Ферментная биотехнология.

1. Ферменты: классификация, строение и физико-химические свойства.
2. Принцип действия ферментов и кинетика ферментативных реакций.
3. Ферменты животного, растительного и микробного происхождения.
4. Иммобилизация ферментов.

1. Ферменты: классификация, строение и физико-химические свойства.

Введение.

Одним из важных направлений современной биотехнологии является получение на основе культивирования микроорганизмов и использование различных ферментных препаратов, которые широко используются в различных отраслях промышленности, медицине, сельском хозяйстве, химическом анализе. В животноводстве Ф. применяются в кормлении с.-х. животных для улучшения усвояемости кормов, а также в ветеринарии для профилактики и лечения желудочных и паразитарных заболеваний.

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и производство Ф.П. постоянно растёт. Это связано с тем, что ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможны осуществление многих биохимических процессов и жизнь в целом..

Применение ферментных препаратов позволило улучшить показатели и выходы в различных биотехнологических процессах, усовершенствовать кормопроизводство, повысить усвояемость кормов, сделать более целенаправленным и эффективным действие синтетических моющих средств, улучшить качество косметических препаратов, наладить производство лекарственных и профилактических средств для медицинской промышленности и т. д.

По сравнению с неорганическими катализаторами: ферменты - нетоксичны, не требуют затрат топлива, что выгодно с экономической и экологической точек зрения. Ферменты по объёму производства занимают 3 место после аминокислот и антибиотиков.

Ферменты (энзимы) (от лат. fermentum - закваска) - это белки, выполняющие роль катализаторов в живых организмах. Основные функции ферментов - ускорять превращение веществ, поступающих в организм и образующихся при метаболизме (для обновления клеточных структур, для обеспечения его энергией и др.), а также регулировать биохимические

процессы (напр., реализацию генетической информации), в т.ч. в ответ на изменяющиеся условия.

Известно и охарактеризовано примерно 3700 ферментов.

Номенклатура ферментов

Рациональные (систематические) названия ферментов включают названия субстратов и характер катализируемой реакции. Рациональные названия громоздки и за ферментами часто сохраняются тривиальные (рабочие) названия. Например, фермент, катализирующий реакцию: АТФ + гексоза = гексозо-6-фосфат + АДФ, имеет рациональное название АТФ: D-гексозо- 6-фосфотрансфераза, а рабочее – гексокиназа.

Классификация ферментов

Каждый фермент по классификации ферментов (КФ, ЕС) обозначается четырьмя цифрами: 1–класс, 2–подкласс, 3–подподкласс, 4–номер фермента в списке. КФ 2.7.1.1. означает: класс 2 – трансферазы; подкласс 7 – перенос фосфата; подподкласс 1 – алкогольная группа – акцептор фосфата.

Название – гексокиназа, или АТФ:D-гексозо-6- фосфотрансфераза.

Все ферменты делятся на 6 классов:

1.Оксидоредуктазы-ускоряют реакции окисления-восстановления.

2.Трансферазы- ускоряют реакции переноса различных групп атомов.

3. Фосфотрансферазы - ускоряютперенос фосфорных остатков внутри одной молекулы без участия АТФ.

4. Аминотрансферазы- катализируют реакции переаминирования аминокислот с кетокислотами.

5. Гидролазы- участвуют в процессах гидролитического распада сложных органических соединений.

6.Лиазы- катализируют распад сложных эфиров, спиртов с органическими и неорганическими кислотами.

Строение ферментов

По строению ферменты делятся на простые (однокомпонентные (пепсин, трипсин, лизоцим) и сложные (двухкомпонентные - аминотрансферазы – пиридоксальфосфат, пероксидазы – гем). Простой фермент состоит только из белковой части; в состав сложного фермента входит белковая и небелковая составляющие (простатическая группа.) Сложный фермент называют холоферментом. Белковую часть в его составе называют апоферментом, а небелковую - коферментом.

Апофермент определяет специфичность фермента, а соединение белка с простетической группой повышает каталитическую активность.

Простетическими группами многих ферментов являются витамины и их производные, например, простетические группы ряда окислительно-

восстановительных ферментов содержат производные ниацина (витамина РР) или рибофлавин (витамин B_2). В состав простетических групп ферментов могут входить производные витаминов B_1, B_6, B_{12}, а также пантотеновая, фолиевая кислоты и биотин.

В состав многих ферментов входят металлы, придающие им активность. Такие металлы называются кофакторами. Например, кофактором α-амилазы является кальций, а каталазы — железо. Ряд ферментов усиливает свою активность в присутствии магния, марганца, цинка, меди, молибдена.

