

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Министерство образования и науки Алтайского края
Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова

В. П. ВИСТОВСКАЯ, Е. П. КАМЕНСКАЯ

БИОТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Учебное пособие

Рекомендовано

*Алтайским государственным техническим университетом им. И. И. Ползунова
в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по направлению подготовки
19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология»*

ISBN 978-5-7568-1504-7



АлтГТУ
Барнаул • 2024

Об издании – [1](#), [2](#)

© Е. П. Каменская, В. П. Вистовская, 2024
© Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова, 2024

УДК 577.15 (075.8)

Рецензенты:

доктор технических наук, доцент *Е. М. Щетинина*,
ведущий научный сотрудник лаборатории пищевых биотехнологий
и специализированных продуктов ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии»;
кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *И. Д. Бородулина*,
Алтайский государственный университет;
кандидат технических наук, доцент *В. Г. Курцева*,
Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова

Вистовская, В. П.

Биотехнология ферментных препаратов : учебное пособие / В. П. Вистовская,
Е. П. Каменская ; Алт. гос. техн. ун-т им. И.И. Ползунова. – Барнаул : АлтГТУ, 2024. – 177 с.
– URL : http://elib.altstu.ru/uploads/open_mat/2024/VistovskayaKamenskaya_BFP_up.pdf. –
Текст : электронный.

ISBN 978-5-7568-1504-7

В учебном пособии представлены теоретический и практический разделы, позволяющие студентам направления 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология» получить теоретические знания и приобрести практические навыки по ряду разделов дисциплины «Биотехнология ферментных препаратов». Представлены лабораторные работы разной степени сложности, позволяющие студентам закрепить теоретические знания по ряду разделов дисциплины путем формирования практических навыков в области биотехнологии ферментных препаратов, овладеть методами исследования ферментов, умением анализировать полученные результаты, а также способствующие развитию навыков научно-исследовательской работы у студентов.

Рекомендовано Алтайским государственным техническим университетом им. И. И. Ползунова в качестве учебного пособия для студентов всех форм обучения, обучающихся по направлениям подготовки 19.03.02 «Продукты питания из растительного сырья» и 19.03.01 «Биотехнология» (протокол № 2 от «23» сентября 2024 г.).

Учебное пособие

Минимальные системные требования: Yandex (20.12.1) или Google Chrome (87.0.4280.141) и т. п.,
скорость подключения – не менее 5 Мб/с, Adobe Reader и т. п.

Дата подписания к использованию 22.11.2024. Объем издания – 6 Мб.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, 656038, г. Барнаул,
пр-т Ленина, 46, <https://www.altstu.ru>.

ISBN 978-5-7568-1504-7

[вперед \(к оглавлению\)](#)

© Е. П. Каменская, В. П. Вистовская, 2024
© Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова, 2024

Оглавление

Введение	4
Теоретическая часть.....	5
1 Основные понятия энзимологии	5
2 Общая природа ферментов. Структурно-функциональные особенности биокатализа	19
3 Механизм и стадии ферментативного катализа.....	42
4 Основы кинетики ферментативного катализа.....	49
5 Регуляция активности ферментов	53
6 Ингибиторы ферментов.....	62
7 Имобилизованные ферменты.....	66
8 Источники и технологии получения ферментных препаратов	82
9 Технология получения ферментов и ферментных препаратов из культур микроорганизмов	89
10 Применение ферментных препаратов в хлебопечении.....	103
11 Применение ферментных препаратов в пивоварении, производстве плодово-ягодных соков, безалкогольных и спиртных напитков.....	114
12 Производство крахмала и крахмалопродуктов.....	126
13 Применение ферментов и ферментных препаратов в молочном и мясном производствах	129
Практическая часть.....	136
Общие требования техники безопасности	136
Лабораторная работа № 1 «Обнаружение ферментов»	141
Лабораторная работа № 2: «Влияние температуры и pH среды на активность ферментов».....	147
Лабораторная работа № 3: «Изучение специфичности ферментов».....	149
Лабораторные работы № 4-5: «Получение сахаразы из дрожжей и определение специфичности её действия».....	153
Лабораторная работа № 6: «Методы количественного определения активности ферментов»	155
Лабораторные работы № 7-8: «Изучение активности α - и β -амилаз, выделенных из солода. Определение общей осахаривающей активности ферментной системы».....	159
Лабораторная работа №9 «Амилолитическая активность ферментного препарата»	163
Список литературы	175
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	177

Введение

Большинство пищевых технологий основаны на биокаталитических методах конверсии сельскохозяйственного сырья. Наиболее масштабно используют ферментные препараты микробного происхождения в спиртовой и пивоваренной (порядка 60 % от общего объема ферментных препаратов), хлебопекарной, кондитерской, крахмалопаточной и сыродельной отраслях пищевой промышленности (до 20 %). Применение биокатализаторов позволяет интенсифицировать существующие биотехнологические процессы в пищевой промышленности. Ферментативная конверсия субстратов растительного, животного и микробного происхождения обеспечивает направленное изменение структурно-фракционного состава пищевого сырья, повышение биологических и потребительских свойств пищевых продуктов и напитков, удовлетворяющих физиологическим потребностям организма человека в соответствии с особенностями метаболических процессов в зависимости от возраста, состояния здоровья, патологии, окружающей среды и других факторов. Рациональный подбор целевых ферментных систем с заданной субстратной специфичностью и механизмом действия позволяет интенсифицировать технологические процессы глубокой переработки сельскохозяйственного сырья, создать новые виды пищевых продуктов путем формирования необходимых органолептических, медико-биологических, физико-химических, энергетических и других свойств» [1].

Ферменты присутствуют во всех живых клетках и обеспечивают превращение одних веществ в другие. Они участвуют практически во всех биохимических реакциях, протекающих в живых организмах.

О существовании ферментов ученые знают давно, уже более 100 лет, так что современная энзимология – наука о ферментах – весьма развитая научная и техническая дисциплина. Энзимология тесно связана с такими быстро развивающимися сегодня областями знания, как молекулярная биология, биотехнология, протеомика, биоинформатика.

На сегодняшний день описано свыше 3000 различных ферментов, а по различным оценкам, в природе их существует около 25000, однако в настоящее время не более десятой части описанных ферментов поступают в продажу. Ферменты – чрезвычайно эффективные катализаторы, и большинство катализируемых ими реакций не могли бы протекать без их участия, во всяком случае, за какое-то разумное время. Ферменты ускоряют спонтанные реакции в 10^8 - 10^{10} раз, а иногда и в 10^{12} раз. Примером является оротидин-5'-фосфат-декарбоксилаза, которая в 10^{17} раз ускоряет реакцию, которая без её участия протекает с периодом полуреакции 78 миллионов лет [2].

Теоретическая часть

1 Основные понятия энзимологии

Исторические сведения о развитии энзимологии. Ферменты как биокатализаторы. Связь энзимологии с другими науками. Фундаментальные и прикладные аспекты инженерной энзимологии. Основные направления развития

Энзимология, или ферментология, является наукой об энзимах¹ (иначе ферментах) – биологических катализаторах, образуемых любой живой клеткой и обладающих способностью активировать различные химические соединения. Понятие «энзимология» в настоящее время расширено в связи с двумя основными обстоятельствами. Во-первых, экспериментально доказано, что ферментативными свойствами обладают не только белки, но и рибонуклеиновые кислоты (рибозимы). Во-вторых, среди белковых посредников биохимических процессов обнаружены не только ферменты (катализаторы биохимических реакций), но и клеточные компоненты, которые прямо не катализируют никаких химических реакций.

Предметом энзимологии является описание любых посредников биохимических процессов, а в ее задачу входит изучение физических и химических основ функционирования этих посредников и их физиологической роли в живом организме.

История открытия и исследования ферментов весьма интересна, и поскольку долгое время энзимология являлась разделом биохимии, то именно развитие биохимии предопределило появление энзимологии как науки. Биохимия – относительно молодая наука, возникшая на рубеже XIX века. Однако корни ее уходят в глубокую древность, 6000 лет назад приводится первое упоминание о биохимической (ферментативной) реакции, и первая изученная реакция – реакция створаживания. В данной реакции участвует сычужный фермент, получаемый из желудка молодых телят. В результате створаживания образуется сгусток, который схож по вкусу и консистенции с незрелым сыром. История получения такого сгустка пришла с Ближнего Востока, где бедуины перевозили молоко в кожаных мешках из овечьих желудков, оно сворачивалось (створаживалось), чему способствовал жаркий климат.

Естественное стремление людей понять причину болезни и найти лекарство против недуга пробудило интерес к процессам, протекающим в живых организмах. В истории развития биохимических знаний и биохимии как науки можно выделить четыре периода.

Первый период – с древних времен до эпохи Возрождения (XV век). Этот период практического использования биохимических процессов без знания их теоретических основ и первых, порой очень примитивных биохимических исследований. В самые отдаленные времена люди уже знали технологию таких производств, основанных на биохимических процессах, как хлебопечение, сыроварение, виноделие, дубление кож. Берестяные грамоты XI века, найденные при раскопках Новгорода, свидетельствуют, что в то время на Руси была хорошо развита технология пивоварения, виноделия,

¹ В английской и французской научной литературе чаще встречается термин «энзимы», в русской и немецкой – ферменты.

хлебопечения. Наши предки уже тогда знали много достаточно сложных рецептов красок и чернил из растений.



Рисунок 1 – Портрет Яна Баптиста ван Гельмонта (Jan Baptist van Helmont) (1580-1644)

Использование растений в пищевых целях, для изготовления красок, тканей, дубителей также наталкивало на попытки понять свойства отдельных веществ растительного происхождения.

Первые попытки объяснить механизм пищеварения привели к появлению термина «фермент», введенного Я. ван Гельмонтом (Рисунок 1), который он сравнивал с процессом брожения от лат. *fermentum* – закваска, брожение.

Однако развитие биохимии долгое время сдерживалось засильем витализма² – идеалистического учения о сущности жизни.

Второй период в развитии биохимии, существующей еще как раздел физиологии, характеризуется усилением накопления биохимических знаний. Этот период ведет отсчет от начала эпохи Возрождения и заканчивается во второй половине XIX века, когда биохимия становится самостоятельной наукой.

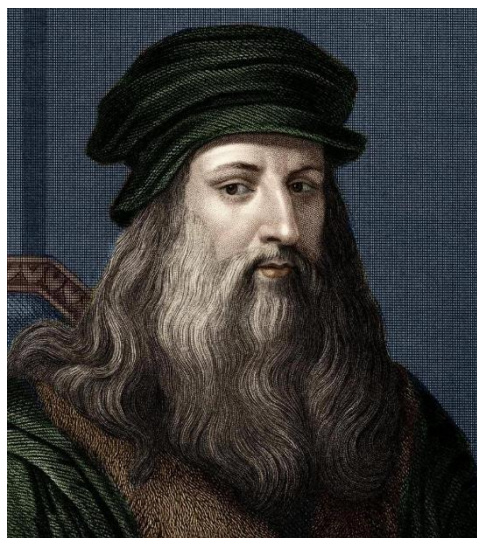


Рисунок 2 – Портрет Леонардо да Винчи (1452-1519)

Эпоха Возрождения (вторая половина XIII - XVI вв.) характеризуется некоторым ослаблением церковного гнета в науке, освобождением естествознания от пут средневекового религиозного мракобесия. Леонардо да Винчи (Рисунок 2), интересовавшийся также процессами, в основе которых лежат биохимические реакции, провел интересные опыты и на основании их результатов сделал важный для тех лет вывод, что живой организм способен существовать только в такой атмосфере, в которой может гореть пламя.

К первым научным описаниям ферментативных процессов относится описание пищеварения у животных Рене Антуаном Реомюром (Рисунок 3). При постановке своих экспериментов он исходил из предположения о том, что хищные птицы отрыгивают непереваренные остатки пищи. Реомюр сконструировал маленькую проволочную капсулу, в которую был положен кусок мяса. Капсулу с мясом поместил в

² Витализм (от лат. *vitalis* – «жизненный») – устаревшее учение о наличии в живых организмах нематериальной сверхъестественной силы, управляющей жизненными явлениями – «жизненной силы» (лат. *vis vitalis*) («души», «энтелехии», «археи» и проч.). Теория витализма постулирует, что процессы в биологических организмах зависят от этой силы и НЕ могут быть полностью объяснены законами физики и химии.



Рисунок 3 – Портрет Рене Антуана Реомюра (1683 – 1757)

клетку к сарычу. Через 24 часа сарыч выплюнул эту капсулу. В ней остался размягченный кусок пищи, который, однако, не портился. «Этот процесс может быть только результатом действия какого-то растворителя», – заключил Реомюр.

Открытие в XVIII в. М.В. Ломоносовым (Рисунок 4) закона сохранения массы веществ нанесло сокрушительный удар по идеализму в естествознании. Это великое открытие заложило основы материалистического понимания природы и ее явлений, послужило началом новой эры в химии, биологии и других науках – эры точных количественных измерений. На основе закона сохранения массы веществ и накопившихся к концу XVIII в. экспериментальных исследований французский ученый, основоположник современной химии Антауан Лоран Лавуазье (Рисунок 5) количественно исследовал и объяснил

сущность дыхания, указав на роль кислорода в этом процессе. Впоследствии он более подробно описал процесс ферментации, изучая спиртовое брожение, происходящее при изготовлении вина, и обнаружил, что глюкоза превращается в спирт и углекислый газ.



Рисунок 4 – Портрет Михаила Васильевича Ломоносова (1711 – 1765)



Рисунок 5 – Портрет Антауана Лорана Лавуазье (1743 – 1794)

К началу XIX в. преобладала общая точка зрения, что термин «ферментация» означает химические изменения, вызываемые некоторыми специальными формами органического материала, а именно «ферментами». До конца XIX в. также было установлено, что ферментативной активностью обладают многие биологические субстанции (слюна, экстракт дрожжей, зерен и др.), однако механизм действия долгое время оставался неизвестным. В этот период ученые начали пытаться

фракционировать различные экстракты для получения частично очищенных ферментов. Но не будем забегать вперед и вернемся к началу XIX века.

В 1814 году русский ученый немецкого происхождения Константин Готлиб Сигизмунд Кирхгоф (Gottlieb Sigismund Constantin Kirchhoff)³ (1764 – 1833) показал, что образование сахара из крахмала в проросших зерновках злаков обусловлено химическим процессом, а не появлением ростков; а в 1833 году, директор сахарного завода в Париже (Ансель Пайен (1795 – 1871)), вместе со своим коллегой выделил из проросших зерен ячменя «вещество, разжижающее крахмал». При этом они уже тогда обнаружили у этого вещества свойства, которые по современным представлениям относятся к определяющим универсальным свойствам ферментов. Например, относительно небольшие количества препарата могли разжижать большие количества крахмала, однако при нагревании препарат утрачивал эту способность. Активная субстанция могла быть получена в порошкообразном виде из раствора, а после повторного растворения в воде вновь становилась активной. Описанная субстанция, получившая название диастазы (от греч. «разделение») (впоследствии оно получило



Рисунок 6 – Портрет Теодора Шванна (1810-1882)

название амилаза) была первым растительным ферментом, изученным в очищенном виде в лаборатории.

