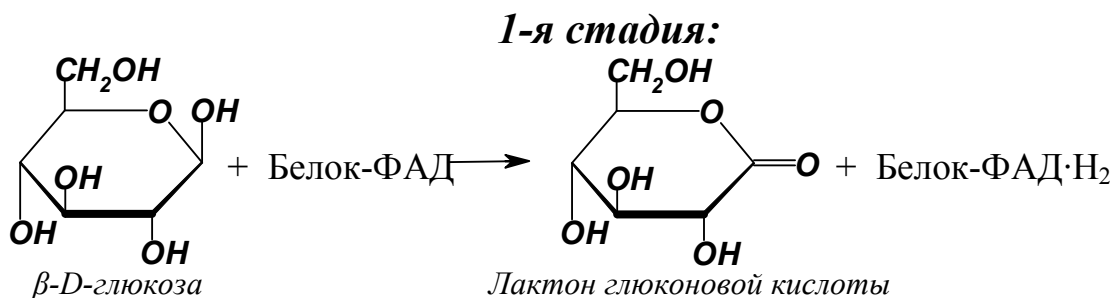
В пищевой промышленности используются препараты каталазы микробного происхождения, выделяемые из грибов пенициллов. Каталаза *Pen. Vitale* имеет широкий pH-оптимум – от 4 до 9, стабильна при температуре до 65 °С.

Каталаза находит свое применение в пищевой промышленности при удалении избытка H_2O_2 при обработке молока в сыроделии, где последняя используется в качестве консерванта; а также совместно с глюкозооксидазой применяется для удаления кислорода и следов глюкозы.

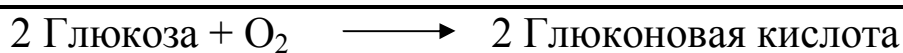
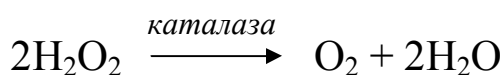
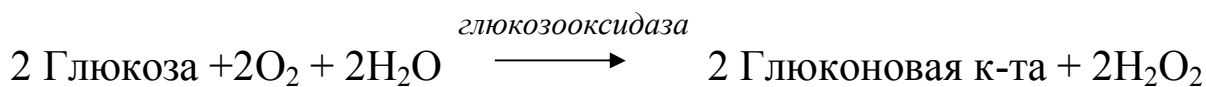
Глюкооксидаза. Фермент представляет собой флавопротеид, в котором белок соединен с двумя молекулами ФАД. Он окисляет глюкозу с образованием в конечном счете глюконовой кислоты и обладает практически абсолютной специфичностью по отношению к глюкозе. Суммарное уравнение имеет следующий вид:



Представленный выше процесс на самом деле протекает в две стадии:



В пищевой технологии глюкозооксидазу используют совместно с каталазой, поскольку необходимо разлагать перекись водорода, образующуюся на первой, ферментативной стадии окисления глюкозы глюкозооксидазой. Общий баланс процессов, протекающих под действием двух ферментов, выглядит так:



Промышленные препараты глюкозооксидазы выделяют из культур микроскопических грибов. Активные продуценты внеклеточной глюкозооксидазы – грибы *p.p. Penicillium* и *Talaromices*, наиболее перспективны *P. Vitale*, *P. Amagasakiense* и *P. Funiculosum*. Фермент из *P. Vitale* имеет молекулярную массу 150 кДа, оптимальный pH 5,6-5,8, стабилен в зоне pH 3-7, при температуре до 50 °С. Ингибиторы – ионы ртути и меди, стабилизаторы – ионы кальция и аммония.

Учитывая сопряженность действия глюкозооксидазы и каталазы, эти ферменты выделяют не только как индивидуальные, но и в виде комплексных препаратов. Грибы пенициллы и аспергиллы обладают способностью продуцировать значительные количества обоих ферментов.

Пероксидаза катализирует окисление органических соединений с помощью перекиси водорода и органических перекисей, например, образующихся из ненасыщенных жирных кислот, каротиноидов. Фермент переносит кислород от молекулы субстрата к перекиси. Субстратами пероксидазы служат различные соединения – фенолы (пирокатехин, пирогаллол, гидрохинон, резорцин), ароматические кислоты (бензойная, салициловая, галловая), аскорбиновая кислота, анилин, толуидин, нитриты и другие соединения. Фермент обладает не только пероксидазными, но и оксидазными свойствами, то есть окисляет органические соединения за счет неактивированного молекулярного кислорода.

Большинство субстратов пероксидазы – фенолы. Под действием фермента они окисляются до хинонов, которые сами по себе являются сильными окислителями. Хиноны склонны к полимеризации, в результате образуются темноокрашенные соединения.

Пероксидаза присутствует в каждой растительной клетке. Этот фермент участвует в циклах фотосинтеза и дыхания, играет существенную роль в защите растений от инфекционных заболеваний. Наблюдается положительная корреляция между степенью повреждения растения, концентрацией фенолов и активностью пероксидазы. Поэтому при переработке инфицированного растительного сырья уровень окислительных процессов в целом выше, чем при переработке интактного, неповрежденного материала.

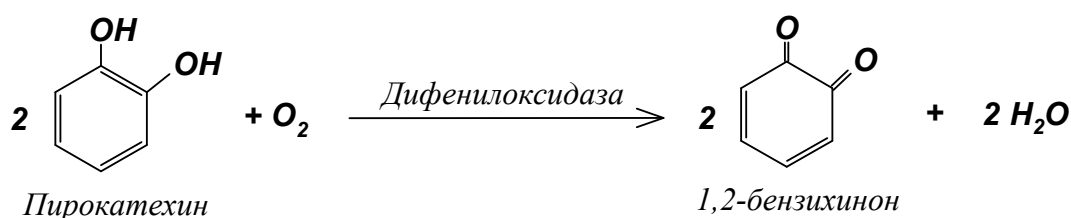
Пероксидаза – двухкомпонентный фермент, состоящий из белка гликопротеина и геминового компонента, который включает протопорфирин IX и ион трехвалентного железа. Геминовый компонент

выполняет роль активного центра. Фермент из различных источников имеет молекулярную массу от 22 до 44 кДа, белковая часть на 43 % спирализована.

Пероксидаза представлена в растениях набором изоферментов, число их у одного вида может составлять от 3 до 42. Из разных видов табака выделили 33 изофермента пероксидазы. Наличие изоферментов расширяет границы функционирования пероксидазы, она проявляет активность в зоне рН 3–14. При изменении внешних условий и гомеостаза у растения изменяется изоферментный состав пероксидазы, что является приспособительным механизмом.

Регуляция действия пероксидазы осуществляется с помощью ионов металлов – марганца, цинка, меди, кальция и др. Их присутствие влияет на соотношение собственно пероксидазной, оксидазной и оксигеназной активности. Ингибиторами пероксидазы являются цианиды и хелаты. С помощью хелатов, таких как ЭДТА, лимонная кислота и ее соли, можно предотвратить окислительные реакции, происходящие в растительном сырье под действием пероксидазы.

o-Дифенолоксидаза (прежнее название – полифенолоксидаза), катализирует окисление дифенолов, полифенола, монофенолов, дубильных веществ с помощью кислорода воздуха. Наименее устойчивы к окислению *o*-дифенолы, у которых гидроксильные группы расположены при соседних углеродных атомах:



Дифенолоксидаза – универсальный растительный фермент, присутствующий во всех органах и тканях. Субстратная специфичность дифенолоксидазы зависит от источника выделения фермента. Она различна у изоформ, выделенных из одного растения.

o-Дифенолоксидаза – медьсодержащий фермент. Ингибиторы фермента – синильная кислота, азид натрия, сероуглерод, окись углерода, диэтилдитиокарбамат, хелаты. Для проявления активности оптимален рН 5–7.

Под действием дифенолоксидазы растительные фенолы окисляются в хиноны, которые, конденсируясь, превращаются в меланины.

Конденсация хинонов протекает по свободнорадикальному механизму. Цвет меланинов зависит от их молекулярной массы. Чем крупнее молекула, тем темнее окраска, по мере увеличения молекулярной массы цвет меняется от розового до черного. Окисление фенолов под действием дифенолоксидазы и тирозиназы (тирозин-2-монооксигеназы) лежит в основе потемнения овощей и фруктов, при чистке, измельчении, сушке. Потемнение чайного листа в процессе ферментации также связано с окислением дубильных веществ в присутствии дифенолоксидазы и кислорода.

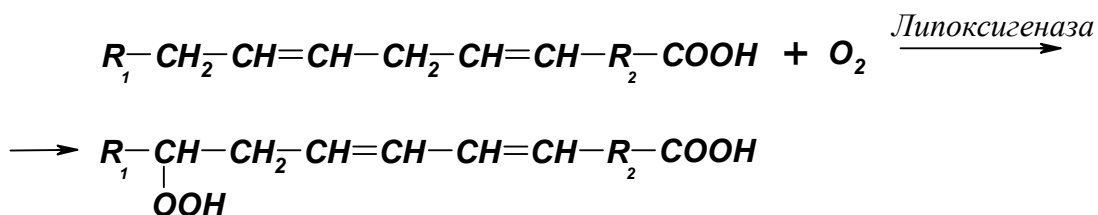
В практике для борьбы с окислительным потемнением перерабатываемых овощей и фруктов используют различные способы, в основе которых лежит инактивация дифенолоксидазы или разобщение фермента с кислородом. Для инактивации используют обработку паром или горячей водой (бланширование), а также подкисление: при рН ниже 3 фермент нестабилен.

Применение восстанавливающих агентов, таких как аскорбиновая кислота, сернистый газ и бисульфит натрия, приостанавливает потемнение продуктов: в присутствии этих агентов происходит восстановление о-хинонов в фенолы и подавляется процесс конденсации хинонов. Введение восстановительных агентов в начальный момент контакта растительного сырья с кислородом можно рассматривать как разобщение фермента с кислородом, который связывают восстановители.

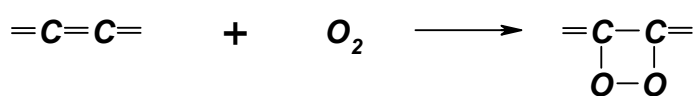
Хорошие результаты дает выдерживание материала, прошедшего механическую обработку (очистку, резку), в слабых растворах лимонной кислоты. Лимонная кислота обладает хелатным действием, она связывает каталитически активные ионы меди, что приводит к подавлению активности дифенолоксидазы. Своевременное погружение растительного материала в воду (а еще лучше – в слегка подсоленную воду) также достаточно эффективно. Процессы окисления развиваются во времени, и если материал тотчас залить водой, разобшив тем самым с кислородом воздуха, можно предотвратить потемнение.

Липоксигеназа катализирует окисление полиненасыщенных жирных кислот (линолевой, линоленовой, арахидоновой), и их эфиров. Окисление происходит за счет молекулярного кислорода. Ненасы-

щенные жирные кислоты превращаются в гидроперекиси, при этом изменяется положение двойной связи:



Возможно образование и циклических перекисей по следующей схеме:



Однако основное количество жирных кислот превращаются в гидроперекиси, обладающие сильными окислительными свойствами, и именно на этом основано использование липоксигеназы в пищевой промышленности.

Гидроперекиси жирных кислот – активные окислительные агенты, способные окислять ненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, хлорофилл, аминокислоты, аскорбиновую кислоту. Таким образом, действие липоксигеназы инициирует целый ряд различных окислительных реакций в растительном сырье.

Высокая липоксигеназная активность найдена в покоящихся семенах бобовых и льна, в зародышах злаков. В семенах подсолнечника, рапса, конопли, ореха активность фермента невелика, она возрастает при прорастании семян.

Липоксигеназа – железосодержащий глобулин. Молекулярная масса растительных липоксигеназ лежит в пределах 67–108 кДа, оптимальный pH 6,2–7,5, температура 20–40 °С.

Самым богатым источником фермента является мука соевых бобов. Липоксигеназа, полученная в кристаллическом состоянии из семян сои, имеет молекулярную 102 000 Да, изоэлектрическую точку 5,4.

В зерне пшеницы активность липоксигеназы колеблется в значительных пределах и является сортовым признаком. Кроме того, активность липоксигеназы связана с показателем жизнеспособности зерна. Она закономерно снижается со снижением всхожести зерна и может быть биохимическим тестом жизнеспособности семян. Зна-

чительная часть липоксигеназы пшеницы прочно связана с клейковинными белками и освобождается при обработке клейковинного комплекса раствором восстановленного глутатиона.

Липоксигеназе принадлежит важная роль в процессах созревания пшеничной муки, связанных с улучшением ее хлебопекарных достоинств. Образующиеся под действием фермента продукты окисления жирных кислот способны вызывать сопряженное окисление ряда других компонентов муки (пигментов, SH-групп клейковинных белков, ферментов и др.). При этом происходит осветление муки, укрепление клейковины, снижение активности протеолитических ферментов и другие положительные изменения.

Образование гидроперекисей жирных кислот – начальная стадия их дегградации, в процессе которой образуются летучие вещества, создающие характерный запах прогоркающих масел, муки, круп при их длительном хранении.

Для предотвращения отрицательных последствий действия липоксигеназы в хранящихся продуктах предпринимают различные меры. Во избежание прогоркания муки при помоле зерна отделяют фракцию зародышей – наиболее богатую липоксигеназой часть зерна. При расфасовке растительных масел и жиросодержащих продуктов по возможности исключают попадание кислорода или используют специальные упаковочные материалы, на которые нанесен фермент глюкозооксидаза, ее субстрат глюкоза и буферные соли (система, поглощающая кислород в реакции окисления глюкозы в глюконовую кислоту).

Широкое применение нашли различные антиоксиданты – токоферолы, каротиноиды, янтарная и фумаровая кислоты, флавоноиды (морин, кемпферол, мирицетин, кверцетин, дегидрокверцетин и др.), аскорбиновая кислота, растительные экстракты, содержащие комплекс различных антиоксидантов.

5. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Технологическая линия производства ферментных препаратов

Ферментные препараты представляют собой концентраты ферментов, полученные с помощью микроорганизмов, содержащие в своем составе наряду с ферментами балластные вещества. Фер-

ментные препараты применяют в пищевых производствах как катализаторы соответствующих биохимических процессов.

В качестве продуцентов ферментов используют разнообразные источники: растения, животные ткани и микроорганизмы. Основные промышленные микроорганизмы для производства ферментных препаратов – это микроскопические грибы рода *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium* и другие, а также бактерии рода *Bacillus* и актиномицеты. Они являются активными синтезаторами амилолитических, протеолитических, пектолитических и других ферментов.

Способностью активно продуцировать целлюлолитические ферменты обладают представители ряда несовершенных грибов родов *Alternaria*, *Trichoderma*, *Fusarium* и др. Важным требованием к применяемому продуценту является его способность к образованию большого количества какого-либо одного фермента при незначительном количестве других ферментов.

Микроорганизмы культивируют на средах, богатых углеводами, азотистыми и минеральными веществами, витаминами.

В производстве ферментных препаратов используют синтетические и комплексные среды, являющиеся смесью синтетических сред с естественными материалами растительного, животного и микробного происхождения.

Синтетические среды готовят из различных минеральных солей и органических соединений, являющихся источником углерода – углеводов, спиртов, органических кислот. В качестве естественных материалов применяют отходы пищевых производств: отруби, мелассу, жмыхи, кукурузный экстракт, солодовые ростки, пивные дрожжи, зерно-картофельную барду и др.

Для накопления ферментов в культуральной среде необходимо обеспечить оптимальные условия для их синтеза: состав среды, температуру, значение рН, снабжение клеток кислородом воздуха.

Для нужд пищевой промышленности вырабатываются амилолитические ферментные препараты Амилоризин П10х и Амилосубтилин Г10х. Препараты представляют собой тонкоизмельченные порошки бежевого или светло-серого цвета влажностью не более 13 %. Они хорошо растворимы в воде без постороннего запаха и вкуса. В состав Амилоризина П10х входит комплекс ферментов с преобладающим действием α -амилазы. В качестве сопутствующих имеются протеолитические ферменты, мальтаза, Р-эндополиглюканаза и др.

Стандартные уровни ферментативной активности промышленного ферментного препарата (ФП) Амилоризин П10х составляют, ед/г, не менее: амилолитическая способность (АС) – 2000; осахаривающая способность (ОС) – 1000; протеолитическая активность (ПА) – 30 при рН 4,7–5,4 и температуре 40–45 °С.

Амилосубтилин Г10х представляет собой очищенный ФП, образуемый *Bac. subtilis*. Препарат содержит α -амилазу, β -глюканазу и протеазу. АС этого препарата не менее 3000 ед/г, а ПА – не более 2 ед/г. Оптимальные для действия Амилосубтилина Г10х условия: рН 6,0–6,3; температура 50–55 °С. Бактериальная α -амилаза по сравнению с грибной обладает более высокой термостабильностью.

Протосубтилин Г10х отличается высокой протеолитической активностью. Это порошок светло-серого или светло-бежевого цвета с влажностью не более 13 %, характеризуется ПА не менее 70 ед/г.

Протеолитические ферментные препараты используют в мясной промышленности для мягчения мяса, придания ему нежного вкуса и консистенции; в молочной промышленности – для получения гидролизатов белков молока, в пивоварении – для стабилизации пива от помутнения и др.

Особенности производства и потребления готовой продукции. Применяют два способа выращивания продуцентов ферментов: поверхностный и глубинный.

Поверхностный способ предусматривает выращивание микроорганизмов на поверхности твердых, жидких, полужидких или сыпучих материалов. Этот способ создает хорошие условия для максимального контакта микроорганизмов с кислородом воздуха. Его используют в основном при выращивании мицелиальных грибов.

Глубинный способ предусматривает выращивание микроорганизмов на жидких средах. Этот способ применяют преимущественно при использовании в качестве продуцентов ферментов бактерий и других микроорганизмов, способных интенсивно развиваться в условиях недостаточного контакта клеток с кислородом. Он может быть применен и для культивирования аэробных микроорганизмов, какими являются плесневые грибы и некоторые бактерии, но для этого необходимо интенсивно аэрировать среду.

При поверхностном способе культивирования оптимальная температура для развития мицелиальных грибов 28–30 °С, бактерий 32–38 °С, относительную влажность воздушной среды на поверхно-

сти субстрата необходимо поддерживать в пределах 60–70 %. Обязательным условием этой технологии является аэрация растительной камеры.

Микроорганизмы синтезируют различные ферменты в определенной последовательности. Так, например, при использовании грибов *Asp. oryzae* максимальное количество амилаз накапливается за 21–30 ч, образование же цитолитических ферментов начинается значительно позже и для максимального накопления этих ферментов требуется увеличить длительность культивирования до 48 ч.

Регулируя состав питательной среды, условия и длительность культивирования, можно достичь превалирующей активности одного фермента в комплексе ферментов препарата.

Температура культивирования зависит от видовых особенностей микроорганизмов и колеблется в широких пределах. Для равномерного распределения клеток по объему аппарата, улучшения их контакта с питательными веществами, обеспечения отвода от клеток продуктов их жизнедеятельности осуществляют перемешивание культуральной среды.

При получении культуры поверхностным способом ферменты из питательной среды экстрагируют водой, отделяют экстракт от твердой фазы, сгущают до концентрации сухих веществ 50 % или высушивают.

При глубинном культивировании отделяют клетки микроорганизмов от культуральной жидкости фильтрацией или центрифугированием. Фильтрат или центрифугат сгущают до концентрации сухих веществ 40 % или высушивают.

Полученные таким образом технические ферментные препараты могут использоваться в жидком виде или в виде порошка.

Для очистки ферментов применяют осаждение их из водных растворов органическими растворителями такими, как метиловый, этиловый, изопропиловый спирты, ацетон; высаливание сульфатами аммония, натрия, цинка, хлоридом натрия; фракционирование. Высушивание предварительно очищенных и сконцентрированных препаратов осуществляют в распылительных сушилках или методом сублимации.

Наименование ферментных препаратов сочетает в себе сокращенное название основного фермента, активность которого в препарате преобладает, и видовое название микроорганизма-продуцента. Так, препарат, в котором превалирующим ферментом является ами-

лаза, синтезированная мицелиальным грибом *Asp. oryzae*, называют амилоризином, если применялась культура *Bac. subtilis* – амилосубтилином.

В наименовании препарата отражаются способ культивирования микроорганизмов, степень очистки препарата и степень концентрирования ферментов. С этой целью после наименования препарата ставится индекс. Например, Амилоризин П10х или Амилосубтилин Г20х. В индексе буква П означает, что препарат получен поверхностным способом культивирования, а буква Г – глубинным. Буква х условно обозначает количество фермента в стандартной (обладающей строго определенной активностью на единицу массы), глубинной или поверхностной культурах. Цифра перед буквой х отражает степень очистки препарата.

Стадии технологического процесса. Ввиду перспективности остановимся на глубинном способе культивирования. Производство ферментных препаратов глубинным способом на жидких питательных средах можно разделить на следующие стадии:

- приготовление, стерилизация и охлаждение питательной среды;
- приготовление посевного материала и выращивание производственной культуры;
- отделение и сушка биомассы;
- фасовка отходов и отделение фильтрата;
- концентрирование и сушка концентрата;
- осаждение, сушка и стандартизация препарата;
- фасование препарата.

Характеристика комплексов оборудования. Линия начинается с комплекса оборудования, в состав которого входят циклон-разгрузитель, экстракторы, стекатель, шнек-пресс, ленточный вакуум-фильтр, смеситель, а также нагревательная колонка, выдерживатель и теплообменники.

В состав линии входит комплекс оборудования, состоящий из инокулятора и ферментатора.

Следующий комплекс оборудования представляют камерный фильтр-пресс и барабанная сушилка.

Далее следует комплекс оборудования для фасования и упаковки ферментных препаратов, а также сепараторы.

Ведущим является комплекс оборудования, включающий вакуум-выпарные аппараты и распылительные (сублимационные) сушилки.

Завершающий комплекс оборудования линии состоит из установки непрерывного осаждения, аппарата обсушки препарата, центрифуги, барабанной вакуум-сушилки, установки для измельчения и смешивания.

Финишным комплексом оборудования являются фасовочные машины.

Машинно-аппаратурная схема линии производства ферментных препаратов глубинным способом на жидких питательных средах представлена на рис. 2.

Устройство и принцип действия линии. В соответствии с компонентным составом питательных сред производят их предварительную подготовку и смешивание. Например, для получения питательной среды используют свекловичный жом, который через циклон-разгрузитель 1 и циклон чистки воздуха 2 направляется на весы 3 и далее в экстрактор 4 свекловичного жома. Полученный экстракт насосом перекачивается в стекатель 5, шнек-пресс для отжима 6 и далее в смеситель 20, куда подводят питание соли и остальные компоненты с таким расчетом, чтобы при последующем соединении этих растворов была достигнута требуемая регламентом концентрация в среде.

Солодовые ростки из бункера 8 взвешиваются на весах 10 и винтовым гибким подъемником 9 направляются в экстрактор 11 и далее в ленточный вакуум-фильтр 12, откуда промывные воды отводятся в ресивер 13, а осадок спускается в бункер 14. Над вакуум-фильтром 12 размещены барометрический конденсатор 16 и ловушка 17, а ниже установлен барометрический ящик 18. Полученный экстракт солодовых ростков из ресивера для фильтрата 15 насосом через приемник 19 закачивается в смеситель 20.

Приготовленные смеси поступают в сборник питательной среды 21, а далее в стерилизатор 23, выдерживатель 24 нагрева питательной среды до 130 °С и на охлаждение среды в теплообменники 25 и 26, откуда охлажденная питательная среда поступает в ферментатор 33, заполняя его на 70–75 %.

Для начала ферментации в среду вводят посевной материал. Приготовление посевного материала осуществляется в аппарате 22, откуда он направляется в ферментатор 33 с форсуночным разбрызгивателем 32. Здесь же установлены фильтры 27, 28 и 29 для очистки воздуха, а также стерилизатор пеногасителя 30 с мерником 31. Забираемый из атмосферы воздух очищается от грубой взвеси, сжимается и охлаждается.

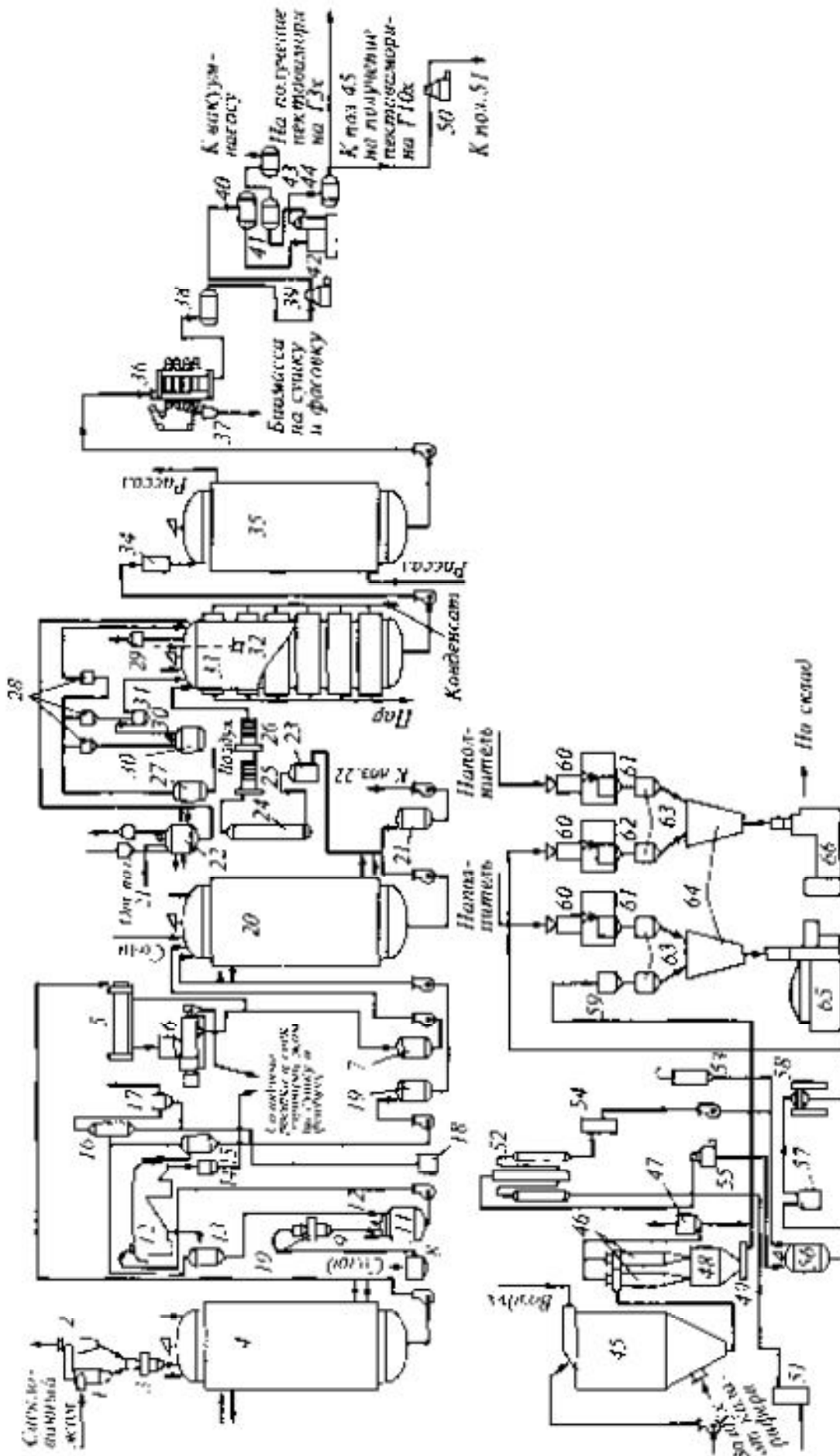


Рис. 2. Машинно-аппаратурная схема линии производства ферментных препаратов на жидких питательных средах глубинным способом

Длительность культивирования зависит от продуцента и условий введения в процесс питательных веществ. Готовую культуральную жидкость, содержащую биомассу продуцента, твердую взвесь среды и всю сумму веществ насосом подают через теплообменник 34 для охлаждения и далее в сборник 35.

После окончания ферментации отделение биомассы от культуральной жидкости происходит в камерном фильтр-прессе 36, откуда биомасса через бункер 37 направляется на сушку и фасовку, а отделенная в сборнике 38 культуральная жидкость – на сепараторы 39, 50 и 55. После сепаратора концентрат поступает в теплообменник 51 для охлаждения.

Перед выпариванием культуральная жидкость подогревается до температуры 95–100 °С и далее поступает в вакуум-выпарной аппарат 42, а конденсат из конденсатора 41 отводится в сборник 43. После выпаривания культуральная жидкость с содержанием сухих веществ около 40 % представляет собой жидкий концентрат, который перекачивается в сборник 44.

Концентрат культуральной жидкости может быть высушен в распылительной или сублимационной сушилке 45 и через циклон 46 и рукавный фильтр 47 направлен в бункер 48 высушенного препарата.

Шнековым транспортером 49 ферментный препарат транспортируется в установку непрерывного осаждения 52 этанолом, куда из мерника 53 через теплообменник для охлаждения спирта 54 подается спирт. Осажденный препарат поступает в аппарат для отсушки ферментного осадка 56, откуда после центрифугирования на центрифуге 57 препарат направляется на барабанную вакуум-сушилку 58.

Высушенный препарат собирают в бункере 59, измельчают на измельчителе 60 и направляют в бункер 61, добавляют наполнитель из бункера 61, взвешивают на весах 63 и направляют в смеситель 64.

Фасование ферментных препаратов производят в фасовочных машинах 65 и 66 порциями по 17 кг или по 0,5 кг.

При переработке различных видов органического сырья используются ферменты растительного, микробного и животного происхождения. Растительные ферменты специфичны в отношении своих естественных субстратов, что определяет высокую эффективность их действия на растительное сырье. Специфичность микробных ферментов совершенствовалась в процессе эволюции сапрофитных и фитопатогенных форм микроорганизмов. В микробном мире можно найти

продуцента всевозможных ферментов, участвующих в круговороте органического вещества. Это объясняет широкое применение микробных ферментов в пищевой промышленности и кормопроизводстве. Из животного сырья получают ограниченный ассортимент ферментных препаратов, которые, как более дорогостоящие, применяются реже микробных.

5.1. Растительные ферменты

Ферменты зерна. В практической деятельности человека с древних времен применяются ферменты зерновых культур. Зерно злаков богато запасными веществами, которые используются в энергетическом и конструктивном метаболизме при прорастании зерна. Превращение крахмала, крахмальных полисахаридов, белка, липидов начинается с их гидролитического расщепления. Продукты расщепления используются в циклах дыхания и биосинтеза структурных элементов растения. В покоящемся зерне имеются ферменты, необходимые для гидролиза всех видов полимеров. Значительная часть гидролитических ферментов находится в связанном, неактивном состоянии. Активность свободных форм гидролаз не проявляется из-за отсутствия свободной воды, необходимой для протекания реакций гидролиза. В зерне имеются ингибиторы протеолитических ферментов и α -амилазы. Ингибиторы протеаз превращают протеолитический процессинг связанных ферментов и их переход в свободные, активные формы.