Активный центр - область фермента, в которой происходит связывание и превращение субстрата. Активный центр формируют R-группы аминокислот полипептидной цепи (чаще SHгруппа цистеина, ОН-группа серина, ε-аминогруппа лизина, имидазольное кольцо гистидина, свободные карбоксильные группы), в сложных ферментах в активный центр входит небелковый компонент.

В активном центре выделяют два участка: якорный (контактный, связывающий) – отвечает за связывание и ориентацию субстрата в активном центре, каталитический – непосредственно отвечает за осуществление реакции. Фермент может иметь аллостерический центр – участок полипептидной цепи, служащий для контакта с эффектором (аллостерическим регулятором активности).

В составе простого и сложного фермента выделяют субстратный, аллостерический и каталитический центры.

Каталитический центр простого фермента представляет собой уникальное сочетание нескольких аминокислотных остатков, расположенных на разных участках полипептидной цепи. Субстратный центр простого фермента - это участок белковой молекулы фермента, который отвечает за связывание субстрата. Аллостерический центр представляет собой участок молекулы фермента, в результате присоединения к которому какого-то низкомолекулярного вещества изменяется третичная структура белковой молекулы фермента, что влечет за собой изменение его активности. Аллостерический центр является регуляторным центром фермента.

В сложных ферментах роль каталитического центра выполняет кофермент, который связывается с апоферментом в определенном участке - кофермент связывающем домене.

Ферменты присутствуют во всех живых клетках и способствуют превращению одних веществ (субстратов) в другие (продукты). Они выступают в роли катализаторов практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах.

Общие свойства ферментов

1. Катализируют только термодинамически возможные реакции.

2. Не изменяют направления реакции.

3. Не смещают равновесия в сторону прямой или обратной реакции.

4. Образуют с субстратами высокореакционные промежуточные комплексы.

5. Не расходуются в процессе реакции.

2.Принцип действия ферментов и кинетика ферментативных реакций.

Механизмы действия ферментов.

1) По Фишеру: субстрат подходит к ферменту (т.е. активному центру), как ключ к замку.

2) По Кошланду: субстрат изменяет конформацию активного центра фермента, делая ее комплементарной (рука-перчатка).

Свойства ферментов

Характерной особенностью ферментов является их высокая каталитическая активность, в значительной степени превосходящая активность химических катализаторов. Ферменты обладают способностью ускорять реакции.

Энергия активации – это избыток энергии по сравнению со средней энергией молекул при данных условиях, необходимый для начала реакции. Ферменты снижают энергию активации катализируемой реакции.

Механизм действия ферментов, как и химических катализаторов, связан с тем, что они снижают энергию активации, необходимую для осуществления определенной реакции, направляя ее обходным путем через промежуточные реакции, которые требуют значительно меньше энергии активации. Однако ферменты гораздо сильнее понижают энергию активации, чем химические катализаторы. Например, для гидролиза сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы без участия катализатора необходима энергия активации около 133,76 кДж (32 ккал) на грамм-молекулу. Если реакция катализируется неорганическим катализатором HCl, то энергия активации составляет 107,0 кДж (25,6 ккал), а если происходит ферментативный катализ, то она снижается до 39,2 кДж (9,4 ккал).

Второй особенностью ферментов является *избирательность их действия.* Например, инвертаза разлагает сахарозу, но не действует на другие дисахариды, в частности, мальтозу, т.е. некоторые ферменты катализируют превращение практически только одного какого-либо вещества.

Многие ферменты действуют только на определенный вид связей. Например, пепсин гидролизует пептидные связи в молекуле белка,

образованные ароматическими аминокислотами. Ряд ферментов катализирует определенные группы реакций. Так, ферменты, называемые липазами, катализируют гидролиз любых сложных эфиров, включая и жиры.

Третьим свойством, отличающим ферменты от химических катализаторов, является их *большая лабильность, т.е. чувствительность к внешним воздействиям среды* (влиянию температуры, концентрации водородных ионов, наличию активаторов и ингибиторов и др.). Ферменты термолобильны-37-40С.

Преимуществом ферментов перед химическими катализаторами является то обстоятельство, что они действуют при нормальном давлении и при относительно низких температурах - от 20 до 70^0С.

Способы выражения ферментативной активности

• Единица активности фермента – количество фермента, которое в стандартных условиях катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в 1 мин (1 МЕ = 1 мкмоль/мин).

• 1 КАТАЛ – количество фермента, способное в течение 1 с обеспечить превращение 1 моля субстрата в стандартных условиях. 1 КАТАЛ = 6 · 107 МЕ.

• Удельная активность – число единиц ферментативной активности, приходящееся на 1 мг белка (1 мкмоль/мг белка · мин).

• Молекулярная активность – число молей субстрата, которые подвергаются превращению молекулой фермента за 1 мин.

• Активность каталитического центра – число молекул субстрата, которые претерпевают превращение за 1 мин в расчете на 1 каталитический центр.