Три года спустя одному из основоположников клеточной теории Теодору Шванну (Рисунок 6) удалось получить в чистом виде и изучить фермент желудочного сока животного происхождения – пепсин.

Еще ранее в 1824 г. немецкий химик Фридрих Вёлер (Рисунок 7), работая в Стокгольме под руководством Йёнса Якоба Берцелиуса (Рисунок 8), открыл щавелевую кислоту, в 1828 г. – синтезировал мочевины, опровергнув виталистическую точку зрения, что органические вещества могут быть продуктом только живых организмов, что также повлияло на развитие биохимии и энзимологии в частности.

Научный руководитель Ф. Вёлера Й. Берцелиус значительно опередил научную мысль своего времени, утверждая, что ферментативные процессы представляют собой каталитические процессы (от греч. «разложение»), определив катализаторы как тела, присутствие которых вызывает химические процессы и без которых эти процессы происходить не могут. В 1837 году Й. Берцелиус показал, что ферменты – катализаторы, поставляемые именно живыми клетками. Сами ферменты остаются в ходе химических реакций в неизменном виде. Катализаторы (ферменты) можно сравнить со сказочной волшебной палочкой, одно лишь прикосновение которой вызывает чудесные превращения, а сама волшебная палочка остается при этом прежней. С почти пророческим ясновидением Берцелиус писал в 1836 году: «У нас есть основания полагать, что в живых растениях и животных протекают тысячи каталитических процессов между тканями и жидкостями».

³ Фото Константина Кирхгофа в открытых источниках не приводится, возможно, из-за однофамильцев.



Рисунок 7 – Портрет Фридриха Вёлера
(1800 – 1880)



Рисунок 8 – Портрет Йёнса Якоба
Берцелиуса (1779 – 1848)

По мере открытия и изучения ферментов назрела необходимость объяснить природу их действия. Л. Пастер (Рисунок 9) считал, что ферментативные процессы неотделимы от жизнедеятельности дрожжевой клетки, с другой стороны, Ю. Либих (Рисунок 10) отстаивал химическую природу брожения, считая, что ферменты могут проявлять свое каталитическое действие как вместе с клетками, так и вне их. Авторитет Пастера, однако, был велик, к тому же все экспериментальные данные того времени говорили, что брожения не может быть без живых дрожжевых клеток и Пастер победил. После этого появились понятия «организованные» и «неорганизованные» ферменты. Организованными называли те ферменты, каталитическая активность которых проявляется лишь при наличии живых организмов (например, ферменты, вызывающие различные виды брожения), а неорганизованными – структурно не связанные с клетками (например, ферменты, содержащиеся в желудочном и кишечном соках).



Рисунок 9 – Фотография Луи Пастера
(1822 – 1895)

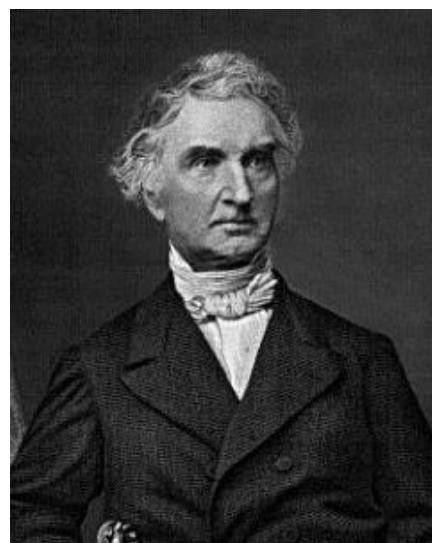


Рисунок 10 – Фотография Юстуса фон
Либиха (1803 – 1873)



В 1878 году Вильгельм Фридрих Кюне (Рисунок 11) предложил «неорганизованные» ферменты называть *энзимами*, а за «организованными» сохранить название ферменты. Спор между Пастером и Либихом был разрешен в результате экспериментальных работ М.М. Манасеиной и Э. Бухнера [3]. Русский врач Мария Михайловна Манасеина (Рисунок 12) в 1871 году показала, что «дрожжевой сок» обладал такой же способностью сбраживать углеводы, как и сами дрожжевые клетки. Эти опыты впоследствии были подтверждены Эдуардом Бухнером (Рисунок 13), за что в 1907 году он получил Нобелевскую премию по химии. Термины «*фермент*» и «*энзим*» стали употребляться как синонимы.

Рисунок 11 – Фотография Вильгельма Фридриха Кюне (1837 – 1900)



Рисунок 12 – Фотография Марии Михайловны Манасеиной (1841 – 1903)



Рисунок 13 – Фотография Эдуарда Бухнера (1860 – 1917)

Третий период в истории биохимии, начинающийся со второй половины XIX века, ознаменован выделением биохимии как самостоятельной науки из физиологии. Это связано с резким увеличением интенсивности и глубины биохимических исследований, в том числе связанных с ферментами, объемом получаемой информации, возросшим прикладным значением – использованием биохимических знаний в промышленности, медицине, сельском хозяйстве. Напомним, что действия ферментов были многократно описаны, но их природа так и не выяснена, хотя точно знали, что ферменты состоят из углерода, водорода и азота, а при нагревании они свертываются. На протяжении 60 лет, начиная с 1858 г. вплоть до 1918 г. высказывались предположения о белковой природе ферментов, но вскоре опровергались, ссылаясь на отсутствие экспериментальных доказательств. Хотя о белках, их составе, свойствах и качественных реакциях уже знали.



Рисунок 14 – Фотография А.Я. Данилевского (1838 – 1923)

К третьему периоду относятся работы одного из основоположников отечественной биохимии Александра Яковлевича Данилевского (Рисунок 14). Исследуя строение белков, он сформулировал ряд положений, которые в дальнейшем легли в основу полипептидной теории структуры белков. А.Я. Данилевский в 1862 году впервые осуществил разделение амилазы и трипсина поджелудочной железы, применив разработанный им метод избирательной адсорбции трипсина на частицах коллодия, принципы которого используют до сих пор. Им была показана коллоидная (но все еще небелковая) природа ферментов. Он экспериментально доказал, что действие сока поджелудочной железы на белки представляет собой реакцию гидролиза, в результате которой белки расщепляются до пептонов⁴.

В 1894 году Эмиль Герман Фишер (Рисунок 15), будучи именитым ученым, занимавшийся на закате своей исследовательской деятельности белками и ферментами, предложил гипотезу, объясняющую специфичность действия ферментов «ключ – замок». Согласно этой гипотезе, существует строгое соответствие между ферментом и его субстратом, благодаря которому образуется фермент-субстратный комплекс и происходит катализ⁵.



Рисунок 15 – Фото Эмиля Германа Фишера (1852 – 1919)

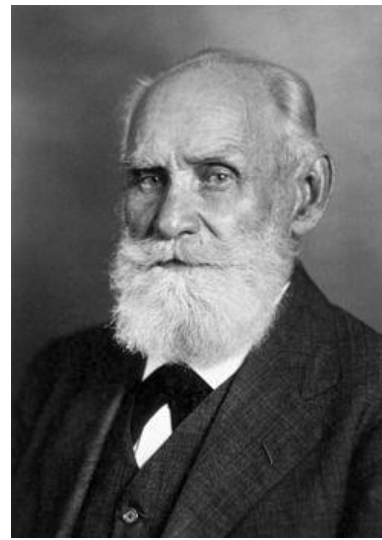


Рисунок 16 – Фото Ивана Петровича Павлова (1849 – 1938)

Иван Петрович Павлов (Рисунок 16), работая в период с 1879 по 1903 гг. с пищеварительными ферментами, впервые доказал, что они в живом организме могут

⁴ На начальных стадиях процесса переваривания белков под действием ферментов, например, пепсина образуются крупные белковые фрагменты, которые и называются пептонами.

⁵ Катализ (от греч. *κατάλυσις* – разрушение), увеличение скорости или инициирование химической реакции в присутствии веществ (катализаторов), многократно вступающих в промежуточное химическое взаимодействие с участниками реакции и восстанавливающих свой химический состав после каждого цикла этих взаимодействий.

существовать в неактивной форме – в виде *проферментов*, им также были предложены первые методы определения активности ферментов. «За труды по физиологии пищеварения, расширившие и изменившие понимание жизненно важных аспектов этого вопроса» Иван Петрович был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине в 1904 г.

Конец XIX века в истории биохимии и энзимологии связан с исследованиями кинетики⁶ ферментативных реакций. Идея использовать инвертазу, которая гидролизует сахарозу в глюкозу и фруктозу, в качестве модельного фермента для изучения кинетики ферментов восходит по крайней мере к 1890 году. В начале XX века несколько исследователей работали над кинетикой ферментов как экспериментально, так и теоретически (большинство из них использовали инвертазу), в основном во Франции, Англии, Германии и США. Среди них были Эмиль Дюкло из Института Пастера в Париже, Виктор Анри из Сорбонны в Париже, Леонор Михаэлис в Берлине, Макс Боденштайн в Лейпциге, Дональд Д. Ван Слайк в Нью-Йорке, Адриан Дж. Браун в Бирмингеме и, с несколько иной темой и независимо от других, Арчибальд Вивиан Хилл в Кембридже. В 1913 году Л. Михаэлис и М. Ментен (Рисунки 17, 18) разработали *теорию механизма действия ферментов и кинетику ферментативных реакций* [4, 5, 6].



Рисунок 17 – Фото Леонора Михаэлиса (1875 –1949)



Рисунок 18 – Фото Мод Леоноры Ментен (1879 — 1960)

Дальнейшее развитие энзимологии сопровождается многочисленными открытиями, связанными с работами сразу нескольких исследователей, работавшими в команде, так было и с Джеймсом Батчеллером Самнером. Именно с работами Самнера связывают переломный момент в истории энзимологии, наступивший в конце 20-х годов XX века, когда впервые удалось получить в кристаллическом состоянии ферменты уреазу и пепсин и доказать, что ферменты являются белками.

Американский биохимик Джеймс С. Самнер [7] в 1926 г. проводил работу по выделению фермента в чистом виде. В качестве исходного материала он использовал

⁶ Ферментативная кинетика – зависимость скорости химической реакции от её условий – раздел биохимии, предметом которого являются химические реакции, катализируемые ферментами, изучающий закономерности течения во времени и механизм ферментативных реакций.

бобы *Canavalia ensiformis*, богатые ферментом уреазой (этот фермент катализирует разложение мочевины на углекислый газ и аммиак). Сначала Самнер измельчил бобы на кофейной мельнице и из полученной муки экстрагировал уреазу с помощью растворителя. После фильтрования экстракт был оставлен на ночь в холодном месте. На следующее утро, к великому удивлению исследователя, в фильтрате были обнаружены маленькие восьмигранные кристаллы. После перекристаллизации они разлагали мочевину в 700 раз активнее, чем исходная мука.

Несмотря на очень скептическое отношение Р.М. Вильштеттера⁷ и его нападки на полученные Самнером результаты, по истечении некоторого времени научный мир поверил в волшебную силу кристаллов фермента. Выделение фермента в виде кристаллов доказывало индивидуальность данного вещества. Кристаллы же уреазы проявляли, кроме того, типичные свойства белков. Полученные Самнером результаты были подтверждены Дж. Х. Норттропом, который в 30-х годах получил в виде кристаллов пищеварительные ферменты пепсин, трипсин, химотрипсин и их неактивные предшественники. Лишь много позже стало понятным, почему в ферментных препаратах Р.М. Вильштеттера не удавалось обнаружить присутствие белков: несмотря на очень тщательную очистку, они были настолько сильно разбавлены, что с помощью имевшихся в то время малочувствительных методов в них просто нельзя было обнаружить никакого белка. В 1946 г. за совместную работу Самнеру и Норттропу была присуждена Нобелевская премия в области медицины. Через 20 лет после получения первого кристаллического фермента стало бесспорным, что ферменты представляют собой белки.

Дальнейшее развитие уже самостоятельной биохимии, в том числе и энзимологии стало настолько стремительным, что эту историю невозможно уместить на страницах данного раздела, поэтому ограничимся основными и наиболее значимыми событиями в биохимии и других областях науки, тесно с ней переплетающихся.

40-е и особенно 50-е годы XX века характеризуются использованием в биохимических исследованиях физических, физико-химических и математических методов, активным и успешным изучением основных жизненных процессов на молекулярном и надмолекулярном уровнях. 50-е годы, в которые была опубликована статья Д. Уотсона и Ф. Крика о строении двойной спирали ДНК, положившая начало новому научному направлению – молекулярной биологии, считаются одновременно и началом качественно нового – *4-го периода* в истории биохимии.

Краткая хронология основных открытий в биохимии этого периода.

1951 г. – Лайнус Полинг, Роберт Кори и Герман Брэнсон сформулировали представления о вторичной структуре белка (конформации полипептидной цепи).

Они обратили внимание на то, что боковые группы аминокислот могут взаимодействовать друг с другом. Учёные ввели чёткие геометрические параметры для разных групп в полипептидной цепочке и на их основе рассчитали возможные структуры, образуемые аминокислотными остатками. Предложенные ими α -спирали и

⁷ Рихард Мартин Вильштеттер (нем. Richard Martin Willstätter) – немецкий химик-органик, лауреат Нобелевской премии по химии в 1915 году «за исследования красящих веществ растительного мира, особенно хлорофилла». Он в свое время называл энзимологию – «химией послезавтрашнего дня». В 20-е годы занимался разработкой методов очистки ферментов.

β -слои были найдены в реальных белках. В глобулярных белках полипептидная цепь может образовывать несколько α -спиралей и β -слоев, по-разному расположенных друг относительно друга. Предложенная Полингом и Кори модель спиральной структуры полипептидной цепи способствовала развитию представлений о белках и созданию спиральной модели ДНК Уотсоном и Криком

1953 г. – Джон Уотсон и Фрэнсис Крик предложили модель двойной спирали строения ДНК.

1953 г. – Ф. Сэнгер впервые расшифровал аминокислотную последовательность белка инсулина, состоящего из 51 аминокислотного остатка.

1955-1960 гг. – А.Н. Белозерский и его сотрудники, исследовав нуклеотидный состав ДНК огромного числа представителей животных, растений и бактерий, охарактеризовали таксономическое и эволюционное значение соотношения отдельных азотистых оснований в ДНК.

1956 г. – установление С. Муром, У. Стайном, К. Анфинсеном аминокислотной последовательности рибонуклеазы из поджелудочной железы быка. Ферменты представляют собой природные биокатализаторы белковой природы.