При соответствующей температуре и влажности зерно набухает и прорастает. Процесс прорастания сопровождается увеличением активности большинства ферментов. Ингибиторы протеаз – белки низкой молекулярной массы – диффундируют во внешнюю среду, что создает условия для проявления активности протеаз. Под действием протеаз активируются связанные формы ферментов. Параллельно происходит новообразование ферментов.

Проросшее зерно (*солод*) является богатейшим источником ферментов. Ферментативный комплекс солода включает: амилолитические ферменты (α -амилазу, β -амилазу, α -глюкозидазу, пуллуланазу, предельную декстриназу), β -фруктофуранозидазу, целлюлолитические ферменты (эндо- и экзоглюканазы, целлобиазу), гемицеллюлазы (эндо- β -1,3-глюканазу, ламинарибиазу, эндо- и экзосиланазы, ксило-

биазу, арабинозидазу), протеазы эндо- и экзо-типов, липазы, фосфатазы, окислительно-восстановительные ферменты (каталазу, пероксидазу, о-дифенолоксидазу).

Рациональная технология солода обеспечивает получение максимальной активности гидролитических ферментов при минимальных затратах массы зерна на дыхание. Активность ферментов в процессе прорастания изменяется в зависимости от влажности зерна, температуры среды, продолжительности выращивания, способа аэрации. Оптимальные режимы солодоращения для разных культур различны (табл. 5). При получении сухого солода его активность зависит от способа сушки.

Таблица 5

Оптимальные режимы солодоращения

Культура	Температура, °С	Влажность зерна, %	Продолжительность проращивания, сут
Ячмень двухрядный	13–15	46	7
Ячмень шестирядный	17–19	47–48	6
Рожь	18–20	48–50	3
Пшеница	16–18	46–48	3–4
Овес	15–18	42–43	5–6
Кукуруза	18–20	46–48	5

Наибольшее применение находят ячменный и ржаной солод, первый – в пивоварении, второй – в хлебопечении и при приготовлении квасного сула. Высокой ферментативной активностью обладает солод из шестирядного озимого ячменя. Амилолитическая, осахаривающая и протеолитическая активность соответственно в 1,5–2, 2–3 и 3–5 раз выше, чем в солоде из двухрядного пивоваренного ячменя.

Ферменты различных видов солода имеют сходные свойства.

α -Амилаза присутствует в покоящемся зерне в незначительных количествах. Фермент активно синтезируется в процессе прорастания. Синтез индуцируют гиббереллины, образующиеся в ростке. Максимальная активность α -амилазы найдена в алейроновом слое. Оптимальные условия действия фермента: рН 5,6–5,8, температура 60–65 °С (табл. 6).

В заторах температурный оптимум повышается до 70–75 °С, а предел термостабильности – до 80 °С, что связано со стабилизирующим действием высоких концентраций крахмала в заторах.

α -Амилаза солода активируется ионами кальция и хлора, ингибируется ионами железа, хрома, меди. В солоде присутствует два фермента α -амилазы. При длительном гидролизе крахмала солодовой α -амилазой получают смесь сахаров, состоящую на 87 % из мальтозы и на 13 % – из глюкозы.

Таблица 6

Гидролитические ферменты ячменного солода

Фермент	Оптimum действия		Стабильность	
	pH	Температура	pH	Температура
α -амилаза в растворе крахмала в заторе	5,6–5,8 –	60–65 70–75	5–9 –	70 80
β -амилаза в растворе крахмала в заторе	4,6 5,4–5,6	40–50 60–65	4–8 –	60 70
Пуллулиназа	5,3	40	–	70
Предельная декстриназа в растворе крахмала в заторе	5,1 5,1	40 55–60	– –	65 –
α -глюкозидаза	6,0	35–40	–	40
β -фруктофуранозидаза	5,5	50	–	–
Цитолитический комплекс (целлюлазы и гемицеллюлазы)	4,5–5,0	40–45	–	55
Протеолитический комплекс эндопептидаза в растворе белка в заторе лейцинаминопептидаза дипептидаза	4,7 5,0–5,2 7,2 7,8–8,2	40 50–60 40–45 40–50	– – – –	70 80 >50 >50
Липаза	6,8	2,8	–	50
Фосфотаза	4,5–5,0	53	–	<70

β -амилаза находится в зерне в свободной и связанной форме. Связанная форма локализуется только в эндосперме. Активация ее происходит под действием протеаз и тиоловых агентов. β -амилаза накапливается в зерне в интервале от 2 до 5 суток проращивания, основная активность сосредоточена в алейроновом слое. Фермент имеет optimum действия в разбавленных растворах крахмала при pH 4,6–5,6 и температуре 40–50 °С, в заторах крахмалистого сырья – при

60–65 °С. Стабилен при рН 4–8 и температуре до 60 °С, в заторах – до 70 °С. Ингибиторы – ионы тяжелых металлов, галогены, озон. β -Амилаза расщепляет амилозу на 100 % с образованием мальтозы. Гидролизу амилопектина препятствуют точки ветвления, вокруг которых долго сохраняются негидролизованые фрагменты полиглюкозидных цепочек. Крахмал в целом расщепляется с образованием около 50 % мальтозы и такого же количества предельного β -декстрина, дальнейшее расщепление которого может происходить при добавлении α -амилазы. Полный комплекс амилолитических ферментов солода гидролизует зерновой крахмал на 100 %.

При прорастании зерна существенно увеличивается активность β -фруктофуранозидазы, эндо- и экзоглюканазы (в 10 раз), эндоксилаказы (в 3 раза), экзоксилаказы (в 2 раза), эндопептидазы (в 5–6 раз), экзопептидазы (в 1,5–10 раз), фосфатазы (в 5–10 раз), липазы (в 2 раза).

Протеолитический комплекс солода включает эндо- и экзопептидазы. Эндопептидазы в зерне представлены свободной и связанной формой. Переход в свободную форму происходит за счет удаления ингибиторов (их протеолиза, диффузии во внешнюю среду). В комплексе экзопептидазы идентифицированы карбоксипептидаза, магнийсодержащая лейцинаминопептидаза и дипептидаза. Протеолитические ферменты солода гидролизуют белок в зоне рН 4–9. Этот диапазон соответствует изменению величины рН в различных участках прорастающего зерна, что связано с гидролизом белка, превращениями аминокислот, синтезом органических кислот. Эти изменения отражаются в возрастании титруемой кислотности в процессе проращивания в 4–5 раз при незначительном увеличении средней величины рН (с 6 до 6,25).

Сушка солода приводит к изменению абсолютной активности ферментов и соотношения ферментативных активностей, что объясняется ограниченной и различной термостабильностью компонентов ферментативного комплекса. В результате сушки амилолитическая активность светлого солода снижается на 30–40 %, темного – на 70 %. Потери происходят в основном за счет термоинактивации β -амилазы, α -амилаза более стабильна. Снижение пептидазной активности при сушке светлого солода (температура 95–100 °С) незначительно. В темном солоде, который сушат в интервале температуры 112–120 °С, наблюдается существенное снижение пептидазной и фосфатазной активности. Высокоферментативный солод из шестирядного ячменя рекомендуют сушить при температуре 72–80 °С.

Тиоловые протеазы растений. Тиоловые растительные протеазы – папаин, химопапаины А и В, бромелаин и фицин – являются ферментами широкой субстратной специфичности. Они гидролизуют пептидные связи, образованные лейцином или глицином, которые часто встречаются в белках.

Папаин выделяют из сока дынного дерева путем фракционированного осаждения органическими растворителями. Аналогично получают бромелаин из сока зеленых стеблей ананаса и фицин – из сока стеблей тропического инжира. Промышленный выпуск тиоловых протеаз растений производится в тропических странах, где произрастает сырье.

В пищевых отраслях широко применяется папаин, который изготавливают в различных товарных формах.

В последние годы в нашей стране освоен выпуск препаратов папаина из незрелых плодов дынного дерева, которые ввозят из Эквадора. В выделяемом ферментном препарате содержится 60 % белка, протеолитическая активность которого составляет 750 – 1000 ед/г (по методу Ансона, субстрат – казеинат натрия). Ферментный комплекс включает: папаин, химопапаин, пептидазу А, незначительное количество лизоцима. Производится также иммобилизованная форма препарата (носитель – нейлоновое полотно), с высокой термо- и операционной стабильностью.

5.2. Микробные ферменты

Технология микробных ферментных препаратов основывается на выборе продуцентов ферментов, способов их культивирования и получения из культур ферментных препаратов.

Продуценты и их культивирование

В качестве продуцентов ферментов используются культуры представителей различных таксономических групп – бактерий, актиномицетов, микроскопических и высших базидиальных грибов.

К микроорганизмам – продуцентам ферментов – предъявляются следующие требования: наличие высокой ферментативной активности; преимущественный синтез фермента или группы ферментов, превращающих определенный субстрат; генетическая стабильность по признаку синтеза фермента или ферментов; достаточно высокая скорость роста; способность расти на средах с доступными и недорогими источниками питания.

Культивирование продуцентов ферментов проводится в условиях стерильности (глубинный процесс) или максимально возможного приближения к ним (твердофазный процесс).

Ферментная промышленность выпускает большой ассортимент препаратов микробного происхождения, продуцентами которых являются представители различных таксономических групп. Большая часть валового количества ферментов, особенно гидролитических, производят на основе культивирования бацилл (прежде всего *B. subtilis*), микроскопических грибов *p.p. Aspergillus, Penicillium, Trichoderma*, а также актиномицетов *p.p. Actinomyces, Streptomyces*. Чаще всего используют мезофильные штаммы аэробных микроорганизмов.

Преобладающим способом культивирования является глубинный, основанный на выращивании продуцентов в стерильных жидких средах с принудительной аэрацией (для аэробных форм) и перемешиванием среды, при автоматическом регулировании параметров процесса, таких как температура, рН среды, ее редокс-потенциал, концентрация растворенного кислорода и пр.

Наряду с глубинным применяется твердофазный способ культивирования, когда культуры продуцентов выращивают на увлажненных и простерилизованных твердых средах, таких как отруби, свекловичный жом, измельченное целлюлозосодержащее сырье, солодовые ростки и др. Твердофазное культивирование сложнее регулировать, чем глубинный процесс. Преимуществом твердофазного процесса является то, что условия культивирования максимально приближены к естественным, в которых полностью реализуется биопотенциал микроорганизмов.

Твердофазная культура хорошо аэрируется. В конце ферментации получают культуру в форме, удобной для выделения ферментных препаратов.

Глубинное культивирование используется как для аэробных, так и для анаэробных продуцентов, твердофазное – только для аэробных, именно для микроскопических и высших базидальных грибов.

Получение ферментных препаратов

Ферментная промышленность выпускает препараты различной степени концентрирования и очистки. Многие виды отечественных ферментных препаратов имеют названия и индексы, несущие информацию о продуценте фермента, основной активности и способе препарата. Название таких препаратов состоит из двух частей: первая со-

ответствует виду основной активности, вторая – видовому названию продуцента. Например, Амилаسوبтилин – это препарат α -амилазы из культуры *B. subtilis*, Глюкаваморин – препарат глюкоамилазы из *Asp. Awamori*, Целловиридин – препарат целлюлазы из *T. viride*.

Препараты, выделенные из глубинной культуры, имеют в индексе букву «Г» (глубинный), из твердофазной – «П» (поверхностный). Далее следует цифровой индекс, который характеризует степень концентрирования фермента в препарате по отношению к культуральной жидкости или твердофазной культуре. Так препараты с индексом ГЗх должны иметь активность в ед/г в 3 раза выше, чем средняя активность культуральной жидкости в ед/мл.

Наряду с препаратами, имеющими буквенно-цифровую индексацию, распространены препараты с тривиальными названиями, в которых отражены основной вид активности, величина активности, название фирмы и т.д.

Индексом Гх обозначается неочищенная культуральная жидкость продуцента фермента. Препараты Гх используются преимущественно на месте выработки. Так, в спиртовом производстве применяют культуральную жидкость продуцентов амилаолитических и целлюлолитических ферментов, получаемую в ферментных цехах спиртзаводов.

В пищевых производствах препараты Гх пригодны лишь в технологических процессах, где исключено попадание препарата в готовый продукт, например, при производстве спирта, где ферментные препараты удаляются из продукта в процессах отгонки и ректификации.

Препараты с индексом ГЗх получают путем распылительной сушки концентрированной культуральной жидкости. Концентрирование проводится методом вакуум-выпаривания при температуре, не вызывающей инактивации ферментов (обычно не выше 30 °С)

Препараты с индексом ГЗх являются неочищенными. Они имеют высокую степень микробной обсемененности, порядка 10^{10} спор или клеток в 1 г. Это ограничивает сферу применения. В пищевой промышленности препараты ГЗх используются в тех же технологиях, что и Гх. В сельском хозяйстве препараты ГЗх широко применяются для обработки кормов с целью повышения их усвояемости.

Индекс Г10х имеют препараты, полученные путем осаждения органическими растворителями из концентрированных фильтратов культуральной жидкости. Перед фильтрацией культуральную жидкость обрабатывают минеральными или органическими коагулянтами, что позволяет в процессе разделения фаз освободить фильтрат от

биомассы микроорганизмов, балластных белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот. Фильтрат концентрируют вакуум-выпариванием, добавляя при необходимости стабилизирующие агенты.

Препараты Г10х имеют значительно более высокую чистоту, чем Гх, Г3х. Это выражается как в активности ферментов на 1 г препарата, так и в удельной активности на 1 мг белка. Микробная обсемененность препаратов Г10х регламентируется на уровне 10^4 - 10^5 спор или клеток в 1 г.

Область применения препаратов Г10х охватывает различные пищевые производства, отрасли легкой и химической промышленности.

Препараты с индексом Г20х получают с применением ультрафильтрации – способа концентрирования, основанного на разделении веществ с различной молекулярной массой с помощью полупроницаемых мембран с определенным размером пор. Ультрафильтрации подвергают предварительно очищенные ферментные растворы, свободные от клеток микроорганизмов и взвешенных частиц.

Из ультраконцентратов получают жидкие и сухие формы ферментных препаратов. Жидкие формы стабилизируют консервантами, например, бензойной кислотой. Сухие формы получают путем распылительной сушки. Перед сушкой в концентрат вносят стабилизаторы и наполнители.

Препараты Г20х применяют при производстве пищевых продуктов и напитков, в кормопроизводстве, в составе лекарственных средств для лечения заболеваний, связанных с ферментной недостаточностью.

Препараты с индексом Пх представляют собой высушенные культуры грибов – продуцентов ферментов, полученные при твердофазном культивировании. Препараты Пх сохраняют полный ферментативный комплекс продуцентов. Они неочищены и имеют высокую микробную обсемененность. Применяются аналогично препаратам Г3х.

Препараты с индексами П10х и П25х получают из свежих или высушенных твердофазных культур грибов по следующей схеме: водная экстракция ферментов из культуры гриба, отделение экстракта, осаждение ферментов из экстракта этиловым или изопропиловым спиртом, отделение ферментного осадка, суспендирование осадка в воде, добавление к суспензии стабилизаторов и наполнителей, сушка суспензии распылением. Препараты П10х применяются аналогично Г10х, П25х – аналогично Г20х.

Препараты с индексом П20х получают по схеме: экстракция ферментов из твердофазной культуры, стерилизующая фильтрация экстракта, ультрафильтрация, стандартизация и стабилизация ультраконцентрата сушка его распылением. Препараты применяют аналогично Г20х.

Перечисленные виды ферментных препаратов относятся к так называемым растворимым, то есть к препаратам, активная часть которых растворяется в водной среде. По окончании ферментативной обработки субстрата растворимый препарат остается в реакционной среде и вторично не используется.

Наряду с растворимыми выпускают также *иммобилизованные ферменты*. Иммуобилизация – это включение объекта в изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна с ней обмениваться молекулами (субстратов, эффекторов).

Иммуобилизованные ферменты получают путем связывания с носителями растворимых ферментов или клеток микроорганизмов, обладающих ферментативной активностью. Наиболее распространенные способы связывания – это сорбция на носителе, ковалентное связывание и включение в структуру гелей-носителей.

Иммуобилизация приближает условия функционирования ферментов к природным. В природе большая часть ферментов ассоциирована со структурами живых организмов или элементами окружающей среды, что важно для проявления активности ферментов и их стабильности.

Иммуобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ перед растворимыми при проведении процессов промышленного биокатализа. Иммуобилизованные ферменты можно изъять из реакционной среды, что позволяет контролировать ход ферментативной реакции и многократно использовать ферментные препараты. Каталитический процесс можно проводить непрерывно, пропуская растворы субстратов через реакторы с иммобилизованными ферментами. Продукты реакции не загрязняются примесями ферментных препаратов. Иммуобилизованные ферменты имеют высокую операционную стабильность, а их каталитические свойства можно модифицировать, изменяя способ связывания и вид носителя.

Применение иммобилизованных ферментов позволило решить задачу создания крупных промышленных биокаталитических процессов, с помощью которых производят аминокислоты, органические

кислоты сахара, органические растворители, метан, антибиотики, гормональные препараты, а также очистку сточных вод и водоемов, биоконверсию органических отходов.

6. ПОЛУЧЕНИЕ КОРМОВЫХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ ПУТЕМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БИОКОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Биоконверсия, или биотрансформация – это превращение одних органических соединений в другие под действием ферментных систем микроорганизмов. Превращению могут подвергаться как продукты жизнедеятельности микроорганизмов, так и специально вводимые в среду вещества. Классическими примерами биоконверсии служат процессы получения продуктов брожения: спиртов, органических кислот (уксусной, молочной, лимонной) из углеводных субстратов, ферментативное превращение глюкозы во фруктозу, гидрокортизона в преднизолон и т.д.

Большинство промышленно важных процессов биоконверсии осуществляется путем многоступенчатого превращения субстрата в конечный продукт с участием нескольких ферментов или ферментных систем. Технологическое преимущество биоконверсии по сравнению с процессами химических превращений веществ состоит в том, что необходимые катализаторы синтезируются культурой микроорганизма, и конверсия может быть осуществлена в одну технологическую стадию. Кроме того, ферментативные процессы в живых системах энергетически более выгодны, чем химический синтез.

В процессах биоконверсии используются как свободные клетки микроорганизмов, так и иммобилизованные, то есть фиксированные на носителе. Так, традиционный способ получения этилового спирта основан на культивировании дрожжей в свободном состоянии в сбраживаемой среде, а новейшая технология предусматривает сбраживание сахара в спирт при пропускании сахарных растворов через колонну с иммобилизованными дрожжевыми клетками.

В технологии биоконверсии наряду с клетками микроорганизмов применяют выделенные из них ферменты, как в свободном (растворенном) состоянии, так и иммобилизованные.

Термин «биоконверсия» включает не только процессы «чистой» конверсии одного вещества в другое, но и такие сложные процессы,

как биологическая очистка сточных вод, объектов природы (почв, водоемов), детоксикация пищевых продуктов и кормов, трансформация органических субстратов в белковые корма и пищевые продукты и пр. В этих случаях речь не идет о получении продукта точного химического состава, определяются лишь допустимые границы концентрации конвертируемого субстрата или целевого продукта, например, допустимая концентрация нефтяных загрязнений, или нижний предел содержания белка в кормовом продукте.

Схема биоконверсии растительного сырья в кормовые и пищевые продукты

Процессы биоконверсии могут осуществляться по различным технологическим схемам, в зависимости от состава сырья, его доступности действию ферментных систем микроорганизмов, заданной характеристики целевого продукта (рис. 3).

Без обработки

В процессах биоконверсии используют необработанное растительное сырье («прямая» биоконверсия), или сырье, подвергнутое предварительной обработке механическими, химическими, электрохимическими, радиационными методами, а также с помощью ферментных препаратов.



Рис. 3. Схема биоконверсии растительного сырья

Прямая биоконверсия целесообразна при переработке жидких субстратов с достаточно высоким содержанием легкоусвояемых соединений углерода и азота. При переработке твердых субстратов прямую биоконверсию применяют при наличии микроорганизмов с мощными ферментными системами, способными воздействовать на биополимеры сырья, прежде всего, на структурные полимеры.

Труднодоступное микробным ферментам сырье предварительно обрабатывают с целью повышения удельной поверхности, набухаемости, частичной или полной деструкции сложных биополимеров и их комплексов. Особое место занимает ферментативная обработка сырья, которая по сути является биоконверсионным процессом. Путем ферментативной обработки получают корма повышенной усвояемости, прежде всего, высокоэффективные углеводные корма, то есть корма, содержащие большое количество легкоусвояемых сахаров. Корма, полученные путем микробиологической биоконверсии после ферментативной предобработки сырья, представляют собой продукты двойной биоконверсии.

Микробиологическую биоконверсию растительного сырья осуществляют путем глубинной, твердофазной или ферментации смешанного типа. Выбор способа культивирования зависит от вида сырья и физиологических особенностей микроорганизма, используемого при биоконверсии. Двухступенчатую ферментацию смешанного типа применяют при необходимости двухстадийной биоконверсии сырья различными штаммами микроорганизмов. Такая ферментация проводится, например, при биологической детоксикации кормов с высоким содержанием афлатоксинов.

Среди продуктов биоконверсии растительного сырья можно выделить следующие группы: корма с повышенным содержанием легкоусвояемых веществ, протеинизированные корма (то есть корма с повышенным содержанием белка), белковые пищевые продукты и обезвреженные корма. Примеры получения этих видов продуктов будут даны в последующих разделах.

6.1. Сырье

Основными источниками сырья для биоконверсии являются пищевая промышленность и сельскохозяйственное производство. Отходы сельскохозяйственного производства (солома злаков, стебли и ли-

стья кукурузы, початки, стебли и корзинки подсолнечника, ботва различных корнеплодов, отходы виноградной лозы, чайных плантаций, стебли табака и пр.) характеризуются низкой кормовой ценностью из-за наличия трудногидролизуемых полисахаридов и невысокого содержания белка. Некоторые виды сельскохозяйственных отходов содержат компоненты, затрудняющие использование их на корм скоту.

Отходы пищевой промышленности более богаты питательными веществами, безвредны, легче поддаются ферментативной и микробиологической биоконверсии, различным видам предобработки. Эти ресурсы рассматриваются как наиболее перспективные для биоконверсии. Количество вторичных ресурсов в пищевой промышленности составляет 60–80 % от перерабатываемого сырья, в некоторых случаях достигает 95 %.

Зерноперерабатывающая промышленность дает ценные для биоконверсии отходы, образующиеся при помоле зерна.

При помоле пшеницы и ржи образуются отруби и кормовые мучки. Их средний суммарный выход при помоле пшеницы составляет не менее 12 %. Пшеничные отруби содержат в среднем крахмала 22,8, белка 18,0, клетчатки 10,7, гемицеллюлозы 23,2, пектина 5,3, лигнина 9,9, жира 4,7, золы 5,5 %. В ржаных отрубях крахмала 21,5, сахарозы 1,7, белка 13,5, клетчатки 26,3, жира 4,1, золы 3,9 %.

При выработке круп из гречихи, овса, проса, ячменя, риса, гороха суммарное количество отходов составляет в среднем 35 % от перерабатываемого зерна.

Как отруби, так и зерновые отходы используются преимущественно на кормовые цели. Эти ресурсы можно рассматривать и как субстраты для биоконверсии, поскольку их кормовую ценность в результате биоконверсии можно повысить в 2–2,5 раза.

Спиртовая промышленность

Общее количество отходов при получении спирта из крахмалистого сырья составляет 30–35 % к массе сырья. Основным видом вторичного сырья является зернокартофельная послеспиртовая барда. В сухом веществе барды содержится, в %: сырого протеина – 39,3, клетчатки – 12,5, безазотистых экстрактивных веществ – 35,0, сырого жира – 4,9, золы – 2,0. Основная масса зернокартофельной барды скармливается животным в натуральном виде. Более рациональным способом утилизации является производство на основе барды кормовых дрожжей.

Пивоварение

В производстве пива образуются такие отходы: пивная солодовая дробина, солодовые ростки, зерновые отходы, сплав зерна, остаточные пивные дрожжи. В отходы переходит около 25 % сырья.

Солодовая дробина, образующаяся на стадии фильтрации затора, содержит около 25 % СВ, в сухом веществе: водорастворимых веществ – 7,5, крахмала – 1,6, других углеводов – 51,1, легкогидролизуемых полисахаридов – 21,3, трудногидролизуемых полисахаридов – 24,7, урсонных кислот – 3,8, лигнина – 10,0, сырого протеина – 27,0, золы – 5,5 %.

Солодовые ростки – корешки свежепросожденного солода, отделяемые при сушке, богаты витаминами, аминокислотами, сахарами, но из-за присутствия горького алкалоида горденина и высокого содержания аспарагина и зольных элементов применяются в кормах лишь в небольшой пропорции. Находят применение в микробиологической промышленности как стимуляторы синтеза целевых продуктов.

Виноделие дает такие виды вторичного сырья, как виноградные выжимки, гребии, дрожжевые и тушевые осадки, виноградные семена. Выход виноградных выжимок составляет в среднем 14 % от переработанного винограда, при содержании СВ в выжимках 45–50 %.

Вторичное сырье виноделия в основном используют при получении этилового спирта и виннокаменной кислоты. Виноградные семена, отделенные от сладких или простых выжимок, являются сырьем для выделения виноградного масла и танина.

Консервная промышленность и плодоовощное хозяйство.

Из числа образующихся отходов наибольшее значение имеют томатные и яблочные выжимки, а также отходы плодоовощных баз (отходы капусты, моркови, картофеля, свеклы).

При производстве томатного сока выжимки образуются в количестве около 30 % при содержании сухих веществ 25–30 %. Из выжимок могут быть отмыты семена томата – ценное сырье для получения масла, богатого каротиноидом ликопином.

Яблочные выжимки составляют в среднем 35 % к массе сырья, перерабатываемого на сок. Экстракты выжимок, полученные с помощью холодной воды, содержат 2–4 % сахара и 0,1–0,2 % органических кислот и могут использоваться для производства напитков, уксуса, спирта. Из выжимок получают яблочный пектин. На перечис-

ленные цели расходуется незначительная часть получаемых выжимок, использование в кормах ограничено структурой выжимок. Состав выжимок дан в табл. 7.

Таблица 7

Химический состав выжимок, % к сухим веществам

Компоненты	Выжимки		
	томатные	яблочные	мандариновые
Вещества, экстрагируемые водой	35,0	60,0	40,0
Растворимые сахара	2,35	23,05	7,80
в том числе глюкоза	0,65	7,65	2,10
Целлюлоза	12,70	11,20	10,80
Гемицеллюлоза	6,90	4,60	5,75
Пектиновые вещества	3,10	7,05	9,80
Сырой протеин	8,0	6,2	15,8
Зола	3,2	3,8	2,6

Значительный интерес как сырье для биоконверсии представляют отходы плодоовощных баз. Количество таких отходов очень велико. Плотные и жидкие отходы резко ухудшают санитарное состояние баз. На очистные сооружения с жидкими стоками поступает большое количество органических остатков. Вывоз плотных отходов, их продажа на корм нерентабельны.

Сахарная промышленность

Сахарные заводы дают следующие виды отходов: свекловичный жом, мелассу, рафинадную патоку, фильтрационный осадок, свекловичный «бой». Наибольший интерес представляет жом, составляющий 83 % к массе переработанной свеклы. В жоме 6–8 % сухих веществ, в составе которых клетчатки 17,2–26,3, пектиновых веществ 20–29, всего полисахаридов 61,7–66,1, белка 8,3–8,9, нуклеиновых кислот 0,1–0,2, зольных элементов 4,2–5,7 %. Жом используется в составе кормов. Сухой жом находит применение в микробиологической промышленности как компонент питательных сред. Из жома получают пектин.

Крахмало-паточная промышленность

Основными видами вторичного сырья, используемыми для биоконверсии, являются картофельная мезга и клеточный сок – отходы получения крахмала. В мезгу переходит от 3 до 7 % сухих веществ картофеля, количество связанного крахмала в мезге составляет

40–60 % ее сухой массы. Выход мезги в сыром виде колеблется в пределах 11–45 % к массе картофеля, в зависимости от применяемой технологии переработки. Клеточный сок, содержащий в среднем 6 % СВ, образуется в количестве 50 % к массе перерабатываемого сырья.

Масложировая промышленность

Как сырье для биоконверсии может быть использована подсолнечная лузга, образующаяся в количестве до 30 % к массе семян подсолнечника. Лузга содержит 52–66 % клетчатки, 24,8–29,6 % лигнина, 1,5–3,5 % жира. Основная масса лузги утилизируется на маслозаводах как топливо. Препятствием к использованию лузги в кормах является то, что при ее измельчении образуются частицы игольчатой формы, повреждающие пищеварительный тракт животных.

Пути переработки растительного сырья определяются его составом. Основу растительной биомассы составляют полимеры углеводной природы – целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, а также лигнин и белок (табл. 8). Последний является наиболее ценным питательным компонентом, однако количество белка даже в наиболее богатых им видах сырья не превышает 26 %. Исключение составляют семена бобовых культур, где содержание белка достигает 50 %. Такие виды растительного сырья, как солома злаков, лузга подсолнечника, отходы хлопчатника, чая и др., очень бедны белком, и для их превращения в ценные корма требуется глубокая биоконверсия. В процессе биоконверсии из продуктов расщепления углеводов и из минеральных солей азота и других элементов синтезируется белок. Увеличение содержания белка является основным показателем эффективности биоконверсии растительного сырья в пищевые продукты и корма.