• Число оборотов фермента – число молекул субстрата, претерпевающих превращение за 1 мин в расчете на 1 активный центр или 1 активную молекулу фермента. Для большинства ферментов число оборотов составляет 1-10 тысяч в мин.

Кинетика ферментативных реакций

Кинетика – это учение о скоростях реакций и их зависимости от различных факторов.

1. Зависимость скорости реакции от температуры. Скорость ферментативной реакции возрастает в 2-4 раза при повышении t° на 10 °С до t° ≈ 55-60 °С (t° денатурации фермента). У некоторых микроорганизмов до 100 °С

2. Зависимость скорости реакции от pH. Для каждого фермента существует оптимальный интервал pH среды для проявления максимальной активности. Например, оптимальные значения pH для пепсина 1,5-2,5, трипсина 8,0-8,5, амилазы слюны 7,2, аргиназы 9,7, кислой фосфатазы 4,5- 5,0, сукцинатдегидрогеназы 9,0

3. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата. При увеличении концентрации субстрата скорость реакции вначале возрастает (за

счет подключения к реакции новых молекул фермента); затем наблюдается эффект насыщения (все молекулы фермента взаимодействуют с молекулами субстрата). При дальнейшем увеличении концентрации субстрата скорость реакции может снижаться (субстратное торможение).

4. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента является линейной (график 1). Нелинейная зависимость при высоких концентрациях фермента (график 2) наблюдается вследствие нехватки субстрата или активатора, агрегации молекул фермента и др., при небольших концентрациях фермента может быть результатом присутствия в инкубационной среде токсических примесей, связывающихся с ферментом и инактивирующих его.

3. Ферменты животного, растительного и микробного происхождения.

Ферменты растительного происхождения

В качестве растительных источников для получения ферментов может использоваться проращенное зерно злаковых культур – солод, который также может применяться непосредственно как неочищенный ферментный препарат, в основном, амилолитического действия.

В ГОСНИИХП совместно с МГУПБ проводились исследования по использованию в хлебопечении проращенной сои как источника ферментов. Установлено, что липоксигеназа, входящая в ее состав, положительно влияет на свойства теста и качество хлеба из пшеничной муки высшего сорта.

В тропических и субтропических странах для получения ферментов, в частности протеолитической группы используют латекс дынного дерева, латекс фикусовых растений, например листья и побеги инжира и сок зеленой массы ананаса.

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

Ферменты микробного происхождения

Наиболее перспективным источником ферментов являются микроорганизмы. В качестве продуцентов ферментных препаратов используются культуры представителей различных таксономических групп – бактерий, актиномицетов, микроскопических и высших базидиальных грибов, среди которых можно найти продуцента практически всех ферментов, участвующих в круговороте органических веществ. Промышленностью

налажено применение как природных штаммов микроорганизмов, выделенных из естественных объектов, так и полученных искусственной селекцией с применением мутагенов.

Преимуществом использования микроорганизмов для получения ферментных препаратов является сравнительно короткий цикл роста (16-100 ч), неприхотливость к составу питательной среды, способность легко переключаться с синтеза одного фермента на другой, а также генетическая стабильность по признаку синтеза фермента.

Следует отметить, что подавляющее количество применяемых в промышленности ферментных препаратов являются комплексными и содержат помимо основного фермента значительное количество сопутствующих ферментов и белков, в связи с чем в технологии ферментов препараты часто классифицируют по основному компоненту. Так, различают амилолитические, протеолитические, липолитические, пектолитические и другие виды препаратов.

В качестве бактериальных продуцентов нейтральных и щелочныхпротеолитических ферментов в промышленности наиболее часто используются различные штаммы бактерии рода Bacillus, в частности Bacillus subtilis, Bacillusmesentericus, Bacillus brevis, Bacillus cereus и Bacillus licheniformis.

Широко известны как продуценты протеолитических ферментовмикроскопические грибы рода Aspergillus, Rhizopus, Penicillium, Strepyomyces,Pseudomonas и Mycor, способные синтезировать не только нейтральные и щелочные, но и кислые протеазы. Наиболее полно изучены протеазы у различных представителей рода Aspergillus и Penicillium. Так, например, установлена молекулярная масса протеаз Penicillium wortmanii и определены оптимальные условия их действия, находящиеся в температурном диапазоне 20-40 °С и области pH от 6,0 до 9,0.

Значительный интерес вызывают протеазы, полученные из культур актиномицетов, в частности Actinomyces thermovulgaris, Actinomyces fradiae,Streptomyces griseus. Указанные штаммы синтезируют богатейшие комплексы протеаз с различной субстратной специфичностью и действующие в широких диапазонах pH.

В литературе описано использование актиномицетов в качестве продуцентов кератиназы, эластазы, коллагеназы.