1959, 1960 гг. – А. С. Спирин и П. Доти установили вторичную и третичную структуру рибосомальной РНК. В 1960 году Д. Филлипс впервые расшифровал трехмерную структуру *лизоцима* с помощью рентгеноструктурного анализа; датский биохимик Кай Урлих Линдерштрем-Ланг предложил рассматривать четыре уровня организации белковой молекулы: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры.

1961 г. – М. Ниренберг расшифровал первую «букву» кода белкового синтеза – триплет ДНК, соответствующий фенилаланину.

1965-1967 г. – Р. Холли и независимо от него А.А. Баев определили нуклеотидную последовательность транспортных РНК; 1965 г. нобелевская премия вручена Франсуазу Жакобу и Жаку Моно за открытие и объяснение работы Лас-оперона прокариот.

1966 г. – П. Митчелл сформулировал хемиосмотическую теорию сопряжения окисления и фосфорилирования.

1969 г. – синтезирована *рибонуклеаза* (Р.Мерифилд).

1971 г. – в совместной работе двух лабораторий, руководимых Ю.А. Овчинниковым и А. Е. Браунштейном, установлена первичная структура аспаратаминотрансферазы – белка из 412 аминокислот.

1977 г. – Ф. Сэнгер и сотрудники впервые полностью расшифровали первичную структуру молекулы ДНК.

Последующее выделение в индивидуальном состоянии ряда других ферментов привело к формулировке правила: «все ферменты — белки», которое было опровергнуто только в 70-е годы в результате открытия ферментативных свойств РНК (например, РНКазы Р, участвующей в процессинге рРНК). Такие ферменты получили название рибозимы. В 1989 г. Чек и Альтман получили Нобелевскую премию по химии за «обнаружение каталитических свойств РНК». Рибозимы – низкомолекулярные молекулы РНК, способные осуществлять низкотемпературный катализ. Именно рибозимы катализируют реакции, сопровождающие созревание тРНК и рРНК; не исключая их участие в процессинге и сплайсинге мРНК. Предполагается, что рибозимы

занимали центральное место в химическом катализе процессов, связанных со становлением жизни на Земле.

Главные этапы развития биохимии связаны с именами ряда ученых, многие из которых работали в России: А.Н. Баха (перекисная теория биологического окисления), В.И. Палладина (теория дегидрирования), В.А. Энгельгарда (открытие АТФ), А.И. Опарина (гипотеза возникновения жизни), А.Н. Белозерского (исследование нуклеиновых кислот), К. Функа (витамины, авитаминоз), Г. Эмбдена и К. Мейергофа (механизм гликолиза), Г. Кребса (цикл трикарбоновых кислот), А. Сцент-Дьёрди (основы биоэнергетики), А. Ленинджера (окислительное фосфорилирование), П. Митчелла (хемиосмотическая теория) и многих других биохимиков, занимавшихся исследованиями ферментов.

Таким образом, стало ясно следующее: химический катализ и биологический катализ – это явления одного порядка; катализаторы обладают общим свойством – они способны ускорять химические реакции. При этом существуют как общие катализаторы, способные ускорять многие реакции (например, кислоты), так и специфические катализаторы, ускоряющие лишь узкий круг реакций и работающие с ограниченным набором субстратов. Последнее свойство характерно для ферментов.

Ферменты как биокатализаторы. Ферменты – очень эффективные катализаторы. По сравнению со свободно протекающими реакциями или реакциями с участием простых химических катализаторов, таких как, например, кислоты, скорость процессов под действием ферментов увеличивается примерно в 10^{12} раз. Если ферментативная реакция протекает в течение 1 с, то на аналогичный процесс с участием протонов потребуется в 10^{12} раз больше времени, т. е. 30000 лет. Очевидно, что ферменты определяют реальные временные характеристики биохимических процессов.

В области энзимологии используют некоторые распространенные термины, для которых за прошедшие годы было опубликовано множество определений. К сожалению, эти определения не всегда полностью согласуются друг с другом, что приводит к некоторой путанице. Воспользуемся определениями, которые одобрены Комиссией по ферментам (IUBMB)⁸, что поможет консолидировать использование этих терминов.

Ферменты являются высокомолекулярными биологическими катализаторами биохимических реакций. Большинство ферментов представляют собой белки, но небольшое количество молекул каталитической РНК, известных как рибозимы, также включены в это определение.

Ферменты не изменяют равновесие реакции; они ускоряют реакцию за счет задействования альтернативного каталитического механизма. Ферменты отличаются от простых химических катализаторов специфичностью к отдельным соединениям или группам соединений.

⁸ IUBMB (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology) тесно сотрудничает с четырьмя региональными организациями, объединяющими биохимические общества Азии и Океании (Федерация биохимиков и молекулярных биологов Азии и Океании - FAOBMB), Европы (Федерация европейских биохимических обществ - FEBS), Америки (Панамериканская ассоциация биохимии и молекулярной биологии - PABMB) и Африки (Федерация африканских обществ биохимии и молекулярной биологии - FASBMB)

Вообще говоря, ферменты не расходуются во время реакции, которую они катализируют, и готовы катализировать другую реакцию, как только они высвобождают продукт(ы) реакции. Однако в небольшом количестве случаев ферменты могут также участвовать в качестве субстратов в реакции, которую они катализируют и в этом случае фермент должен быть восстановлен до своего активного состояния, прежде чем он сможет катализировать дополнительный цикл.

Некоторые ферменты вырабатываются в неактивной форме – проферментов– и требуют определенных модификаций, прежде чем они смогут катализировать реакции. *Профермент*, также известный как *зимоген*, является неактивным предшественником фермента, который должен быть расщеплен, прежде чем стать активным. Расщепление может выполняться самим ферментом после изменения окружающей среды (например, pH), или для этого может потребоваться другой фермент – пептидаза. Иногда используется термин «*препроэнзим*», указывающий на то, что предшественник также содержит сигнальный пептид, который направляет его к определенной органелле или субклеточной локализации, в которой произойдет расщепление для получения профермента. Некоторые ферменты активны только при связывании с дополнительными небелковыми молекулами (см. Кофакторы ниже). Неактивная форма таких ферментов называется *апоферментом*, в то время как активная форма называется *холоферментом*. Эти термины обычно не применяются к свободно обратимому связыванию субстратов или активаторов.

Еще один термин «*реагент*» – химическое соединение, которое участвует в ферментативной реакции и модифицируется в ходе нее. Соединения, которые существовали до реакции, называются *субстратами*, а соединения, которые образуются в ходе реакции, называются *продуктами*. Ферменты могут действовать на один или несколько субстратов, в зависимости от конкретной реакции и фермента. После химической трансформации продукт(ы) высвобождается из фермента.

Субстраты иногда подразделяют на *основные субстраты* и *сопутствующие субстраты* (*косубстраты*). Это различие проистекает из роли, которую соединение играет во время реакции. Косубстраты обычно обеспечивают субстраты электронами, протонами, фосфатными группами, метильными группами и т.д. для его модификации, и большинство косубстратов участвует во многих различных реакциях и используется несколькими различными ферментами. Поскольку определение косубстрата зависит от его роли в конкретной реакции, одно и то же соединение может рассматриваться как основной субстрат в одной реакции и косубстрат в другой. Примеры распространенных косубстратов включают НАД(Н), S-аденозил-L-метионин и АТФ.

Кофактор – небелковое химическое соединение, которое требуется ферменту для катализа химической реакции. Кофакторы связываются с неактивными апоферментами, что приводит к образованию активных *холоферментов*. Хотя состояние кофактора может меняться в ходе реакции, оно остается неизменным в конце каталитического цикла и, таким образом, в отличие от косубстратов, кофакторы обычно не включаются в уравнение реакции. Кофакторами могут быть неорганические ионы (например, Ca^{2+}), неорганические молекулы (например, кластер железо-сера) или органические молекулы (например, пиридоксаль 5'-фосфат). В некоторых случаях с ферментом связывается предшественник кофактора, за которым следует

модификация *in situ*⁹, которая генерирует кофактор. Некоторые кофакторы могут образовываться путем модификации существующих аминокислотных остатков внутри фермента. Некоторые соединения могут действовать как кофакторы для определенного фермента и косубстраты для другого фермента, в зависимости от того, восстанавливаются ли они до своего активного состояния в конце реакции.

Простетические группы. Кофакторы, которые тесно связаны с ферментом, часто называют простетическими группами. Следует отметить, что степень точности, необходимая для этого определения, не определена и что один и тот же кофактор может по-разному связываться с разными ферментами, что делает этот термин неточным. Таким образом, рекомендуется не использовать его.

Косубстраты. Термин «косубстрат» использовался в прошлом для обозначения химических соединений, выполняющих функции, соответствующие категориям косубстратов и кофакторов. Настоятельно рекомендуется использовать альтернативные термины *cosubstrate* и *cofactor*. По историческим причинам этот термин приемлем в случае устоявшихся названий косубстрата А, В, М и F₄₂₀. Итак, термины «простетическая группа» и «косубстрат» не используем по рекомендации IUBMB, и если данный термин используется в тексте, подразумеваем – кофактор [11].

Повторимся, что ферменты – биологические катализаторы, большинство из изученных имеют белковую природу. При этом ферменты не расходуются и не претерпевают необратимых изменений.

Каким образом ферменты повышают скорость реакций? Они ускоряют химические реакции, находя «обходные пути», позволяющие молекулам преодолевать активационный барьер на более низком энергетическом уровне. Это становится возможным потому, что ферментативная реакция состоит из 2-х стадий: на первой стадии происходит образование фермент-субстратного комплекса, переходному состоянию которого соответствует значительно более низкая энергия активации; на второй стадии этот комплекс распадается на продукты реакции и свободный фермент, который может взаимодействовать с новой молекулой субстрата. Это можно выразить следующим упрощенным уравнением:



где *E* – фермент, *S* – субстрат, *ES* – фермент-субстратный комплекс, *P* – продукты реакции.

Связь энзимологии с другими науками. Энзимология является междисциплинарной областью исследований и объединяет области биохимии, микробиологии, молекулярной биологии, молекулярной генетики и биофизики. Ядро энзимологии состоит из разработки надежных анализов активности, (сверх) экспрессии и очистки, стационарной кинетической характеристики и начальной базовой структурной характеристики, которая может включать определение структуры субъединицы, молекулярной массы, требований к косубстратам, кофакторам, а также информацию о посттрансляционных модификациях. Более подробные структурные и механические характеристики часто требуют сравнения ферментов дикого типа с

⁹ *In situ* (с латинского — «на месте», «в месте нахождения», «в естественной среде»)

мутантными и со специфически мечеными ферментами. Помимо академического интереса, понимание каталитических механизмов ферментов имеет важное значение для успешного применения ферментов в промышленных процессах.

Уже в начале прошлого века теоретическая энзимология заинтересовала промышленников и к настоящему времени прикладная энзимология стала ведущей отраслью биотехнологии. Объем продаж производимых биотехнологической промышленностью ферментных препаратов исчисляется миллиардами долларов в год, при этом их производство ежегодно возрастает на 10 – 15 % в год. Ферментные препараты широко используются в биотехнологических процессах, а также в различных отраслях современной индустрии, фармацевтике, медицине. В настоящее время энзимологи и биотехнологи занимаются не только поиском новых ферментов и изучением их свойств, но всё больше усилий прилагают к повышению стабильности ферментных препаратов, увеличению срока их действия, снижению потерь при промышленном использовании. Активно развиваются технологии химической модификации, иммобилизации ферментов, а также получения их методами генетической инженерии [8].

Подведем итоги: Ферменты являются высокомолекулярными биологическими катализаторами биохимических реакций. Большинство ферментов представляют собой белки, но небольшое количество молекул каталитической РНК, известных как рибозимы, также включены в это определение.

Ферменты не изменяют равновесие реакции; они ускоряют реакцию за счет снижения энергии ее активации или задействования альтернативного каталитического механизма. Ферменты отличаются от простых химических катализаторов специфичностью к отдельным соединениям или группам соединений.

Вообще говоря, ферменты не расходуются во время реакции, которую они катализируют, и готовы катализировать другую реакцию, как только они высвобождают продукт (ы) реакции. Однако в небольшом количестве случаев ферменты могут также участвовать в качестве субстратов в реакции, которую они катализируют (например, ферменты, которые переносят серу из внутреннего железосернистого кластера к субстрату), и в этом случае фермент должен быть восстановлен до своего активного состояния, прежде чем он сможет катализировать дополнительный цикл.

Контрольные вопросы

1. Кратко охарактеризуйте первый и второй периоды развития биохимии как основы энзимологии.
2. Что изучает энзимология?
3. В чем отличие высказываний Л. Пастера и Ю. Либиха, касающихся ферментов?
4. Какую гипотезу предложил Э. Фишер и в чем она заключается?
5. Назовите основные этапы формирования энзимологии как самостоятельной науки в 20 веке.
6. Охарактеризуйте свойства ферментов как биокатализаторов.
7. Дайте определение понятиям «профермент», «апофермент», «косубстрат», «кофактор».
8. Опишите упрощенное уравнение ферментативной реакции.

2 Общая природа ферментов. Структурно-функциональные особенности биокатализа

Структурная и функциональная организация ферментов. Основные свойства ферментов. Классификация и номенклатура ферментов

Ферменты представляют собой глобулярные белки, состоящие из L-аминокислот. К белкам относят полипептиды, способные формировать и удерживать определенную пространственную структуру. Белок может функционировать, т. е. выполнять функции фермента, структурного или транспортного белка, регулятора, токсина, ингибитора только потому, что он обладает вполне определенным пространственным строением. Еще в 1959 г датский биохимик Кай Урлих Линдерштрем-Ланг предложил рассматривать четыре уровня организации белковой молекулы: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Эта классификация закрепились в литературе, поскольку в ней отразились реальные ступени формирования пространственного строения белковых молекул. Эта классификация господствовала до начала 80-х гг. XX в., когда Г. Шульц и Р. Ширмер, учитывая новые данные о структурных особенностях белков, предложили дополнить ее еще двумя уровнями организации: сверхвторичные (надвторичные) структурами и доменами (Рисунок 19).