Таблица 8

*Состав некоторых видов растительного сырья, в %
к сухим веществам*

Вид сырья	Гемицеллюлозы	Целлюлозы	Пектин	Лигнин	Белок
Солома ячменя	27,0	33,8	-	14,5	4,5
Солома овса	16,0	39,4		17,5	4,0
Солома ржи	26,0	37,6	-	19,0	3,8
Солома пшеницы	36,0	39,9	-	16,7	2,6
Лузга овса	24,0	22,1	9,5	14,3	2,0

Мучка овса	25,5	18,3	7,0	14,1	3,7
<i>Окончание табл. 8</i>					
Свекловичный жом	37,4	20,1	8,4	8,3	11,8
Кожура томатов	7,8	15,3	6,8	53,5	11,4
Створки зеленого гороха	16,0	25,9	9,9	8,4	14,8
Створки зрелого гороха	22,4	29,5	7,0	11,1	11,8
Ботва зрелого гороха	21,3	40,4	7,8	17,4	9,1
Люцерна	20,4	22,4	6,7	15,8	16,8
Шрот люцерны	22,0	28,3	5,1	22,1	15,6
Эспарцет	22,7	30,4	4,2	14,4	21,7
Вика озимая	25,2	33,5	4,5	14,8	16,9
Древесина березы	22,3	44,4	-	27,4	-
Лист шелковицы	12,4	13,5	8,4	14,1	26,4

Из числа углеводов сравнительно легко гидролизуются ферментами микроорганизмов крахмал и пектиновые вещества, гемицеллюлоза занимает промежуточное положение, а наиболее трудногидролизуемой является целлюлоза. Соответственно труднее всего поддаются прямой биоконверсии субстраты с высоким содержанием целлюлозы, такие как древесина, солома, ботва, одревесневшие части растений. В результате прямой биоконверсии эти виды сырья лишь незначительно обогащаются белком. Для повышения степени конверсии в белок трудногидролизуемые виды сырья подвергают предварительной обработке различными способами.

6.2. Предобработка сырья

Предобработка сырья применяется для увеличения его доступности действию микробных ферментов, частичной или полной деструкции комплексов биополимеров и их компонентов. Основной задачей предобработки является воздействие на структурные полимеры растений – целлюлозу, гемицеллюлозу, пектиновые вещества – и матриксный компонент лигнин. Эти полимеры создают прочность и жесткость клеточных стенок растений, что является основным препятствием для ферментативной деструкции.

Механическое измельчение является наиболее простым способом предобработки растительного сырья. Измельчение позволяет увели-

чить удельную поверхность материала, то есть площадь его контакта с химическими агентами или биокатализаторами. Это адекватно повышению реальной концентрации субстратов в реакционной среде и приводит к пропорциональному возрастанию скорости их превращений, в соответствии с законом действующих масс, которому подчиняются как химические, так и ферментативные реакции.

В современных биотехнологических схемах переработки крахмалосодержащего сырья в продукты брожения (пиво, спирт) сырье не только измельчают, но и фракционируют по величине частиц. Каждую фракцию обрабатывают ферментами в соответствии с химическим составом и кинетикой ферментативных реакций, характерных для данной фракции. Это позволяет рационально использовать ферментные препараты и достигать высокой степени конверсии субстратов на стадии брожения.

Сильное механическое измельчение приводит к изменению структуры сырья на молекулярном уровне. Так, при измельчении целлюлозы на вибромельнице степень полимеризации снижается с 1200 до 900 глюкозных единиц. Очень важно контролировать температурный режим процесса измельчения, поскольку сильный нагрев вызывает побочные химические реакции в сырье.

При биоконверсии зернового сырья в продукты брожения используют взорванные структуры, имеющие очень высокую пористость – от 200 до 600 % к сухой массе сырья, что позволяет резко увеличить скорость диффузионных процессов внутри частиц и тем самым активизировать ферментативные реакции, лимитируемые оттоком их продуктов.

Механические методы предобработки часто сочетают с химическими и ферментативными.

Химическая предобработка растительного сырья применяется для разделения комплексов структурных полимеров растений путем преимущественной экстракции какого-либо компонента, а также для расщепления растительных полимеров на низкомолекулярные продукты, которые могут быть использованы микроорганизмами как источники питания.

В качестве химических агентов чаще всего используют кислоты и щелочи. Мягкая обработка этими агентами (при температуре не выше 100 °С, в течение 1–4 ч при атмосферном давлении) применяется для перевода в растворимое состояние гемицеллюлозы, пектиновых веществ, лигнина. Более жесткий режим обработки дает возмож-

ность расщепить биополимеры на блоки различной величины, вплоть до мономеров.

Недостатком химической обработки является то, что она дает побочные продукты реакции, обладающие токсическим действием на организм. При кислотном гидролизе растительного материала образуются такие токсины, как метанол, формальдегид, ацетон, летучие фенолы, фурфурол и его производные, муравьиная кислота. Как кислотный, так и щелочной гидролиз приводит к деградации аминокислот, образованию продуктов их конденсации с углеводами и другими соединениями. Поэтому использование химических агентов для предобработки растительного сырья требует тщательных исследований механизма и кинетики процессов с целью получения продуктов гидролиза заданного состава и качества.

Жесткий кислотный гидролиз целлюлозосодержащего сырья лежит в основе технологии так называемых гидролизных дрожжей (то есть дрожжей, выращиваемых на гидролизатах древесины). Изучение механизма кислотного гидролиза различных групп полисахаридов растительного сырья позволило разработать рациональную технологию отдельного получения пентозных и гексозных смесей моносахаров с минимальными примесями нежелательных продуктов. Пентозы входят в состав гемицеллюлоз, которые гидролизуются легче целлюлозы и лигнина. Отделение продуктов гидролиза гемицеллюлоз, обогащенных пентозными сахарами, дает в качестве второго продукта целлолигнин, из которого далее получают гексозный гидролизат с преимущественным содержанием глюкозы. Такое разделение очень важно, поскольку на гексозном гидролизате можно выращивать экологически безопасные дрожжи-сахаромицеты, тогда как на смеси пентоз и гексоз, так же как на чистых пентозах, можно культивировать только дрожжи р. *Candida*, вызывающие аллергические реакции у людей и животных.

При получении гидролизатов древесины успешно используют сочетание термических, механических и химических воздействий на целлюлозу. В модельных опытах на обеззоленной древесной целлюлозе показано, что ее термический гидролиз при 400 °С с наложением напряжения сдвига (угол поворота наковальни Бриджмена от 0 до 800 °С) дает выход легкогидролизуемой фракции целлюлозы 12 %, то же при давлении 2000 мПа – 22,5 %. а при дополнительной пропитке материала 1–5 % растворами различных кислот – от 43 до 80 %. В оп-

тимальном варианте степень полимеризации целлюлозы снизилась со 170 до 15 глюкозных единиц.

Термохимическая обработка в слабых растворах сернистой или серной кислоты под давлением применяется для разделения древесины на фракции, обогащенные целлюлозой, гемицеллюлозой и лигнином. Метод, получивший название «парового взрыва», разработан применительно к древесине быстрорастущих пород деревьев, которую используют как сырье для получения спирта путем биоконверсии. Паровой взрыв применяют также для повышения питательной ценности древесины, подсолнечной лузги и других грубых кормов. Так, переваримость измельченной березы после парового взрыва возросла с 4,7 до 60,7 %, ее клетчатки – с 2,2 до 65 %. Усвояемость подсолнечной лузги в рубце жвачных повысилась с 45 до 73 %. В этих примерах паровой взрыв можно рассматривать как метод обработки сырья перед биоконверсией, имеющей место в пищеварительном тракте животных.

Исследование конверсии древесины березы с помощью парового взрыва и ферментативной обработки показало, что при увеличении температуры пара со 170 до 230 °С выход растворимых веществ повышается с 30 до 40 %. Оптimalен режим обработки в течение 4 мин при 230 °С, после чего с помощью целлюлолитических ферментов можно перевести в растворимое состояние 84 % сахаров, содержащихся в древесине, причем пентозные сахара полностью переходят в мономерные формы, а выход глюкозы составляет 66 % от теоретического (ферментативный гидролиз проводили в течение суток при рН 4,5 и температуре 40 °С). Гидролизаты использовали для получения высокобелковой биомассы дрожжей р. *Candida*.

Большую проблему представляет переработка соломы в корма повышенной усвояемости для жвачных животных. Механические способы обработки не оказывают существенного влияния на структуру соломы, так как не разрушаются связи лигнина с другими компонентами клеточных стенок, и материал в целом остается гидрофобным, трудно смачивается и вследствие этого плохо ферментируется.

Малоэффективен способ замачивания соломы в 1,5 % растворе поваренной соли в течение 7–24 ч с последующей промывкой водой, который был распространен в Германии. Значительно лучше проходит делигнификация соломы в щелочи. При обработке 4 % едким натром клеточные стенки пшеничной соломы увеличиваются в объеме на 37 %, ячменной – на 74 %, что свидетельствует о повышении гид-

рофильности вследствие экстракции части лигнина. В Дании и Великобритании солому размалывают и гранулируют с едким натром, затем нагревают при повышенном давлении, что увеличивает переваримость соломы на 20 %. Действуют промышленные установки по изготовлению такого корма. Однако способ не получил большого распространения, поскольку солома, обработанная щелочью, плохо поедается животными.

Более дешевым и рациональным считают способ обработки соломы 25–30 % раствором аммиака, при этом солома хорошо сохраняется и не поражается плесневыми грибами – продуцентами токсинов. Обработку проводят в скирдах с укрытием. После обработки солома пригодна к скармливанию жвачным животным в течение 2 месяцев, ее питательная ценность на 30–47 % выше, чем необработанной.

При обработке соломы озимой пшеницы жидким аммиаком в камерной установке при температуре 85–95 °С питательность увеличилась на 70–80 %, переваримость сухих веществ – на 9,3 %. В 1 кг корма содержание кормовых единиц повысилось с 0,22 до 0,37, а переваримого протеина – с 10,8 до 66,2 г.

Наряду с едким натром и аммиаком для обработки соломы используют карбамид (мочевину), карбамидфосфат, а также фосфат аммония. Последний дает увеличение переваримости на 38,7 %. Хорошие результаты получают при комбинированном воздействии на солому двуокиси серы и безводного аммиака.

Обработка окислителями – перманганатом калия, хлоритом натрия – позволяет повысить усвояемость соломы соответственно на 49 и 56 %. Под действием окислителей происходит химическая деструкция лигнина.

Несмотря на разнообразие модификаций химической обработки соломы, остается нерешенной проблема существенного повышения ее питательной ценности при последующей биоконверсии в пищеварительном тракте жвачных, поэтому солому вводят в их рацион в ограниченном количестве.

Электрохимическая обработка (ЭХО) привлекает внимание биотехнологов как экологически чистый, дешевый и эффективный способ деструкции растительного сырья. По существу ЭХО близка к химической обработке кислотами и щелочами, однако имеет свои особенности. При ЭХО воду или слабые водные солевые растворы, как таковые или в смеси с растительным сырьем, подвергают электролизу. В катодной зоне получается кислый раствор, содержащий поло-

жительно заряженные ионы водорода и металлов, в анодной – щелочной, содержащий гидроксилы и анионы солей. Эти растворы, аналогичные растворам кислот и щелочей, обладают гораздо более высокой химической активностью при равных концентрациях ионов, что связано с конфигурацией водных сольватных оболочек, образующихся вокруг ионов в момент диссоциации воды и солей в процессе электролиза. Благодаря высокой химической активности ЭХО воды и растворов, с их помощью можно в мягких условиях гидролиза достигать тех же результатов, что при жесткой химической обработке. Это очень существенно, так как избавляет от необходимости конструировать оборудование, устойчивое к агрессивным средам.

ЭХО растворы содержат низкие концентрации ионов и потому имеют малую буферную емкость. При соединении с растительным материалом реакция среды становится близкой к нейтральной. После обработки сырья не требуется нейтрализации среды и последующего выведения из нее солей, то есть отпадает необходимость очистки сточных вод на стадии получения гидролизатов растительного сырья.

При обработке ЭХО растворами или ЭХО водой их можно брать в количестве не более половины объема реакционной среды, не снижая эффекта действия.

ЭХО используют для предподготовки к биоконверсии лигноцеллюлозного сырья (соломы, кукурузной кочерыжки, цитрусовой муки и др.). В производстве пива ЭХО может заменить обработку несоложенных материалов ферментными препаратами.

Радиационная обработка применяется для повышения степени конверсии целлюлозосодержащих субстратов. Облучение целлюлозы кобальтом-60 приводит к снижению степени полимеризации с 1200 до 20 глюкозных единиц, что сопоставимо с гидролизом целлюлазами эндотипа. Радиационная обработка мало используется из-за дороговизны и сложности установок.

Ферментативную обработку применяют в технологии биоконверсии низкоценного и трудногидролизуемого сырья – плодоовощных отходов, некондиционного фуражного зерна, лигноцеллюлозных материалов (соломы, отходов хлопчатника, подсолнечника и др.). В животноводстве ферменты используют для получения кормов повышенной усвояемости.

Ферментные препараты выбирают в соответствии с составом сырья. Так для гидролиза плодоовощных отходов, содержащих значительные количества пектиновых веществ и целлюлозы, используют

комплекс пектиназ и целлюлаз, для отходов хлопчатника – комплекс гемицеллюлаз и целлюлаз. Для обработки фуражного зерна, главные компоненты которого – крахмал, белок, глюкан, арабиноксилан, необходим комплекс амилазы, протеазы, глюканазы и ксиланазы, такой комплекс можно получить, например, сочетанием Амилосубтилина, Протосубтилина и Целловиридина или Вильзима АК.

В тех случаях, когда микробиологическую биоконверсию осуществляют в асептических условиях, ферментативную обработку проводят на стадии приготовления питательной среды. При выращивании микроорганизмов на нестерильных средах обработку сырья ферментами можно совместить с процессом культивирования, однако необходимо учитывать уровень и характер обсемененности ферментных препаратов.

6.3. Культивирование микроорганизмов

В технологии биоконверсии растительного сырья используют глубинный способ культивирования, твердофазную ферментацию и ферментацию смешанного типа, когда субстрат конвертируют последовательно в глубинном и твердофазном режиме.

Разработка технологии культивирования включает обязательные стадии: выбор штамма микроорганизма, выбор способа культивирования и определение оптимальных параметров технологического процесса.

Культуры микроорганизмов

Выбор культуры микроорганизмов определяется, прежде всего, их способностью продуцировать целевой продукт на сырье, подлежащем биоконверсии.

Для прямой биоконверсии субстрата можно использовать один штамм микроорганизмов, обладающий комплексом ферментов для гидролиза субстрата и синтеза белка на основе продуктов гидролиза, либо ассоциацию из двух и более штаммов, среди которых есть микроорганизмы с высокой активностью гидролитических ферментов и микроорганизмы, активно синтезирующие белок (принцип «разделения труда»). Так, например, получение белковых кормов на основе мелассы проводят с помощью одного микроорганизма – пекарских дрожжей, а при биоконверсии соломы дрожжи необходимо сочетать с другими микроорганизмами, поскольку дрожжи не обладают цитолитической активностью. В качестве микроорганизмов, гидролизую-

щих солому, можно использовать грибы пенициллы, а в продукты гидролиза соломы вносить культуру дрожжей.

Выбор микроорганизма – продуцента белка облегчается, если есть возможности для предобработки сырья, которая частично заменяет действие гидролитических ферментов микроорганизмов.

При выборе микроорганизмов принимают во внимание ограничения, связанные с имеющимся арсеналом технологического оборудования. Аппаратурное оформление процесса культивирования должно обеспечивать соблюдение оптимальных технологических параметров.

Выбранный штамм микроорганизмов, помимо способности синтезировать целевой продукт на определенном виде сырья, должен обладать рядом признаков: генетической стабильностью (то есть способностью сохранять биосинтетический потенциал длительное время в условиях промышленного производства); высокой скоростью роста; устойчивостью к инфекции; способностью к выживанию в достаточно широком диапазоне параметров внешней среды (рН, температуры, концентрации кислорода и элементов питания).

Предпочтительно использовать спорообразующие формы микроорганизмов, так как они имеют более высокую генетическую стабильность, чем вегетативные формы, и более удобны для размножения в чистой культуре.

Посевной материал

Качество и количество посевного материала в значительной мере определяют результат культивирования микроорганизмов на субстрате биоконверсии. Посевного материала должно быть достаточно, чтобы обеспечить быстрое развитие микроорганизмов в питательной среде. Это особенно важно при выращивании микроорганизмов на нестерильных средах, когда продолжительная лаг-фаза микроорганизма-продуцента может способствовать развитию инфицирующих форм, содержащихся в среде или поступающих из воздуха.

При выращивании грибов, обладающих способностью к спороношению (конидиеобразованию), в качестве посевного материала используют поверхностные культуры, которые получают выращиванием на твердых средах – отрубях, свекловичном жоме, крупах, ломтях моркови и пр. Культуры должны обильно спорносить, количество спор 0,5–3 млрд/г сухой культуры. Расход посевной культуры грибов на единицу массы среды составляет при глубинном культивировании около 0,005 %, при твердофазном – около 0,01 %. Перед использованием посевного материала его активируют. Культуру заливают сте-

рильным раствором минеральных солей, иногда с добавлением биостимуляторов (экстракта солодовых ростков, кукурузного экстракта, триптического гидролизата казеина, отдельных сахаров, аминокислот), получают суспензию спор, которую переносят в колбу и ставят в термостатируемую качалку на 6–12 ч. Споры набухают и прорастают, что сокращает лаг-фазу роста в основной ферментации.

Спороносящие бактерии выращивают в виде пленок на твердых или жидких питательных средах в течение времени, необходимого для перехода культуры в стадию спороношения (1–3 суток). Расход посевного материала (по массе среды, на которой он выращен) – 0,002–0,03 %. Активация посевного материала не требуется. Пленки на жидких средах используются непосредственно, пленки на твердых средах (отрубях, ломтях картофеля, крупах) заливают стерильной водой, взбалтывают и полученной суспензией засевают производственную питательную среду.

Посевной материал спороносящих культур грибов и бактерий, выращенный на отрубях и крупяных твердых средах, может храниться при комнатной температуре в течение месяца и более без потери биологического потенциала.

Посевной материал неспороносящих форм микроорганизмов расходуется в больших количествах – от 3 до 10 % к объему засеваемой среды. При малых дозах посевного материала вегетативные формы микроорганизмов развиваются очень медленно.

Выращивание вегетативных форм микроорганизмов ведут ступенчато. Классическим примером является получение пекарских дрожжей на мелассе. Дрожжи из пробирки с чистой культурой пересевают несколько раз в последовательно возрастающие объемы питательной среды, сохраняя дозировку посевного материала 10 %. Аналогично поступают при получении культуральной жидкости продуцентов белка, аминокислот, ферментов и пр. При периодическом культивировании микроорганизмов такая технология доставляет много хлопот. Поэтому культивирование вегетативных форм стараются проводить в непрерывном режиме, если позволяют технологические характеристики процесса. Примерами непрерывных процессов, основанных на культивировании вегетативных форм микроорганизмов, являются получение пищевых и кормовых дрожжей, производство этанола, уксусной кислоты, ацетона и бутанола.

Способы культивирования

Выбор способа культивирования определяется физиологическими особенностями микроорганизма и свойствами сырья для биоконверсии. Существуют два основных способа культивирования – твердофазный и глубинный. Твердофазный способ осуществляется в периодическом режиме, глубинный – в периодическом и различных вариантах непрерывного культивирования.

Исторически первой сложилась технология твердофазного культивирования, возникшая в Юго-Восточной Азии в условиях кустарного производства ферментных препаратов. Твердофазное культивирование – это выращивание микроорганизмов на увлажненных, хорошо аэрируемых твердых средах. Основой сред могут служить отруби зерновых культур, крупы, лигноцеллюлозные субстраты, свекловичный жом и пр. Эти компоненты при необходимости дополняют минеральными солями, растворы которых используют для увлажнения субстратов. Влажность питательных сред, в зависимости от вида культивируемого микроорганизма, составляет 55–75 %. Питательные среды стерилизуют, засевают культурами микроорганизмов, перемешивают для равномерного распределения посевного материала, а затем раскладывают в кюветы тонким слоем (3–5 см). Кюветы помещают в растительные камеры с регулируемой температурой и влажностью. Современный вариант твердофазного культивирования – это выращивание микроорганизмов в механизированных растительных камерах вертикального или горизонтального типа при толщине слоя культуры 30–50 см.

По окончании твердофазного процесса получают культуру в виде плотной, подсохшей массы, с содержанием сухих веществ 50–65 %. До 30 % сухих веществ составляют водорастворимые компоненты – ферменты, неактивные белки, пептиды, аминокислоты, олиго- и полисахариды, нуклеиновые соединения, минеральные элементы.

Преимуществами твердофазного культивирования являются возможность использования крупнодисперсных субстратов, хорошие физические свойства среды, обеспечивающие высокий уровень тепло- и массообменных процессов в культуре. Микроорганизмы растут в условиях, близких к естественным, при фиксации на субстрате, который при этом быстро и полно используется. Микроскопические грибы при твердофазном культивировании имеют истинно мицелиальный, а не пеллетный рост, и соответственно высокую скорость синтеза белка. Мицелий не повреждается механически, как это имеет

место в глубинной культуре. Наконец, готовая культура имеет низкую влажность, что облегчает получение товарной формы.

Твердофазное культивирование применяют почти исключительно для выращивания мицелиальных грибов. Одноклеточные микроорганизмы выращивают в тех случаях, когда они имеют тенденцию к образованию нитевидных, мицелиальных форм, то есть обладают диморфизмом. Это относится к р.р. *Candida*, *Endomycopsis*, в глубинной культуре эти организмы ведут себя как одноклеточные, а в поверхностной растут по типу мицелиальных грибов.

Для выращивания бактерий, одноклеточных дрожжей и актиномицетов применяют глубинный способ культивирования. Он успешно используется и для мицелиальных грибов.

Глубинное культивирование проводят на ферментерах, снабженных перемешивающими устройствами, системами аэрации, термо- и рН-регуляции. Питательные среды стерилизуют в ферментерах или установках непрерывной стерилизации. В технологии биоконверсии растительного сырья часто используют нестерильные среды.

Концентрация питательных компонентов в средах не превышает 25 %, обычно составляя 5–10 %. В состав питательных сред входят минеральные соли, стимуляторы роста, источники органических соединений углерода и азота, последние в водорастворимой или мелкодисперсной форме.

Преимуществами глубинного способа выращивания являются: высокий уровень механизации и автоматизации процесса; возможность ведения процесса в условиях стерильности, регулируемого рН и состава среды, а также в непрерывном режиме, при котором значительно повышаются экономические показатели и обеспечивается генетическая стабильность микроорганизмов-продуцентов.

Непрерывное культивирование используется в тех процессах биоконверсии, где образование целевого продукта связано с накоплением биомассы и достигает максимума в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы. Это имеет место, например, в процессах микробиологического синтеза белка.

Переход к непрерывному процессу осуществляют следующим образом. В экспоненциальной фазе роста культуры включают проток свежей среды со скоростью, равной удельной скорости роста микроорганизмов, что обеспечивает сохранение уровня концентрации биомассы в ферментере. Поступление свежей питательной среды снимает ингибирование роста микроорганизмов продуктами обмена. Как

правило, при непрерывном культивировании удельная скорость роста и биосинтеза целевых продуктов выше, чем при периодическом. Снижается расход компонентов питательной среды, поскольку для протока используются более бедные среды, чем для периодического культивирования. Повышается коэффициент использования оборудования, уменьшается расход энергии и количество сточных вод. В длительных непрерывных процессах за счет автоселекции стабилизируется генотип микроорганизмов, что приводит к повышению продуктивности.

Упрощенный вариант непрерывного процесса – это отъемно-доливной способ культивирования. Он имеет более низкие технологические характеристики, поскольку периодический отъем и долив среды вызывает физиологический шок культуры и временное снижение скорости роста после долива.

Наиболее примитивный вариант непрерывного способа – доливной, когда к небольшому объему культуральной жидкости постепенно добавляют свежие порции среды до заполнения резервного объема ферментера. Доливной способ позволяет лишь частично корректировать состав среды, что дает незначительные преимущества перед периодическим способом культивирования.

Режимы культивирования

Выбор оптимального режима культивирования включает определение следующих параметров: состава среды, рН среды, температуры, уровня аэрации среды, влажности среды и подаваемого воздуха (для твердофазного процесса), вида пеногасителя (для глубинного процесса), продолжительности культивирования.

При получении обогащенных или обезвреженных кормов основой среды является обогащаемый или обезвреживаемый корм, к которому добавляются минеральные элементы, в небольших количествах и тех видов, которые допустимы в составе корма (соли аммония, сульфат магния, сульфат или хлорид калия, фосфаты, сульфат или хлорид кальция, микроэлементы). При твердофазном культивировании, где в ходе роста рН среды не регулируется, солевой состав подбирают так, чтобы обеспечить наименьшие отклонения рН среды от оптимальной величины.

Кислотность среды должна соответствовать оптимуму для роста микроорганизмов. Обычно рН устанавливают в интервале 5–7. В условиях глубинного культивирования рН регулируют подачей

водного аммиака или растворов слабых кислот (ортофосфорной, уксусной).

В период активного роста микроорганизмов температуру среды поддерживают на оптимальном для роста уровне. Оптимальная температура роста для мезофильных бактерий составляет 30–37 °С, дрожжей и грибов – 26–30 °С. Термофильные формы микроорганизмов имеют оптимальную температуру роста до 65 °С, в зависимости от температуры естественной среды обитания.

В начальной стадии культивирования спорообразующих форм микроорганизмов устанавливают температуру несколько выше оптимальной для вегетативного роста, с целью активировать прорастание спор. Так культивирование спороносных бактерий с оптимумом роста 37 °С начинают при температуре 43–45 °С.

Заключительные стадии процессов биоконверсии, связанных с образованием вторичных метаболитов (ферментов, органических кислот и пр.) или детоксикацией растительных материалов, проводят при температуре, оптимальной для биоконверсии, которая обычно несколько ниже оптимальной для роста.

При твердофазном культивировании температуру среды поддерживают подачей воздуха с соответствующей температурой или воды в рубашку установки. При глубинном культивировании терморегуляцию осуществляют подачей горячей или холодной воды в рубашку ферментера.

Аэрацию жидких питательных сред увеличивают по мере ускорения роста и накопления биомассы микроорганизмов. Для бактерий уровень аэрации составляет 0,5–1, для грибов – 1–2 об/об-мин. Аэрация усиливается за счет барботажа и перемешивания жидкости. Диспергирование продуваемого воздуха необходимо, поскольку микроорганизмы поглощают только растворенный кислород.

При твердофазном культивировании воздух расходуется не только на аэрацию, но и на теплообмен, поэтому воздух находится в сфере роста всегда в достаточном количестве. Доступ к культуре обеспечен хорошими физическими свойствами среды. Расход воздуха в зависимости от возраста культуры и типа растительной установки колеблется в пределах 3–30 м³/ч-кг абсолютно сухих веществ культуры.

Влажность подаваемого воздуха 98–100 %, что необходимо для предотвращения высыхания твердофазной культуры.

Пеногашение – важный элемент технологии глубинного культивирования. Вспенивание среды вызывается наличием таких компонентов, как крахмал, декстрины, белки, пептиды, глюкозиды, пектиновые вещества. Вспенивание приводит к потере культуральной жидкости в результате уноса с газообразной фазой. Для предотвращения вспенивания применяют природные и синтетические пеногасители, чаще вторые (адеканолю, пропинолу и др.). Наиболее сильное вспенивание происходит в фазе активного роста, что связано с выделением белков из клеток активно размножающейся культуры, а также с высоким уровнем аэрации среды в этот период. Для пеногашения используют разбавленные стерильные растворы пеногасителей, которые вносят в культуральную жидкость небольшими порциями. Передозировка пеногасителя может привести к прекращению роста культуры или его частичному торможению. Современные ферментеры оснащены системами автоматической подачи пеногасителя, а также механическими устройствами для пеногашения.

При культивировании анаэробных микроорганизмов (клубридий, некоторых видов молочнокислых бактерий и др.) среды не аэрируют, но производят постоянное или периодическое перемешивание для активизации массообмена. Анаэробы выращивают только глубинным способом.

Продолжительность культивирования микроорганизмов определяется кинетикой роста, накопления целевых продуктов, потребления компонентов среды.

В периодическом процессе кривая роста имеет типичный вид (рис. 4). В лаг-фазе *I* происходит адаптация микроорганизмов к новой среде, биомасса не увеличивается. Длительность лаг-фазы зависит от наличия в среде легкоусвояемых питательных веществ, количества и качества посевного материала. Основной прирост биомассы происходит в логарифмической, или экспоненциальной фазе *II*, когда рост не лимитирован накоплением в среде продуктов обмена и идет пропорционально количеству клеток в культуре. Далее следует фаза замедления роста *III*, когда рост тормозится накоплением микробных метаболитов и исчерпанием питательных элементов в среде. В стационарной фазе *IV* устанавливается равновесие процессов роста и автолитического отмирания клеток. И, наконец, в фазе отмирания куль-

туры V деструктивные процессы становятся преобладающими, величина биомассы снижается, в пределе – до полного исчезновения.

При получении кормовых продуктов целесообразно вести процесс до начала стационарной фазы, то есть до момента накопления максимальной биомассы и белка. Дальнейшее культивирование приводит к ненужному расходу питательных веществ среды и снижению количества белка в корме. Поэтому важно уметь определить, прямо или косвенно, динамику накопления биомассы.



Рис. 4. Кривая роста микробной популяции

При выращивании микроорганизмов глубинным способом на питательных средах, не содержащих взвешенных частиц, прирост биомассы определяют турбидиметрически, по величине оптической плотности культуральной жидкости при соответствующем разбавлении, с учетом оптической плотности незасеянной питательной среды. В практике чаще используют питательные среды с диспергированными частицами различной величины, часть которых сохраняется в культуральной жидкости до конца процесса культивирования, так что определение биомассы турбидиметрическим способом неприменимо. Очевидно, что оптические методы неприложимы и к твердофазному процессу. Поэтому широко используются косвенные методы, основанные на определении динамики сопряженных с ростом показателей, таких как выделение тепла и поглощение кислорода. Активно растущие культуры интенсивно выделяют тепло и поглощают

кислород, снижение и последующая стабилизация этих показателей соответствуют переходу в фазу замедления роста и стационарную фазу. У большинства микроорганизмов при выращивании на средах, содержащих легкоусвояемые соединения углерода и азота, максимум накопления биомассы и белка достигается не позднее суток. На средах с трудногидролизуемыми субстратами процесс идет 3–10 суток.

Необходимая продолжительность ферментации может быть определена по динамике накопления целевых продуктов или утилизации компонентов среды (в частности, токсинов – в процессах детоксикации). При этом используются соответствующие аналитические методы, предпочтительно в экспресс-модификациях.

6.4. Получение белковых продуктов из биомассы микроорганизмов

Микробиологическую биоконверсию растительного сырья проводят с целью получения кормов, обогащенных белком и ферментами, белковых пищевых продуктов, а также для детоксикации пищевых продуктов и кормов.

Основным критерием ценности белковых продуктов биоконверсии является содержание истинного белка и сырого протеина. Второй показатель всегда превышает первый, так как рассчитывается на основании содержания всех форм азота (сырой протеин = N-6,25). Соотношение истинного белка и сырого протеина в продуктах различно, так как определяется долей небелковых соединений в сумме азотсодержащих, которая зависит от многих факторов.