Однако исследователями отмечается существенный недостаток, не позволяющий использовать ферменты актиномицетов в пищевой промышленности, суть которого в состоит том, что эти микроорганизмы наряду с протеазами активно синтезируют антибиотики.

Источниками амилолитических ферментов являются бактериальные и грибные культуры. Наиболее активными продуцентами амилаз являются грибы родаAspergillus и Rhizopus, такие как Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Aspergillusawamory, Rhizopus delamar и Rhizopus niveus.

Микробные продуценты амилолитических ферментов активно изучаются российскими учеными. Так, в ГУ ВНИИПАКК проведена разработка технологии получения комплекса амилолитических ферментов грибной культуры Aspergillusniger, обладающих способностью сохранять активность в кислой области pH при повышенных температурах. Максимальная активность указанного комплекса проявляется при температуре 55-60 °С и pH 4,5-5,0.

Пектолитические ферменты в промышленности получают с использованием бактерии рода Clostridium и Bacillus, такие как Bacillus macerans, Bacillus polymyxa,Bacillus felseneus, Clostridium multifermentas, Clostridium felsineum и микроскопические грибы рода Aspergillus, Fusarium и Penicillium: Aspergillus niger,Aspergillus oryzae, Asp ergillus foetidus, Fusarium moliniforme, Penicillium digitatus,Penicillium expansum, Penicillium italicum.

Микробными продуцентами ферментов разрушающих целлюлозу являются анаэробные бактерии рода Clostridium, а также микроскопические грибы родаAspergillus, Trichoderma, Fusarium, Cellulomonas, Geotrichum такие как Aspergillusamstelodamy, Aspergillus fumigatus, Aspergillus oryzae, Trichoderm a koningii,Trichoderma lignorum, Fusarium culmotum, Fusrium lini, Fusarium solani , Geotrichumcandidum.

В литературе встречаются упоминания об использовании для производства целюлаз микроскопического гриба Trichoderma viride, способного также синтезировать ксиланазу, как сопутствующий фермент. М.В. Гернет исследован процесс получения целлюлаз штамма Trichoderma longibranchiatum глубинным и поверхностным способом.

Наиболее перспективным методом получения ферментов из источников различного происхождения является сорбция на макропористых носителях – сорбентах, не изменяющих структуру ферментов.

В настоящее время с использованием животных, растительных и микробных источников мировой промышленностью выпускается около 250 наименований ферментных препаратов.

Следует отметить, что по статистическим данным за 2000 год в нашей стране было выпущено всего 7,5 тыс. усл. т ферментов в год, большинство из которых уступают по качеству и цене мировому уровню, при потребности порядка 40 тыс. т. Наибольший удельный вес среди промышленных

ферментных препаратов занимают препараты, гидролизующие белковые вещества – протеиназы.

Ферменты животного происхождения были одними из первых ферментов, выделенных в кристаллическом состоянии, и именно они стали объектами для расшифровки структуры активного центра и механизма каталитической активности. Сырьем для их промышленного производства могут служить поджелудочная железа, содержащая большое количество разнообразных ферментов, в частности химотрипсин, коллагеназу, эластин, трипсин, амилазу, липазу, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней, сычуги крупного рогатого скота, из которых выделяют пепсин и липазу, сычужки молочных телят и ягнят, содержащие реннин, и другие органы животных.

Помимо сырья, собираемого на мясокомбинатах, специалистами Калининградского государственного технического университета показана возможность получения ферментов протеолитического действия из двустворчатых моллюсков.

4. Иммобилизация ферментов.

Известно, что использование ферментов, как сычужного, так и микробиального происхождения, производится однократно, в связи с этим являются актуальными использование и разработка приемов, позволяющих многократно использовать ферменты. Одним из таких приемов является иммобилизация, т. е. включение молекул фермента в какую-либо изолированную фазу, которая отделена от фазы свободного раствора, но способна обмениваться с находящимися в ней молекулами субстрата, эффектора или ингибитора.

Иммобилизованные ферменты имеют ряд преимуществ в сравнении со свободными молекулами. Прежде всего, такие ферменты, представляя собой гетерогенные катализаторы, легко отделяются от реакционной среды, могут использоваться многократно и обеспечивают непрерывность каталитического процесса. Кроме того, иммобилизация ведет к изменению свойств фермента: субстратной специфичности, устойчивости, зависимости активности от параметров среды. Иммобилизованные ферменты долговечны и в десятки тысяч раз стабильнее свободных энзимов.

Ферменты - вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает создание иммобилизованных ферментов. Начало этому методу было положено в 1916 году, когда Дж.Нельсон и Е.Гриффин адсорбировали на угле инвертазу и показали, что она сохраняет в таком виде каталитическую активность. Сам термин "иммобилизованные ферменты узаконен в 1971 году, и

означает любое ограничение свободы передвижения белковых молекул в пространстве.