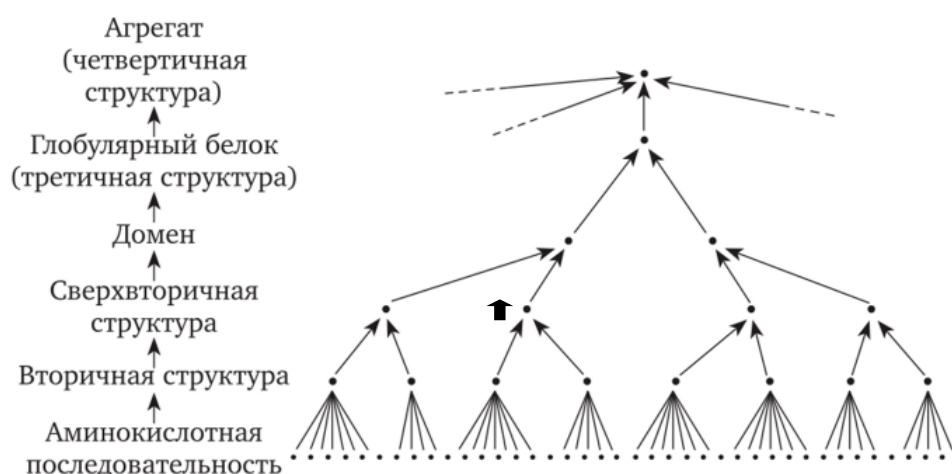


Рисунок 19 – Структурная организация белков (Г. Шульц, Р. Ширмер)

Первичной структурой называют последовательность α -аминокислотных остатков в молекуле белка, соединенных пептидными связями. Анализ данных по первичной структуре позволяет сделать следующие выводы:

- стабильность первичной структуры обеспечивается, в основном ковалентными пептидными связями, возможно участие и небольшого числа дисульфидных связей; дисульфидные связи довольно часто встречаются в ферментах, секретируемых клетками, и значительно реже возникают во внутриклеточных ферментах, что объясняется отсутствием необходимости стабилизировать молекулу фермента за счет S–S-связей при неизменяющихся условиях внутри клетки [9];
- в полипептидной цепи могут быть обнаружены разнообразные комбинации аминокислот; в полипептидах относительно редки

- повторяющиеся последовательности;
- каждый индивидуальный белок характеризуется уникальной первичной структурой; замена аминокислот приводит не только к структурным перестройкам, но и к изменениям физико-химических свойств и биологических функций;
 - в некоторых ферментах с близкими свойствами, встречаются идентичные пептидные структуры, особенно в области их активных центров.

При соединении аминокислот друг с другом посредством амидной (пептидной) связи образуются длинные линейные молекулы. Полимерные цепочки с длиной цепи до 100 аминокислотных остатков называют пептидами (олиго- или полипептидами), а более длинные – белками [10, 11].

Вторичная структура белка – пространственная ориентация полипептидной цепи, т. е. способ упаковки, свертывания, скручивания полипептидного «скелета» в определенную конформацию в результате свободного вращения вокруг связей полипептидной цепи, соединяющих α -углеродные атомы. Некоторые из этих образований носят регулярный характер и обуславливают периодичность структуры. Примерами вторичной структуры, обнаруженными в природных полипептидных цепях, являются α -спираль, β -складчатый лист, β -петли, статистический клубок. Эти структуры возникают в соответствии с программой, заложенной в первичной структуре белка. Спиральные и складчатые формы представлены упорядоченным, а статистический клубок – относительно, упорядоченным расположением полипептидной цепи. α -Спираль и β -складчатый лист были предложены в 1951 году Л. Полингом, Р. Кори и Г. Брэнсоном. Структура α -спирали была ими предсказана за 6 лет до экспериментального подтверждения ее существования методом рентгеноструктурного анализа миоглобина.

α -Спираль. В полипептидных цепях, состоящих из α -L-аминокислот, встречается правая α -спираль (закручена вправо), которая имеет вид стержня. В правой спирали радикалы аминокислотных остатков располагаются по спирали и направлены наружу от основной цепи. В стабилизации конформации α -спирали важную роль играют водородные связи, которые образуются между карбонильным атомом кислорода (C=O) каждого первого и атомом водорода NH-группы каждого пятого остатка α -аминокислот (Рисунки 20, 21). В результате все CO- и NH-группы полипептидной цепи связаны между собой водородными связями, расположенными почти параллельно центральной оси. Шаг спирали составляет 0,54 нм, расстояние между аминокислотными остатками по оси спирали – 0,15 нм, а угол между ними составляет 100° . На полный виток α -спирали приходится 3,6 аминокислотных остатка.

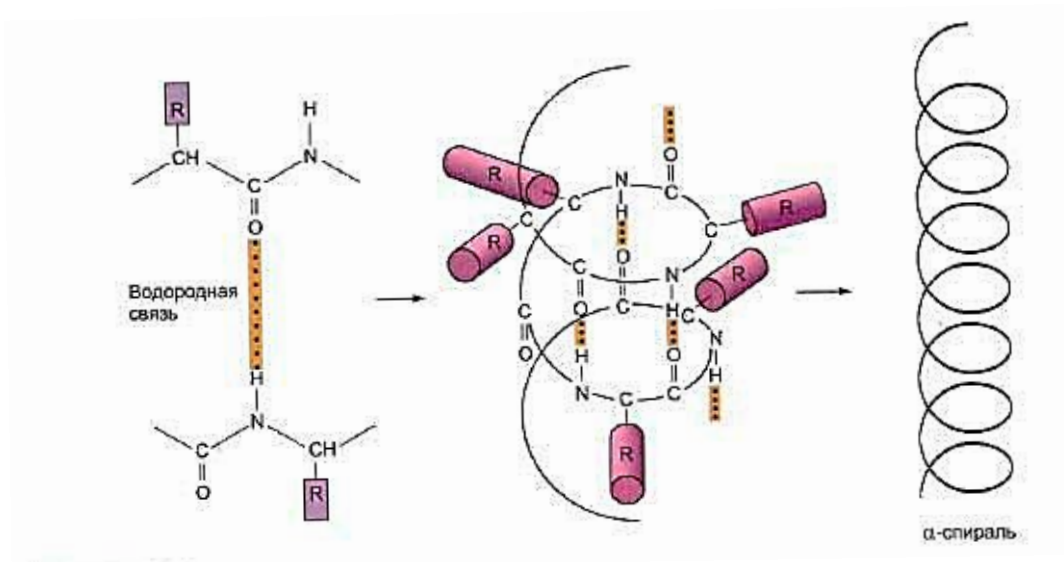
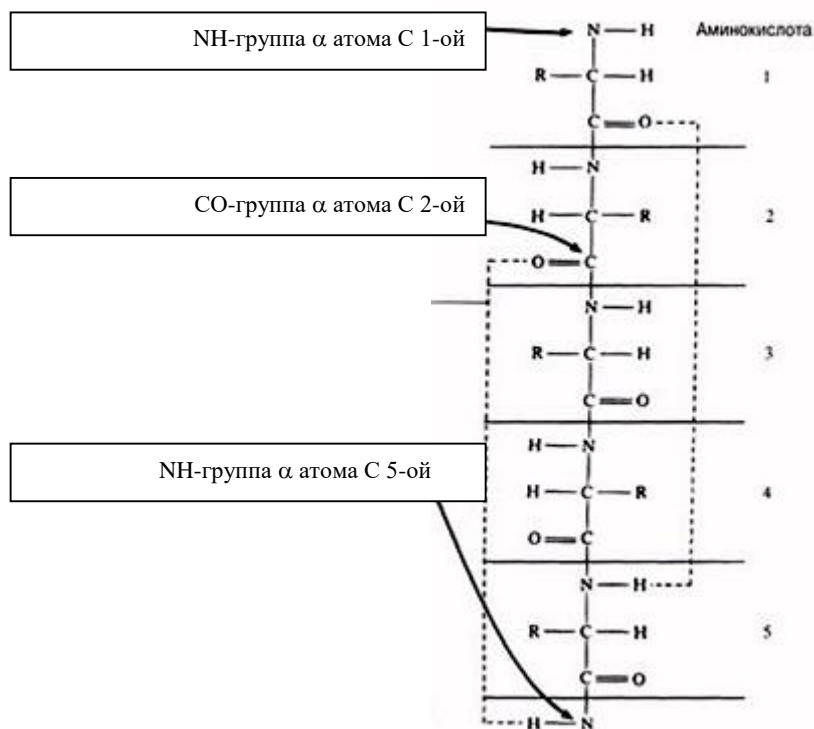


Рисунок 20 – Стабилизация конформации α-спирали водородными связями

Спирализация полипептидных цепей в различных белках колеблется от 0 до 80-90 %. Так, например, в гемоглобине и миоглобине α-спираль является основой структуры на 75%, а химотрипсин практически не содержит α-спиральной структуры. В среднем отдельные спиральные участки включают 10 аминокислотных остатков, но в различных белках длина спиралей может колебаться в значительных пределах.

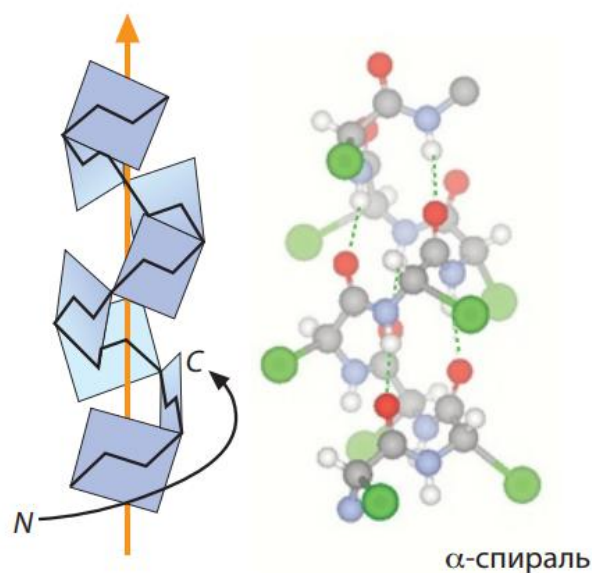


Рисунок 21 – Правая α -спираль (αR)

Спиральную структуру полипептидной цепи может нарушить наличие остатка пролина, циклическая структура которого вносит излом в пептидную цепь. Атом азота, входя в состав жесткого цикла, не позволяет вращаться вокруг N – C связи. Кроме того, пролин не может образовывать водородную связь, т. к. у атома азота пролина, принимающего участие в образовании пептидной связи, нет атома водорода. В β -петлях, состоящих из четырех аминокислотных остатков, происходит смена направления белковой цепи на противоположное. Петли стабилизируются водородными связями между первым и четвертым аминокислотными остатками. Такие структуры возникают между отдельными β -листами или между β -листами и α -спиралями (Рисунок 22).

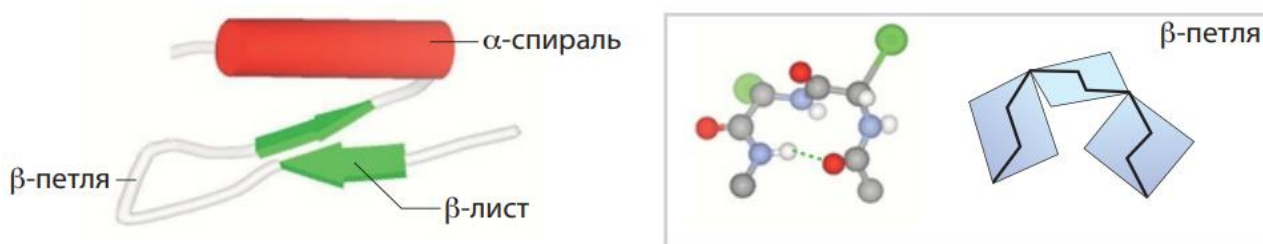


Рисунок 22 – Вторичные структуры

β -Структура. Л. Полинг и Р. Кори открыли и другой вариант вторичной структуры и назвали *β -складчатым слоем (β -складчатым листом)*, (β потому, что второй после α -спирали) (Рисунок 23).

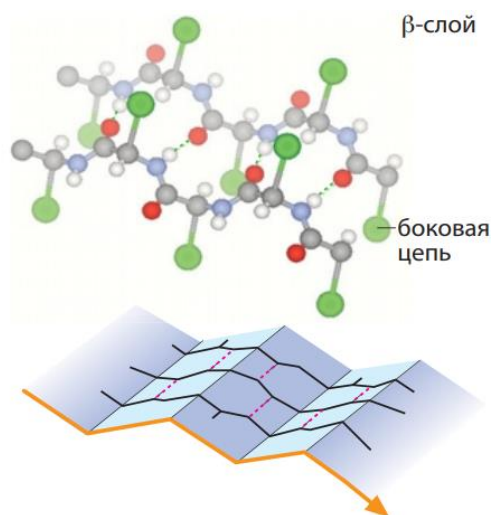


Рисунок 23 – β -слои (β -листы или β -складки)

β -Складчатая структура имеет плоскую форму. Полипептидные цепи находятся в растянутом состоянии. Расстояние по оси между аминокислотными остатками составляет 0,35 нм (в α -спирали – 0,15 нм). Особенность β -складчатой структуры состоит в том, что она поддерживается водородными связями между C=O и N-H группами разных полипептидных цепей или внутримолекулярными водородными связями между различными участками одной и той же пептидной цепи. Водородные связи расположены перпендикулярно полипептидной оси.

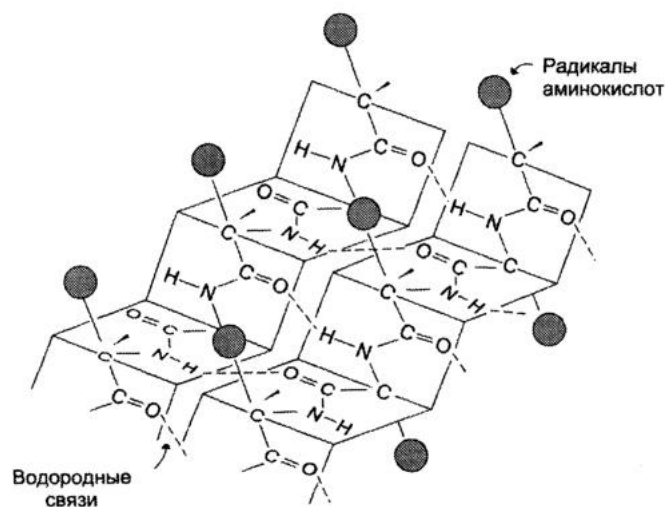


Рисунок 24 – Параллельный β -слой

Складчатым называют потому, что α -углеродные атомы аминокислотных остатков расположены попеременно по обе стороны центральной плоскости слоя. В зависимости от направленности расположения полипептидных цепей возможно существование двух типов складчатого листа. Если цепи своими одинаковыми N- и C-концами направлены параллельно в одну сторону, то образуется параллельный β -слой, а если в противоположном направлении – антипараллельный β -слой (Рисунки 23, 24, 25). Антипараллельная β -структура возникает, когда пептидная цепь поворачивает в противоположную сторону, образуя так называемую шпильку. Место поворота

называют β -изгибом. Хотя в природе встречаются оба типа, но антипараллельное расположение более стабильно.