Существует шкала оценки качества пищевых и кормовых белковых продуктов на основании содержания белка. Белковый изопат – это продукт с содержанием сырого протеина не менее 85 %, истинного белка – не менее 75 %. Белковый концентрат должен содержать сырого протеина не менее 65 %, белковый продукт – не менее 30 %.

Содержание сырого протеина в продуктах биоконверсии обычно не превышает уровня белкового продукта. Некоторые образцы биомассы дрожжей, выращенных на мелассе, углеводородных субстратах, приближаются к уровню белкового концентрата. Пищевые белковые продукты (изоляты, смеси аминокислот и низкомолекулярных белковых продуктов), содержащие белковые вещества в высоких концентрациях, получают из биомассы микроорганизмов с примене-

нием ферментативной обработки и химического разделения ферменто-лизатов.

В качестве продуцентов микробного белка используют культуры дрожжей (р.р. *Candida*, *Endomycopsis*), несовершенных грибов (*Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*) и базидиомицетов (*Agaricus*, *Coprinus*, *Lentinus*, *Panus*, *Pholiota*, *Pleurotus*, *Russula*). Выбор продуцента определяется общим содержанием белка в биомассе, аминокислотным составом и усвояемостью белка, содержанием нежелательных компонентов (нуклеиновых кислот, некоторых разновидностей жирных кислот, неусвояемых форм полисахаридов с аллергенными свойствами).

Применение необработанной биомассы дрожжей для пищевых целей ограничено высоким содержанием нуклеиновых кислот (6–12 %). В биомассе некоторых видов дрожжей находят α -линоленовую кислоту в количестве 11–28 % от суммы жирных кислот. В организме животных α -линоленовая кислота конкурентно ингибирует метаболизм γ -линоленовой кислоты – предшественника арахидоновой кислоты, участвующей в регуляции ряда физиологических функций.

В мицелии несовершенных грибов уровень содержания сырого протеина достигает 55–57 %, истинного белка – 41–43 %, при содержании нуклеиновых кислот 5–6 %. В мицелии базидиомицетов 42,5–48,5 % сырого протеина, 24,3–30 % истинного белка и 2–4 % нуклеиновых кислот. Плодовые тела базидиальных грибов беднее белком, чем мицелий, они содержат сырого протеина 23–28 %, истинного белка 15–19,3 %. Это объясняется повышенным количеством углеводных компонентов, выполняющих архитектурные функции в плодовых телах грибов. В плодовых телах базидиомицетов содержится до 40 % углеводов, в мицелии 25–30 %. В наиболее богатом белком мицелии несовершенных грибов содержание углеводов не превышает 20 %. Следует оговориться, что эти цифры получены в условиях культивирования грибов как продуцентов белка. В природных условиях доля углеводного компонента в мицелии выше, в особенности в почвах с бедным минеральным составом.

Содержание липидов в биомассе грибов – продуцентов белка составляет не более 6 %.

В грибном белке содержится 38–45 % незаменимых аминокислот, что близко к их уровню в белке дрожжей (38–49 %), говядины (45 %), и выше, чем в пшеничном белке (30–32 %). Грибной белок дефицитен по серосодержащим аминокислотам, лейцину и валину, а доля лизина (6–8 %) превышает норму идеального белка. Смесь из 59 % мицелиального и 41 % пшеничного белка имеет скор 92 % по серосодержащим аминокислотам и лизину.

Грибной белок хорошо усваивается. Степень усвояемости белка *Fusarium culmorum* составляет 84 %, а биологическая ценность по отношению к казеину – 50–70 %.

Грибной белок имеет хорошие структурные свойства, что важно при использовании его в пищевых продуктах, кулинарных изделиях. Белковые концентраты из биомассы несовершенных грибов имеют высокую жиродерживающую способность – около 400 %, и могут давать при соединении с жирами однородные продукты. Водоудерживающая способность белковых концентратов в отсутствие солей составляет около 100 %, она возрастает до 200–223 % при увеличении ионной силы до 0,3–1 (ионная сила 0,3 соответствует 0,3 М раствору поваренной соли, или концентрации ее раствора 1,75 %).

Биомасса грибов привлекает внимание не только как источник белка. Липидная фракция грибов богата полиненасыщенными жирными кислотами. По структуре грибные триглицериды сходны с растительными, так как имеют в позиции 2 ненасыщенную жирную кислоту. Наиболее благоприятный жирнокислотный состав у представителей класса фикомицетов, которые синтезируют полиненасыщенные жирные кислоты по γ -линоленовому типу. Среди ненасыщенных жирных кислот существенную долю, до 70 %, составляют незаменимые жирные кислоты – линолевая, линоленовая и арахидоновая. Незаменимые жирные кислоты участвуют в синтезе простагландинов – регуляторов эндокринной, репродуктивной, нервной системы. Важно отметить, что по содержанию γ -линоленовой кислоты грибные липиды существенно превосходят растительные масла. Наиболее ценная арахидоновая кислота у некоторых фикомицетов составляет более 20 % суммы жирных кислот, тогда как в растительных маслах она отсутствует.

При использовании методов биоконверсии для детоксикации кормов и пищевых продуктов основным критерием качества является содержание токсического компонента, которое не должно превышать

санитарно допустимой нормы. Одновременно с детоксикацией кормов в ряде случаев проводят их обогащение белком, контролируя в продукте биоконверсии содержание сырого протеина.

Глубинная ферментация

При получении протеинизированных кормов с помощью глубокой ферментации продуцентов белка в качестве сырья используют различные виды плодовоовощных отходов (ПОО), отходы свеклосахарного производства, некондиционное фуражное зерно, отруби, послеспиртовую барду, чайные и древесные отходы и др. Сырье ферментируют как в необработанном виде, так и после различных видов предобработки.

Концентрация растительного сырья в питательных средах составляет в большинстве случаев не более 10 %. Продолжительность культивирования продуцентов зависит от состава среды и физиологических особенностей микроорганизмов и лежит в пределах 6–72 ч.

В качестве продуцентов белка используют дрожжи р.р. *Candida*, *Saccharomyces*, дрожжеподобный гриб *Endomycopsis*, а также микроскопические грибы р.р. *Chaetomium*, *Penicillium*, *Trichoderma* и др., базидиальные грибы р.р. *Panus*, *Pleurotus* и др. При выращивании их на различных видах отходов получают кормовые продукты с содержанием сырого протеина до 52,5 %, истинного белка – до 42 % (табл. 9). Наиболее высокие результаты получены при выращивании *Candida*, *Endomycopsis* и *Penicillium* на отрубях, плодовых и овощных отходах. Достаточно хорошо используются для синтеза белка отходы чайного производства, кислотный гидролизат верхового торфа. Трудно ферментируется солома, для получения корма с содержанием сырого протеина 15–20 % необходимо обрабатывать ее щелочью, кислотой или подвергать радиолизу. Лишь гриб вешенка (*Pleurotus ostreatus*) способен за 3 суток конвертировать необработанную солому в продукт с 18 % истинного белка.

При оценке результатов биоконверсии необходимо учитывать не только содержание белка в конечном продукте, но и степень повышения этого показателя по сравнению с исходным сырьем. При конвер-

сии томатных выжимок содержание истинного белка увеличивается с 8,9 до 24–29 %, то есть примерно в 3 раза, а при конверсии соломы – с 2,6 до 9,5–20 %, или в 3,5–8 раз.

Таблица 9

*Биоконверсия растительного сырья в белковые корма
путем глубинного культивирования микроорганизмов*

Вид сырья	Микроорга- низмы	Продол- житель- ность культиви- рования, ч	Содержание белка в кор- мовом продукте, %	
			сырой про- теин	истинный белок
1	2	3	4	5
Меласса	<i>Pen. decumbens</i>	42	50,0	32,8
Фуражное зерно, гидролизованное кислотой	<i>C. tropicalis</i>	8	–	40–50
Отруби пшенич- ные, гидролизо- ванные фермен- тами после гид- робаротермичес- кой обработки	Ассоциация дрожжей <i>p.p. Candida,</i> <i>Hansenula</i>	28–40	46,0	41,0
Отруби ржаные, гидроли- зованные фер- ментами	То же	7,5	–	15,7
Мезга ржаная, гидролизованная ферментами	То же	8,5	–	18,2
Свекловичный жом	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	45–48	–	35–37
Нестандартные клубни карто- феля + кукуруз- ный экстракт, 5:1	<i>Partus tigrinus</i>	66	46,8	36,7
Нестандартные клубни картофеля	<i>Pen. notatum</i>	28	50,0	40,0
	<i>Pen. digitatum</i>	28	52,5	42,0
Картофельная мезга и клеточный сок	<i>Pen. notatum.</i> <i>Pen. digitatum</i>	54	45,0	36,0
Картофельный сок + фуражная мука	<i>End fibuliger</i> <i>C. units</i>	12–16		30–35
Картофельные отходы	<i>C. tropicalis,</i> <i>C. guilliermondii</i>	8–10	–	20–25

Продолжение табл. 9

1	2	3	4	5
Послеспиртовая барда	<i>C. tropicalis</i>	10	–	35
То же + свекловичный жом	То же	10	–	25
Яблочные выжимки	<i>C. tropicalis</i>	8	26,3	15,7
Виноградные выжимки	То же	8	34,1	20,1
Томатные выжимки	<i>C. krusei</i>	8	36,4	24,2
Комплексные ПОО	<i>End fibuliger</i>	8	25,2	17,6
Осветленный сок ПОО	<i>C. humicola</i>	6	52,6	40,1
Гранатовые отходы	<i>C. tropicalis, C guilliermondii</i>	36–48	22,5	
Отходы производства чайных концентратов	Термофильные микроскопические грибы	72	–	32–35
Чайные отходы, обработанные ЭХО-водой	<i>C. humicola</i>	–	41,9	28,1
Кислотный гидролизат чайного жома	<i>Candida sp.</i>	6	19,5	13,7
Экстрагированные зеленые части виноградной лозы	<i>End fibuliger</i>	16	37,4	32,3
Щелочеобработанная солома	<i>Tr. viride</i>	60	–	19,8
Солома:				
необработанная	<i>Pen. verruculosum</i>	–		9,5
щелочеобработанная	То же	42	–	14,5
радиолизованная	То же	30	–	20,0
Солома, гидролизованная кислотой	<i>C. tropicalis</i>	8	10–15	–

Окончание табл. 9

1	2	3	4	5
Опилки осиновые:				
необработанные	Chaetomium	60	8,4	4,2
делигнифицированные	megalocarpum	55	23,7	14,5
Кислотный гидролизат древесины	Lipomyces lipoferus	12	–	20–25
Ферментативный гидролизат верхового торфа	C. scottii	–	–	8–10
Кислотный гидролизат верхового торфа	Asp. niger	–	48–55	–

Таким образом, процесс обогащения соломы белком происходит вполне успешно, но трудно поднять очень низкое исходное содержание белка до уровня белкового продукта или белкового концентрата.

Процесс биоконверсии органических субстратов характеризуют коэффициентом конверсии, то есть количеством сухой биомассы, образовавшейся из единицы сухой массы сырья. Определение коэффициента корректно лишь для сред, не содержащих взвешенных частиц, и потому неприменимо к большинству примеров, приведенных в табл. 9. Если же прибегнуть к упрощенной оценке по конверсии субстрата в конечный продукт (содержащий не только биомассу, но и элементы питательной среды), то величины коэффициента конверсии достаточно высоки. Коэффициент конверсии плодовоовощных отходов составляет 0,64–0,75, мезги и клеточного сока картофеля – 0,9, делигнифицированных опилок – 0,81. Эти величины свидетельствуют о том, что в процессе культивирования потери органического вещества на энергетический метаболизм незначительны, основная часть потребляемого субстрата превращается в биомассу.

Абсолютная концентрация биомассы в глубинной культуре зависит от концентрации среды и условий культивирования. В большинстве случаев в результате биоконверсии получают культуральную жидкость с содержанием биомассы 2–3 %, на средах с плодовоовощными отходами – до 5,4 %.

Культуральную жидкость используют на корм непосредственно, а также после распылительной сушки или гранулирования с добавлением сухих компонентов кормосмесей. Глубинную ферментацию

применяют для получения пищевых белковых продуктов на основе биомассы грибов и дрожжей. Классическим примером является получение пекарских дрожжей на мелассе. По содержанию белка пекарские дрожжи приближаются к белковым концентратам, а после соответствующей обработки из них получают белковые изоляты, обладающие высокой биологической активностью.

Большой интерес представляет культивирование съедобных базидиальных грибов в жидких средах. В природе эти грибы дают плодовые тела, где много структурных полимеров полисахаридной природы и мало белка. В глубинной культуре образуется только мицелий, в котором содержание белка может быть очень высоким. При выращивании базидиального гриба *Panus tigrinus* на среде, содержащей отходы переработки картофеля и молочную сыворотку, получили биомассу, в которой было сырого протеина 46,8 %, истинного белка – 36,7 %, липидов – 6 %. По содержанию нуклеиновых кислот (0,7 %) биомасса гриба находится на уровне мяса и растительной пищи. Биомасса базидиальных грибов имеет высокие вкусовые качества и применяется как добавка к различным кулинарным блюдам.

Твердофазная ферментация

С помощью твердофазной ферментации получают корма из плотных субстратов. В качестве продуцентов используют грибы родов *Fusarium*, *Nimicola*, *Trichoderma*, дрожжи *Candida*, дрожжеподобный гриб *Endomycopsis* и др.

Твердофазная ферментация, как правило, более продолжительна, чем глубинная. Степень протеинизации кормов ниже, чем при глубинной ферментации. Так, при культивировании *E. Jibuliger* на плодовоовощных отходах в глубинной культуре получают продукт с содержанием истинного белка 13,9–17,6 %, а на твердофазной – 10,3 %. Содержание белка в кормах, полученных на разных видах сырья, не превышает 20 %. Вместе с тем, твердофазный процесс имеет свои привлекательные стороны. Твердофазные культуры имеют довольно высокую ферментативную активность – целлюлазную, гемицеллюлазную, пектиназную, которая сохраняется в кормовом продукте. Для продуктов твердофазной ферментации часто используют термин «белково-ферментный препарат», подчеркивая их биологическую активность. Добавление белково-ферментных препаратов к различным видам грубых кормов способствует повышению переваримости последних. Это особенно важно в кормлении жвачных животных и птиц. Другим преимуществом твердофазного культивирования яв-

ляется простота его реализации в любом хозяйстве при минимальных затратах. И, наконец, твердофазное культивирование практически не дает стоков, подлежащих очистке.

В последние годы разработаны процессы культивирования смешанного типа, когда продуценты белка выращивают попеременно в жидкой и твердой фазе. Примером служит получение кормового продукта из щелочеобработанной соломы путем культивирования гриба *Tg. viride* и дрожжей *H. anomala*. Сконструирован биореактор комбинированного типа, где гриб выращивают в твердофазной культуре, а дрожжи – в глубинной, периодически циркулирующей через твердую фазу. При этом культуральная жидкость обогащается продуктами ферментативного гидролиза полисахаридов соломы, образующимися под действием ферментов гриба. Твердофазно-глубинная ферментация позволила повысить производительность биоконверсии соломы в белок по сравнению с глубинной ферментацией – в 1,7 раза, с твердофазной – в 1,6 раза. Содержание белка повышено с 3,6 % в щелочеобработанной соломе до 12,5 % в кормовом продукте.

Твердофазное культивирование традиционно используется для выращивания высших базидиальных съедобных грибов (макромицетов). К числу грибов, освоенных в культуре, относятся шампиньон двуспоровый (*Agaricus bisporus*), вешенка устричная (*Pleurotus ostreatus*), опенок летний (*Kuehneromyces mutabilis*), опенок зимний (*Flammulina*), гриб сиитаке, или пилолистник (*Lentinus edodes*), строфария кольцевая. Высшие базидиомицеты в глубинной культуре растут как микроскопические грибы, а в твердофазной дают плодовые тела. Отличительной чертой высших базидиальных грибов является высокая способность к деструкции целлюлозы и лигнина, что позволяет их выращивать на таких субстратах, как солома злаков (пшеницы, ржи, ячменя, овса), стержнях кукурузных початков, лузге и жмыхе подсолнечника, шелухе гречихи, мякине, камыше, опилках, стружках и блоках древесины. В южных районах используют виноградные выжимки, на которых хорошо развиваются вешенка и гриб сиитаке.

Плодовые тела базидиомицетов имеют не только высокие вкусовые и пищевые достоинства, но и содержат биологически активные вещества лечебно-профилактического значения. Полисахариды клеточных стенок грибов, извлекаемые с помощью горячей воды, имеют противовоспалительное и онкостатическое действие, хитин – мощный сорбент радионуклидов и других поливалентных металлов, полиненасыщенные жирные кислоты липидов грибов – антисклероти-

ческий и иммуностимулирующий фактор. В связи с этими качествами грибы используют как сырье для получения фармакологических препаратов, в частности, технология культивирования *Lentinus edodes* разрабатывается именно в этих целях.

6.5. Обезвреживание продуктов

Методы биоконверсии применяются для снижения токсичности пищевых и кормовых продуктов. Токсичность может быть вызвана присутствием токсигенных микроорганизмов или продуктов их жизнедеятельности, пестицидов, а также природных растительных токсинов, содержащихся в сырье.

Для обезвреживания продуктов используют способность микроорганизмов конкурентно подавлять развитие инородных форм, сорбировать и деградировать токсические соединения. В качестве микроорганизмов-летоксикантов часто используют дрожжи. Различные виды сахаромицетов (пекарские, пивные, винные дрожжи-киллеры) полностью обезвреживают среды, содержащие токсины *Clostridium* и *Naftia alvei*. Эффективны как живые, так и автолизированные и мертвые дрожжевые клетки, что свидетельствует о сорбционном характере связывания токсинов.

Среды с комбикормами, зараженными токсигенными бактериями (*Aeromonas* sp., *Sedacea* sp., *Enterobacter cloacae*), практически полностью обезвреживаются при ферментации различных видов дрожжей в течение 48 ч. Лишь культуры *Ps. aeruginosa* не теряют токсигенности при совместном культивировании с дрожжами. Детоксикация зараженных сред сопровождается снижением антиоксидантной активности липидов токсигенных микроорганизмов. Роль окислителей играют поверхностные структуры дрожжей. Детоксикация кормов проходит более успешно в глубинной культуре, что объясняется повышенной интенсивностью массообмена по сравнению с твердофазным процессом.

Дрожжи способны связывать токсины различной природы. Клеточные стенки дрожжей активно сорбируют пестициды фосфор- и хлорорганической природы (фосфамид, фозалон, кельтан). Препарат дрожжевых оболочек шампанской расы *S. vini* 10 С, внесенный в виноградный сок в количестве 0,5 г/л, связывал 100 % фосфамида,

97–98 % фозалона, 98 % кельгана. Для обработки виноградного сусла из винограда машинного сбора рекомендуется доза дрожжевого сорбента 0,1–0,3 г/л.

Дрожжи – продуценты каротиноидных пигментов обладают способностью деградировать афлатоксины. Активный деструктор афлатоксинов *Rhodotorula mucilaginosa* при выращивании на модельной среде разрушал афлатоксины В₁, В₂, G₁ и G₂ соответственно на 98,6; 68,6; 76,8 и 16,2 %. Наиболее опасные токсины В₁, и G₁ превращались в значительно менее токсичные производные В₂ и G₂.

Для снижения содержания природного растительного токсина госсипола в хлопковом шроте, получаемом после извлечения масла из семян, шрот ферментируют культурами микромицетов – мукоров и пенициллов (табл. 10).

При этом достигается снижение концентрации свободного госсипола до 65 раз, связанного – до 88 раз. Микробная детоксикация позволяет использовать на корм скоту шрот после прямой экстракции масла, содержащий изначально свободный госсипол в концентрации выше допустимой (0,02 %).

Таблица 10

Микробиологическая детоксикация хлопкового шрота

Способ выделения масла из семян	Вариант обработки шрота	Содержание госсипола, %	
		свободного	связанного
Форпрессование - экстракция	Без обработки	0,017–0,021	0,35–0,47
	Ферментация 48 ч:		
	<i>Mucor hiemalis</i>	0,003–0,005	0,06–0,08
	<i>Pen. roquefortii</i>	0,007–0,008	0,08–0,10
Прямая экстракция	Без обработки	0,37–0,59	0,09–0,11
	Ферментация 60 ч:		
	<i>M. hiemalis</i>	0,008–0,009	0,004–0,009
	<i>Pen. roquefortii</i>	0,012–0,017	0,005–0,011

6.6. Получение белковых продуктов из биомассы дрожжей

Для получения белковых препаратов из биомассы дрожжей используют автолиз и ферментативный лизис с помощью дрожжелитических ферментных препаратов и протеаз обычного типа.

Технологический автолиз дрожжей проводят в условиях подавления роста и активации цитоплазматических деполимераз. При блокировании роста автолиз клеточных стенок происходит слабо,

и значительная часть стеночного материала может быть отделена в конце процесса в виде крупных структурных фрагментов. Активация цитоплазматических деполимераз приводит к накоплению продуктов гидролиза белков и нуклеиновых кислот. За счет этого в заключительной фазе автолиза происходит снижение рН реакционной среды. Регистрация рН является простым методом контроля автолиза: стабилизация рН свидетельствует об окончании процесса. Этот метод применим и при проведении лизиса дрожжей с помощью ферментных препаратов. Распространенным методом контроля является также определение содержания свободного аминного азота, нарастающего в процессе протеолиза.

Технологический автолиз пекарских дрожжей проводят при температуре 45–53 °С в присутствии плазмолизирующих агентов: толуола, хлороформа, этанола, поваренной соли и других. В суспензии биомассы создают рН 5,5–6,5. В ходе автолиза чаще всего рН не регулируют: при естественном изменении рН чередуются оптимальные условия для действия различных деполимеризующих ферментов, что повышает эффективность процесса в целом. Содержание сухих веществ в суспензии варьирует в пределах от 1 до 20 %, снижение концентрации биомассы в этих пределах приводит к интенсификации автолиза. Рациональной считают концентрацию около 10 %. Продолжительность автолиза составляет 15–30 ч, а при предварительной механической дезинтеграции замороженной биомассы – 5–6 ч.

Способ комплексной переработки биомассы пекарских дрожжей, разработанный отечественными учеными, предполагает проведение автолиза 20 % суспензии дрожжей в присутствии 1 % толуола, в течение 15–20 ч при 45–50 °С. Последующее фракционирование автолизата включает: отделение клеточных стенок дрожжей центрифугированием, обесцвечивание жидкой фазы автолизата, удаление нуклеиновых соединений и пептидов сорбцией на ионите ИА-Ір в ОН'-форме, сорбцию аминокислот из очищенного раствора предыдущей стадии на катионите КУ-2х8 и их последующую элюацию раствором аммиака. Получаемая смесь аминокислот содержит все незаменимые и заменимые аминокислоты в пропорциях, характерных для высокопитательных белковых продуктов. Содержание свободных аминокислот составляет около 70 % от белка автолизированной биомассы, около 25 % белка гидролизовано до низших пептидов (500–700 Да). По данной схеме из 50 кг дрожжей с влажностью 75 % получают 2–3 кг смеси аминокислот, 0,3–0,5 кг нуклеиновых компонентов

и около 6 кг клеточных стенок, из которых можно дополнительно выделить 35–45 г эргостерина. Аминокислотная смесь используется в препаратах для парентерального и энтерального лечебного питания, а также в качестве добавок (2–3 %) в макаронные и мучные кулинарные изделия, что увеличивает их биологическую ценность на 20–40 %. Аминокислотная смесь рекомендуется как заменитель цветочной пыльцы в период расплода пчел. Неочищенный дрожжевой автолизат, приготовленный с использованием нетоксичных плазмолитиков, может применяться как кормовая добавка в птицеводстве, рыбоводстве и звероводстве.

Перспективным источником белка являются избыточные пивные дрожжи, которые могут быть автолизированы также по описанной схеме.

Лизис дрожжей с использованием ферментных препаратов по сравнению с автолизом представляет более широкие возможности для получения продуктов различного состава. Применение ферментных препаратов специфического действия позволяет быстро удалить клеточную стенку, а из освободившихся протопластов выделить продукты различной степени гидролиза в зависимости от целевого назначения. Для получения недеградированных цитоплазматических компонентов следует использовать биомассу с низкой автолитической активностью.

Ферментативный лизис клеточных стенок дрожжей проводят с помощью различных ферментов и мультиэнзимных композиций. При лизисе суспензии прессованных пивных дрожжей ферментами *Arthrobacter luteus* в жидкую фазу лизата переходит около 80 % клеточных включений, большая часть белков лизата имеет молекулярную массу выше 50 кДа, что свидетельствует о незначительной степени расщепления.

Для разрушения клеточных стенок свежих дрожжей р.р. *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* рекомендуют комплекс внеклеточных ферментов гриба *Tr. viride*, обладающий β -1,3-глюканазной активностью, в сочетании с протеазой растительного происхождения (папаином, бромелаином, фицином).

Способы получения продуктов глубокого расщепления основываются на сочетании автолиза дрожжей а их лизиса препаратами литического или протеолитического действия. Для активации протеолиза дрожжей используют растительные, животные и микробные протеазы. Протеазы могут быть неспецифичными по отношению

к дрожжевому белку, но в сочетании с автолитическими протеазами дрожжей дают хороший эффект. Так, например, Проназа Е, папаин, пепсин, Протосубтилин Г10х нейтральный в соотношении с изолированным белком пекарских дрожжей 1:1000 гидролизуют его не более чем на 4 %, в добавление этих препаратов в том же соотношении к белку автолизирующихся дрожжей через 5 ч после начала автолиза позволяет спустя еще час получить глубину гидролиза белка 95 %. В контроле этот уровень достигается лишь после 20 ч автолиза.

С применением препарата Лизосубтилина Г10х разработан способ получения белково-витаминного обогатителя пищи из гидролизных дрожжей р. *Candida*. Процесс включает следующие операции: кормовые дрожжи с влажностью 75–90 % нагревают до температуры 46–50 °С, вносят Лизосубтилин в количестве 0,2–0,5 % к сухому веществу дрожжей, проводят гидролиз в течение 20–30 ч при постоянной температуре и перемешивании. Затем непрогидролизованные остатки клеток отделяют сепарацией, а жидкую фазу высушивают. Сухой продукт представляет собой порошок соломенно-желтого цвета с приятным пищевым запахом. Содержание аминного азота составляет 4,3 %, около половины определяемых аминокислот принадлежат свободным аминокислотам, среди которых преобладают аланин, лизин, лейцин (соответственно 16,0; 15,7 и 12,4 %).

Лизосубтилин может использоваться для получения белковых продуктов из дрожжей спиртового производства. Эти дрожжи обладают заметной автолитической активностью, причем оптимальные условия автолиза и лизиса Лизосубтилином совпадают, что позволяет вести процесс при постоянных значениях рН и температуры (рН 6,3–6,8, температура 50–55 °С). При дозе препарата 0,1 % к сухим веществам биомассы дрожжей выход растворимых форм азота и углеводов возрастает в 2–2,5 раза (по сравнению с автолизом), через 6 ч в жидкую фазу ферментолизата переходит около половины азотистых соединений и треть углеводов. Выход аминного азота составляет около 3 % к сухой массе дрожжей.

Разработан способ получения искусственного корма для молоди рыб, включающий ферментативный гидролиз кормосмеси Лизосубтилином Г10х и бактериальной рибонуклеазой Г3х. В состав кормосмеси входят кормовые дрожжи в количестве 20–25 %, сухое молоко, соевый шрот, рыбная, пшеничная и мясокостная мука. Кормосмесь соединяют с водой в соотношении 1:2,5, устанавливают рН 6,3–6,8 и гидролизуют в течение часа при 45–50 °С Лизосубтилином, в дозе

1,2–1,4 % к массе корма. Затем устанавливают рН 7–7,5 и вносят рибонуклеазу в количестве 0,2–0,3 % к сухой массе корма, после чего продолжают гидролиз в течение 2,5–3 ч при той же температуре. По окончании гидролиза в смесь вводят антиоксидант и связующее средство, затем корм высушивают. Обработка ферментами повышает переваримость корма и исключает образование в корме продуктов, приостанавливающих рост и развитие рыб. В описанных условиях нуклеиновые кислоты кормосмеси гидролизуются на 68 %. Применение корма обеспечивает выживаемость молоди рыб до 78 %.

Дрожжевые ферментативные гидролизаты входят в рецептуру заменителей цельного молока для молодняка сельскохозяйственных животных. Гидролизаты дрожжей составляют 60–65 % сухой массы ЗЦМ, помимо этого ЗЦМ содержат гидролизат сложных углеводов или глюкозу, жиры, микроэлементы, витамины. Для приготовления ферментализатов дрожжей рекомендуются препараты Протосубтилин ГЗх и Пектофоедин П10х. Композиция этих препаратов обладает активностью нейтральной и кислой протеазы, а также β -1,3-глюканазы, что позволяет осуществлять глубокий гидролиз кормовых дрожжей. ЗЦМ применяется в рационе телят, ягнят и поросят.

7. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ

7.1. Спиртные напитки и пивоварение

Спиртные напитки и пивоварение. Производство спиртных напитков из крахмалсодержащего сырья практикуется почти во всех странах мира. Основными видами сырья являются картофель и рожь в Европе, картофель и пшеница в России, кукуруза и рожь в США, рис и бататы на Востоке, тапиока в тропических странах.

Крахмал, как основной компонент сухих веществ сырья, из которого и образуется спирт, непосредственно дрожжами не сбраживается. Поэтому его необходимо гидролизовать до сбраживаемых сахаров, для чего требуется применение ферментов.

Применяемый издавна зерновой солод, как источник амилолитических ферментов, обеспечивает достаточно глубокое осахаривание и выбраживание только за трое суток. Необходимо отметить, что зерновой солод не только выполняет задачу гидролиза крахмала до

сбраживаемых сахаров, но и является источником легкоусвояемого азотистого питания для дрожжей, т. к. в процессе солодоращения, под действием протеиназ, к нем накапливается значительное количество аминокислот (до 32 % от общего азота). Активность протеиназ в процессе солодоращения возрастает примерно в 40 раз. Зерновой солод обладает и цитолитической активностью, обеспечивая определенную степень гидролиза клеточных стенок растительного сырья и тем самым улучшая контакт крахмала с амилолитическими ферментами.

Таким образом, применяемый в спиртовом производстве зерновой солод выполняет три основные функции: осуществляет гидролиз крахмала до сбраживаемых сахаров; является источником азотистого питания для дрожжей и при осахаривании крахмалистого сырья производит частичное разрушение клеточных стенок сырья.

Однако скорость осахаривания крахмала при использовании солода остается достаточно низкой, что затрудняет интенсификацию процесса брожения. Применение ферментных препаратов микробного происхождения дает возможность значительно повысить концентрацию необходимых ферментов в среде и обеспечить глубокий гидролиз крахмала за сравнительно короткий период.