Сущность иммобилизации ферментов — прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему. Прикрепление фермента к носителю осуществляется адсорбционно, химической связью или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (в капсулу и т. п.). При этом допускается прикрепление фермента только за счет функциональных групп, не входящих в активный центр фермента и не участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса. Носитель фермента или матрица может иметь вид зернистого материала, волокнистой структуры, пластинчатой поверхности, пленок или тканей, полых волокон, трубочек, капсул и т. д. Имеет значение размер частиц носителя. Важно иметь большую поверхность, поэтому рекомендуются небольшие частицы диаметром 0,1—0,2 мм. Носитель фермента может быть как природное вещество, так и синтетический полимер.

Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками:

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук. Иммобилизовать ферменты можно как путем связывания на нерастворимых носителях, так и путем внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными соединениями, а также путем присоединения к растворимому полимеру.

Производство ферментных препаратов осуществляется поверхностным или глубинным способом (рис.1). В основе поверхностного способа лежит выращивание микроорганизмов на рыхлых питательных средах. Этот способ

используется для культивирования микроскопических грибов. При глубинном способе культивирования микроорганизмы выращиваются в толще жидких питательных сред. В этих условиях культивируют как аэробные, так и анаэробные микроорганизмы. Из поверхностных культур труднее получить высокоочищенные препараты, так как они содержат много балластных веществ. Питательные среды подбирают в зависимости от физиолого-биохимических особенностей микроорганизма-продуцента и того фермента, который необходимо получить.

Основную часть ферментов, получаемых промышленным способом, составляют гидролазы. К ним относятся в первую очередь амилолитические ферменты: α-амилаза, β-амилаза, глюкоамилаза. Их основная функция - гидролиз крахмала и гликогена. Крахмал при гидролизе расщепляется на декстрины, а затем до глюкозы. Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

Продуцентами амилолитических ферментов являются микроскопические грибы родов Aspergillus, Rhisopus (видов oryzae, niger, awamori, batatae, foetidus, flavus и др). Большое количество амилолитических ферментов синтезируют также спороносные бактерии рода Bacillus (видов subtilis, mesentericus, brevis и др.).

Протеолитические ферменты образуют класс пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность - селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин - на связь между аргинином и лизином. Среди продуцентов протеолитических ферментов практический интерес представляют грибы рода Aspergillus, Penicillium, Rhisopus. Спороносные бактерии рода Bacillus способны образовывать протеолитические ферменты.

Протеазы находят широкое применение в разных отраслях промышленности: молочной - производство сыров, творога; мясной - для смягчения мяса; кожевенной - смягчение шкур; парфюмерной - добавки в зубную пасту, кремы, лосьоны; производство моющих средств - добавки для удаления загрязнений белковой природы; медицина - при лечении воспалительных процессов, тромбозов и т. д.

Пектолитические ферменты уменьшают молекулярную массу и снижают вязкость пектиновых веществ. Пектиназы делятся на две группы - гидролазы и трансэлиминазы. Гидралазы отщепляют метильные остатки или разрывают гликозидные связи. Трансэлиминазы ускоряют негидролитическое расщепление пектиновых веществ с образованием двойных связей.

Применяются в текстильной промышленности (вымачивание льна перед переработкой); в виноделии - осветление вин; при консервировании фруктовых соков.

Продуцентами пектолитических ферментов являются бактерии, микроскопические грибы, дрожжи. Наибольшая продуцирующая способность обнаружена у грибов рода Aspergillus, Penicillium. Продуцентами пектиназы могут быть также анаэробы - спороносные бактерии рода Clostridium. Активными продуцентами цитолитических ферментов являются грибы Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Trichoderma (вид viride).

Целлюлолитические ферменты очень специфичны, их действие проявляется в деполимеризации молекул целлюлозы. Обычно используются в виде комплекса, доводящего гидролиз целлюлозы до глюкозы (в гидролизной промышленности). В медицинской промышленности их используют для выделения стероидов из растений; в пищевой - для улучшения качества растительных масел; в сельском хозяйстве - в качестве добавки в комбикорма для жвачных животных. Целлюлолитические ферменты синтезируются в основном грибами, относящимися к различным видам: Aspergillus amstelodamy, Aspergillus fumigatus, Aspergillus oryzae, Aspergi llus terreus, Fusarium culmorum, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Penicillium notatum, Rhizopus oryzae, Trichoderma lignorum, Trichoderma virida, Trichoderma koningii и многие другие. Они широко распространены в природе (в почве, в организмах животных, в растительных остатках).