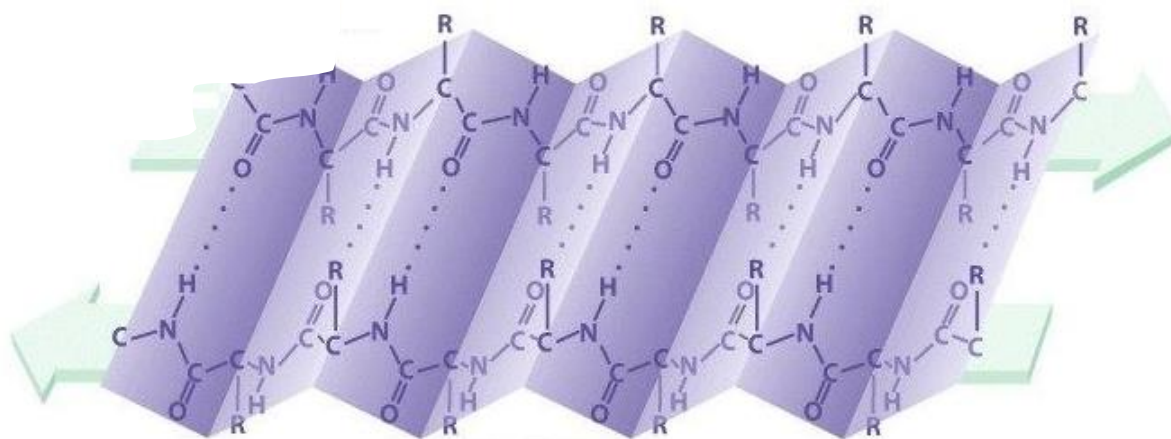


Рисунок 25 – Антипараллельный β -слой

Статистический клубок (беспорядочный клубок, нерегулярные вторичные структуры, соединительные петли) представляет собой участок полипептидной цепи, не обладающий α -спиральной или β -складчатой структурой, а представленный петлеобразными и кольцеобразными структурами. Но это не означает произвольной ориентации полипептидной цепи, а наоборот, обладает определенной высокоупорядоченной статистической структурой, которая в основном определяется взаимодействиями радикалов аминокислотных остатков, входящих в их состав. В молекулах конкретных белков она не беспорядочна, а фиксирована. В этих структурах не все группы C=O и N-H могут участвовать в образовании водородных связей, поэтому эти участки полипептидной цепи в большинстве случаев находятся на поверхности белковой молекулы в области контакта с водой.

Выделяют *сверхвторичные (надвторичные) структуры* – стабильные комплексы α -спиралей и β -структур, формирующиеся за счет межрадикальных взаимодействий. Определенные характерные сочетания α -спиралей и β -структур часто обозначают как «структурные мотивы». Структурный мотив – это набор сходно расположенных в пространстве элементов вторичной структуры, обнаруживаемый в пространственных структурах многих белков. Некоторым структурным мотивам приписывается определенная функциональная или структурная роль в белке. В глобулярных белках обнаружены, например, складка Россмана ($\beta\alpha\beta$ -элемент, т. е. 2 сегмента α -спирали (розовые), вставленные между тремя параллельными β -цепями (сиреневые)) (Рисунок 26), β -меандр (слой из трех антипараллельных β -цепей, «Меандр» – название очень извилистой реки в Греции). Например, фермент триозофосфатизомераза имеет супервторичную структуру в виде β -бочонка.

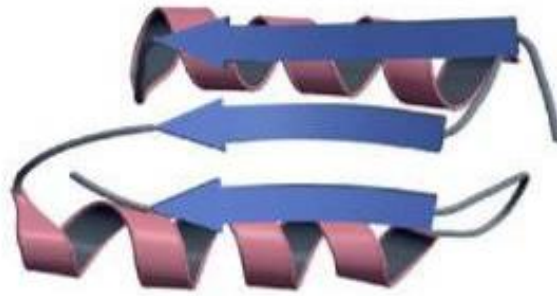


Рисунок 26 – Укладка Россмана

Третичная структура белка. Основой функциональности белка, которая требует точной пространственной организации больших ансамблей аминокислот является третичная структура. Третичной структурой называют распределение в пространстве всех атомов белковой молекулы. Домен является участком третичной структуры фермента, а глобулярный белок – третичной структурой белковой молекулы фермента.

Третичная или нативная структура – это трехмерная конформация полипептидной цепи в пространстве или способ укладки вторичной структуры в компактную структуру определённого объема. При сворачивании вторичной структуры в третичную образуются домены. Домен – это участок в третичной структуре белка, который обладает структурной и функциональной автономией, например, фермент папаин имеет доменную структуру. Его трёхмерная структура состоит из двух различных доменов (очерчены пунктиром), между которыми находится активный центр фермента (указаны стрелками). В его состав входят аминокислоты цистеин-25 и гистидин-159. Папаин стабилизируется тремя дисульфидными мостиками (Рисунок 27).

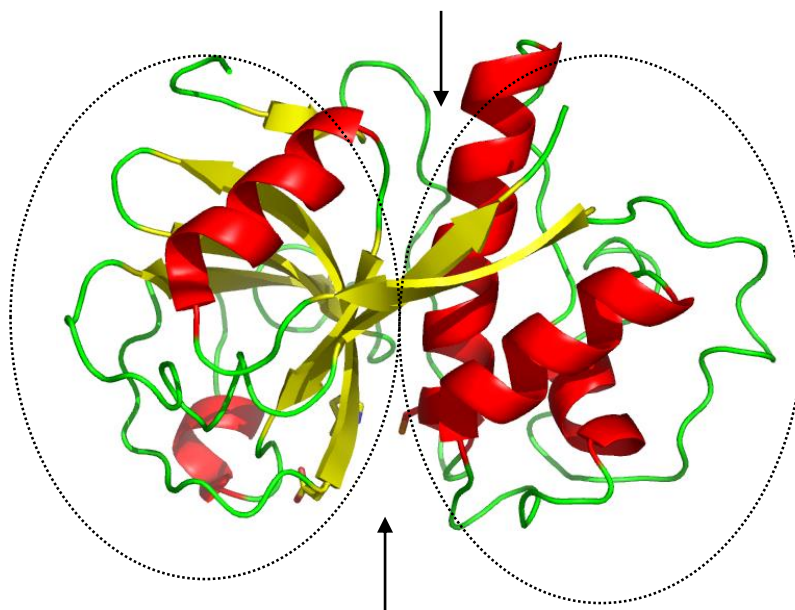


Рисунок 27 – Доменная структура фермента папаина

В молекулах фермента может быть один или несколько доменов, их функции могут быть одинаковыми или разными. Домен одного и того же типа строения может входить в состав разных белков ферментов, это даёт схожесть их биологических и химических функций. Ферменты сконструированы по модульному принципу, где модулем является домен. Стабильность третичной структуры зависит от системы нековалентных взаимодействий внутри белковой глобулы. Некоторые белки дополнительно стабилизируются ковалентными – дисульфидными связями; однако немало белков, в том числе достаточно стабильных, вовсе их лишены. Среди нековалентных взаимодействий, реализующихся при образовании пространственной структуры белка, наибольшую точность в фиксировании межатомных расстояний и углов обеспечивают водородные связи.

В нативном белке неполярные аминокислотные остатки формируют гидрофобное ядро, которое окружено наружной оболочкой, состоящей в основном, из полярных аминокислотных остатков. Нередко на поверхности белка образуются гидрофобные «пятна», которые могут иметь функциональное значение – участвовать в связывании субстрата или другого компонента (лиганда), в белок-белковых взаимодействиях, в частности в стабилизации четвертичной структуры. Полярные остатки, в свою очередь, могут находиться внутри глобулы, где они формируют электростатические или водородные связи. Иногда это также необходимо для выполнения белком своих функций.

Геометрическая форма ферментов, являющихся глобулярными белками, в первом приближении, представляет собой эллипсоид вращения, у которого отношение полуосей, как правило, не превышает 2:1. При этом поверхность глобулярных белков как бы изрыта, содержит впадины, щели которые существенны для функционирования белка, образуя активный центр.

Для пространственной структуры белка характерна определенная динамика, т.е. возможны определенные типы движений белковой молекулы: атомные флуктуации (несогласованные перемещения отдельных атомов); коллективные (согласованные) перемещения групп атомов (от нескольких до сотен) и индуцированные внешними факторами изменения конформации.

Именно система нековалентных связей в белке допускает локальные флуктуации, например частичное и обратимое «расстегивание» α -спиралей или β -структур. Аминокислотные остатки, расположенные на концах упорядоченных элементов вторичной структуры обладают большей подвижностью по сравнению с «внутренними» остатками, перемещение которых потребовало бы серьезных нарушений кооперативной системы нековалентных взаимодействий. В сочетании с наличием небольших пустот все это позволяет молекулам малого размера перемещаться внутри пространственной структуры, несмотря на плотность ее упаковки. Аминокислотные остатки, расположенные на поверхности белка, еще более динамичны. Например, длинные и, как правило, хорошо гидратированные боковые цепи лизина описывают окружности. Нередко значительной подвижностью (до 10 Å) обладают петли нерегулярной структуры на поверхности белка. В то же время многие элементы структуры белков, содержащие компоненты каталитического центра или иные функционально важные остатки, нередко оказываются менее подвижными, чем

наружные петли. Этим, видимо, обеспечивается точность их взаимодействия с субстратами и другими компонентами (лигандами).

Атомные флуктуации могут выполнять роль «смазки» при перемещениях крупных участков структуры, препятствуя их «залипанию», а также помогать «причаливанию», взаимной подгонке поверхностей белковых глобул при образовании ими четвертичной структуры, формировании комплексов ферментов с субстратами и ингибиторами.

Источником первых двух типов движений могут быть тепловые колебания, тогда как движения третьего типа – крупные перестройки, – как правило, происходят за счет энергии взаимодействия белка с теми или иными лигандами. При изменении внешних условий (например, при повышении температуры) твердый белок ведет себя как кристалл – то есть он «терпит», а потом разом плавится, – а не теряет своей формы и твердости постепенно, как стекло. Это фундаментальное свойство белков тесно связано с надежностью их работы: как электрическая лампочка, белки ломаются по принципу «все или ничего», а не постепенно (последнее привело бы к ненадежности их действия – к расплыванию специфичности и т.д.). Говоря о твердости, надо различать сравнительно небольшие и действительно твердые однодоменные белки (они состоят из одной компактной глобулы), – и более крупные белки, имеющие либо доменную, либо четвертичную структуру: слагающие их субглобулы могут сдвигаться и раздвигаться, а также слегка, как твердое тело, деформироваться (но не полностью перестраиваться!) при функционировании белка.

Четвертичная структура – последний уровень в организации белковой молекулы, к тому же необязательный, до половины белков ее не имеют.

Четвертичная структура способна выполнять одну или несколько функций.

Объединение нескольких взаимосвязанных функций в единой структуре. Например, протеинкиназа состоит из двух субъединиц, одна из которых катализирует перенос фосфата АТФ на белок, а другая является регуляторной.

Архитектурная функция. В триозофосфатизомеразе зона связывания субстрата образована двумя субъединицами, которые при взаимодействии с фосфатной группой субстрата сближаются, закрывая его от окружающего растворителя, так что реакция протекает при полном его отсутствии.

Регуляторная функция. Главная функциональная особенность четвертичной структуры, по-видимому, смысл ее существования, состоит в том, что относительно слабые взаимодействия между субъединицами, характер которых существенно зависит от третичной структуры каждой из них, особенно удобны для регуляторных воздействий, управления активностью белков. Ввиду относительной слабости межсубъединичных контактов изменения в третичной структуре какой-либо субъединицы, вызванные ее взаимодействием с субстратом или иным лигандом, передаются на зону ее контакта с другой субъединицей, изменяя характер этой зоны. Такое изменение приводит к перестройке всей четвертичной структуры и обеспечивает передачу эффекта от одной субъединицы к другим.

Зона контакта между субъединицами, будучи относительно слабым элементом белковой структуры, легко воспринимает и изменения, происходящие при

посттрансляционной модификации белка, например, при включении или отщеплении фосфатного остатка, что опять таки используется как регуляторный механизм.

А теперь капля дегтя в бочке меда. Столь распространенное разделение пространственного строения белка на вторичные и третичную структуры, предложенное в 1952 г. Линдерстрем-Лангом или на вторичные, супервторичные, доменные и третичные структуры, предложенное в 1979 г. Шульцем и Ширмером, строго говоря, справедливо лишь по отношению к регулярным компонентам фибриллярных белков и ограниченной группе глобулярных белков. Большая часть белковых молекул существенно иррегулярна, что делает бесплодным поиск простых эмпирических предсказаний пространственной структуры по аминокислотной последовательности. У эволюционно отобранной аминокислотной последовательности именно взаимодействия боковых цепей между собой и с элементами основной цепи приводят к возникновению энергетических барьеров между вероятными конформационными состояниями макромолекулы и делают возможным выделение из их огромного количества наиболее стабильной, строго определенной нативной структуры. Представление о том, что у полипептидной цепи наиболее компактными, энергетически предпочтительными во всех случаях оказываются только регулярные структуры, не подкрепляется физическими соображениями, противоречит экспериментальным данным и результатам теоретического конформационного анализа. Часто встречаемые в природе регулярность и простота форм всегда обусловлены физическими причинами, стремлением обрести минимальную свободную энергию. У монокристалла, например, высокая симметрия элементарной ячейки представляет наилучшие условия для образования наибольшего количества стабилизирующих контактов. У жидкости шаровая форма капель обладает минимальной поверхностью и, соответственно наименьшей энергией поверхностного натяжения и т.д. У белков с крайне нерегулярным расположением вдоль цепи боковых радикалов пространственные структуры с регулярными формами основной цепи не могут во всех случаях обеспечить максимальное число эффективных внутримолекулярных контактов и быть всегда самыми стабильными. Реализующаяся пространственная структура белка определяется конкретной аминокислотной последовательностью. В силу своей уникальности она непредсказуема на основе статистических характеристик уже изученных белков.

Рассмотрев структурную организацию белковых ферментов, перейдем к функциональным особенностям данной группы молекул. Ферменты, являясь растворимыми белками имеют сферическую (глобулярную) форму. В биологически активном состоянии глобулярные белки характеризуются специфической трехмерной структурой (нативной конформацией). Если эта структура нарушается в процессе денатурации, белок теряет биологическую активность, переходит обычно в нерастворимую форму и осаждается. Это происходит, например, при варке яиц: при нагревании жидкий яичный белок переходит в нерастворимую форму и затвердевает. Для изображения конформации белка (в очень упрощенном виде) часто используют ленточные диаграммы (диаграммы Ричардсон; Рисунок 28). Здесь α -спирали изображены в виде красных цилиндров, а складчатые β -структуры – в виде зеленых

стрелок. Участки с менее выраженной структурой, включая β -петли, представлены в виде серых трубочек.