Кроме стадии осахаривания ферментные препараты, обладающие сильной разжижающей активностью (α -амилаза), применяются на стадии водно-тепловой обработки сырья с целью смягчить режим разваривания, снизить вязкость замесов и облегчить их дальнейшую транспортировку.

Применяя ферментные препараты на стадии приготовления сусла для дрожжегенерации, необходимо обеспечить интенсивный гидролиз белков с целью обогащения ценным азотистым питанием дрожжевого сусла.

Таким образом, для спиртового производства, перерабатывающего крахмалсодержащее сырье, необходимо применение ферментных препаратов с амилолитическим, протеолитическим и цитологическим действием.

Ферментные препараты с относительно низкой оптимальной температурой действия целесообразно использовать на стадии осахаривания. Это относится к препаратам с основной активностью α -амилазы (Амилосубтилину, Амилоризину, солоду) и препаратам глюкоамилазы. Амилолитический комплекс солода и грибная α -амилаза более глубоко расщепляют крахмал, чем бактериальная α -амилаза, но полное осахаривание достигается только с помощью глюкоамилазы.

Применение микробной глюкоамилазы позволяет увеличить степень сбраживания на 1,3–1,5 % по сравнению с вариантом осахаривания солодом.

В качестве препаратов глюкоамилазы обычно применяют Глюкоаваморин Гх или амилоглюкоаваморин Гх (культуральную жидкость гриба *Asp. awamori*, получаемую в ферментных цехах спиртзаводов). Оптимум действия Глюкоаваморина (рН 4–5,5) соответствует активной кислотности бражки (рН 4,2–5,2).

Пивоварение. При производстве пива по обычной технологической схеме необходимые ферментные системы для подготовки зернового сырья и перевода экстрактивных веществ в растворимое состояние на стадии затирания образуются в процессе солодоращения.

Основными ферментами, образующимися в процессе солодоращения и имеющими наиболее существенное значение в технологии пивоварения, являются: амилолитические ферменты, разжижающие и осахаривающие крахмал; протеолитические ферменты, расщепляющие белок ячменя до пептидов различной молекулярной массы и свободных аминокислот; цитолитические ферменты, гидролизующие некрахмальные полисахариды, растворяющие клеточные стенки эндосперма зерна, благодаря чему облегчается доступ амилаз и протеаз к соответствующим субстратам.

Каждый из перечисленных процессов должен пройти с определенной глубиной, чтобы обеспечить нормальное протекание фильтрации затора, брожение сусла, осветление и фильтрацию пива, а также создание определенных физико-химических свойств (пенообразование, прозрачность, стойкость при хранении) и вкусовых качеств готового продукта.

Применение ферментативных препаратов микробного происхождения (амилоризин П10Х, амилосубтилин Г10Х, Г20Х, протосубтилин Г10Х, цитороземин ПХ) с целью замены солода несоложенным ячменем позволяет интенсифицировать процесс, избежать потерь ценных компонентов сырья на дыхание и образование проростка, в целом повысить рентабельность пивоваренного производства. Кроме отечественных препаратов, в настоящее время широко используются ферментные препараты различных зарубежных фирм. Предназначенные для замены ферментов солода ферментные препараты микробного происхождения должны по характеру своего действия соответствовать ферментам солода и значительно превосходить их по активности.

Ферменты, используемые для борьбы с холодной мутью.

К образованию холодной мути в бутылочном пиве приводит рост микроорганизмов; такое биологическое помутнение предотвращается пастеризацией пива или стерильной фильтрацией при заполнении бутылок в асептических условиях. Небиологическое помутнение пива может происходить при его продолжительном хранении; этот процесс ускоряется при действии света, тепла, кислорода, в присутствии следов железа или меди, а также при одновременном воздействии этих факторов. Состав мути зависит от преобладающего действия того или иного из этих факторов. Основными составляющими холодной мути являются: белки – 40–76 %; танин – 17–55 %; углеводы – 3–13 %.

Холодная муть состоит из очень тонкого осадка, который образуется при выдержке пива при температурах ниже 10 °С. Для борьбы с холодной мутью могут быть использованы растительные ферменты – папаин, фицин, бромелаин, а также грибные (продуцируемая микроскопическими грибами рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Amylomyces*) и бактериальные (продуцируемая *B. subtilis*) протеазы. Но наиболее широко для этой цели применяется лишь папаин или комплексные препараты, включающие папаин и другие протеазы, что объясняется высокой термостабильностью препаратов папаина, сохраняющего свою активность после пастеризации.

7.2. Производство крахмала и крахмалопродуктов

Современная крахмало-паточная промышленность, используя в основном традиционные источники сырья – картофель и кукурузу – вырабатывает большой ассортимент продукции, включающей десятки наименований, которые используются в различных отраслях промышленности. В первую очередь это отрасли пищевой промышленности (кондитерская, хлебопекарная, молочная, консервная, пище-концентратная и т. д.), а также другие отрасли (медицинская, текстильная, полиграфическая и др.).

Основными продуктами крахмало-паточного производства являются:

- сухой крахмал;
- модифицированные крахмалы: расщепленные крахмалы (окисленные и набухающие); замещенные крахмалы (фосфатные, ацетилированные, сополимеры крахмала);

- декстрины;
- различные виды крахмальных патонок: карамельная (38–44 % РВ), карамельная низкосахаренная (30–34 % РВ), глюкозная высокосахаренная (44–60 % РВ), мальтозная (не менее 60 % РВ);
- глюкоза (техническая, пищевая, кристаллическая);
- глюкозофруктозные сиропы.

Применение амилаз. Ферментные препараты амилаз нашли широкое применение в технологиях получения различных патонок и глюкозы.

Первой технологической операцией производства крахмальных гидролизатов является гидролиз крахмала. Его проводят кислотным, кислотнo-ферментативным или ферментативным способом. Во всех случаях процесс гидролиза включает стадии клейстеризации крахмала, разжижения крахмального клейстера и его осахаривания.

Кислотно-ферментативным методом производят разжижение крахмала сначала кислотой, для этого суспензию крахмала подкисляют соляной кислотой до рН 1,8–2,5, нагревают до 140 °С в течение 5 мин. Затем нейтрализуют раствором кальцинированной соды до рН 6,0–6,5 и охлаждают до 85 °С, после чего добавляют ферментный препарат α -амилазы и ведут гидролиз в течение 30 мин.

С целью разжижения на этой стадии используют ферментный препарат амилосубтилин Г10Х. Этот препарат выпускается в виде порошка; содержит в основном α -амлазу и β -глюконазу. Оптимальные условия действия препарата: рН 6,2–6,8, температура – 85–87 °С.

Осахаривание полученного гидролизата также проводят с использованием ферментов. Для этой цели наиболее широко применяют порошкообразный препарат глюкоавомарин Г20х.

Препарат содержит в основном глюкоамилазу. Оптимальные условия действия препарата глюкоавомарина Г20Х: оптимум рН 4,0–5,5; оптимум температуры 56–58 °С.

Ферментативный способ заключается в том, что 30–35%-ю крахмальную суспензию прогревают до 55 °С, доводят рН до 6,3–6,5, добавляют раствор ферментного препарата амилосубтилина Г10х и раствор кальцинированной соды в качестве стабилизатора. Процесс разжижения длится в течение 1 часа при температуре 85–90 °С при непрерывном перемешивании. Далее стадия декстринизации и осахаривания проводится с использованием препаратов амилосубтилина Г10Х, амилоризина Г10Х и П10Х. Этот процесс идет 2–3 часа при температуре от 53 до 85 °С и рН 4,7–5,5.

Дальнейшее осахаривание ведут при 60 °С и оптимальном рН, а продолжительность осахаривания зависит от желаемого результата (требуемой степени осахаривания). Инактивацию фермента и остановку процесса гидролиза производят нагреванием продукта до 80 °С в течение 20 мин.

Ферментный препарат амилоризин П10Х и ферментный препарат амилоризин Г10Х имеют оптимальные условия действия: рН 4,8–5,3 и температуру 53–55 °С.

Применение глюкоизомеразы. Фермент глюкоизомераза катализирует реакцию изомеризации глюкозы во фруктозу. В промышленности преимущественно используются препараты глюкоизомеразы, продуцируемые микроорганизмами, которые относятся к роду *Streptomyces*, а также к родам *Aerobacter* и *Lactobacillus*.

На реакции ферментативной изомеризации основана технология получения глюкозофруктозных сиропов из крахмала. Для получения глюкозофруктозных сиропов используют гидролизаты кукурузного крахмала, полученные с помощью ферментативного гидролиза. Процесс изомеризации под действием иммобилизованного (закрепленного на носителе) ферментного препарата глюкоизомеразы длится в течение 20–24 часов (до содержания в гидролизате 42 % фруктозы и 52 % глюкозы). В ходе процесса необходимо контролировать и поддерживать оптимальные условия для работы фермента: температура 60 °С, рН 7,0–8,5. Кроме того для повышения активности фермента и его стабильности в субстрат добавляют ионы магния и кобальта (в виде растворимых солей), а также бисульфит для предупреждения развития микрофлоры.

Полученные с помощью ферментативной изомеризации глюкозофруктозные сиропы обладают более высокой степенью сладости, по своим свойствам они близки к инвертному сахару, благодаря чему широко применяются при производстве детского и диетического питания, хлебобулочных изделий, безалкогольных напитков, кондитерских изделий, мороженого и т.д.

7.3. Хлебопечение

Качество хлеба определяется особенностями химического состава муки и активностью ее ферментного комплекса. Значительное влияние оказывают также условия брожения и выпечки. Получить

хлеб хорошего качества можно только в том случае, когда в процессе тестоведения гармонически сочетаются скорости микробиологических процессов и биохимических превращений. Ферментативный гидролиз высокомолекулярных компонентов сырья – белков и углеводов – в определенной степени способствует интенсификации этих превращений и, в конечном счете, положительно сказывается на качестве хлеба.

Эффективность использования тех или иных ферментных препаратов в хлебопечении в значительной степени зависит от качества муки. Хлебопекарные свойства муки, в особенности качество клейковины и активность собственных ферментов, определяют требования к ферментным препаратам. Основным препаратом, широко внедренным в хлебопекарную промышленность, является амилоризин П10х. Препарат получают из поверхностной культуры *A. oryzae* осаждением этанолом. Он обладает амилолитической и протеолитической активностью.

Получить хлеб с надлежащей пористостью, объемом и окраской корки можно только в том случае, если на всех стадиях технологического процесса достаточно сахаров, обеспечивающих интенсивность газообразования. Несмотря на присутствие в муке собственных сахаров, хлеб, полученный за счет сбраживания только собственных сахаров муки, не будет отвечать требованиям стандарта. При газообразовании только за счет собственных сахаров муки максимум выделения диоксида углерода приходится на первые 1–2 часа брожения. Между тем в процессе хлебопечения газообразование в тесте должно оставаться достаточно высоким и на последней стадии (расстойка и первые 10–15 минут выпечки). При наличии в муке активной β -амилазы газообразование в процессе брожения теста идет по возрастающей и максимум приходится на 4 часа брожения. В противном случае для получения дополнительного количества сбраживаемых сахаров и интенсификации процесса брожения необходимо применение амилолитических ферментных препаратов.

Однако значение сахаров, безусловно, не ограничивается только процессом брожения. Огромную роль сахара играют в образовании красящих и ароматических веществ хлеба, участвуя в реакции меланоидинообразования.

Исключительно важны для хлебопечения и те изменения, которые претерпевает при тестоведении и расстойке белковый комплекс муки. Именно белковый комплекс и его ферментативные изменения

определяют собой физические свойства теста. От белкового комплекса зависит как поведение теста при его замесе и расстойке (в частности, формоудержание), так и качество готового хлеба, его объем, пористость, структура мякиша.

Говоря о протеолитических ферментах, воздействующих на белковый комплекс муки, необходимо еще раз отметить эндогенные протеазы зерна пшеницы, среди которых наибольшее значение имеют нейтральные протеиназы, превосходящие по своей активности кислые протеазы в несколько раз и способные в условиях теста эффективно расщеплять белки клейковины.

7.4. Производство плодово-ягодных соков, безалкогольных напитков и вин

Применение ферментных препаратов при производстве плодово-ягодных соков, вин и безалкогольных напитков осуществляется с целью повышения выхода сока, осветления и стабилизации соков, безалкогольных напитков и вин, предотвращения окислительных процессов в соках и в изготавливаемых из них продуктах, а также для инверсии сахарозы при производстве безалкогольных напитков и сиропов.

В соответствии со спецификой плодово-ягодного сырья и целями применения ферментные препараты можно разделить на шесть групп:

1) препараты, предназначенные для получения неосветленных соков, увеличивающие выход и повышающие экстрактивность;

2) препараты, предназначенные для получения осветленных соков, увеличивающие выход, повышающие экстрактивность и обеспечивающие полный гидролиз пектиновых и белковых веществ;

3) препараты, мацерирующие плодово-ягодную ткань, повышающие выход и гомогенность соков с мякотью;

4) препараты, предназначенные для получения осветленных плодово-ягодных виноматериалов, увеличивающие выход и повышающие экстрактивность виноматериалов;

5) препараты, способствующие предотвращению окислительных процессов и развитию аэробных микроорганизмов в соках, винах, безалкогольных напитках;

6) препараты, катализирующие инверсию сахарных сиропов при производстве безалкогольных напитков и товарных сиропов.

Применение пектолитических ферментов. Основной биохимический процесс, протекающий в плодово-ягодной мякоти и соке при их обработке пектолитическими препаратами или при совместном применении термической и ферментативной обработки, – гидролиз пектиновых веществ. Но наряду с этим происходят превращения белков, целлюлозы, гемицеллюлозы и других компонентов сырья.

Поэтому ферментные препараты, используемые для получения полностью осветленного сока из большинства плодов и ягод, должны содержать не только пектолитические ферменты, но и ферменты, гидролизующие другие коллоидные соединения, которые обуславливают опалесценцию соков и нестабильность изготавливаемых из них вин и безалкогольных напитков.

В настоящее время в мире производится достаточно широкий спектр пектолитических ферментных препаратов. Среди промышленных продуцентов пектолитических ферментов следует отметить *A. niger*, *A. wentii*, *A. oryzae*, *A. foetidus*, *P. Expansum*, *P. Italicum*, *Rhizopus spp.*

Применение протеолитических ферментов. Некоторые плодово-ягодные соки и вина трудно осветляются и часто мутнеют при хранении из-за наличия в них белковых соединений. Для многих видов сырья огромную роль в процессе осветления соков играют протеиназы, в связи с чем наличие кислых протеиназ наряду с ферментами пектолитического комплекса обязательно.

Применение мацерирующих ферментов. При производстве плодово-ягодных соков с мякотью размельчение плодовой ткани осуществляется механическим путем. Соки с мякотью часто содержат недостаточно тонко измельченную мякоть, неомогенную и расслаивающуюся при хранении. С позиции устранения указанных выше недостатков и получения гомогенных соков с мякотью, не подвергающихся расслаиванию, целесообразным является применение мацерирующих ферментных препаратов, расщепляющих протопектин, но не снижающие вязкость сока.

Пектолитические ферментные препараты, применяемые для увеличения выхода и осветления соков, непригодны для производства соков с мякотью, т.к. основным ферментом в них является эндополигалактуроназа, резко снижающая вязкость сока. Гемицеллюлаза и целлюлаза способствуют получению однородной консистенции соков с мякотью.

Применение глюкозооксидазы и каталазы. Ферментный препарат глюкозооксидаза (в котором в качестве обязательного компонента присутствует каталаза) применяют с целью улучшения качества и стабилизации плодово-ягодных соков, вин, и безалкогольных напитков за счет удаления кислорода в результате реакции окисления глюкозы. Таким образом, этот препарат способствует предотвращению окислительных процессов и микробиологической порчи под действием аэробных микроорганизмов.

Ферментные препараты, применяемые в плодово-ягодном виноделии, должны сохранять активность в условиях определенного содержания алкоголя (до 10–12 %) и эффективно действовать при значениях рН, обусловленных химическим составом виноматериалов.

Применение инвертазы. Препараты, катализирующие гидролиз сахарозы при изготовлении сахарных сиропов, используемых при производстве сахарных сиропов, безалкогольных напитков, должны содержать фермент инвертазу (β -фруктофуранозидазу), не должны иметь специфического запаха, темного цвета, окислительных или других ферментов, способных изменять цвет, аромат и вкус продукта.

Необходимо, чтобы препараты катализировали процесс инверсии сахарозы в довольно широком диапазоне рН (для чистого сахарного сиропа рН 6,0–6,5; для сахарного сиропа, изготовленного на фруктовых соках рН 2,5–4,5). Кроме того, необходимо учитывать специфику биохимического состава сырья и особенности технологического процесса производства соков и виноматериалов.

При производстве продуктов, относящихся к первой группе, – слабоокрашенных – следует применять ферментные препараты, не содержащие окислительных ферментов, вызывающих потемнение продукта, а в ряде случаев – снижение органолептических свойств и пищевой ценности, таких как полифенолоксидаза, пероксидаза, каталаза, аскорбатоксидаза. При переработке сырья второй группы – окрашенных в красный цвет – недопустимо применение препаратов, содержащих ферменты, разрушающие антоцианы.

7.5. Кондитерское производство

Применение протеаз и амилаз. Комплексные ферментные препараты, содержащие активные протеазы и α -амилазу (например, амилоризин П10Х), применяют при производстве мучных кондитерских

изделий с целью ускорения процесса брожения и корректировки физических свойств клейковины муки, изменения реологических свойств теста, ускорения его «созревания».

При производстве мучных кондитерских изделий с использованием дрожжей, таких как галеты, крекеры, кексы, целесообразно применение комплексных препаратов с преобладанием протеолитического действия, но содержащих в своем составе и α -амилазу. Совокупное действие этих ферментов обеспечивают дрожжи сбраживаемыми сахарами и низкомолекулярными азотистыми веществами. Часть неиспользованных при брожении сахаров и азотистых веществ вступает в реакцию меланоидинообразования, благодаря чему галеты и крекеры приобретают интенсивную окраску и приятный аромат.

При производстве затяжного печенья с использованием химических разрыхлителей, когда много усилий направляется на расслабление клейковины, на протяжении длительного технологического процесса наряду с механическим воздействием на белки клейковины целесообразно использование протеолитических ферментных препаратов; α -амилаза, присутствующая в качестве сопутствующего фермента как в грибных, так и бактериальных препаратах, не мешает их использованию.

Для заварных и сырцовых пряников наибольшее значение имеет протеолиз, но наряду с потребностью в регулируемом расслаблении теста важным является и сохранение свежести (мягкости) продукта. Очевидно, что при производстве таких видов изделий целесообразно применение комплексных ферментных препаратов с преобладанием протеолитической активности.

При производстве бисквитного полуфабриката нужны комплексные ферментные препараты с умеренной активностью протеолитических ферментов и невысокой α -амилазной (декстринирующей) способностью. При таком сочетании обеспечивается умеренное расслабление клейковины, способствующее лучшему подъему теста при выпечке и образованию тонкопористой воздушной структуры готовых изделий. Образование декстринов, в свою очередь, способствует сохранению их свежести.

Комплексные ферментные препараты, содержащие протеазы и α -амилазу, используются для ускорения и облегчения обработки теста при приготовлении слоеного полуфабриката с целью улучшения его эластичных свойств и предупреждения усадки при выпечке. Кроме того, применение таких ферментных препаратов при произ-

водстве вафель позволяет оптимально снизить вязкость вафельного теста, способствует получению тонких хрустящих вафельных листов.

Применение инвертазы. Препараты инвертазы, как уже отмечалось, получают из дрожжей *S. cerevisiae* или *S. carlsbergensis* путем автолиза.

Инвертаза применяется в кондитерской промышленности для производства отливных помадных корпусов конфет, круглых помадных корпусов и жидких фруктовых начинок, таких как вишневый ликер. В каждом случае ее применение обусловлено необходимостью получить полумягкую или жидкую консистенцию при высоких концентрациях сахара (78 %), предотвращающих брожение. Ускорение или замедление действия инвертазы достигается путем изменения концентрации вносимого препарата, количества воды и температурного режима. При высокой температуре инвертаза инактивируется, и даже при температуре отливки (65 °С) активность инвертазы снижается на 12 % в течение 30 мин и на 24 % в течение 60 мин. Некоторые сорта конфет, например, конфеты с вишневым ликером, невозможно изготовить без инвертазы.

8. ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ В СОСТАВЕ КОРМОВ

В пищеварительном тракте животных полисахариды, белки и липиды кормов расщепляются до легкоусвояемых соединений под действием пищеварительных ферментов животных, ферментов симбиотических микроорганизмов и простейших, а также фитоферментов, присутствующих в кормах.

Введение ферментных препаратов в корма преследует две основные цели – повышение усвояемости кормов и, соответственно, продуктивности животных, и сохранение продуктивности при включении в корма компонентов трудноусвояемых или содержащих антипитательные вещества. Рациональное использование ферментных препаратов способствует улучшению физиологического состояния животных, сохранности поголовья, облегчает соблюдение санитарно-гигиенических норм содержания животных.

Применение ферментных препаратов приводит к ускоренному накоплению низкомолекулярных продуктов в пищеварительном тракте животных, что способствует развитию микрофлоры, интенсификации процессов микробной ферментации кормов, повышению

уровня энергетического питания животных, их ускоренному росту и развитию. Эффективность применения ферментных препаратов зависит от вида, возраста и физиологического состояния животных, а также от структуры рациона. Наибольший эффект отмечается при введении ферментных препаратов в рационы молодняка с неразвитой ферментной системой, а также животных с нарушением функции ферментов. Ферментные препараты дают ощутимые результаты при обработке кормов с низкой концентрацией и доступностью питательных веществ, в частности, кормов с низким содержанием кукурузы, соевого шрота, кормовых жиров.

Основные группы ферментов, используемых в кормах, это амилолитические, протеолитические и цитолитические (целлюлазы, гемицеллюлазы, пектинрасщепляющие ферменты). Применяются также ферменты литического действия и фитаза.

Амилолитические ферменты используются в рационах с высоким содержанием зерна и картофеля. Протеолитические ферменты способствуют более полному усвоению белковой части рациона и наиболее эффективны в кормлении молодняка животных с низкой активностью ферментов протеолитического комплекса.

Из группы цитолитических традиционно применяются пектинрасщепляющие ферменты, способствующие перевариванию кормов с относительно высоким содержанием пектина – корнеплодов, плодовоовощных отходов, вегетативной массы растений.

Интерес к препаратам целлюлаз и гемицеллюлаз возрос в связи с тенденцией к изменению структуры рационов, замене кукурузы зерном ячменя, ржи, пшеницы, овса, тритикале, и, соответственно, с возрастанием содержания некрахмальных полисахаридов в кормах.

У жвачных животных некрахмальные полисахариды частично расщепляются ферментами микрофлоры рубца и не создают препятствий нормальному протеканию процесса пищеварения.

У свиней и птиц частичное переваривание некрахмальных полисахаридов происходит лишь в толстом отделе кишечника, с помощью ферментов симбиотических организмов. В тонком кишечнике сильно набухающие полисахариды создают вязкую, гелеобразную структуру, в которой затруднен гидролиз основных питательных компонентов и всасывание продуктов гидролиза. Низкая концентрация субстратов и ферментов в обводненной среде снижают скорость ферментативных реакций. Гидролизу питательных компонентов препятствует образование их комплексов с некрахмальными полисахаридами (белков

– с ксиланами и пектином, липидов – с пектином). Липиды медленно расщепляются из-за слабого эмульгирования в вязкой среде, причем твердые животные жиры с высоким содержанием насыщенных жирных кислот эмульгируются труднее жидких растительных масел. Следствием низкой концентрации продуктов гидролиза и вязкости среды является медленное всасывание питательных веществ. Витаминные компоненты (каротиноиды, токоферолы) и минеральные элементы не всасываются, будучи связаны с полисахаридами и нерасщепленным белком.

Замедленное, неправильное пищеварение и высокая обводненность содержимого кишечника способствуют развитию инфицирующей микрофлоры, вызывают поносы.

Гидролиз некрахмальных полисахаридов цитолитическими ферментами приводит к разрушению комплексов полисахаридов с другими питательными компонентами, снижению вязкости и водоудерживающей способности содержимого пищеварительного тракта. Повышается эффективность усвоения кормов, нормализуются физиологические функции животных. Расщепление целлюлозы и гемицеллюлоз, содержащих глюкозу (глюканов, ксилоглюкана), непосредственно повышает питательную ценность кормов.

Помимо собственно пищеварительных ферментов, в кормах используют ферменты литического действия как факторы стабилизации иммунной системы животных.

Ферментные препараты используются преимущественно путем введения в премиксы, которые включают в комбикорма. Важными условиями эффективности ферментов являются их равномерное распределение в корме и стабильность в процессе приготовления и хранения комбикорма. Для равномерного распределения применяют метод ступенчатого смешивания. Стабильность достигается с помощью специальных способов защиты ферментов от инактивации. Фирма «Ново Нордиск» использует покрытие гранул ферментов целлюлозно-жировой оболочкой, что гарантирует сохранение активности в течение 3 месяцев хранения комбикорма.

Наряду с включением в премиксы, ферментные препараты используют и путем непосредственного введения в корма.

В кормлении свиней применяют ферментные препараты с амилолитической, протеолитической и цитолитической активностью. Амилазы и протеазы эффективны в кормлении поросят, поскольку у новорожденных поросят α -амилаза отсутствует, а синтез протеазы дос-

тигает максимума к возрасту 6–8 недель. Потребность в цитолитических ферментах сохраняется на протяжении всей жизни животных.

Препараты Пектофоедин и Амилосубтилин вводят в комбикорма для поросят-сосунов и отъемышей, что способствует более быстрой адаптации животных к кормам и их лучшему перевариванию. Дозировка ферментов для поросят до 60 дней: пектиназы – 2,4, амилазы – 360 ед/кг корма; для поросят в возрасте 61–120 дней – соответственно 1,2 и 180 ед/кг корма.

Для откорма молодняка свиней старше 105–120 дней рекомендуют добавлять в комбикорма следующие ферментные препараты: Пектофоедин ГЗх, Протосубтилин ГЗх, Амилосубтилин ГЗх. Их оптимальные дозы при отдельном использовании составляют соответственно 1,2 ед. пектиназы, 2,1 ед. протеазы и 300 ед. амилазы на 1 кг корма. Введение Амилосубтилина способствует перевариванию крахмала и глюкогена и отложению жира в организме животных. При введении в корма Пектофоедина и Протосубтилина наблюдается более равномерное отложение белка и жира у свиней, что объясняется более глубоким расщеплением и усвоением различных компонентов кормов.

При скармливании сбалансированных комбикормов с ферментными препаратами среднесуточный прирост массы у поросят раннего отъема увеличивается до 440–450 г, или на 6–10 %. Затраты кормов на единицу привеса снижаются на 7–9 %. Более высокий эффект получают при обработке ферментами запаренных кормов, охлажденных до 40–45 °С.

При откорме свиней используют МЭК ЛП, который получают смешиванием Лизоцима ГЗх и Протосубтилина ГЗх. Препарат имеет лизоцимную активность 150, протеолитическую – 3,5 ед/г. МЭК ЛП вводят в жидкие кормосмеси в дозе 0,3 %, для свиней 4,5–7,5-месячного возраста. Лизоцим повышает общую резистентность организма, а Протосубтилин способствует более полному усвоению белкового компонента кормосмесей. Средний прирост живой массы свиней повышается на 13,2 %, а затраты корма на 1 кг привеса сокращаются на 12,5 %.

МЭК ГПЛ используют в рационах поросят-отъемышей, в возрасте 45–105 дней. Наибольший эффект получают на фоне кормов, изготовленных из ячменя, ржи, овса и пшеницы. Доза препарата – 3 г/кг корма. Ферментный комплекс МЭК ГПЛ гидролизует крахмал,

глюкан, белки, что способствует преодолению стрессового состояния поросят раннего отъема. Присутствие лизоцимной активности повышает иммунитет молодых животных.

На отечественном рынке появились различные препараты, предназначенные для введения в рационы с повышенным содержанием ячменя, ржи, овса, низкосортной пшеницы. Это мультиэнзимные композиции, включающие целлюлолитические ферменты, β -1,3-1,4-глюканазу, ксиланазу, амилазу и протеазу. Состав МЭК варьируется в зависимости от структуры рациона свиней. Из числа препаратов можно назвать отечественный МЭК СХ-2, зарубежные препараты серий Порзим, Хостазим, Ровабио.

Применение МЭК СХ-2 в количестве 0,1 % к массе корма позволяет использовать в его составе 40–67 % ячменя (в зависимости от возраста животных), получая привесы выше контрольных, в частности, у поросят 60–105 дней – на 16,8–22,7 %.

Добавление Порзима в рацион с 67 % ячменя повышает привес свиней на 11,2 % при снижении расхода корма с 3,04 до 2,72 кг/кг. Уровень привесов превышает полученный на фоне 67 % пшеницы без Порзима.

В кормлении молодняка крупного рогатого скота и овец применяют преимущественно пектинрасщепляющие, целлюлолитические и амилолитические ферментные препараты. Лучшие результаты получены при скармливании их в составе гранул с разным уровнем соломы и зерна и в рационах, состоящих в основном из жома, барды и растительной массы ячменя.

Для молодняка КРС с живой массой 120 кг и более при скармливании сеноконцентратного корма, концентратов с травой, кормов на основе жома и барды вводят Пектофоетидин ГЗх в дозе по пектолитической активности 1,2–1,8 ед/кг сухого вещества корма. При массе животных 350–400 кг ферментная добавка обеспечивает прирост на 8–11 кг и снижение затрат кормов на 1 кг прироста на 6–8 %.

Разработаны рецептуры стартерных комбикормов для телят, включающие кукурузу (15 %), ячмень шелушенный (43,6 %), рожь (10 %), соевый шрот (23,7 %) и витаминно-минеральные добавки. Введение в эти корма отечественных МЭК, в составе которых Амилосубтилин сочетается с Целловиридином или Пектофоетидином,

способствовало увеличению среднесуточного прироста массы на 7–11,6 %, затраты комбикорма на 1 кг привеса снизились на 4,4–8,4 %. Корма обеспечивают плавный переход кормления телят с молочного питания на растительные корма.

В рацион ягнят до 4-месячного возраста рекомендуют вводить Пектофоедин в сочетании с Амилоусубтилином в дозе соответственно 1,8 ед. пектиназы и 300 ед. амилазы на 1 кг сухого вещества корма. Для ягнят старше 4 месяцев дают лишь Пектофоедин в дозе 1,2 ед. пектиназы/кг корма.