Молокосвертывающие ферменты. В основе технологии производства сыров лежит способность казеина молока коагулировать под воздействием протеолитических ферментов, получивших название молокосвертывающих. Общее свойство молокосвертывающих ферментов, применяемых в сыроделии, - способность гидролизовать казеин по связи Фен105-Мет106 называют молокосвертывающей активностью, в отличие от общей протеолитической активности - способности расщеплять другие связи в белках. Общая протеолитическая активность ферментов, применяемых в сыроделии, должна быть как можно более низкой по отношению к молокосвертывающей.

Реннин (химозин) - *фермент* из класса *гидролаз,* который вырабатывается в желудочных железах млекопитающих. У жвачных животных вырабатывается железами *сычуга* (4-го отдела желудка), отсюда одно из его названий - сычужный фермент. Вторым главным составляющими сычужного фермента являются пепсин.

Сычуг, полученный из желудка теленка молочного возраста (до 3 месяцев), содержит 88-94 % химозина и 6-12 % пепсина. Сычуг из желудка более взрослого животного, получающего обычный корм, содержит 90-94 % пепсина

и всего 10 % химозина. Химозин, полученный из желудка молочного теленка, наиболее активен при pH 6,2-6,4, а активность пепсина располагается в области повышенной кислотности при pH 1,7-2,3, поэтому эти ферменты дополняют друг друга, и их смеси нашли широкое применение в сыроделии.

В настоящее время в связи с дефицитом сычужного фермента из-за нецелесообразности забоя молодняка в молочный период жизни и снижения поголовья скота при резком возрастании его продуктивности широко используются другие ферменты, близкие по действию к сычужному: пепсины свиной, говяжий, птичий, а также энзимы, продуцируемые некоторыми микроорганизмами.

Наряду с ферментными препаратами животного и микробного происхождения для сквашивания молока используются также препараты растительного происхождения. Экстракты растений, которые традиционно считались ферментными коагулянтами молока, такими не являются, так как они имеют другой механизм действия или, возможно, они содержат микробы, обладающие способностью к свертыванию молока. Примером использования растительного экстракта может служить выработка португальского сыра Sena da Estrela из овечьего молока с помощью водной вытяжки цветков кардона (артишока).

Методические указания

Оборудование и материалы: весы лабораторные аналитические, водяная баня, термостат, секундомер, ФЭК, pH-метр, пипетки на 5 и 10 $см^3$, мерный цилиндр на 100 $см^3$, колбы на 50-100 $см^3$, бюретки на 25 $см^3$, стаканы на 100 $см^3$, чашка фарфоровая, пестик, шпатель, термометр со шкалой 0-100 С, 1 %-й раствор фенолфталеина, 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 3 %-й раствор сычужного фермента, препарат амилазы, 1 %-й раствор крахмала, ацетатный буферный раствор с pH 4,7, 0,1 М раствор соляной кислоты, основной раствор йода.

Подготовить образцы к исследованию.

Приготовить рабочие растворы ферментных препаратов.

Ads by **optAd360**

Исследовать влияние температуры и дозы протеолитического фермента на процесс свертывания молока.

Исследовать амилолитическую активность ферментов.

Сравнить полученные результаты и сделать выводы.

Техника определения

Изучение влияния температуры и дозы протеолитического фермента на процесс свертывания молока

Для свертывания молока в сыроделии применяют препараты сычужного фермента и пепсин, который содержит два компонента - химозин (реннин) и пепсин (А и В), оба свертывают молоко, но химозин более активен. Молокосвертывающая активность сычужного фермента зависит от соотношения компонентов и от свойств молока: кислотности, температуры и содержания в нем ионов кальция. Фермент стабилен при pH 5,3-6,3, имеет оптимальную активность при pH 6,2 и температуре 40 °С. Увеличение дозы фермента ускоряет процесс сычужного свертывания молока - сокращается общая продолжительность гелеобразования и его отдельных стадий.

Приготовление рабочего раствора фермента. Рабочий 0,03 %-й раствор сычужного фермента (пепсина) готовят

непосредственно перед проведение исследования из 3 %-го. Для приготовления рабочего раствора отмеряют 1 см3 3 %-го раствора фермента, вносят в мерную колбу на 100 $см^3$ и доводят дистиллированной водой до метки.

Подготовить образцы сырого молока для исследований. Определить титруемую и активную кислотность молока.

В стаканы отмерить по 50 $см^3$ молока и подготовить по схеме, представленной в табл. 5. Ставятся 2 серии параллельных опытов с применением сычужного фермента и пепсина.

Молоко подогреть до требуемой температуры и в каждый образец внести раствор фермента. Тщательно перемешать стеклянной палочкой. Палочку после каждого образца сполоснуть водой, протереть сухим бумажным фильтром или салфеткой.