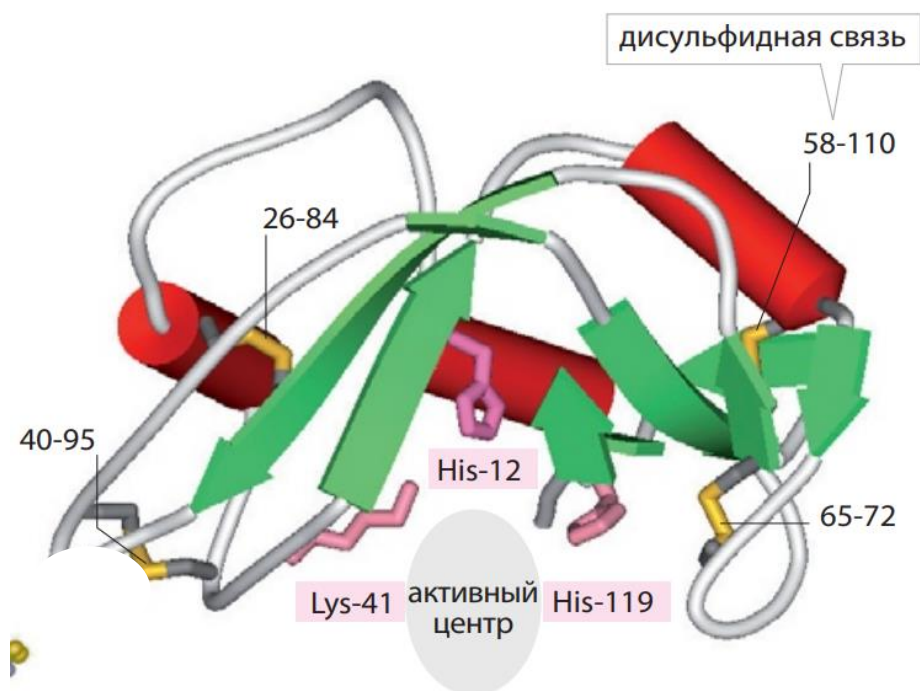


Рисунок 28 – Нативная конформация рибонуклеазы

Нативная конформация белка стабилизирована за счет множества различных взаимодействий (Рисунок 29). Как указывалось ранее, во всех белках в ее поддержании участвуют многочисленные водородные связи. Они возникают не только внутри вторичных структур, но и между боковыми цепями отдаленных друг от друга остатков. Многие белки стабилизируются за счет образования комплексов с ионами металлов. Кроме того, чрезвычайно важную роль в стабилизации белков играют гидрофобные взаимодействия. В глобулярных белках большинство гидрофобных аминокислотных остатков сосредоточено во внутренней полости, а полярные остатки экспонированы наружу и контактируют с водой. Единственный вид ковалентных взаимодействий, участвующих в стабилизации белков, – дисульфидные связи между остатками цистеина. Чаще всего они встречаются во внеклеточных белках, поскольку во внутриклеточном пространстве обычно поддерживаются восстанавливающие условия, при которых дисульфидные мостики расщепляются. В физиологических условиях белки самопроизвольно сворачиваются, переходя в нативную конформацию (фолдинг). Денатурация (потеря нативной конформации) происходит при экстремальных значениях pH, высокой температуре или под действием органических растворителей, детергентов и других денатурирующих веществ (например, мочевины).

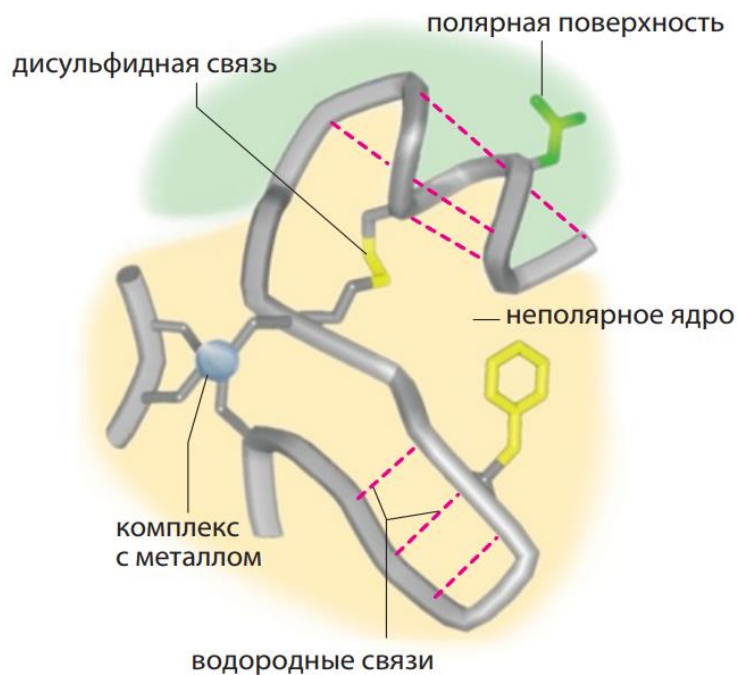


Рисунок 29 – Стабилизация конформации белка

Способность белка самопроизвольно возвращаться в нативную конформацию впервые была продемонстрирована в эксперименте с рибонуклеазой (Рисунок 29) – пищеварительным ферментом, состоящим из 124 аминокислотных остатков. Нативный белок (Рисунок 28) имеет протяженные участки β -структуры и три α -спирали. Восемь остатков цистеина образуют четыре дисульфидных мостика. Наиболее важную роль в катализе играют остатки His-12, Lys-41 и His-119 (выделены розовым цветом). Вместе с другими аминокислотными остатками они формируют активный центр фермента. Дисульфидные мостики рибонуклеазы можно расщепить с помощью тиоспиртов. Если, кроме того, к раствору белка добавить концентрированный раствор мочевины, белковая глобула полностью разворачивается. В такой форме (Рисунок 30 слева) молекула имеет длину 35 нм.

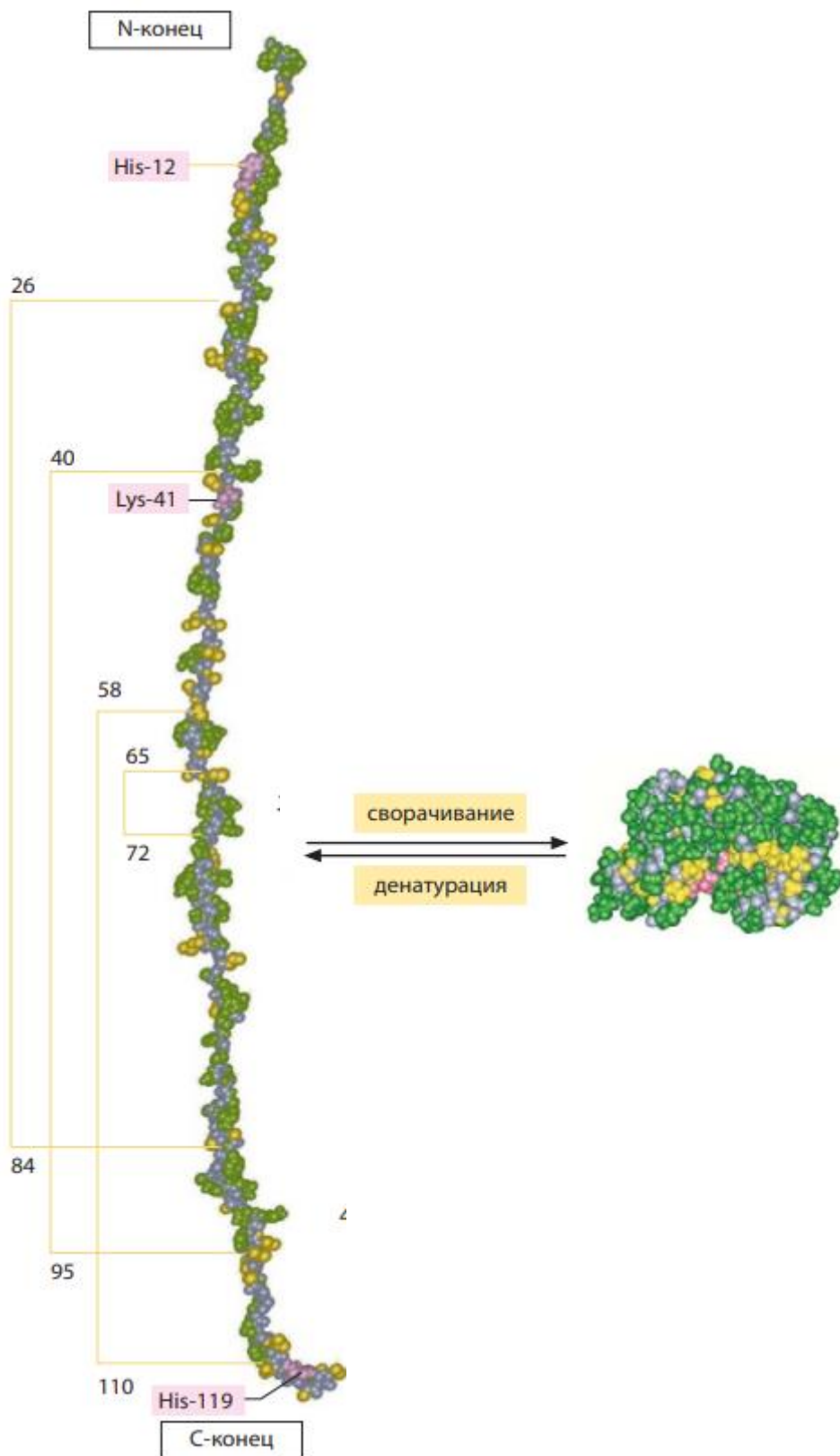


Рисунок 30 – Фолдинг и денатурация рибонуклеазы

В денатурированном белке полярные (зеленые) и неполярные (желтые) аминокислотные остатки расположены случайным образом. Важные для катализа аминокислотные остатки (розовые) разнесены на значительное расстояние и не могут взаимодействовать друг с другом и с субстратом. Поэтому в денатурированной форме белок полностью теряет ферментативную активность.

При удалении из раствора тиоспирта и мочевины белковая молекула самопроизвольно восстанавливает вторичную и третичную структуры. Остатки цистеина сближаются и под действием кислорода воздуха окисляются, вновь образуя дисульфидные мостики. Восстанавливается активный центр. По сравнению с денатурированной формой нативная форма белка выглядит удивительно компактной: глобула имеет размер $4,5 \times 2,5$ нм. В этом состоянии неполярные боковые цепи (желтые) в основном спрятаны внутрь глобулы, а полярные (зеленые) располагаются на поверхности. Как уже упоминалось выше, это объясняется гидрофобными взаимодействиями, которые играют важную роль в стабилизации нативной конформации.

Ферментативной активностью могут обладать как простые, так и сложные белки. Первые состоят только из полипептидных цепей и гидролизуются до аминокислот (примерами могут служить ферменты пепсин, трипсин, уреазы и т.д.). Вторая группа ферментов представлена сложными белками, для проявления каталитической активности которых требуется присутствие веществ небелковой природы – кофакторов или косубстратов. Кофакторы – ионы металлов (а также некоторые неорганические анионы) и косубстраты (НАД(Н), S-аденозил-L-метионин и АТФ), 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-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, например, Ca^{2+} .

В составе фермента выделяют области, выполняющие различную функцию (Рисунок 31):

Активный центр – комбинация аминокислотных остатков (обычно 12-16), обеспечивающая непосредственное связывание с молекулой субстрата и осуществляющая катализ. Аминокислотные радикалы в активном центре могут находиться в любом сочетании, при этом рядом располагаются аминокислоты, значительно удаленные друг от друга в линейной цепи.

У ферментов, имеющих в своем составе несколько мономеров, может быть несколько активных центров по числу субъединиц. Также две и более субъединицы

могут формировать один активный центр. У сложных ферментов в активном центре обязательно расположены функциональные группы кофактора.

В свою очередь в активном центре выделяют два участка: **якорный** (контактный, связывающий) – отвечает за связывание и ориентацию субстрата в активном центре; **каталитический** – непосредственно отвечает за осуществление реакции.



Рисунок 31 – Области, выполняющие различные функции фермента

Аллостерический центр (*allos* – чужой) – центр регуляции активности фермента, который пространственно отделен от активного центра и имеется не у всех ферментов. Связывание с аллостерическим центром какой-либо молекулы (называемой активатором или ингибитором, а также эффектором, модулятором, регулятором) вызывает изменение конфигурации белка-фермента и, как следствие, скорости ферментативной реакции. В качестве такого регулятора может выступать продукт данной или одной из последующих реакций, субстрат реакции или иное вещество. Аллостерические ферменты являются полимерными белками, активный и регуляторный центры находятся в разных субъединицах (Рисунок 32).



Рисунок 32 – Каталитическая и регуляторная субъединицы фермента

Изоферменты – это молекулярные формы одного и того же фермента, возникшие в результате небольших генетических различий в первичной структуре фермента. Различные изоферменты определяют скорость и направление реакции благодаря разному сродству к субстрату.

Примером фермента, имеющего изоферменты, является амилаза. Панкреатическая амилаза (изофермент Р) отличается по аминокислотной последовательности и свойствам от амилазы слюнных желёз (изофермент S), кишечника и других органов.

Также, например, фермент креатинкиназа (креатинфосфокиназа)(КФК) представлен тремя изоферментными формами, составленными из двух типов субъединиц: М (англ. *muscle* – мышца) и В (англ. *brain* – мозг). Креатинкиназа-ВВ состоит из субъединиц типа В и локализуется в головном мозге, креатинкиназа-ВМ – по одной М и В субъединице, активна в миокарде, креатинкиназа-ММ содержит две М-субъединицы, специфична для скелетной мышцы.

Основные свойства ферментов. Действие ферментов отличается **специфичностью**. Это касается не только типа катализируемой реакции (реакционная специфичность), но и природы реагирующих веществ (субстратов; субстратная специфичность). Более того, большинство ферментов способны различать стереоизомеры (стереоспецифичность).

В результате метаболизма глюкозы в клетке образуется пируват – анион 2-кетокислоты (2-оксокислоты). Далее в анаэробных условиях в присутствии косубстрата НАД(Н) пируват восстанавливается до лактата — аниона соответствующей 2-гидроксикислоты. В аэробных условиях эта реакция идет в обратном направлении, но оба превращения катализирует фермент лактатдегидрогеназа. Таким образом, лактатдегидрогеназа не является высокоспецифичной по отношению к субстрату. Она участвует в превращениях не только пирувата, но и других короткоцепочечных 2-кетокислот или 2-гидроксикислот.