В птицеводстве в последние годы применяют корма без кукурузы или с низкой ее долей, вводя взамен ячмень, овес, пшеницу, рожь, просо, зерновые отходы.

В зерне пшеницы, ржи, тритикале из гемицеллюлоз преобладает арабиноксилан, в ячмене и овсе – арабиноксилан и β -глюкан. Общее содержание так называемой кормовой клетчатки (арабиноксилана, β -глюкана, маннана и пектина) составляет в пшенице 11,75 %, в том числе арабиноксилана – 5,57 %, в ячмене кормовой клетчатки 13,16 %, в том числе 4,56 % арабиноксилана и 3,53 % β -глюкана.

Мультиэнзимные композиции для эффективного гидролиза зерновых рационов птицы включают ферменты, расщепляющие некрахмальные полисахариды, а также амилолитические и протеолитические ферменты. В некоторые МЭК вводят препарат Лизоцим ГЗх как средство профилактики инфекционных заболеваний и стимулятор роста.

Применение цитолитических ферментов не только повышает общую усвояемость корма, но и позволяет решить проблему жидкого помета, поскольку при снижении набухаемости корма птицы потребляют меньше воды.

При отсутствии кукурузы и соевого шрота рекомендуют использовать в составе кормов ячмень (40–50 %), пшеницу или тритикале (30–40 %) рожь (15–20 %), подсолнечный шрот и горох (15–25 %), обогащая такие корма МЭК ЦГАП или ЦГАП-Л в количестве 0,05–0,1 % к массе корма. Ферментные добавки позволяют увеличить прирост массы цыплят-бройлеров на 9–10 %, продуктивность кур-несушек на 5–6 %, снизить расход корма на единицу продукции на 4–7 %. Ферментативная активность в пищеварительном тракте бройлеров повышается на 10–18 %, что выражается в более полном усвоении белков и жиров (на 4–7 %).

Ферментный премикс МЭК ГПЛ эффективен на фоне кормов с высоким содержанием ячменя (45–50 %), а также при наличии в рационе ржи (до 20 %). Препарат используют в течение всего периода выращивания птицы в дозе 0,1 % к массе корма. Гидролитический комплекс МЭК ГПЛ расщепляет основные биополимеры корма, повышая его конверсию на 5–7 %. Прирост живой массы цыплят увеличивается на 6–9 %, продуктивность кур-несушек – на 4–7 %.

При использовании ржи в рационах кур эффективны препарат Целловиридин П10х и МЭК СХ-1, включающий Амилосубтилин Г3х и Целловиридин Г20х. В МЭК СХ-1 активность α -амилазы составляет 1000 ед/г, целлюлазы – 200 ед/г. При дозировке Целловиридина Г20х 60 г/т корма возможно введение 7–20 % ржи в кормосмесь для кур-несушек. При этом яйценоскость на 1,6–3,8 % выше, чем в варианте корма с 7 % ржи и без ферментного препарата. Добавка Целловиридина повысила усвоение каротиноидов в корме на 37 %, что можно объяснить переходом каротиноидов в свободное, легкоусвояемое состояние при расщеплении ассоциированных с ними некрахмальных полисахаридов. Положительные результаты получены при кормлении бройлеров рационами с 5–15 % ржи при добавлении Целловиридина в дозе 60–70 г/т корма.

При введении в корма кур-несушек МЭК СХ-1 можно увеличивать долю ржи в корме до 25 %, получая повышенную яйценоскость (на 10 %) при снижении затрат корма на единицу продукции (на 13,4 %).

Отмечен положительный эффект Целловиридина Г20х при скармливании курам-несушкам свежезаготовленного зерна с повышенным содержанием арабиноксилана. Рекомендуемая доза препарата – 100 г/т корма.

На отечественном рынке представлены препараты зарубежных фирм, предназначенные для рационов с ячменем, рожью, овсом, пшеницей, тритикале. Препараты включают те же группы ферментов, что и отечественные композиции. Предлагаются препараты серий Био-Фид, Хостазим, Авизим, Кемзайм, Энерджекс.

Особая проблема в кормлении кур – это повышение усвояемости фосфора зерновых рационов. Значительная часть фосфора зерновых представлена в виде фитина, который трудно гидролизуется в организме птицы. Недостаток фосфора приводит к хрупкости костной ткани и скорлупы яиц. Снижается уровень обменных процессов и продуктивность птицы. Для освобождения фосфора из фитина при-

меняют фермент фитазу, который дает хороший эффект даже на кукурузно-соевых рационах. Разработана мультиэнзимная композиция Вильзим F, которая имеет активность α -амилазы и β -глюканазы не менее 100 ед/г, протеазы – 2 ед/г, целлюлазы – 10 межд. ед/г, фитазы – не менее 500 ед/г. Применение препарата в рационах кур в количестве 0,05–0,1 % к массе корма повышает сохранность поголовья с 92 до 96 %, яйценоскость с 72,3 до 77,8 %, массы яиц с 61,9 до 62,8 г. Снижается затрата корма на единицу продукции и величина упругой деформации яиц. У цыплят повышается уровень использования фосфора на 10 %.

9. ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В СОСТАВЕ КОРМОВ

Ферментные препараты, применяемые в составе кормов, оказывают прямое и опосредованное лечебное или профилактическое воздействие на организм животных.

Прямой лечебный эффект дают препараты бактериолитических ферментов, литических протеаз широкого спектра действия, а также протеаз обычного типа. В пищеварительном тракте животных эти ферменты в сочетании с собственными ферментами животных (лизозимом слюны и слизистых оболочек, ацетилглюкозаминидазой, трипсином, химотрипсином, другими пептидазами) создают противомикробный барьер, что особенно важно для молодняка животных, а также при использовании инфицированных кормов. Ферментная защита ярко проявляется при диспепсии животных. Применение Лизозима ГЗх в дозе 2–4 г на 1 л молока 3 раза в день дает 100 %-й положительный эффект при лечении диспепсии новорожденных телят. Лизосубтилин Г10х, в дозе 0,025 г/кг живой массы 3 раза в день с молоком или молозивом позволяет за 1–2 дня вылечить 98,3 % молодняка животных от диспепсии. Для профилактики диспепсии, с эффективностью 94–100 %, препарат дают в дозе 0,02 г/кг живой массы 2 раза в день в течение первых 8–10 дней жизни животных. Аналогично применяют Фермосорб (иммобилизованную форму Лизосубтилина) и Полиферм (кислотоустойчивую форму нейтральной бактериальной протеазы). Последний в дозе 1–3 ед. протеазы/кг жи-

вой массы животных 3 раза в день с молоком или водой обеспечивает выздоровление от диспепсии 93,5–100 % животных за 2–3 суток.

Профилактическое действие препаратов литических ферментов, выражающееся в нормализации микрофлоры пищеварительного тракта, сопровождается повышением скорости роста молодых животных. Поэтому такие препараты, как Лизоцим ГЗх, Лизосубтилин ГЗх, Гликозидаза ГЗх, животноводы используют в качестве стимуляторов роста. Так при введении Лизоцима ГЗх в дозе 0,55 г/кормовую единицу в течение 6 месяцев кормления получили увеличение привеса телят на 19,5–23,0 %. Применение Гликозидазы ГЗх в дозе 0,16 % к массе корма дало увеличение живой массы 8-недельных бройлеров на 2,6–3,8 %.

Помимо прямого литического действия бактериолитические ферменты влияют опосредованно, катализируя образование продуктов расщепления бактериального пептидогликана с образованием фрагментов иммуностимулирующего характера. Низкомолекулярные фрагменты пептидогликана – сигнальные вещества, индуцирующие синтез факторов иммунитета в организме животных. Этот природный механизм слабо реализуется при пониженной лизоцимной активности животных, что характерно для молодняка раннего отъема. Введение бактериолитических ферментов в корма компенсирует лизоцимную недостаточность, тем самым оказывая благоприятное воздействие на иммунную систему. Принимая во внимание роль протеаз обычного типа в лизисе микроорганизмов, следует в широком смысле отнести и эти ферменты к числу иммуностимулирующих.

Прямой лечебно-профилактический эффект протеолитических ферментов, не связанный с их участием в лизисе микроорганизмов, проявляется в тех случаях, когда несварение белка вызывает заболевания животных. При низкой активности молокосвертывающего фермента (протеазы, катализирующей частичный гидролиз казеина и свертывание молока) в желудках телят образуется плотный молочный сгусток, постепенно заполняющий весь объем желудка и вызывающий гибель животных. Применение протеолитических ферментов предотвращает образование сгустка, а при его наличии – позволяет спасти животных. Для гидролитического расщепления молочного сгустка применимы различные протеазы общего типа, активные в слабокислой, нейтральной или слабощелочной среде. Большинство протеаз общего типа способны расщеплять казеин.

Ферменты, гидролизующие полисахариды (карбогидразы), оказывают общее благоприятное физиологическое воздействие, обусловленное активизацией пищеварения и снижением обводненности содержимого пищеварительного тракта. Нормальная обводненность содержимого и его быстрая эвакуация предотвращают развитие инфицирующих форм микроорганизмов, что может расцениваться как лечебно-профилактическое действие карбогидразных ферментов.

II. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

ПРАВИЛА РАБОТЫ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Приступая к выполнению лабораторного практикума, студент должен быть подготовленным к лабораторному занятию. Подготовка проводится до занятий по учебникам, лекционным записям и методическим пособиям. В специальную тетрадь заносится краткое описание опыта, уравнения реакций. Наблюдения и выводы записываются при непосредственном выполнении опытов.

Во время проведения опытов на рабочем месте не должно быть ничего лишнего, необходимо поддерживать на нем чистоту и порядок. По окончании работы студент должен убрать рабочее место, вымыть лабораторную посуду.

Нельзя уносить приборы, реактивы, цилиндры, пипетки и другие предметы общего пользования на свое рабочее место.

После выполнения цикла лабораторных работ студенты сдают теоретический коллоквиум.

Староста группы на время занятий назначает дежурного по группе. Дежурный отвечает в течение всего занятия за порядок и чистоту рабочих мест, за оборудование общего пользования. По окончании работы дежурный сдает лабораторию учебному лаборанту. Рабочее место, не приведенное в порядок, убирает сам дежурный.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Каждый работающий должен знать, где находятся в лаборатории средства противопожарной защиты и аптечка, содержащая все необходимое для оказания первой помощи.

Никакие вещества в лаборатории нельзя пробовать на вкус. нюхать вещества можно лишь осторожно, направляя на себя пары или газы легким движением руки, а не наклоняясь к сосуду и не вдыхая полной грудью.

Приступать к выполнению каждой работы следует только с разрешения преподавателя и после полного выяснения всех ее операций.

Нельзя производить какие-либо опыты в загрязненной посуде. Посуду следует мыть сейчас же после окончания опыта.

Не разрешается работать в лаборатории без халата.

Нельзя оставлять действующий прибор без присмотра.

Концентрированные кислоты и щелочи нужно наливать в сосуд осторожно, под тягой, чтобы не облить рук, не получить брызг на лицо и платье. При наливании концентрированных растворов кислот и щелочей обязательно пользоваться воронкой. Надо твердо помнить правило смешивания концентрированной серной кислоты с водой: не воду лить в кислоту, а наоборот – кислоту в воду небольшими порциями.

В случае воспламенения легкоиспаряющихся жидкостей нужно, прежде всего, потушить горелки, выключить электроприборы, унести все находящиеся поблизости горючие вещества, а затем гасить пламя, засыпая его песком, закрывая мокрым полотенцем или одеялом. Большое пламя гасят с помощью углекислотных огнетушителей. Не следует заливать пламя водой, во многих случаях это приводит к большему распространению пламени и расширению очага пожара.

В случае воспламенения одежды не следует бежать, надо набросить на пострадавшего халат, брезент, шерстяное или войлочное одеяло. Можно тушить одежду на себе обливанием водой или быстрым перекачиванием на полу.

При легких термических ожогах кожу следует обработать спиртом, а затем смазать глицерином или вазелином. При более сильных ожогах, после обработки спиртом или концентрированным раствором перманганата калия, обожженное место необходимо смазать мазью от ожога.

При ожогах крепкими кислотами необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством воды, а затем 3%-м раствором гидрокарбоната натрия и опять водой.

При ожогах едкими щелочами обильно промыть пораженное место проточной водой, затем разбавленным раствором уксусной кислоты, а после опять большим количеством воды.

При попадании кислоты или щелочи в глаза следует сразу же их промыть. Для этого направляют небольшую струю воды то в один, то в другой глаз в течение 3–5 минут. Затем глаза необходимо промыть 3%-м раствором борной кислоты. После этого нужно немедленно обратиться к врачу.

При порезах стеклом необходимо удалить осколки стекла из раны, залить пораженное место спиртовым раствором йода и наложить стерильную повязку. При сильных кровотечениях следует наложить выше раны жгут и вызвать врача или отправить пострадавшего в медпункт.

Лабораторная работа № 1

Способы получения ферментов

Цель: освоить методы выделения ферментов из сырья.

Ферментами или биологическими катализаторами называются специфические белки, входящие в состав всех клеток и тканей организмов, ускоряющие течение отдельных химических реакций и обладающие специфичностью действия.

Ферменты обладают рядом особенностей, отличающих их от неорганических катализаторов.

В настоящее время около 140 ферментов получено в кристаллическом состоянии. Источниками выделения ферментов являются различные животные и растительные ткани, а также дрожжи и микроорганизмы. Из одних только плесневых грибов получено около 80 различных ферментных препаратов: амилалитических, протеолитических и пектолитических, нашедших широкое применение в народном хозяйстве. Существует несколько методов получения ферментных препаратов. Основной – извлечение фермента водой на холоду из тканей, высушенных каким-либо обезвоживающим веществом, ацетоном или солевыми растворами. Хорошо измельченные и высушенные препараты тканей долгое время могут служить источником получения ферментов. Для получения более чистых препаратов сухой порошок ткани экстрагируют водой (или глицерином), отделяют жидкость центрифугированием. Ферменты водного экстракта либо осаждают ацетоном, осадок отделяют и высушивают, либо водный экстракт подвергают лиофильной сушке. Полученный порошок гигроскопичен, его нужно хранить в запаянных ампулах или в герметически закупоренных баночках в холодном месте. Для получения чистых препаратов ферментов широко используют в настоящее время такие эффективные методы, как электрофорез и ионообменную хроматографию. При сочетании этих методов с методами адсорбции и дробного высаливания белков, применявшимися ранее для очистки ферментов, значительно возросли возможности препаративного получения чистых ферментов.

Опыт 1. Получение сахаразы из дрожжей

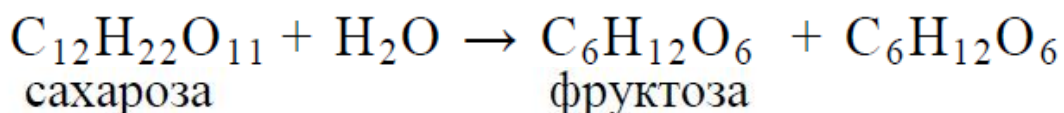
Реактивы, посуда, оборудование: Пекарские дрожжи, ацетон, тимол, фелинговая жидкость, песок, вода, стекло, ступка, складчатый фильтр, термостат.

Выполнение работы

100 г пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке с песком, наносят тонким слоем на стекло и высушивают в токе сухого воздуха. Высушенные дрожжи растирают в порошок. Для извлечения сахаразы к полученному порошку приливают небольшими порциями 200 мл воды при постоянном перемешивании. Всю массу оставляют стоять в термостате при 25–30 °С на 1–2 ч. Затем массу вновь растирают в жидкость, отделяют центрифугированием в течение 10 мин или фильтрованием через складчатый фильтр. Отфильтрованную прозрачную вытяжку упаривают в вакууме при 35 °С до небольшого объема и выливают в пятикратный объем ацетона, перемешивают и через несколько минут центрифугируют. Образующийся осадок высушивают при температуре 35 °С и растирают в ступке в порошок. Сахараза (инвертаза) длительно сохраняется, если к порошку добавить кристаллик тимола в качестве антисептика.

Качественная проба на сахаразу

Сахараза расщепляет тростниковый сахар по следующей схеме:



В две пробирки берут по 0,5 мл раствора фермента сахаразы. Содержимое одной из них кипятят для разрушения фермента и охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 3 мл раствора сахарозы и ставят в водяную баню при 40 °С на 10–15 мин. По истечении указанного времени в обе пробирки добавляют по 2 мл фелинговой жидкости и нагревают до начинающегося кипения. В пробирке, где фермент разрушен, осадка закиси меди не появляется. В другой же пробирке с активным ферментом: образуется красный осадок закиси меди, что указывает на присутствие глюкозы.

Опыт 2. Получение уреазы из соевой муки

Реактивы, посуда, оборудование: Бобы сои, петролейный эфир (или серный эфир), 1 %-й водный раствор мочевины, 1 %-й спиртовой раствор фенолфталеина, ацетон, воронка Бюхнера, кофейная мельница, колба для отсасывания, резиновая трубка с зажимом.

Выполнение работы

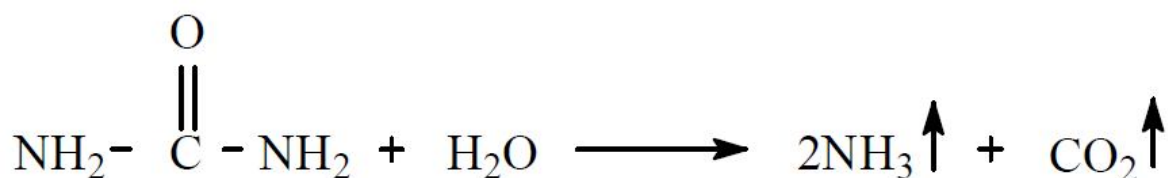
Сухие бобы сои дважды размалывают на кофейной мельнице и хорошо растирают в ступке. Муку высыпают в колбу и встряхивают

в течение 10–15 мин с петролейным эфиром (или диэтиловым) для обезжиривания. после чего смесь фильтруют на воронке Бюхнера. Процесс экстрагирования эфиром повторяют 5–6 раз. Обезжиренную муку высушивают, распределяя ее тонким слоем на стекле. Высушенная обезжиренная мука хранится в закрытой банке в сухом месте и может долго давать активные вытяжки уреазы.

Для работы отвешивают 20–30 г обезжиренной муки и настаивают ее с пятикратным количеством золы в течение 15–20 ч на холоде. Затем всю массу центрифугируют. После этого упаривают в вакууме при температуре 35–40 °С до небольшого объема (5–10 мл) и этот раствор вливают в четырех-пятикратный объем ацетона. Выпавший осадок обрабатывается несколько раз безводным ацетоном и окончательно высушивается. Полученный порошок хорошо растворяется в воде. Для проверки активности готовят 0,01 % раствор уреазы.

Проверка активности

В пробирку наливают 5 мл мочевины, 2–3 капли фенолфталеина и 0,1 мл раствора уреазы (0,01 %-й раствор). Пробирку помещают на 30 мин в термостат при температуре 38 °С. Смесь окрашивается в малиново-красный цвет и ощущается запах аммиака при наличии активного фермента. Уреаза расщепляет мочевину на CO_2 и NH_4^+ в соответствии со следующей схемой:



Уреаза содержится в больших количествах в семенах сои, белой акации, в микроорганизмах и др. У позвоночных животных она отсутствует.

Опыт 3. Получение препарата амилаз из плесневых грибов

Реактивы, посуда, оборудование: Синтетическая питательная среда, универсальный индикатор, среда Чапека, колба, термостат, фарфоровая ступка, битое стекло, грибная масса, 1 %-й раствор крахмала, 1 %-й раствор йода в йодистом калии, воронка, фарфоровая пластинка, колбы на 100 мл, раствор йода, вода.

Выполнение работы

Культивирование плесневых грибов

Плесневые грибки развиваются на синтетических питательных средах. Состав одной из них (среды Чапека) представлен в табл. 11.

Для определения рН среды пользуются универсальным индикатором.

Таблица 11

Состав среды Чапека

Компонент (рН≈7)	Количество компонента в среде, г
Сахароза	3,0
NaNO ₃	0,2
KH ₂ PO ₄	0,1
MgSO ₄	0,05
KCl	0,05
FeSO ₄ или Fe ₂ (SO ₄) ₃	0,001
Вода	100,0

Для накопления грибной массы вносят кусочек плесени (с заплесневевшего предмета или пользуются чистой культурой гриба *Aspergillus niger*) в питательную среду Чапека. Засеянную колбу помещают на несколько дней в термостат при температуре 25–28 °С. Через 5–6 дней на поверхности среды вырастает пленка, вполне пригодная для работы. Грибную массу отделяют от среды фильтрованием, распределяют ее небольшими кусочками на поверхности стекла и высушивают при температуре 37 °С. Затем воздушно-сухую массу тщательно растирают в фарфоровой ступке с битым стеклом, взятым в отношении 3:1 к весу микробной массы. Полученный тонкий однородный порошок и будет служить объектом для проведения ферментных опытов.

Качественная проба на амилазу. Ферменты амилазы осуществляют гидролиз α-1,4-глюкановых связей в полисахаридах (крахмал, гликоген и др.) и олигосахаридах с образованием в качестве конечных продуктов либо мальтозы, либо глюкозы. В процессе постепенного дробления молекулы крахмала под действием α-амилаз возникают в качестве промежуточных продуктов распада декстрины (амилодекстрины, эритродекстрины, ахродекстрины). Протекание процесса гидролиза крахмала можно проследить по изменению окраски крахмала с йодом. Крахмал даст синее окрашивание с йодом, растворимый крахмал – сине-фиолетовое, амилодекстрины – фиолетовое, эритродекстрины – от красно-бурого до красного, ахродекстрины не изменяют окраски йода.

Препарат плесневых грибов характеризуется большим содержанием α -амилазы.

2 г смеси (0,5 г грибной массы – 1,5 г стеклянного порошка) смешивают с 50 мл воды, нагретой до 37 °С. энергично встряхивают в течение 5 мин, а затем оставляют еще на 2 ч при температуре 37 °С. После повторного встряхивания осадок отфильтровывают. Фильтрат является ферментной вытяжкой.

В пробирку наливают 5 мл вытяжки. Прибавляют 10 мл 1 %-го раствора крахмала и тотчас же несколько капель содержимого пробирки смешивают на фарфоровой пластинке с одной-двумя каплями раствора йода. Проба окрашивается в интенсивно-синий цвет. Пробирку помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через определенные промежутки времени (через 2, 4, 6 и т.д. мин) повторяют взятие проб. По мере расщепления крахмала пробы с йодом будут окрашиваться в различные цвета (от синего к фиолетовому, от красного до желтого, отвечающего цвету йода) вследствие образования декстринов разной степени сложности и олигосахаридов. Гидролиз можно считать законченным, когда проба с йодом окрашивается в желтый цвет, т.е. сохраняется цвет йода.

Опыт 4. Открытие амилазы в слюне

Реактивы, посуда, оборудование: Раствор крахмального клейстера, 1 %-й раствор йода в йодистом калии, фелинговая жидкость, дистиллированная вода, вата, воронка, водяная баня, стаканы на 100 мл, колбочки на 100 мл. термометр до 100 °С, фарфоровая пластинка.

Выполнение работы

Приготовление разбавленной слюны. Ополаскивают 2–3 раза рот, чтобы удалить остатки пищи. Отмеряют цилиндром 20 мл дистиллированной воды, сливают ее в стакан и ополаскивают ею рот в течение 1–2 мин, выливают жидкость в другой стакан или колбу. Эту операцию повторяют 2–3 раза. Собранную жидкость (примерно 50–60 мл) фильтруют через вату и фильтрат употребляют для работы.

Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны. В 2 пробирки наливают по 5 мл крахмального клейстера и в одну из них 5 мл воды, а в другую 5 мл раствора слюны. Обе пробирки со стеклянными палочками одновременно помещают в водяную баню при 40 °С. Через несколько секунд наблюдают уменьшение опалесценции (резкое усиление рассеяния света чистыми веществами (газами или жид-

костями) в критических состояниях, а также растворами при достижении ими критических точек смещения. Объясняется резким возрастанием сжимаемости вещества, в результате чего в нём увеличивается число флуктуаций плотности, на которых рассеивается свет, т.е. прозрачное вещество становится мутным) жидкости в пробирке со слюной вследствие образования растворимого крахмала. Через 1 мин с момента нагревания пробирок в водяной бане от каждой смеси отбирают с помощью стеклянной палочки по капле жидкости и смешивают ее с каплей заранее нанесенного на пластинку йода. Повторяют подобное исследование действия фермента через 2, 4, 6, 8 мин. Окраска с йодом проб жидкости из пробирки со слюной меняется от синей к сине-фиолетовой, буро-красной, красной и, наконец, желтой, т.е. сохраняется цвет йода. После этого к оставшейся жидкости в опытной пробирке добавляют 1–2 мл фелинговой жидкости, смесь нагревают на пламени горелки до начала кипения. Образуется красный осадок закиси меди. Восстановление окиси меди в закись меди производится образовавшейся мальтозой, а также низкомолекулярными декстринами. Жидкость в контрольной пробирке (вода) не изменяется при выстаивании в водяной бане: пробы ее дают синее окрашивание с йодом, и она не восстанавливает гидраты окиси меди в закись меди.

В табл. 12 приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом.

Таблица 12

Продукты гидролиза крахмала

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн. и более	Синяя
Амилодекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1000	Желтая
Мальтоза	342	Желтая

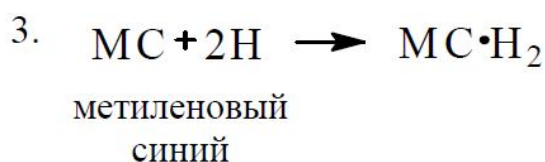
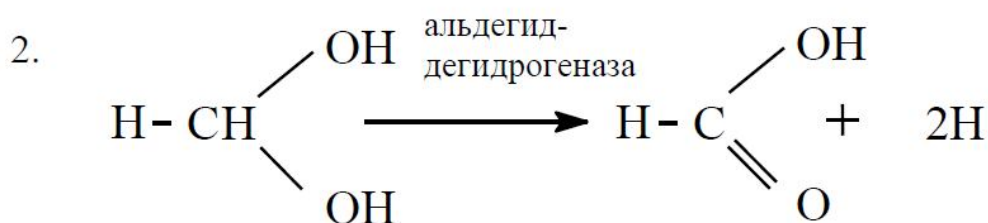
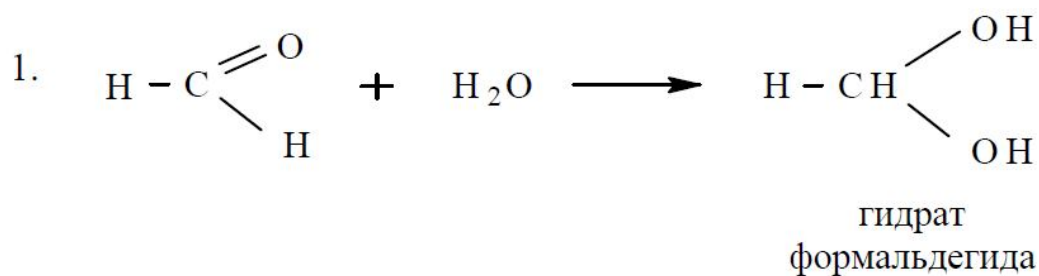
Опыт 5. Открытие альдегиддегидрогеназы в сыром молоке

Реактивы, посуда, оборудование: Свежее коровье молоко 0,4 % раствор формальдегида, 0,01 %-й раствор метиленовой сини, вазелиновое масло, водяная баня.

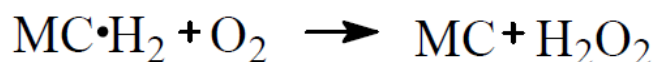
Выполнение работы

Коферментом альдегиддегидрогеназы является ФАД (флавинадениндинуклеотид). Существуют многочисленные вещества, которые, будучи добавлены в реакционную смесь, легко принимают на себя водород (промежуточные акцепторы водорода). Особенно интересны некоторые красители, которые, присоединяя к себе водород, обесцвечиваются. Так, например, метиленовая синь, присоединяя водород (восстанавливаясь) от субстрата при его окислении под действием альдегиддегидрогеназы, переходит в бесцветное соединение (лейко-соединение). При взбалтывании на воздухе бесцветная форма метиленовой сини отдает принятый водород кислороду воздуха (окисляется) и снова приобретает свою окраску.

В три пробирки наливают приблизительно по 5 мл свежего коровьего молока. Одну пробу кипятят в течение 2–3 мин и остужают. В прокипяченную пробу (№ 1) и в одну из некипяченных проб (№ 2) добавляют по 1 мл 0,4 %-го раствора формалина, а в пробу № 3 – 1 мл воды. Во все три пробы приливают по 1 мл метиленовой сини. Содержимое хорошо перемешивают и доливают сверху 3–4 капли вазелинового масла, чтобы предохранить жидкость от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробы помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через некоторое время жидкость в той из некипяченных проб, в которую был добавлен формалин, обесцвечивается. Обесцвечивание обусловлено восстановлением за счет атомов водорода, который при участии альдегиддегидрогеназы молока отщепляется от формальдегида, превращающегося при этом в муравьиную кислоту:



Если затем бесцветный раствор метиленового синего встряхнуть на воздухе, раствор вновь приобретает синий цвет, так как восстановленная форма отдаст водород кислороду воздуха с образованием перекиси водорода:



В прокипяченной пробе и некипяченой пробе (без добавления формальдегида) обесцвечивания метиленового синего не происходит вследствие отсутствия активного фермента в первой и отсутствия субстрата во второй. Результаты опыта заносят в табл. 13.

Таблица 13

Результаты эксперимента

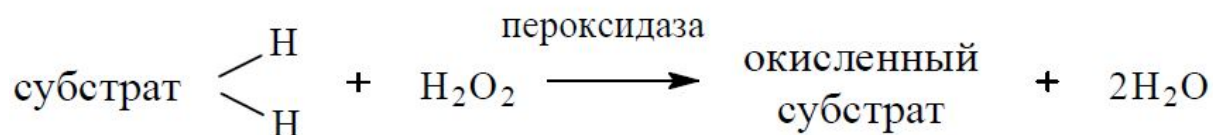
№ пробы	Состав смеси, мл				Результаты опыта
	молоко	формалин	вода	метиленовая синь	
1	5 (прокипяч.)	1	—	1	
2	5	1	—	1	
3	5	—	1	1	

Опыт 7. Открытие пероксидазы в картофеле

Реактивы, посуда, оборудование: Сырой картофель, 1 %-й раствор пирогаллола, 2 %-й раствор перекиси водорода.