Таблица 5. Схема исследования и результаты

Обр ец молок	Температ ра свертывани °С	Количество 0,03 % го раствора фермен $см^3$	Продолжительность свертывания молока применением, мин	
			препарата сычужного фермента	препарата пепсина
8.	40	10		
9.		5		
10.	30	10		
11.		5		
12.	20	10		
13.		5		

Ads by **optAd360**

После внесения фермента молоко тщательно перемешать и оставить в покое до готовности сгустка. Готовность определяют визуально. Через каждые 2-3 мин стакан с образцом слегка наклоняют, чтобы определить начало свертывания молока. Затем оставляют в покое. Окончание процесса свертывания молока определяют: через каждые 2-3 мин аккуратно надавливают на поверхность шпателем или стеклянной палочкой у стенки сосуда. Если при незначительном разрушении сгустка начинает отделяться прозрачная сыворотка, процесс закончен.

Продолжительность свертывания отмечают по секундомеру и записывают в таблицу. Рассчитать дозу фермента, вносимую в каждый образец молока. Построить графики зависимостей продолжительности свертывания молока от дозы ферментных препаратов при разных температурах свертывания.

Сделать выводы.

Определение амилолитической активности ферментов (АС)

Метод основан на гидролизе крахмала ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы.

Амилолитическая активность характеризует способность ферментов катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы и выражается числом единиц указанных ферментов в 1 г препарата (или на 1 мг белка).

За единицу активности амилолитического фермента (АС) принято такое количество фермента, которое в строго определенных условиях температуры, pH и времени действия катализирует до декстринов различной молекулярной массы 1 г растворимого крахмала, что составляет 30 % от введенного в реакцию.

За единицу амилолитической активности (АС) принято такое количество фермента, которое при определенных значениях pH (6,0 - для бактериальных и 4,7 - для грибных амилаз) и температуре 30 °С за 1 ч катализирует гидролиз 1 г крахмала до декстринов различной молекулярной массы, что составляет 30 % крахмала, введенного в реакцию. Активность выражается в ед. АС/г (для порошкообразного) или в ед. АС/см^3 (для жидкого) анализируемого ферментного препарата.

Техника определения

В 2 пробирки наливают по 5 мл 1 %-го раствора крахмала, ставят в термостат с температурой 30 С и выдерживают 5-10 мин. Не вынимая пробирки из термостата, наливают в первую пробирку 2,5 см

Ads by **optAd360**

^{3} дистиллированной воды (контрольная), а во вторую - 2,5 см^3 ферментного раствора (опытная). Смеси быстро перемешивают и выдерживают в термостате 10 мин. Через 10 мин из контрольного и опытного растворов отбирают по 0,25 см^3 и переносят в одну из колб с предварительно налитыми 25 см^3 рабочего раствора йода. Содержимое колб перемешивают. Полученные растворы приобретают следующую окраску: контрольный - синюю, опытный - фиолетовую различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала. Непосредственно после смешивания растворов определяют их оптическую плотность на ФЭК с максимумом светопоглощения 656 нм, пользуясь кюветами с толщиной поглощающего слоя 10 см^3. Контрольным раствором при колориметрировании является дистиллированная вода. Оптическая плотность контрольного раствора (Д1) соответствует количеству исходного субстрата - крахмала. Оптическая плотность опытного раствора ($Д_2$) соответствует количеству крахмала, оставшегося после действия фермента. Разница между значениями оптической плотности соответствует прогидролизованному количеству крахмала.

Расчет активности фермента

Количество прогидролизованного крахмала С в граммах определяют по формуле

$$C = \frac{(Д_1 - Д_2)0,05}{Д_1},$$

где Д1 - оптическая плотность контрольного раствора; $Д_2$ - оптическая плотность опытного раствора; 0,05 - количество крахмала, взятое для испытания в качестве субстрата, г.

Если количество прогидролизованного крахмала меньше 0,02 или больше 0,04 г, испытание повторяют. При приготовлении рабочего раствора фермента берут большее или меньшее количество исходного раствора для разбавления.

Амилолитическую активность (ед/г) препарата бактериального происхождения (АС) определяют по формуле

$$AC = \frac{(5,885C + 0,001671)1000}{n},$$

где С - количество прогидролизованного крахмала, г; n - количество ферментного препарата, взятое для испытания, мг; 1000 - коэффициент пересчета мг в г; 5,885 и 0,001671 - коэффициенты расчетного уравнения.

Ads by **optAd360**

Коэффициенты расчетного уравнения получены при математической обработке экспериментальных данных зависимости количества прогидролизованного крахмала от количества фермента, взятого для

испытания. В коэффициенты введен множитель для пересчета на 1 ч действия фермента.

Выполнить расчеты и сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Какими способами осуществляется производство ферментных препаратов?