● Реакционная специфичность	$2\text{-оксокислота} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightleftharpoons{1} 2\text{-гидроксикислота} + \text{NAD}^+$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> COO^- $$ $\text{O}=\text{C}$ $$ R <p>субстрат</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\text{NADH} + \text{H}^+$ <p>кофермент</p> </div> <div style="text-align: center;"> COO^- $$ $\text{O}=\text{C}$ $$ R <p>субстрат</p> </div> <div style="text-align: center;"> NAD^+ <p>кофермент</p> </div> </div>																					
● Субстратная специфичность	COO^- $ $ $\text{O}=\text{C}$ $ $ R	<table border="1"> <thead> <tr> <th>R</th> <th>k_{cat}</th> <th>K_M (mM)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-CH₃</td> <td>100</td> <td>0,09</td> </tr> <tr> <td>-H</td> <td>60</td> <td>3,2</td> </tr> <tr> <td>-CH₂-CH₃</td> <td>50</td> <td>0,6</td> </tr> <tr> <td>-CH₂-CH₂-CH₃</td> <td>6</td> <td>1,9</td> </tr> <tr> <td>-CH₂-CH(CH₃)₂</td> <td>0,02</td> <td>3,6</td> </tr> </tbody> </table>	R	k_{cat}	K_M (mM)	-CH ₃	100	0,09	-H	60	3,2	-CH ₂ -CH ₃	50	0,6	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	6	1,9	-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	0,02	3,6		
R	k_{cat}	K_M (mM)																				
-CH ₃	100	0,09																				
-H	60	3,2																				
-CH ₂ -CH ₃	50	0,6																				
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	6	1,9																				
-CH ₂ -CH(CH ₃) ₂	0,02	3,6																				
● Стереоспецифичность	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> COO^- $$ $\text{HO}-\overset{*}{\text{C}}-\text{H}$ $$ CH_3 <p>L-лактат</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\xrightleftharpoons{1a}$ </div> <div style="text-align: center;"> COO^- $$ $\text{O}=\text{C}$ $$ CH_3 <p>пируват</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\xrightleftharpoons{1b}$ </div> <div style="text-align: center;"> COO^- $$ $\text{H}-\overset{*}{\text{C}}-\text{O}$ $$ CH_3 <p>D-лактат</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> <div style="text-align: center;"> <p>1a L-лактатдегидрогеназа</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>1b D-лактатдегидрогеназа</p> </div> </div>																					

Рисунок 33 – Специфичность ферментативного катализа [10]

Как видно из таблицы (Рисунок 33) (субстратная специфичность), параметры k_{cat}^{10} и K_M для реакции восстановления разных 2-кетокислот достаточно сильно различаются. Наибольшую активность (выраженную в виде отношения k_{cat}/K_M) фермент проявляет в отношении пирувата ($R = \text{CH}_3$). А субстрат с более крупной и разветвленной цепью ($R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) подвергается превращению в 200 000 раз медленнее. Поскольку молекула лактата содержит хиральный центр, существуют два энантиомера – L-лактат и D-лактат. У животных в результате восстановления пирувата под действием стереоспецифической L-лактатдегидрогеназы образуется почти исключительно L-лактат, а вот при ферментации молочной кислоты бактериями образуется D-энантиомер. К специфичности ферментов мы еще не раз будем обращаться и пояснять в последующих разделах.

На каталитические свойства ферментов и как следствие — на их активность влияют многие факторы. Чтобы точно и воспроизводимо измерить активность фермента, эти факторы нужно контролировать. Это касается физических параметров (температура и давление), химических свойств раствора (рН, ионная сила) и концентрации всех субстратов, кофакторов и ингибиторов.

Зависимость ферментативной активности от рН. Активность ферментов очень сильно зависит **от рН** (Рисунок 33). График зависимости ферментативной активности от рН обычно имеет колоколообразный вид. Если речь идет о ферментах животных, их рН-оптимум, т. е. значение рН, при котором достигается максимальная активность, часто находится вблизи внутриклеточного значения рН (т. е. около 7). Однако бывают и исключения. Например, протеиназа пепсин, действующая в кислой среде желудка, имеет рН-оптимум около 2, а некоторые другие ферменты активны при рН выше 9.

¹⁰ k_{cat} – молекулярная активность фермента, определяется как «число превращений», т.е. число молекул субстрата, подвергающихся превращению одной молекулой фермента в одну секунду при определенных условиях; K_M – константа Михаэлиса.

Колоколообразный вид рН-зависимости объясняется тем, что в катализе главную роль играют аминокислотные остатки с ионизируемыми группами в боковой цепи. В представленном на рисунке примере для активации фермента важны две группы: основная группа В активна только в протонированном виде (BH^+), а группа АН – только в диссоциированном виде (A^-). При рН 7 обе группы на 90% ионизированы; при понижении или повышении рН одна из групп переходит в неактивное состояние.

Зависимость активности фермента от температуры обычно имеет несимметричный вид (Рисунок 34). При повышении температуры усиливается движение молекул, скорость реакции повышается, но при определенной температуре фермент теряет стабильность и денатурирует, что резко снижает его активность.

Активность ферментов высших организмов редко повышается при действии температуры выше $50\text{ }^\circ\text{C}$, а вот ферменты термофильных бактерий сохраняют активность даже при $100\text{ }^\circ\text{C}$.

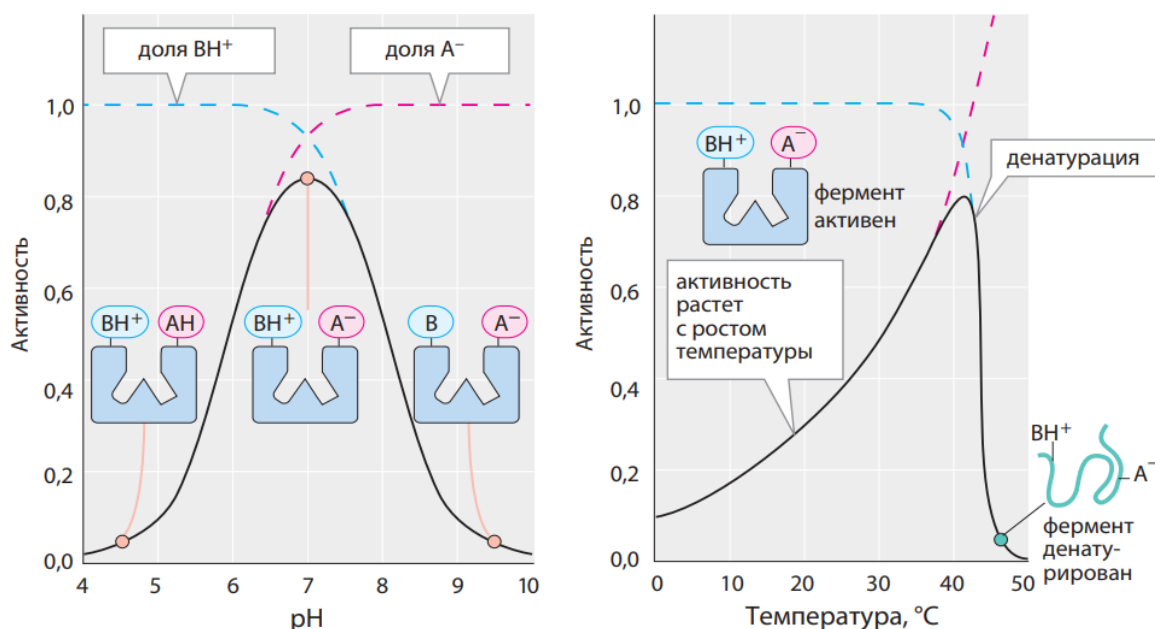


Рисунок 34 – Зависимость активности фермента от рН и температуры [10]

В отличие от оптимума рН не существует температурного оптимума активности ферментов, хотя такие данные часто приводят, даже в общеизвестных учебниках. При исследовании зависимости активности ферментов от температуры на самом деле обнаруживается максимум, напоминающий рН-оптимум, однако в данном случае этот максимум является результатом наложения двух различных процессов. Благодаря ускорению движения молекул скорость химической реакции возрастает в 2-3 раза при повышении температуры на каждые 10° . Это относится и к ферментативным реакциям, и этот рост может продолжаться до очень высокой температуры. Однако из-за высокой чувствительности ферментов при повышении температуры начинает доминировать процесс денатурации и фермент инактивируется. Денатурация ферментов определяется двумя факторами – температурой и временем. При высокой температуре инактивация происходит быстро, но даже при умеренной температуре возможна денатурация. Например, в случае алкогольдегидрогеназы инактивация может

произойти уже при физиологической температуре 37 °С. Поскольку этот процесс развивается во времени, степень инактивации зависит от того, как долго фермент находился в неблагоприятных условиях, прежде чем была измерена скорость катализируемой им реакции.

В исследовательских работах определенную роль играет и навык экспериментатора: в идентичных условиях определенное количество фермента при добавлении в реакционную смесь проявляет большую активность, чем то же количество фермента после длительной предварительной инкубации (например, при слишком медленной работе). Это, кроме того, еще один довод против использования температуры, при которой достигается наибольшая скорость реакции. С этой точки зрения стандартная температура эксперимента должна быть значительно ниже той, при которой достигается максимальная скорость реакции. Однако при слишком низких температурах скорость реакции низкая и для проведения анализа требуется более высокая концентрация фермента. Поэтому приходится принимать компромиссное решение. При проведении анализа обычно выбирают одно из трех указанных ниже значений температуры:

– 25°С: Умеренная температура для чувствительных ферментов. Это значение чуть превышает значение комнатной температуры, так что его легко поддерживать и нет необходимости предварительно инкубировать реакционную смесь (проводить эксперимент при комнатной температуре не рекомендуется, так как она не постоянна, а подвержена различным флуктуациям: открытые окна, солнечный свет и др.);

– 30°С: Средняя температура, ближе к физиологическим условиям; рекомендуется для более стабильных ферментов;

– 37°С: Для исследований в физиологических условиях, если только фермент остается стабильным при этой температуре. Поскольку для нагревания реакционной среды до данной температуры требуется определенное время, обычно необходима предварительная инкубация. Для ферментов из организмов, обитающих в экстремальных условиях, таких как психрофилы или термофилы, требуются особые температурные условия [2].

Классификация и номенклатура ферментов

На сегодняшний день известно более 6000 ферментов. Динамика нарастания количества обнаруживаемых в природе ферментов представлена в таблице 1, а их классификация – в таблице 2.

Таблица 1 – Динамика нарастания количества обнаруженных в природе ферментов

Год	1930	1947	1957	1962	1972	1975	1994	2024
Число ферментов	80	200	660	880	1770	2140	3200	6800

Классификация ферментов была принята в 1961 году на V Международном конгрессе биохимиков, хотя международный союз биохимии, спонсирующий данный конгресс, существовал к этому моменту уже 6 лет. В настоящее время Международный союз биохимии и молекулярной биологии, объединяющий биохимиков и молекулярных

биологов из 75 стран и регионов (NC-IUBMB¹¹), решает многочисленные вопросы в одноименных областях, в том числе отвечает за номенклатуру и классификацию описанных ранее и вновь обнаруженных ферментов [1, 11].

Таблица 2 – Классы ферментов

№	Класс	Тип реакции	Важнейшие подклассы
1	<i>Оксидоредуктазы</i>	<p>○ = Восстановительный эквивалент</p>	дегидрогеназы, пероксидазы, нитратредуктазы
2	<i>Трансферазы</i>		метилтрансферазы, сульфотрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы, ацилтрансферазы
3	<i>Гидролазы</i>		пептидазы, эстеразы, фосфатазы, гликозидазы
4	<i>Лиазы</i>		декарбоксилазы, альдолазы, дегидратазы
5	<i>Изомеразы</i>		эпимеразы, рацемазы, цис-транс-изомеразы
6	<i>Лигазы</i>		аминокислотно-тРНК-лигазы, пируваткарбоксилаза
7	<i>Транслоказы (с 2018 года)</i>		транслоказы транспортируют протоны; катионы (ионы металлов)

На сегодняшний день известно свыше 6800 различных ферментов. Система классификации ферментов основана на их реакционной и субстратной специфичности. В каталоге ферментов каждому ферменту присвоен классификационный номер (КФ), состоящий из четырех цифр. Первая цифра указывает на принадлежность фермента к одному из семи основных классов. Следующие две цифры определяют подкласс и подподкласс, а последняя – номер фермента в этом подподклассе. Например,

¹¹ IUBMB (The International Union of Biochemistry and Molecular Biology) тесно сотрудничает с четырьмя региональными организациями, объединяющими биохимические общества Азии и Океании (Федерация биохимиков и молекулярных биологов Азии и Океании - FAOBMB), Европы (Федерация европейских биохимических обществ - FEBS), Америки (Панамериканская ассоциация биохимии и молекулярной биологии - PABMB) и Африки (Федерация африканских обществ биохимии и молекулярной биологии - FASBMB)

лактатдегидрогеназа имеет номер КФ 1.1.1.27 (класс 1 – оксидоредуктазы; подкласс 1.1 – группа СН-ОН как донор электронов; подподкласс 1.1.1 – NAD(P)⁺ как акцептор электронов). В таблице 2 указаны названия классов, типы катализируемых реакций и важные подклассы. Шесть классов ферментов были признаны с тех пор, как первый список классификации и номенклатуры ферментов был впервые утвержден Международным союзом биохимиков в 1961 году. Они были основаны на типе катализируемой реакции: оксидоредуктазы (ЕС 1¹²), трансферазы (ЕС 2), гидролазы (ЕС 3), лиазы (ЕС 4), изомеразы (ЕС 5) и лигазы (ЕС 6). Однако в 2018 году стало очевидно, что ни один из классов не может описать важную группу ферментов, которые катализируют перемещение ионов или молекул через мембраны или их разделение внутри мембран. Некоторые из них связаны с гидролизом АТФ и ранее классифицировались как АТФазы (ЕС 3.6.3.X), хотя гидролитическая реакция не является их основной функцией. Теперь эти ферменты отнесены к новому классу транслоказ ЕС (ЕС 7).

Многочисленные функциональные базы данных ферментов охватывают широкий спектр свойств и функций биокатализаторов, таких как возникновение, кинетика реакций, структура или метаболическая функция. Так база данных ExplorEnz, одобренная NC-IUBMB, разработана в Тринити-колледже Дублина в 2005 году как новый способ доступа к данным списка номенклатуры ферментов NC-IUBMB. Данные, которые хранятся в базе данных MySQL, сохраняют форматирование названий химических веществ в соответствии со стандартами IUPAC¹³. База данных BRENDA хранит большое разнообразие различных данных по всем классифицированным ферментам, в то время как KEGG, MEROPS, MetaCyc, REBASE, CAZy, ESTHER, PeroxiBase и KinBase специализируются либо на определенных аспектах функции ферментов, либо на конкретных классах ферментов, организмах или метаболических путях. Базами данных, охватывающими номенклатуру ферментов, являются упомянутый ранее ExplorEnz, SIB-ENZYME и IntEnz [12].

Но вернемся к названиям ферментов. Номенклатура фермента может быть различной, например фермент α -амилаза имеет еще пять разных по звучанию названий: гликогеназа; эндоамилаза; Така-амилаза А; 1,4- α -D-глюканглюканогидролаза; 4- α -D-глюканогидролаза. Чтобы разобраться с такой «многоликостью» наименований ферментов, стоит рассмотреть виды номенклатур. Итак, можно выделить три вида номенклатуры.

1. Систематическая номенклатура. Это название фермента включает химическое название субстрата; тип химической реакции (в соответствии с международной классификацией ферментов) и суффикс «-аза». Для α -амилазы систематическое название – 4- α -D-глюканогидролаза.