Выполнение работы

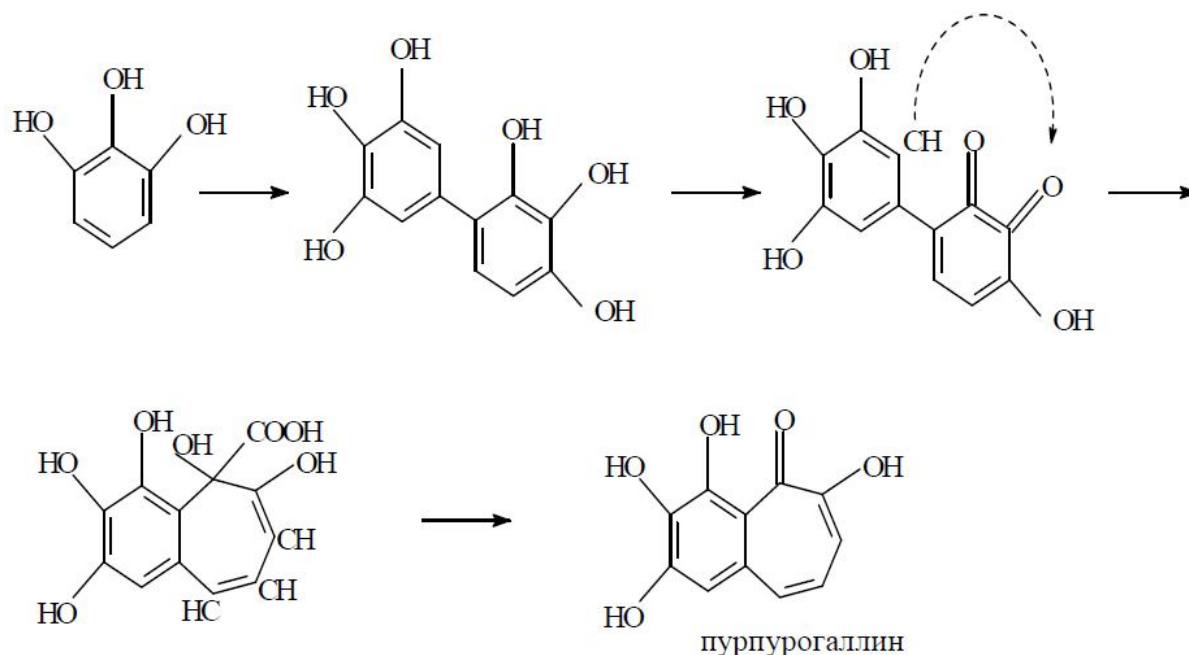
Пероксидаза катализирует окисление перекисью водорода различных полифенолов и ароматических аминов:



Пероксидаза распространена в растительных тканях, особенно в хрене. В животном организме она почти не встречается, в небольших количествах ее можно обнаружить лишь в лейкоцитах и в молоке. Пероксидаза – сложный железосодержащий белок, простетическая группа которого близка к гемоглобину: железо в пероксидазе находится в трехвалентном состоянии.

Фермент обнаруживают при помощи гваяковой настойки (синяя окраска) или по появлению пурпурогаллина (желто-бурый осадок).

Картофель натирают на терке. Небольшое количество его с водой переносят в пробирку, добавляют 1–2 мл 1 %-го раствора пирогаллола и 1–2 капли 2 %-го раствора перекиси водорода. При выстаивании выпадает желто-бурый осадок пурпурогаллина. Образование пурпурогаллина происходит согласно нижеприведенной схеме:



Контрольные вопросы:

1. Что такое ферменты, их биологическая роль?
2. Номенклатура и классификация ферментов.
3. Химическая природа ферментов.
4. Строение простых и сложных ферментов.
5. Понятие об активном центре ферментов.
6. Определение наличия амилазы в слюне.
7. Определение наличия сахаразы в дрожжах.

Лабораторная работа № 2

Изучение активности α - и β -амилаз, выделенных из солода. Определение общей осаживающей активности ферментной системы

Цель: Освоить методику выделения и изучения активности амилитических ферментов из зерновых продуктов.

В солоде (проросшем зерне пшеницы, ржи, ячменя) содержатся активные α - и β -амилазы. Они хорошо растворяются в воде, поэтому их можно получить в виде водной вытяжки.

Выделение α - и β -амилазы из солодовой водной вытяжки основано на различной устойчивости этих ферментов к температуре и рН среды. При нагревании солодовой вытяжки до 70 °С β -амилаза денатурирует, тогда как α -амилаза при этой температуре сохраняет нативную конформацию и активность. Оптимум действия β -амилазы проявляется при рН 4,8, однако α -амилаза при таких значениях рН теряет свою активность, а при понижении до рН 3,3 – денатурирует.

Реактивы, посуда, оборудование: Вода дистиллированная; вытяжка из солода; ацетатный буфер рН 5,5 (к 57,4 мл раствора с концентрацией уксусной кислоты 1 моль/л добавляют 50 мл раствора с концентрацией гидроксида натрия 1 моль/л и общий объем доводят водой до 500 мл); раствор с массовой долей крахмала 2 % (суспензируют 2 г растворимого крахмала в 20 мл холодной воды, затем при помешивании добавляют 80 мл кипящей воды и кипятят 1 мин, после охлаждения объем доводят водой до 100 мл и содержимое перемешивают); раствор с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л; раствор с массовой долей йода 0,3 % в растворе с массовой долей йодида калия 3 % (0,3 г йода кристаллического и 3 г йодида ка-

лия смешивают с 3–5 мл воды и после растворения йода объем доводят водой до 100 мл).

Выполнение работы

Приготовление вытяжки из солода. 20 г измельченного солода растирают в ступке с небольшим количеством воды до однородной массы и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл. Объем доводят водой до метки, содержимое перемешивают и оставляют на льду на 2 часа (можно поставить в холодильник на ночь). По истечении времени экстрагирования содержимое перемешивают и центрифугируют в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин. Центрифугат используют в качестве источника амилазы.

Выделение α -амилазы. В пробирку вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют на кончике ножа порошок ацетата кальция и пробирку выдерживают в течение 15 мин на водяной бане, нагретой до 68 °С (в период нагревания температура воды не должна подниматься выше 70 °С и опускаться ниже 66 °С). Затем содержимое пробирки охлаждают холодной водой. При таком прогревании β -амилаза полностью инактивируется, а α -амилаза сохраняет свою активность. Полученный раствор используют для определения активности α -амилазы.

Выделение β -амилазы. В колбу вместимостью 50 мл вносят 5 мл солодовой вытяжки, содержащей активные α - и β -амилазы, добавляют 4 мл воды, 1 мл раствора с концентрацией соляной кислоты равной 0,1 моль/л (рН полученной смеси должен быть 3,3). Затем колбу с содержимым помещают на 15 мин на снег или лед (можно в морозильную камеру холодильника). В этих условиях α -амилаза полностью инактивируется, а β -амилаза сохраняет свою активность. По истечении 15 мин выдержки на холоде к содержимому колбы добавляют 2 мл раствора с концентрацией гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4) 0,15 моль/л для того, чтобы рН довести до 6,0. Полученный раствор используют для определения активности β -амилазы.

Определение активности амилаз солода (по массе гидролизованного крахмала). Действие амилаз на крахмал можно установить либо по убыли крахмала, либо по накоплению продуктов его распада – сахара.

Метод определения активности амилаз по массе расщепленного крахмала получил название колориметрического.

Принцип метода состоит в том, что активность амилаз рассчитывают по разности между массами взятого для опыта и оставшегося по

окончании опыта нерасщепленным крахмала, определяемого фотометрическим анализом по цветной реакции с йодом. При проведении опыта продолжительность инкубации и объем раствора ферментного препарата устанавливают такими, чтобы в опытных пробирках (содержащих фермент) не произошел полный гидролиз крахмала.

Данный метод позволяет установить специфичность и активность совместного действия амилаз на крахмал. α -Амилаза (КФ 3.2.1.1.) гидролизует в крахмале и родственных полисахаридах α -1,4-гликозидные связи без определенного порядка. В результате образуются декстрины и незначительное количество мальтозы. β -Амилаза (КФ 3.2.1.2.) гидролизует в крахмале и родственных полисахаридах α -1,4-гликозидные связи, последовательно отщепляя молекулы мальтозы с нередуцирующих концов цепочек.

Наиболее эффективно гидролиз осуществляется под действием комплекса амилаз, содержащихся в вытяжке из солода.

Для проведения опыта берут 6 пробирок, одна из них контрольная. Пробирки заполняют в соответствии с табл. 14.

Содержимое в пробирках перемешивают и ставят в термостат при 37–38 °С на 30 мин. Такая постановка опыта позволяет одновременно определить суммарную активность амилаз в солодовой вытяжке (α - и β -амилаз вместе), активность α -амилазы и активность β -амилазы. По окончании времени инкубации пробирки из термостата вынимают и в каждую немедленно добавляют по 2 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л и по 3 капли водного раствора йода; содержимое перемешать.

Таблица 14

Определение активности амилаз солода

№ пробы	Компоненты, мл	Номер пробирки					
		1	2	3	4	5	6
1.	Вытяжка из солода	–	0,1	0,2	–	–	–
2.	α -Амилаза	–	–	–	0,2	0,4	–
3.	β -Амилаза	–	–	–	–	–	1,0
4.	Вода	1,0	0,9	0,8	0,8	0,6	–
5.	Буфер, pH 5,5	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
6.	Крахмал, 2%	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
	Разбавление, R	–	10	5	5	2,5	2,4

Пробирки с содержимым, окрашенным в желтые тона, убирают. Пробирки с содержимым, окрашенным в синие, фиолетовые или красные тона оставляют для дальнейшей работы (если после добавления раствора йода все пробирки с одним и тем же ферментным препаратом будут окрашены в желтый цвет, то опыт следует повторить, взяв этот ферментный препарат в меньшем количестве).

Берут мерные колбы вместимостью 50 мл, нумеруют их соответственно номерам, оставленных для дальнейшей работы пробирок. В каждую колбу вносят 30–40 мл воды, 0,5 мл раствора с концентрацией соляной кислоты 1 моль/л, 10 капель водного раствора йода и 0,5 мл смеси из пробирки в соответствии с номером колбы. Непосредственно перед отбором смеси содержимое пробирки перемешивают. Содержимое колбы доводят до метки водой, перемешивают и колориметрируют на ФЭКе при красном светофильтре против воды.

Активность амилаз выражают в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин. Расчет производят следующим образом:

- определяют массу расщепленного крахмала по формуле:

$$m = \frac{E_k - E_o}{E_k} \times C$$

где m – масса расщепленного крахмала за время опыта, мг;

E_k – оптическая плотность контрольного раствора;

E_o – оптическая плотность опытного раствора;

C – масса внесенного крахмала, мг (3 мл раствора с массовой долей крахмала 2 % содержат 60 мг крахмала);

- полученный результат умножают на разбавление (см. табл. 14), т.е. приводят к 1 мл исходной ферментной вытяжки и затем делят на время инкубации (30 мин), что позволяет выразить активность амилазы в мг расщепленного крахмала 1 мл ферментной вытяжки за 1 мин.

Зная методику приготовления вытяжки из биологического объекта, можно легко рассчитать активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1 г биологического материала за 1 мин по формуле:

$$A = \frac{(E_k - E_o) \times 60 \times V}{E_k \times V_1 \times m \times 30}$$

где A – активность амилазы в мг расщепленного крахмала на 1 г солода (или другого материала) за 1 мин;

E_k – оптическая плотность контрольного раствора;

E_o – оптическая плотность опытного раствора; 60 – масса взятого для анализа крахмала, мг (в 3 мл 2 %-го раствора содержится 60 мг крахмала);

V – общий объем солодовой вытяжки, полученной из солода (100 мл);

V_1 – объем ферментного препарата, взятого для инкубирования, мл;

30 – время инкубации, мин;

m – масса солода, взятого для приготовления солодовой вытяжки.

При расчете активности β -амилазы в числитель необходимо ввести число 2,4, которое учитывает все разведения солодовой вытяжки, сделанные при выделении β -амилазы.

Результаты исследований записывают и делают выводы об активности амилаз солода.

Контрольные вопросы:

1. Общая характеристика солода.
2. Какие ферменты содержатся в солоде и как их можно выделить?
3. Техника выделения α -амилазы. На чем она основана?
4. Метод выделения β -амилазы, на чем он основан?
5. Специфичность действия и активность α -амилазы.
6. Специфичность действия и активность β -амилазы.
7. Принцип колориметрического метода определения активности амилаз? Что положено в основу?
8. Расчет активности и характеристика полученных результатов.

Лабораторная работа № 3

Количественное определение активности амилаз по Вольгемуту

Цель: Определить количественное содержание амилазы, методом, основанном на установлении предельного разбавления раствора

амилазы, при котором еще происходит в определенных условиях расщепление определенного количества крахмала до эритродекстрина.

Большинство существующих методов количественного определения ферментов основано на определении их активности. О присутствии фермента в растворе судят, как правило, по его действию на определенный субстрат (или на определенный тип химической связи в молекуле субстрата) в условиях, оптимальных для действия фермента.

Общим для всех методов является положение, согласно которому активность фермента, выражаемая в ферментных единицах, определяется количеством превращенного субстрата при определенных стандартных условиях: концентрации субстрата, температуры и рН среды. При определении активности фермента следует не забывать о том, что она резко меняется при различных условиях реакции.

Различные методы количественного определения активности ферментов основаны на следующих принципах:

1. Определяется наименьшее количество ферментного препарата, способного за определенный промежуток времени и при определенных условиях расщепить требуемое количество субстрата.

2. Определяется остаток субстрата после воздействия фермента и по полученным данным рассчитывается количество субстрата, расщепившегося под действием определенного количества фермента.

3. Активность фермента обозначают по времени, в течение которого определенная навеска ферментного препарата катализирует превращение определенной доли субстрата в стандартных условиях начальной концентрации субстрата, температуры и рН среды.

Согласно правилам, рекомендованным в 1961 г. комиссией по ферментам Международного биохимического союза, за единицу активности (E) любого фермента принимается такое его количество, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата при оптимальных условиях.

Если субстратом служит белок, полисахарид или иная молекула, в которой фермент атакует более одной связи, то вместо «микромоль субстрата» следует говорить «микроэквивалент затронутых реакцией групп», т.е. за меру скорости реакции принимается число расщепленных пептидных или гликозидных связей, а не общее число молекул.

Реактивы, посуда, оборудование: Ферментная вытяжка из плесневого порошка, 1 %-й раствор растворимого крахмала, 10 %-й раствор серной кислоты, 1 %-й раствор йода в йодистом калии, штатив, пробирки, термостат.

Выполнение работы

Готовят убывающий ряд разбавлений ферментной вытяжки из плесневых грибов (содержат амилазу), для чего в цилиндр вносят 1 мл вытяжки и 9 мл воды. Нумеруют 10 пробирок (см. табл. 15). Вносят в каждую пробирку по 1 мл воды. Далее 1 мл вытяжки, разбавленной в 10 раз, помешают в пробирку № 1. Жидкость хорошо перемешивают, затем 1 мл жидкости из пробирки № 1 переносят в пробирку № 2. Жидкость в пробирке № 2 так же тщательно перемешивают, и 1 мл жидкости из нее переносят в пробирку № 3 и т.д. Из последней (№ 10) пробирки 1 мл смеси выливают.

В каждую пробирку вносят по 2 мл 0,1 %-го раствора растворимого крахмала. Все пробирки помещают в термостат при 37 °С на 30 мин; а затем в них прибавляют по 1 мл 10 %-й серной кислоты (для прекращения действия фермента) и 1–2 капли раствора йода в йодистом калии. Отмечают, при каком разведении произошел полный гидролиз крахмала, т.е. отмечают последнюю пробирку с желтой окраской, за которой следует пробирка с эритродекстринами, окрашенная в красновато-фиолетовый цвет (в ней содержится минимальное количество фермента).

Таблица 15

Опытные данные для определения активности амилазы

Показатели	№ Пробирки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Объём крахмала, мл										
Разведение вытяжки	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Окраска после добавления йода в йодистом калии										

Пример расчета

Допустим, полный гидролиз произошел в пробирке № 4 (последняя пробирка с желтой окраской). Умножив 2 мл на величину разбавления (в данном случае она равна 160), получим амилазное число для данного раствора: $160 \cdot 2 = 320$, т.е. 1 мл неразбавленной ферментной вытяжки расщепляет за 30 мин при 37 °С 320 мл 0,1 %-го раствора крахмала.

Контрольные вопросы:

1. Аллостерические (регуляторные) ферменты.
2. Регуляция по типу обратной связи (ретроингибирование).
3. Изоферменты, механизм образования, биологическая роль.
4. Имобилизованные ферменты, значение в медицине.
5. Связь витаминов с ферментами.
6. Терапевтический эффект применения сульфаниламидных препаратов.

Лабораторная работа № 4 Определение активности каталазы (по А.Н. Баху и А.И. Опарину)

Цель: Определить активность каталазы субстрата по А.Н. Баху и А.И. Опарину.

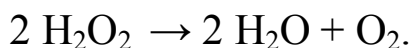
Оксидоредуктазы – класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Окисление мономеров, образующихся в процессе катаболизма полимеров, представляет собой сложный многоступенчатый процесс.

Окисление веществ в клетках протекает, в основном, путем отщепления водорода (дегидрированием) или отщеплением электронов или путем присоединения кислорода к молекуле окисляемого соединения.

Акцепторами водорода у дегидрогеназ является НАД⁺, НАДФ, ФАД и ФМН, у некоторых флавиновых – кислород (их называют оксидазами), у гемсодержащих (пероксидаз и каталазы) – H₂O₂ (пероксид водорода).

Акцепторами и переносчиками электронов являются цитохромы, содержащие гем (гемопротеины).

Каталаза (КФ 1.11.1.6) относится к гемопротеинам, катализирует процесс разрушения ядовитого для клеток пероксида водорода на воду и кислород:



Для живой клетки пероксид водорода является сильным ядом, поэтому все ферменты, образующие и обезвреживающие H_2O_2 , находятся в пероксисомах – органеллах, покрытых мембраной. Главными потребителями H_2O_2 являются пероксидазы (КФ 1.11.1.7.), которые окисляют фенолы, амины, некоторые гетероциклические соединения и др. субстраты дегидрированием, переносят снятые с субстратов $[2\text{H}^+]$ на H_2O_2 , восстанавливая его до $2\text{H}_2\text{O}$. Молекулы пероксида водорода, неостребованные пероксидазами, обезвреживаются каталазой.

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом.

Реактивы, посуда, оборудование: Свежий растительный материал, песок, 0,1 н раствор марганцовокислого калия 10 %-й раствор серной кислоты, углекислый кальций, 0,1 н. раствор перекиси водорода, вытяжка каталазы, бюретки на 50 мл, пипетки на 20–25 мл, мерный цилиндр на 10–25 мл, коническая колба на 200 мл, ступка с пестиком.

Выполнение работы

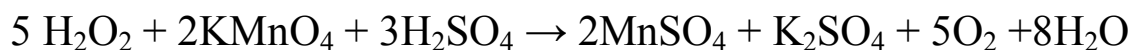
Приготовление вытяжки растительного материала

Свежий растительный материал (морковь, картофель) в количестве 2 г растирают с песком в ступке, добавляя 2–3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции добавляют углекислый кальций. После растирания всю массу переносят в мерную колбу и доливают водой до 100 мл. Смесь оставляют стоять в течение 30–60 мин, после чего ее фильтруют.

К 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода добавляют 20 мл вытяжки фермента (оба раствора отмеряют пипетками). Через 30 мин действие фермента прекращают прибавлением 5 мл 10 %-го раствора серной кислоты и титруют смесь 0,1 н. раствором марганцовокислого калия (до образования устойчивого в течение

1 мин розового окрашивания). Отмечают количество миллилитров раствора марганцовокислого калия, израсходованного на титрование оставшейся неразложившейся перекиси водорода. Одновременно ставится контрольный опыт с инактивированным нагреванием в кипящей водяной бане (5 мин) ферментным раствором (20 мл). К этому раствору после нагревания и последующего охлаждения добавляют 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода. Смесь оставляют стоять на 30 мин, после чего добавляют 5 мл 10 %-го раствора серной кислоты и титруют 0,1 н. раствором марганцовокислого калия. Отмечают количество миллилитров раствора марганцовокислого калия, израсходованного на титрование.

Расчет количества перекиси водорода, разложившейся ферментом, ведется по разности опытного и контрольного определения. Ход процесса определяется схемой:



1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг перекиси водорода, поскольку:

$$\text{Э} \times \text{н} / 1000 = 17 \times 0,1 / 1000 = 0,0017 \text{ г, или } 1,7 \text{ мг.}$$

Пример расчета

Приготовлена вытяжка каталазы из 1,25 г моркови в 100 мл. На титрование опытной пробы (20 мл вытяжки – 25 мл 0,1 н. раствора перекиси водорода) затрачено 15,5 мл, а на контрольную – 30,2 мл 0,1 н. раствора перманганата калия. Количество разложившейся перекиси в пробе отвечает:

$$30,2 - 15,5 = 14,7 \text{ (мл)}$$

0,1 н. раствора перманганата калия, т.е.

$$14,7 \times 1,7 \text{ мг} = 24,99 \text{ мг перекиси водорода.}$$

Количество перекиси водорода, которое может быть разложено каталазой в 1 г моркови, равно

$$24,99 \times 100 / 20 \times 1,25 = 99,96 \text{ мг.}$$

Активность каталазы, определяемая количеством разложившейся перекиси водорода, обычно пересчитывают на 1 г абсолютно сухого вещества, из которого была получена вытяжка фермента.

Контрольные вопросы:

1. Основные пути окисления субстратов в клетке.

2. Характеристика строения и действия НАД⁺- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ.
3. Характеристика строения и действия ФАД-зависимых дегидрогеназ.
4. Какие ферменты называют оксидазами? Их кофакторы.
5. Характеристика строения и действия пероксидаз и каталаз.
6. Характеристика строения и действия цитохромов.
7. Химизм, образование и пути обезвреживания пероксида водорода в клетках.
8. Метод определения активности каталазы.

Лабораторная работа № 5

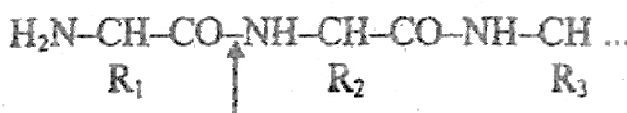
Определение активности протеолитических ферментов в единицах ферментативной активности

Цель: 1) Изучить методы определения активности протеолитических ферментов муки; 2) получить кристаллическую уреазу и определить активность фермента, учитывая величину отрезка времени, в течение которого происходят определенные химические превращения. Найденная величина (показатель времени) будет обратно пропорциональна активности фермента, или числу единиц ферментативного действия, т.е. препараты, имеющие вдвое меньшую активность, будут требовать вдвое больше времени для проведения того же объема химических превращений.

Протеолитические ферменты катализируют расщепление белковых веществ до пептидов и дальнейший гидролиз этих продуктов где R₁ и R₂ – остатки аминокислот или пептидов.

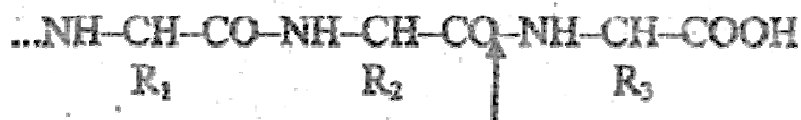
Протеазы делятся на две группы – протеиназы и пептидазы.

Пептидазы обладают очень большой специфичностью действия и делятся на три группы: аминопептидазы, карбоксипептидазы и дипептидазы. Аминопептидазы катализируют расщепление полипептидов по месту пептидной связи, расположенной у того конца пептида, на котором имеется свободная аминная группа:



где R_1 , R_2 и R_3 – остатки аминокислот;
стрелкой показано место действия аминопептидазы.

Карбоксипептидаза расщепляет в полипептидах пептидную связь у того конца пептида, где имеется свободная карбоксильная группа;



где R_1 , R_2 и R_3 – остатки аминокислот; стрелкой показано действие карбоксипептидазы.

Во всех продуктах растительного происхождения протеиназы и пептидазы присутствуют вместе, поэтому гидролиз белка происходит до конца (до аминокислот).

Определить активность протеолитических ферментов можно следующими способами:

- автолизом, когда навеску исследуемого материала заливают водой, прибавляют антисептик (например, тимол или толуол) и под влиянием ферментов, находящихся в клетках этого же растительного материала, собственный белок расщепляется до аминокислот. Распад белков и продуктов их гидролиза происходят по месту пептидных связей по следующей схеме:



- действием вытяжки фермента на препарат белка или какой-либо другой субстрат.

- выделением ферментов из растительных тканей, очисткой этих ферментов и определением их действия на белки или препаратов растительных тканей. Чаще всего активность протеолитических ферментов определяют более простым первым методом.

Активность протеаз учитывают обычно по количеству освобождающихся аминных или карбоксильных групп в навеске материала за определенный отрезок времени. Определение аминных групп можно проводить методом Ван-Сляйка или методом Несслера.

Реактивы, посуда, оборудование: колбы конические на 100 мл, колбы мерные на 100 мл; фосфатный буфер 1/15 М с рН 5,6

(0,5 мл 1/5 М Na_2HPO_4 и 9,5 мл 1/15 М KH_2PO_4); толуол, реактив Несслера (растворяют 25 г йодистого калия в 50 мл воды, прибавляют 35 г йодистой ртути красной и в фарфоровой ступке пестиком растирают до полного растворения. Прибавляют 870 мл 15 %-го раствора КОН, перемешивают, дают отстояться и декантируют прозрачную жидкость. Раствор хранят в темной склянке); сегнетова соль 25 %-я; образцовый раствор NH_4Cl (0,7405 г х.ч. перекристаллизованного хлорида аммония растворяют в дистиллированной безаммиачной воде и доводят объем до 1 л, 20 мл этого раствора переносят в мерную колбу на 1 л, доводят объем до метки, 1 мл этого раствора содержит 0,005 мг NH_4^+).

Выполнение работы

Навеску 10 г муки помещают в коническую колбу емкостью 100 мл, приливают 50 мл дистиллированной воды, 20 мл фосфатного буфера (рН 5,6), 0,5 мл толуола.

При изучении активности ферментов в зависимости от температуры колбы с буфером выдерживают при различных температурах (3–8 °С, 16–24 °С, 35 °С, 50 °С) в течение 24 часов.

Обязательно ставят контрольную колбу с инактивированными ферментами. Инактивацию проводят кипячением содержимого колбы в течение 3–5 минут.

После соответствующей экспозиции колбы вынимают из термостата, фильтруют в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки водой и 10 мл раствора используют для определения аминного азота методом Несслера.

10 мл раствора помещают в мерную колбу на 100 мл, добавляют воды до половины объема, затем приливают 4 мл 25 %-го раствора сегнетовой соли и перемешивают. Снова доводят общий объем в колбе водой до 90 мл и приливают 4 мл реактива Несслера.

После этого доводят объем до метки. Периодическое разбавление опытного раствора при добавлении реактива Несслера обеспечивает получение прозрачного раствора чисто-желтого цвета.

Содержание в растворе аммония устанавливают по калибровочной кривой образцовых растворов. Для построения ее готовят образцовые растворы одновременно с испытуемым раствором. В мерные колбы на 100 мл помещают 0,5; 1; 2; 4 мл рабочего образцового раствора хлористого аммония, добавляют воды до половины объема, а затем раствор сегнетовой соли и реактив Несслера.

Просмотр окраски образцового и испытуемого растворов проводят через 10 минут прибавления реактива Несслера при длине волны $\lambda = 400$ нм.

Содержание аммонийного азота (%) рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{a \times b \times 100}{m \times c \times 1000}$$

где a – количество азота по графику, мг,
 b – общий объем раствора, мл (500);
 c – объем раствора, взятый для окрашивания, мл;
 m – навеска воздушно-сухого материала, г;
 1000 – перевод мг в г

Полученные результаты записывают в табл. 16.

Таблица 16

Результаты экспериментов

Образец	Температура воздействия, °С	Показания прибора	Количество азота по графику, мг	Содержание азота, %
Контрольный				
Опытный				

Контрольные вопросы:

1. Дайте классификацию протеолитических ферментов.
2. Что является субстратом для действия протеаз?
3. Каковы продукты гидролиза белков?
4. В чем заключается значение протеаз для пищевой промышленности?
5. Какие вам известны ферментные препараты протеолитического действия?
6. Какова сущность метода определения активности протеолитических ферментов?

Лабораторная работа № 6

Изучение влияния температуры и pH среды на скорость ферментативной реакции

Цель: Установить влияние температуры и pH среды на активность ферментов.

Опыт 1. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

Скорость ферментативных реакций, как и неферментативных, увеличивается при повышении температуры. Но в связи с белковой природой ферментов, повышение температуры может привести к их денатурации и снижению скорости реакции. Денатурация тем значительнее, чем выше температура и чем больше время инкубации.

Реактивы, посуда, оборудование: 1 %-й раствор крахмала, фильтрованная и разбавленная (1:10) слюна, раствор йода в йодистом калии, водяная баня, пипетки на 1 и 2 мл, стеклянные палочки, фарфоровая пластинка.

Выполнение работы

Скорость ферментативных реакций, как и большинства любых химических процессов, увеличивается при нагревании. Однако, в отличие от неферментативных реакций, это увеличение скорости в случае ферментов наблюдается в сравнительно узком температурном интервале. По достижении некоторой температуры, характерной для каждого фермента, скорость реакции достигает максимального значения, после чего с повышением температуры падает. Температура, соответствующая максимальной скорости, называется оптимальной (t_{opt}).

Для большинства ферментов, выделенных от теплокровных животных, такой оптимальной температурой является 30–40 °С. Уменьшение скорости ферментативной реакции при температурах, более высоких, чем оптимальная, объясняется термолабильностью ферментов, т.е. чувствительностью к действию высокой температуры. Как правило, ферментативные процессы не могут протекать при температуре выше 70 °С. Степень инактивации фермента зависит не только от температуры, но и от длительности теплового воздействия. Уменьшение скорости ферментативной реакции при повышении температуры объясняется неспецифической тепловой денатурацией белковой молекулы фермента и потерей вследствие этого каталитической активности.

При более низких температурах скорость ферментативного катализа замедляется, падая при 0 °С до очень малой величины.

В четыре пронумерованные пробирки наливают по 2 мл 0,5 %-го раствора крахмала. Пробирку с номером 1 помешают в кипящую баню, пробирку № 2 – в баню при 40 °С; пробирку № 3 оставляют на рабочем столе (при комнатной температуре); пробирку № 4 помешают в лед. В течение 10 мин содержимое пробирок принимает температуру окружающей среды. Далее во все пробирки добавляют по 0,5 мл слюны (разбавленной в 10 раз), перемешивают и оставляют в тех же условиях. Наблюдение за ходом гидролиза осуществляют с помощью йодной реакции. Для этого наносят на фарфоровую пластинку несколько капель раствора йода в йодистом калии и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси из каждой пробирки, беря пробы через 1, 2, 4, 6, 8 мин. По изменению окраски крахмала с йодом судят о степени гидролиза. Схема опыта приведена в табл. 17.