2. Какие единицы используются для характеристики активности ферментов?

3. Назовите основные продуценты амилолитических ферментов.

4. Назовите основные продуценты протеолитических ферментов.

5. Назовите основные продуценты пектолитических и целюлолитических ферментов.

6. Дайте характеристику молокосвертывающих ферментов и назовите особенности их применения.

7. Назовите области применения ферментов.

8. В чем заключается преимущество применения иммобилизованных ферментов?

Оформление отчета

Отчет должен содержать:

1. Цель работы.

2. Описание основных групп ферментов и их продуцентов.

3. Описание факторов, влияющих на молокосвертывающую способность ферментов и их активность.

4. Расчеты амилолитической активности фермента.

5. Выводы.

Приготовление реактивов для определения амилолитической активности ферментов

Ads by **optAd360**

1. Приготовление 1 %-ного раствора крахмала (субстрат).

1 г крахмала помещают в мерную колбу вместимостью 100 см^3, добавляют 25 см3 воды и перемешивают. Затем добавляют в колбу еще 25 см^3 воды, помещают колбу в кипящую водяную баню, непрерывно перемешивая до полного растворения крахмала. После этого содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 см3 ацетатного буферного раствора pH 4,7 и доводят объём жидкости до метки дистиллированной водой. Раствор крахмала готовят в день проведения анализа.

2. Приготовление ацетатного буферного раствора с pH 4,7.

Раствор А - 1 М раствор уксусной кислоты. 58 $см^3$ ледяной уксусной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Раствор Б - 1 М раствор уксуснокислого натрия. 82 г уксуснокислого натрия помещают в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$ и доводят объем до метки дистиллированной водой.

Ацетатный буферный раствор с pH 4,7 готовят смешиванием равных объемов растворов А и Б. Проверяют значение pH на pH-метре.

3. Приготовление 0,1 М раствора соляной кислоты. 8,2 $см^3$ соляной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1000 см3 и доводят объем до метки дистиллированной водой.

4. Приготовление основного раствора йода.

0,5 г йода и 5 г йодистого калия растворяют в бюксе с притертой крышкой в малом количестве воды. Содержимое осторожно перемешивают при плотно закрытой крышке бюкса. После полного растворения йода раствор переносят в мерную колбу с притертой пробкой вместимостью 200 $см^3$ и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор хранят в темноте и используют в течение 1 месяца.

5. Приготовление рабочего раствора йода.

2 $см^3$ основного раствора йода разводят 0,1 М раствором соляной кислоты в мерной колбе вместимостью 100 $см^3$. Перед применением рабочего раствора проверяют на фотоэлектроколориметре его оптическую плотность, пользуясь светофильтром с максимумом пропускания при длине волны 453 нм и толщине пропускающего слоя 1 $см^3$. Оптическая плотность раствора йода должна составлять 0,21-0,23. В случае отклонения оптической плотности раствора от этой величины ее приводят к необходимой, добавляя несколько капель кислоты или основного раствора йода.

Ads by **optAd360**

6. Приготовление основного раствора ферментного препарата.

0,1 г исследуемого препарата взвешивают в стаканчике вместимостью 25 - 30 $см^3$. Навеску тщательно растирают стеклянной палочкой с небольшим количеством воды, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см3, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и при необходимости фильтруют. Раствор ферментного препарата может храниться в течение 1 суток при температуре от 0 до минус 4 °С.

7. Приготовление рабочего раствора ферментного препарата.

Рабочий раствор фермента готовят из основного раствора, разбавляя его так, чтобы в 5 $см^3$ рабочего раствора содержалось такое количество фермента, которое обеспечивает в принятых условиях гидролиз крахмала от 20 до 70 %.

Для этого берут различные количества основного раствора в зависимости от активности исследуемого препарата и разбавляют водой до 50 $см^3$ (при испытании препарата с активностью от 20 до 700 ед/г) и до 200 см3 (при активности от 700 ед/г и выше). Количество основного раствора препарата, которое необходимо взять для приготовления рабочего раствора фермента, находят по таблице:

Амилолитическая активность (А препарата, ед (предполагаемая)	Количество препарата в $см^3$ рабочего раствора, мг	Количество основного раство необходимое д вторичного разбавления, $см^3$	Общий об разбавленного раствора, $см^3$
От 20 до 80	5,0	50	50
От 80 до 150	2,0	20	50
От 150 до 300	1,0	10	50
От 300 до 700	0,5	5	50
От 700 до 1200	0,25	10	50
От 1200 до 250	0,125	5	200
От 2500 до 500	0,05	2	200
Свыше 5000	0,025	1	200

https://lifelib.info/microbiology/biotechnology/7.html

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ - Е.П. СУЧКОВА - 2016

Принципиальная схема получения ферментных препаратов