Таблица 17

Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

№ пробирки	Количество 0,5 %-го раствора крахмала, мл	Объем слюны (1:10), мл	Температура, °С	Продолжительность опыта	Реакция с йодом
1	2	0,5	100		
2	2	0,5	40		
3	2	0,5	15-20		
4	2	0,5	0		

Опыт 2. Влияние рН на скорость ферментативных реакций

Все ферменты проявляют максимальную активность при определенном оптимальном значении рН. Ниже и выше оптимума рН наблюдается снижение активности ферментов. Зависимость активности от рН объясняется влиянием на степень ионизации ионогенных групп фермента, а также субстрата.

Оптимум рН для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях рН среды. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции крахмала с раствором йода. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью (окраска с йодом отсутствует). По мере удаления от оптимума рН в кислую или щелочную зоны расщепление крахмала произойдет только частично до стадии декстринов или крахмал вообще не подвергнется расщеплению.

Реактивы, посуда, оборудование: 1/15 М раствор фосфатного буфера (с рН: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04), 0,5 %-й раствор крахмала, раствор

йода в йодистом калии, бюретка на 50 мл, пипетки на 2 и 5 мл, водяная баня, термометр на 100 °С фарфоровая пластинка.

Выполнение работы

Для получения среды с определенным значением рН удобно воспользоваться фосфатным буфером. В пять пробирок наливают по 5 мл фосфатной буферной смеси, составленной из различных количеств растворов 1/15 М двухзамещенного фосфата натрия и 1/15 М однозамещенного фосфата калия со следующими значениями рН: 5,59; 6,98; 7,38; 8,04. В каждую пробирку добавляют по 1 мл 0,5 %-го раствора крахмала и по 1 мл разбавленной (1:15) слюны. Далее все пробирки помещают в водяную баню, нагретую до 42 °С. Спустя 3–5 мин из всех пробирок наносят по капле смеси на фарфоровую пластинку, на которую предварительно был нанесен реактив Люголя (раствор йода в йодистом калии). Если наблюдается различие по окраске с йодом в испытуемых пробах, то пробирки вынимают из бани, охлаждают и добавляют в каждую пробирку по 3–4 капли раствора йода в йодистом калии. По окраске с йодом определяют степень расщепления крахмала амилазой слюны. При отсутствии заметного различия в окраске с кодом проб на фарфоровой пластинке продолжают нагревание пробирок в водяной бане еще 10–15 мин, а затем вновь испытывают пробы на степень расщепления крахмала. Результаты исследования целесообразно представить в виде табл. 18.

Результаты исследования

Показатели	№ пробирки				
	1	2	3	4	5
рН буферной смеси					
Окраска с йодом					
Оптимум рН					

Контрольные вопросы:

1. Механизм действия ферментов.
2. Свойство ферментов как биологических катализаторов: термоллабильность, влияние рН среды, специфичность.
3. Механизмы активирования ферментов. Проферменты, физиологическое значение образования их.
4. Ингибиторы ферментов: специфические и неспецифические.
5. Конкурентное торможение.

Лабораторная работа № 7 Изучение специфичности ферментов

Цель: Определить виды специфичности и то, как они проявляются.

Ферменты как биологические катализаторы характеризуются признаками как гомогенных, так и гетерогенных катализаторов, а именно они проявляют обычно свое каталитическое действие в водных растворах, но ввиду большого молекулярного веса (от десятков до сотен тысяч) в растворе ферментов существует микроповерхность раздела, характерная для гетерогенных катализаторов. Каталитическая активность ферментов определяется наличием на их поверхности особых участков – активных центров (участков с определенным сочетанием аминокислот в третичной структуре молекулы), обладающих специфической реакционной способностью. Многие ферменты, например ферменты переноса электронов в окислительно-восстановительных реакциях, ферменты, участвующие в биосинтезе

белка, функционируют, будучи «вмонтированными» в сравнительно жесткие структурные компоненты клетки, обладающие макроповерхностью раздела (митохондрии, рибосомы и т.п.). Наряду с общими признаками как гомогенных, так и гетерогенных катализаторов ферменты обладают рядом особых свойств, отличающих их от катализаторов небиологической природы.

Глазные отличия ферментов состоят в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия. Причины этого лежат в особенностях строения и механизма действия ферментов. Как известно, скорость реакции зависит от величины энергетического барьера (энергии активации), который должен быть преодолен реагирующими веществами. Ферменты, как и катализаторы вообще, влияют на энергию активации, снижая ее, однако в случае ферментов, как правило, достигается относительно большее снижение энергии активации. Это дает огромное возрастание скорости реакции при действии ферментов.

Характерной особенностью ферментативного катализа является его мультиплетность (полифункциональность), т.е. одновременное участие в реакции нескольких (обычно более трех) группировок активного центра и соответственно субстратов. Согласованность каталитического действия всех необходимых групп активного центра достигается в ферментах благодаря упорядоченному их расположению в белковой молекуле. Наличие в активном центре фермента на определенном расстоянии друг от друга группировок, характеризующихся электронодонорными и электроноакцепторными свойствами, приведет к тому, что при взаимодействии с соответствующими группировками субстратов образуются стабилизированные комплексы, и каталитическая реакция происходит внутримолекулярно. Такие реакции, естественно, требуют значительно меньшей энергии активации.

Опыт 1. Специфичность действия амилазы

α -Амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала с образованием мальтозы. Промежуточными продуктами в данной реакции являются различные декстрины (амино-, эритро-, ахро-, мальтодекстрины).

Степень гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины в зависимости от размеров молекул окрашиваются с йодом в раз-

ные цвета (сине-фиолетовый, красно-бурый, желто-бурый), а конечные продукты с йодом окраски не дают. Второй контрольной пробой может быть реакция на наличие свободных альдегидных групп.

Реактивы, посуда и оборудование: 1 %-й раствор крахмала; 1 %-й раствор сахарозы; 10 %-й раствор NaOH; 5 %-й раствор CuSO₄; реактив Люголя; дистиллированная вода, пробирки, пипетки, термостат, электроплитка, водяная баня.

Выполнение работы.

Готовят 2 инкубационные пробы, как указано в таблице, используя в качестве субстратов для амилазы два вещества – крахмал и сахарозу.

№ пробы	Амилаза слюны (мл)	Крахмал (мл)	Сахароза (мл)	Реакция Троммера (+, -)	Реакция с йодом (+, -)
1	1	1			
2	1		1		

Пробы выдерживают в термостате 15 мин при 37 °С. Затем с первой пробой проделывают 2 реакции: Троммера и реакцию с йодом. Со второй пробой проделывают реакцию Троммера.

Реакция Троммера. К содержимому пробирок добавляют 2 мл раствора с массовой долей гидроксида натрия 10 %, при встряхивании по каплям раствор с массовой долей сульфата меди 5 % до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Содержимое пробирок нагревают на водяной бане до изменения цвета. Появление желтого окрашивания, переходящего в красное, указывает на наличие восстанавливающих сахаров (глюкозы и фруктозы), которые в щелочной среде восстанавливают гидроксид меди (II) в оксид меди (I), сами при этом окисляются до альдоновых кислот.

Вносят в таблицу результаты реакций. Делают вывод о специфичности амилазы.

Опыт 2. Специфичность действия сахаразы

Сахараза катализирует расщепление сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы. Действие сахаразы можно обнаружить по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающей положительную реакцию Троммера вследствие наличия в молекуле глюкозы

свободного полуацетального альдегида. Сахароза не обладает восстанавливающими свойствами.

Реактивы, посуда и оборудование: 1 %-й раствор крахмала; 1 %-й раствор сахарозы; 10 %-й раствор NaOH; 5 %-й раствор CuSO₄; реактив Люголя; дистиллированная вода, песок, пробирки, пипетки, термостат, электроплитка, водяная баня.

Выполнение работы.

Выделяют препарат сахаразы из дрожжей (см. лабораторную работу № 1). Готовят две инкубационные пробы, как указано в таблице, используя в качестве субстратов для сахаразы два вещества – крахмал и сахарозу.

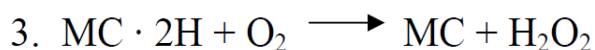
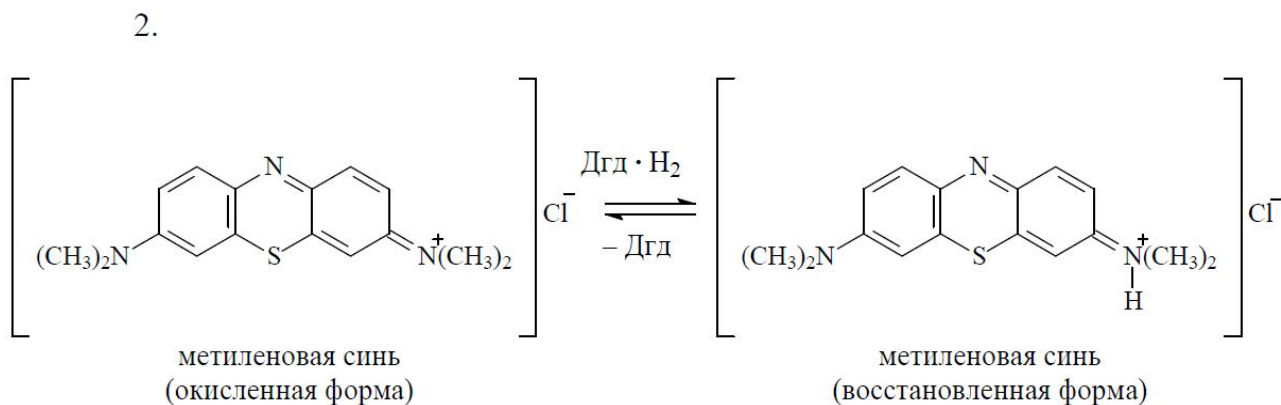
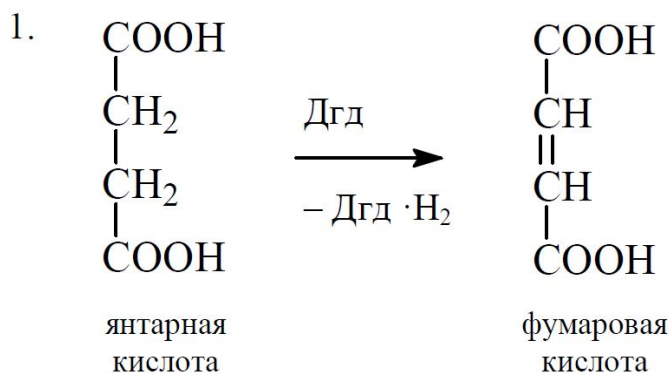
№ пробы	Сахараза (мл)	Крахмал (мл)	Сахароза (мл)	Реакция Троммера (+, -)	Реакция с йодом (+,-)
1	1	1			
2	1		1		

Пробы выдерживают в термостате 15 мин при 37 °С. Затем со второй пробой проделывают две реакции: Троммера и реакцию с йодом. С первой пробой проделывают реакцию Троммера.

Вносят в таблицу результаты реакций. Делают вывод о специфичности сахаразы.

Опыт 3. Специфичность действия сукцинатдегидрогеназы

Сукцинатдегидрогеназа (флавопротеид, обозначенный далее Дгд) окисляет янтарную кислоту в фумаровую путем отнятия от первой двух атомов водорода. Роль промежуточного акцептора водорода в нашем опыте играет метиленовая синь, которая далее отдаст водород кислороду воздуха. Ход процесса можно выразить схемой:



Для получения сукцинатдегидрогеназы мясо (лучше от молодых животных) пропускают через мясорубку и многократно промывают при помешивании водой до тех пор, пока промывные воды не перестанут окрашиваться в розовый цвет от присутствующей в мышцах крови. Промытую и отжатую мышечную кашицу настаивают в течение часа в 0,9 %-м растворе поваренной соли.

В три пронумерованные пробирки помещают по 3–4 мл мышечной кашицы и добавляют: в первую – около 0,5 мл 3 %-го раствора янтарной кислоты, нейтрализованной по лакмусу 10 %-м раствором едкого натра, во вторую пробирку наливают 0,5 мл нейтрализованного 3 %-го раствора яблочной кислоты и а третью пробирку – 0,5 мл воды. В каждую пробирку добавляют по 2–3 капли 0,02 %-го раствора метиленовой сини (для окрашивания смеси в голубой цвет). Содержимое каждой пробирки перемешивают и одновременно помещают в водяную баню при температуре 37–40 °С. Через 5–10 мин наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других. Первую пробирку после обесцвечивания сильно взбалтывают, появляется вновь синее окра-

шивание вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини (восстановленной формы – $MC \cdot H_2$) кислородом воздуха.

Опыт 4. Групповая и абсолютная специфичность

1. *Групповая специфичность действия сахаразы (инвертазы).* Наливают в одну пробирку 2 мл 1 %-го раствора сахарозы, а в другую – 2 мл 1 %-ого раствора раффинозы. Добавляют в обе пробирки по 1 мл раствора дрожжевой сахаразы и, перемешав содержимое каждой пробирки, ставят их на 5–10 мин. в водяную баню при 35–40 °С. После нагревания исследуют содержимое обеих пробирок на присутствие восстанавливающих углеводов, которые при нагревании с фелинговой жидкостью легко окисляются с образованием красного осадка закиси меди. В обе пробирки наливают по 3 мл фелинговой жидкости, хорошо перемешивают и смесь нагревают до кипения (рис. 5 и 6).

Фермент сахараза (β -фруктофуранозидаза) разрывает кислородный мостик между глюкозой и фруктозой (β -гликозидную связь) и в сахарозе, и в раффинозе. Образующиеся углеводы дают при окислении фелинговой жидкостью характерный красный осадок закиси меди.

2. *Абсолютная специфичность уреазы.* Уреаза обладает высокой специфичностью, субстратом для нее является мочеви́на (карбамид) (рис. 7).

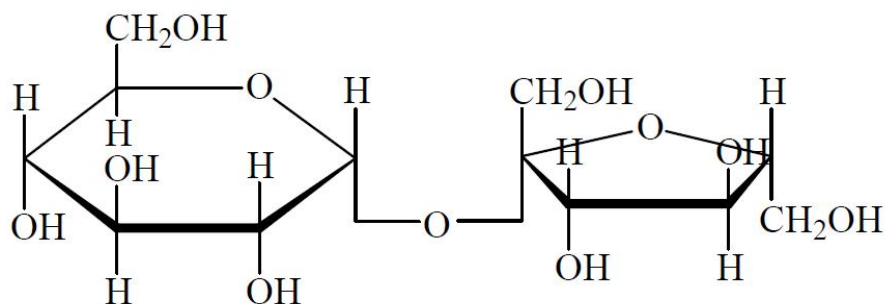


Рис. 5. α -D-глюкопиранозидо-1,2- β -D-фруктофуранозид (сахароза)

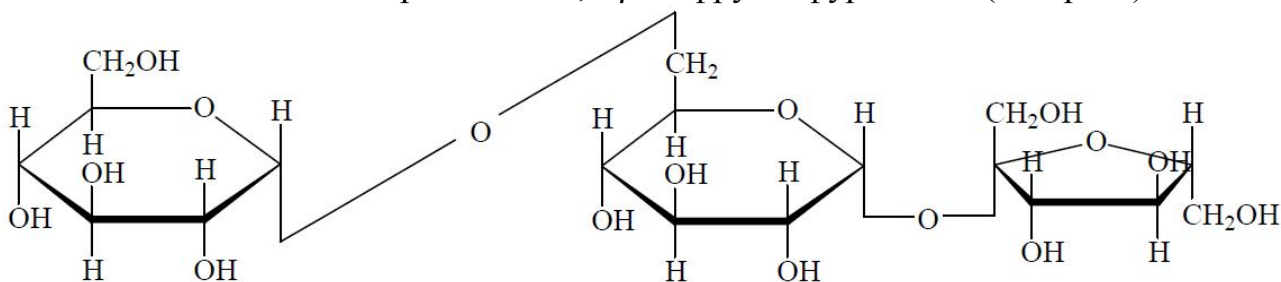


Рис. 6. α-D-галактопиранозидо-1,6-β-D-глюкопиранозидо-1-2-β-D-фруктофуранозид (рафиноза)

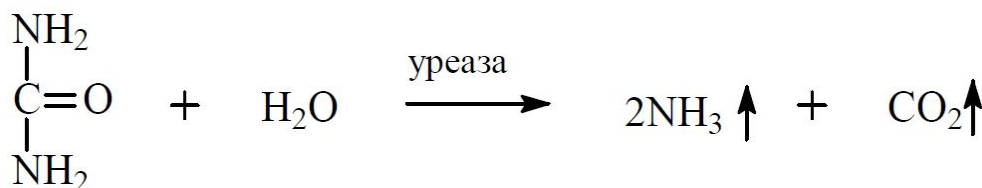


Рис. 7. Специфическое действие уреазы

В одну пробирку наливают 5 %-й раствор мочевины, а в другую – 5 %-й раствор ацетамида. Добавляют при помешивании в каждую пробирку около 1 г соевой муки. В отверстие пробирок вставляют полоску влажной красной лакмусовой бумажки и оставляют пробирки на некоторое время в штативе.

Через несколько минут лакмусовая бумажка в пробирке с мочевиной синееет от выделяющегося аммиака, который можно обнаружить и по запаху. В пробирке с ацетамидом изменения окраски лакмусовой бумажки не наблюдается, что подтверждает высокую специфичность действия уреазы.

Контрольные вопросы:

1. Что такое скорость химической реакции: а) для гомогенной реакции? б) для гетерогенной реакции?
2. Какие факторы влияют на скорость химической реакции?
3. Что такое энергия активации?
4. Что такое константа химического равновесия?
5. Какой принцип положен в основу классификации ферментов? Назовите основные классы ферментов.
6. Каковы основные свойства ферментов?
7. Каково строение ферментов? Что называют коферментом, апоферментом? Какова роль этих структурных компонентов фермента в ферментативном катализе?
8. В чем сущность активации и ингибирования ферментов? Какие факторы оказывают активирующее и ингибирующее действие на ферменты?
9. В чем заключается механизм ферментативного катализа?

Лабораторная работа № 8

Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Цель: Определить присутствие в растворе ряда химических соединений, одни из которых повышают активность ферментов (активаторы), другие, напротив, действуют на них угнетающим образом (ингибиторы, или парализаторы).

Активность ферментов, помимо температуры и рН, в значительной степени зависит от наличия и концентрации в реакционной среде некоторых ионов и соединений. Одни из них усиливают активность ферментов – активаторы, другие действуют угнетающе – ингибиторы. Одни из регуляторов – активаторы, присоединяясь к молекуле неактивного или малоактивного фермента, увеличивают активность до максимальной. Эту функцию часто выполняют ионы металлов: калия, кальция, магния, цинка, меди, железа, марганца, кобальта и анион хлора. Ряд протеиназ (папаин) и аргиназа активируются молекулами цистеина, восстановленного глутатиона, имеющими свободную HS-группу.

Нарастание активности ферментов под действием металлов объясняется тем, что в одних случаях ионы металлов выполняют роль кофакторов, в других – облегчают образование фермент-субстратного комплекса, в третьих – способствуют присоединению кофермента к апоферменту, в четвертых обеспечивают стабилизацию третичной и четвертичной структуры фермента.

Вещества, вызывающие частичное или полное торможение ферментных реакций, называют ингибиторами. К таким веществам относятся соли и ионы тяжелых металлов, дубильные вещества и др.

Ключевые (регуляторные) ферменты имеют аллостерический центр для присоединения активаторов и ингибиторов, которые, присоединившись, вызывают обратимое изменение в структуре активного центра. Аллостерические ферменты выполняют важную роль в регуляции процессов метаболизма. Установлено, роль активаторов чаще всего в этом случае выполняют молекулы собственного субстрата, когда их концентрация в среде достигает определенного уровня, а также АМФ и некоторые гормоны. В ряду ингибиторов для этих ферментов обнаружены неорганические соли, некоторые гормоны, конечный или промежуточный продукт многостадийного процесса распада или синтеза часто служит аллостерическим ингибитором од-

ной из первых реакций (так называемое ингибирование по типу обратной связи).

Опыт 1. Изучение влияния активаторов и ингибиторов на активность амилолитических ферментов

Реактивы, посуда и реактивы: Вода дистиллированная; вытяжка из солода; растворы с массовыми долями: крахмала 1 %-го; хлорида натрия 1 %-го; сульфата меди 1 %-го; серной (или соляной) кислоты 10 %-й; раствор йода в йодиде калия.

Выполнение работы. В качестве источника фермента используют для работы вытяжку из солода.

В штативе располагают тремя рядами 18 пробирок (6 пробирок в каждом ряду). Пробирки каждого ряда нумеруют и во все вносят по 1 мл воды. Затем в первую пробирку добавляют 1 мл вытяжки из солода, тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Содержимое тщательно перемешивают и 1 мл смеси из пробирки 2 переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней пробирки 1 мл смеси после перемешивания выливают. Таким образом, получается ряд разведений, в котором содержание солодовой вытяжки в каждой следующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей.

После разбавления во все пробирки первого ряда наливают по 1 мл воды (контрольный ряд), в пробирки второго ряда – по 1 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1 % и в пробирки 3-го ряда – по 1 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Затем во все пробирки приливают по 1 мл раствора с массовой долей крахмала 1 % в следующем порядке: сначала в первые пробирки всех рядов, после этого во вторые пробирки всех рядов и т.д. Содержимое перемешивают встряхиванием и штатив с пробирками ставят в термостат при 37–38 °С на 30 мин. По окончании инкубации в пробирки каждого ряда добавляют по 1 мл раствора с массовой долей серной (или соляной) кислоты 10 %-й и по 3 капли раствора йода в том же порядке, в каком приливался раствор крахмала. Содержимое перемешивают и отмечают в каждом ряду номер пробирки, в которой реакция на крахмал отрицательная (желтое окрашивание). Результаты опыта заносят в табл. 19, обозначив желтые тона буквой «Ж», красные (красно-коричневые) – «К», фиолетовые – «Ф» и синие – «С».

Таблица 19

Окраска проб с йодом после инкубации

Компоненты	Номера пробирок и доля вытяжки из солода в содержимом, мл					
	1	2	3	4	5	6
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Вода						
Хлорид натрия						
Сульфат меди						

Определяют активатор и ингибитор. Разделив степень разведения контрольной пробы (первый ряд), в которой реакция с йодом отрицательная, на степень разведения проб, давших отрицательную реакцию с исследуемыми веществами, находят во сколько раз активатор или ингибитор стимулирует или тормозит действие амилазы. При высокой активности амилазы солода число пробирок в опыте увеличивают до 7–8.

Опыт 2. Ингибирующее действие иона хлора на дегидрогеназы картофеля

Две картофелины разрезают пополам. Одну половину оставляют для контроля, вторую – посыпают поваренной солью, третью – йодистым натрием, четвертую – бертолетовой солью. Оставляют материал на воздухе на 15–20 мин. За это время срезы трех половинок темнеют, а срез с поваренной солью остается без изменения. Объясните результаты опыта.

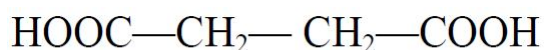
Опыт 3. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности

В три пронумерованные пробирки помещают 3–4 мл мышечной кашицы и добавляют: в первую – 0,4 мл воды; во вторую – 0,2 мл 1 %-го раствора малоновой кислоты и 0,2 мл воды и в третью – 0,4 мл 1 %-го раствора малоновой кислоты. Во все три пробирки добавляют по 1 мл 1 %-го раствора янтарной кислоты, по 2–3 капли 1 %-го раствора метиленовой сини и после перемешивания 3–4 капли вазелинового масла.

Пробирки ставят в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через 3–5 мин наблюдается почти полное исчезновение голубой окраски в пробирке № 1, некоторое уменьшение интенсивности окраски про-

исходит во второй пробирке, в пробирке № 3 –голубая окраска сохраняется полностью [14].

Сукцинатдегидрогеназная активность снижается в присутствии малоновой кислоты, являющейся структурным аналогом янтарной кислоты:



янтарная кислота



малоновая кислота

Контрольные вопросы:

1. Общая характеристика регуляторов ферментов.
2. Характеристика строения и действия активаторов.
3. Химическая природа и механизм действия ингибиторов.
4. Характеристика аллостерических (ключевых) ферментов и их роли в регуляции процессов метаболизма.
5. Схема опыта «Действие некоторых ионов на активность амилаз солода».
6. Каким методом, в этом опыте, определяли активность амилаз солода?
7. Какие соединения в опыте были активаторами и ингибиторами. Объясните механизм их действия.

Лабораторная работа № 9

Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

Ферменты отличаются от неорганических катализаторов исключительно высокой каталитической активностью в условиях нормальной температуры, рН и давления.

Реактивы, посуда и оборудование. Вода дистиллированная; растворы с массовыми долями: крахмала 1 %-го, соляной (или серной) кислоты 10 %-й; водный раствор йода; вытяжка из солода.

Выполнение работы. В пять пробирок наливают по 3 мл раствора с массовой долей крахмала 1 %. В первую и пятую добавляют по 1 мл воды, во вторую – 1 мл вытяжки из солода, в третью и четвертую – по

1 мл раствора с массовой долей серной или соляной кислоты 10 %. Содержимое перемешивают встряхиванием и первые три пробирки ставят в термостат при 37–38 °С, а четвертую и пятую – в кипящую водяную баню. Через 20 мин пробирки из термостата и водяной бани убирают, горячие охлаждают до комнатной температуры и в каждую добавляют по 3 капли водного раствора йода. Расщепление крахмала шло в тех пробирках, где содержимое окрашено в желтые, красные и фиолетовые тона. Записывают окраску содержимого каждой пробирки и на основании полученных результатов делают вывод о том, какие из исследованных веществ являются катализаторами и при какой температуре происходит их каталитическое действие. Результаты оформить в виде табл. 20.

Таблица 20

*Сравнение действия неорганических катализаторов
и ферментов*

№ пробы	Субстрат, 2 мл	Катализатор, 1 мл	Температура инкубации, °С	Окраска с йодом
1.	Крахмал	Вода	37-38	
2.	Крахмал	Амилаза	37-38	
3.	Крахмал	Кислота	37-38	
4.	Крахмал	Кислота	100	
5.	Крахмал	Вода	100	

Контрольные вопросы:

1. В каких пробирках отмечен гидролиз крахмала и какова его глубина?
2. Назовите катализаторы, которые осуществили гидролиз крахмала в данном опыте.
3. Назовите наиболее эффективный катализатор и объясните его преимущества.
4. Как влияла температура на активность небиологического катализатора и почему?

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин, И.В. Исследования в области ферментативного катализа и инженерной энзимологии / И.В. Березин. – М.: Наука, 1990. – 384 с.
2. Березин, И.В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И.В. Березин, А.А. Клёсов. – М.: МГУ, 1976. – 320 с.
3. Волькенштейн, М.В. Физика ферментов / М.В. Волькенштейн. – М.: Наука, 1967. – 200 с.
4. Келети, Т. Основы ферментативной кинетики / Т. Келети. – М.: Мир, 1990. – 350 с.
5. Клёсов, А.А. Ферментативный катализ / А.А. Клёсов, И.В. Березин. – М.: МГУ, 1980. – Ч. 1. – 264 с.
6. Клёсов, А.А. Ферментативный катализ / А.А. Клёсов. – М.: МГУ, 1984. – Ч. 2. – 264 с.
7. Крупянко, В.И. Векторный метод представления ферментативных реакций / В.И. Крупянко. – М.: Наука, 1990. – 144 с.
8. Попов, Е.М. Теоретическое изучение фермент-субстратных взаимодействий / Е.М. Попов, // Молекулярная биология. – 1977. – № 1. (Т. 11) – С. 5 – 41.
9. Резенгарт, В.И. Ферменты – двигатели жизни / В.И. Резенгарт. – Л.: Наука, 1983. – 160 с.
10. Уолтер, Ч. Кинетика ферментативных реакций / Ч. Уолтер. – М.: Мир, 1969. – 128 с.
11. Ферменты. Лабораторный практикум: учебное пособие / В.С. Гамаюрова, М.Е. Зиновьева. – СПб.: Проспект Науки, 2011. – 256 с.
12. Фёрш, Э. Структура и механизм действия ферментов / Э. Фёрш; [пер. с англ.]. – М.: Мир, 1980 – 432 с.
13. Хайдеров, А. Развитие отечественной энзимологии / А. Хайдеров. – Душанбе: Дониш, 1990 – 156 с.
14. Химическая и биологическая кинетика / под ред. Н.М. Эмануэля. – М.: МГУ, 1983. – 296 с.
15. Чернов, Н.Н. Ферменты в клетке и пробирке / Н.Н. Чернов // Соревский образовательный журнал. – 1996. – № 5. – С. 28–34.
16. Яковлев, В.А. Кинетика ферментативного катализа / В.А. Яковлев. – М.: Наука, 1965. – 248 с.

17. Eyring H., Limpy R., Spikes I.D. The mechanism of enzyme action. – N.Y.: Hopkins Press, 1954 – 540 p.
18. Gutfreund H. An introduction to – the steady of enzymes. – Oxford, 1965. – P. 86
19. Jencks W.P. The mechanism of enzyme action. – In: Current aspects of biochemical energetics. – N.Y.: Acad. Press, 1966. – P. 273 – 300.
20. Karush F. Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin. // J. Amer. Chem.Soc. – 1950 – Vol. 72, № 6 – P. 2705 – 2713.
21. Kim Y.D., Lumry R. Studies of the chymotrypsinogen family XII "A" type substates of α -chymotrypsin at neutral and alkaline pH values. // J. Amer. Chem. Soc. – 1971. – Vol. 93, № 3 – P. 1003 – 1013.
22. Segel I.H. Enzyme kinetics – L.: Wiley, 1975. – P. 100.

Учебное издание

*Кузнецова Елена Анатольевна
Черепнина Людмила Васильевна*

**ФЕРМЕНТЫ: СТРУКТУРА,
СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ**

Учебно-методическое пособие

Редактор И.А. Хлюпина
Технический редактор Н.А. Соловьева

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования
«Государственный университет - учебно-научно-
производственный комплекс»

Подписано к печати 10.06.2013 г. Формат 60x90 1/16.

Усл. печ. л. 11,0. Тираж 100 экз.

Заказ № _____

Отпечатано с готового оригинал-макета
на полиграфической базе ФГБОУ ВПО «Госуниверситет - УНПК»,
302030, г. Орел, ул. Московская, 65.