2. Рабочая номенклатура (принятое название, часто используемое). Название фермента образуется из химического названия субстрата с добавлением суффикса «-аза» либо из названия химического превращения субстрата с добавлением суффикса «-аза». Например: α -амилаза. Этот фермент катализирует эндогидролиз (1 \rightarrow 4)- α -D-

¹² ЕС (Enzyme Commission) в русской транскрипции комиссия по ферментам –КФ

¹³ Международный союз теоретической и прикладной химии (рус. аббр. ИЮПАК, англ. International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) – международная неправительственная организация

глюкозидных связей в полисахаридах, содержащих три или более (1→4) - α -связанных D-глюкозидных звеньев. Воздействует на крахмал, гликоген и родственные полисахариды и олигосахариды случайным образом; восстанавливающие группы высвобождаются в α -конфигурации. Термин " α " относится к начальной аномерной конфигурации высвобождаемой свободной углеводной группы, а не к конфигурации гидролизованной связи. В качестве примера приведем рабочую номенклатуру β -амилазы.

Систематическое название этого фермента 4- α -D-глюканмальтогидролаза. Другие названия: сахарогенамилаза; гликогеназа; 1,4- α -D-глюканмальтогидролаза. Катализирует гидролиз (1→4)- α -D-глюкозидных связей в полисахаридах с целью удаления последовательных мальтозных звеньев с невозстанавливающихся концов цепей. Воздействует на крахмал, гликоген и родственные полисахариды и олигосахариды с образованием β -мальтозы путем инверсии. Термин ' β ' относится к начальной аномерной конфигурации высвобождаемой свободной углеводной группы, а не к конфигурации гидролизованной связи.

3. Тривиальное (исторически сложившееся) название. Не дает представления о субстрате или типе химического превращения. Пример – пепсин, тромбин, трипсин, ренин, реннин.

Контрольные вопросы

1. Какие классы ферментов вы знаете?
2. Как влияет pH на активность ферментов?
3. Что такое оптимум pH?
4. Как влияет температура на активность ферментов?
5. Охарактеризуйте структурную организацию белков согласно Г. Шульцу и Р. Ширмеру.
6. Дайте определение первичной структуре белка.
7. Приведите примеры вторичных структур, встречающихся в ферментах.
8. Что такое сверхвторичные структуры, приведите примеры. Что такое домен?
9. Дайте определение понятию «фолдинг».
10. Опишите понятия «активный центр», «аллостерический центр», «изоферменты».
11. Охарактеризуйте виды специфичности ферментов.
12. Какие реакции катализируют оксидоредуктазы?
13. Как называются ферменты, которые катализируют окислительно-восстановительные реакции? Приведите примеры важнейших подклассов.
14. Какие реакции катализируют трансферазы?
15. Как называются ферменты, которые катализируют перенос функциональной группы с одного субстрата на другой? Приведите примеры.
16. Какие реакции катализируют гидролазы? Приведите примеры.
17. Приведите примеры ферментов, которые катализируют гидролитические реакции?
18. Какие реакции катализируют лиазы? Приведите примеры.

19. Как называются ферменты, которые катализируют реакции расщепления или образования двойных связей? Приведите примеры.
20. Какие реакции катализируют изомеразы? Приведите примеры.
21. Как называются ферменты, которые катализируют реакции перенесения функциональных групп в пределах молекулы? Приведите примеры.
22. Какие реакции катализируют лигазы? Приведите примеры.
23. Как называются ферменты, которые катализируют реакции присоединения, сопряженные с гидролизом нуклеозидтрифосфатов? Приведите примеры.

3 Механизм и стадии ферментативного катализа

Отличительные черты ферментативного катализа. Образование фермент-субстратных комплексов. Эффективность действия ферментов. Факторы, влияющие на скорость ферментативных реакций

Ферменты – чрезвычайно эффективные катализаторы. Они способны повышать скорость реакции в 10^{15} раз и более. Чтобы понять механизмы ферментативного катализа, сначала нужно проследить за ходом некаталитической реакции, а также рассмотреть показатели, используемые для описания химических реакций. В качестве примера рассмотрим реакцию $A + B \rightarrow C + D$ (Рисунок 35).

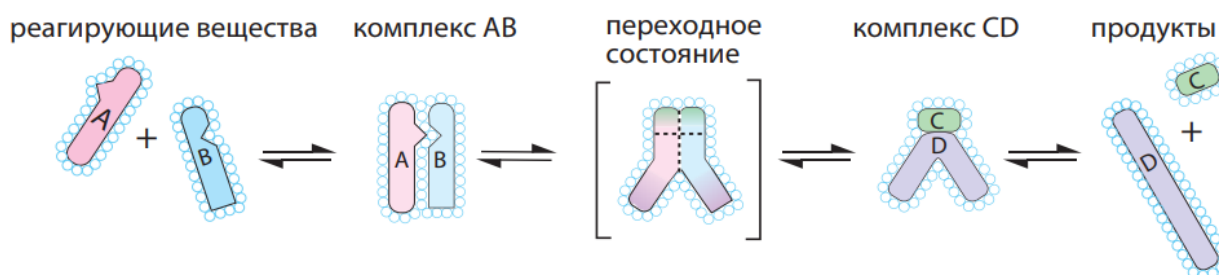


Рисунок 35 – Реакция без катализатора [10]

В водном растворе молекулы реагирующих веществ А и В, окруженные оболочкой из молекул воды (гидратной оболочкой), хаотически перемещаются под действием тепла. Взаимодействовать друг с другом они могут лишь в том случае, если столкнутся в благоприятной ориентации. Вероятность этого события невелика, и, следовательно, такие взаимодействия редки. До превращения в продукты реакции комплекс А–В должен пройти через переходное состояние, для образования которого требуются значительные затраты энергии (энергия активации, E_a).

Поскольку лишь небольшая часть комплексов А–В обладает достаточным запасом энергии, продуктивное переходное состояние возникает еще реже, чем комплекс А–В. В растворе значительная часть энергии активации расходуется на преодоление экранирующего действия гидратной оболочки и сближение молекул А и В. Кроме того, определенную роль играют перенос заряда и другие химические процессы. В результате этих ограничений без катализатора такое превращение происходит очень редко, и даже если реакция термодинамически допустима, ее скорость (v) обычно очень низкая.

Как мы уже поняли, многие химические реакции между органическими веществами в растворах протекают очень медленно вне зависимости от величины ΔG^{14} . Это связано с тем, что реагирующие вещества должны преодолеть определенный энергетический барьер. Рассмотрим ещё одну простейшую химическую реакцию $A \rightarrow B$ (Рисунок 36).

¹⁴ Химический потенциал молекулы или группы молекул называют свободной энтальпией (энергией Гиббса) и обозначают буквой G . При самопроизвольном взаимодействии молекул образуются продукты с более низким химическим потенциалом, чем у исходных веществ. Разность химических потенциалов реагирующих веществ и продуктов реакции (изменение энергии Гиббса, ΔG) и служит мерой движущей силы реакции.

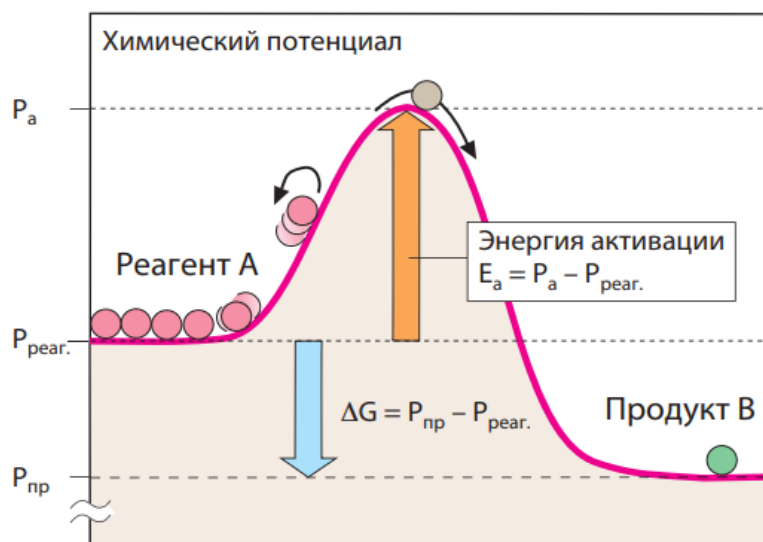
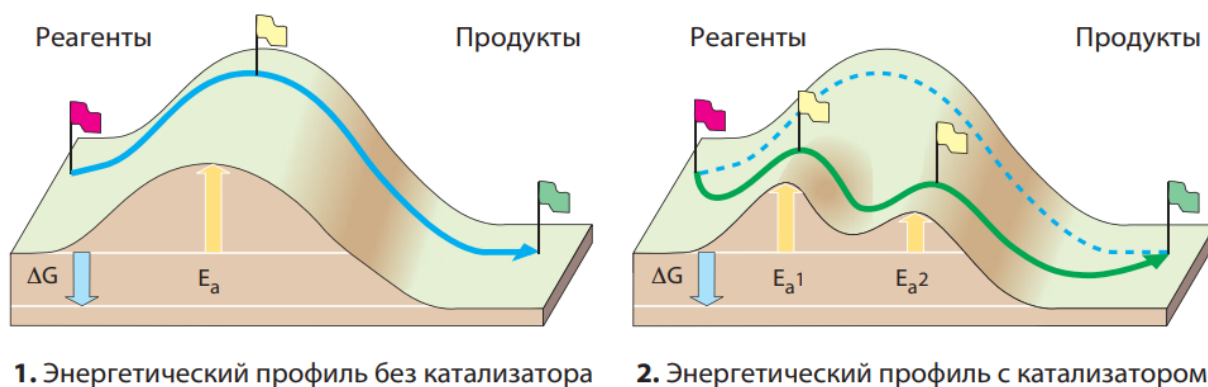


Рисунок 36 – Энергетический профиль реакции

Как реагент А, так и продукт В обладают определенным *химическим потенциалом* (соответственно $P_{реаг}$ и $P_{пр}$). Изменение свободной энергии реакции (ΔG) соответствует разности этих потенциалов. Чтобы превратиться в В, А сначала должно преодолеть энергетический барьер, высота которого, P_a , больше высоты $P_{реаг}$. Разность потенциалов $P_a - P_{реаг}$ называется энергией активации (E_a) и измеряется в кДж/моль. Принципиальная возможность превращения А в В объясняется тем, что некоторые молекулы могут иметь очень высокий потенциал, например, за счет соударений с другими молекулами. Если полученная молекулой энергия выше значения E_a , А может превратиться в В.

Катализатор создает новый путь для протекания реакции. Если у промежуточного соединения в реакции с катализатором (2) уровень энергии активации будет ниже, чем у промежуточного соединения в реакции без катализатора (1), реакция (2) будет протекать быстрее, даже при наличии нескольких промежуточных соединений (Рисунок 37).

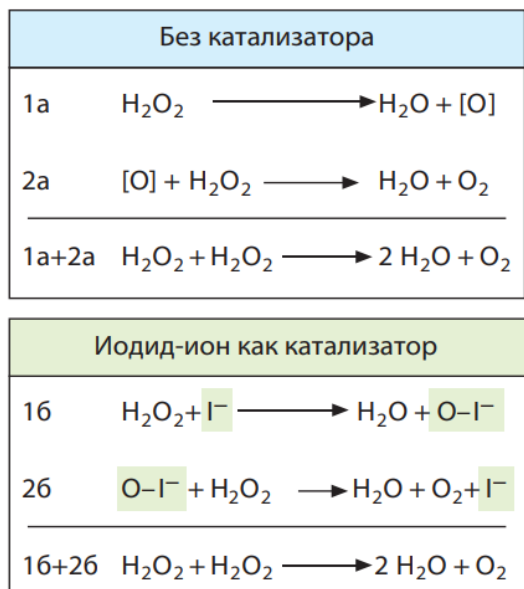


1. Энергетический профиль без катализатора 2. Энергетический профиль с катализатором

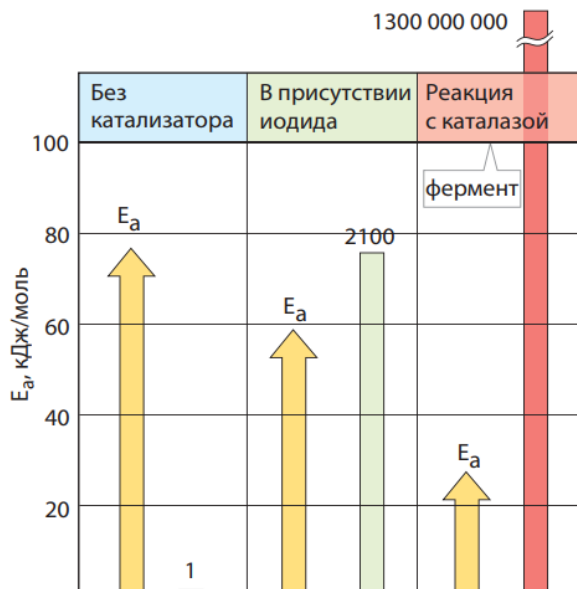
Рисунок 37 – Принципы катализа

Так как исходные вещества и продукты в обеих реакциях (без катализатора и с катализатором) одинаковы, наличие катализатора не влияет на величину ΔG . Катализаторы (и ферменты в том числе) в принципе не способны смещать равновесие катализируемой реакции.

В качестве примера рассмотрим каталитическую реакцию разложения пероксида водорода (H_2O_2), приводящую к образованию кислорода и воды. Без катализатора (Рисунок 38, 1а, 2а) молекула H_2O_2 сначала распадается на молекулу воды и атомарный кислород $[\text{O}]$, который взаимодействует с другой молекулой H_2O_2 , в результате чего образуется еще одна молекула воды и молекула кислорода O_2 .



1. Реакции



2. Энергия активации

Рисунок 38 – Разложение пероксида водорода

Энергия активации данной реакции достаточно высока (75 кДж/моль). В присутствии иодид-ионов (I^-) в качестве промежуточного соединения вместо атомарного кислорода образуется гипоиодит (O-I^-), который взаимодействует с новой молекулой H_2O_2 , образуя воду и молекулярный кислород (16, 26 рисунка 38). На этой стадии иодид-ион высвобождается и может снова вступать в реакцию. Энергия активации этой реакции ниже (56 кДж/моль), что объясняет ускорение реакции в 2100 раз по сравнению с реакцией без катализатора. Фермент каталаза, защищающий клетки от токсического воздействия пероксида водорода, обладает гораздо более высокой каталитической активностью. Энергия активации катализируемой этим ферментом реакции составляет всего 23 кДж/моль, что приводит к ускорению реакции в $1,3 \times 10^9$ раз по сравнению с реакцией без катализатора. Каталаза – один из самых эффективных ферментов. Единственная молекула фермента может осуществить превращение 10^8 (т. е. сотни миллионов) молекул H_2O_2 за секунду.

Ферментативные реакции представляют последовательный механизм, при котором субстраты А и В сначала связываются друг с другом, а потом превращаются в продукты С и D (Рисунок 39).

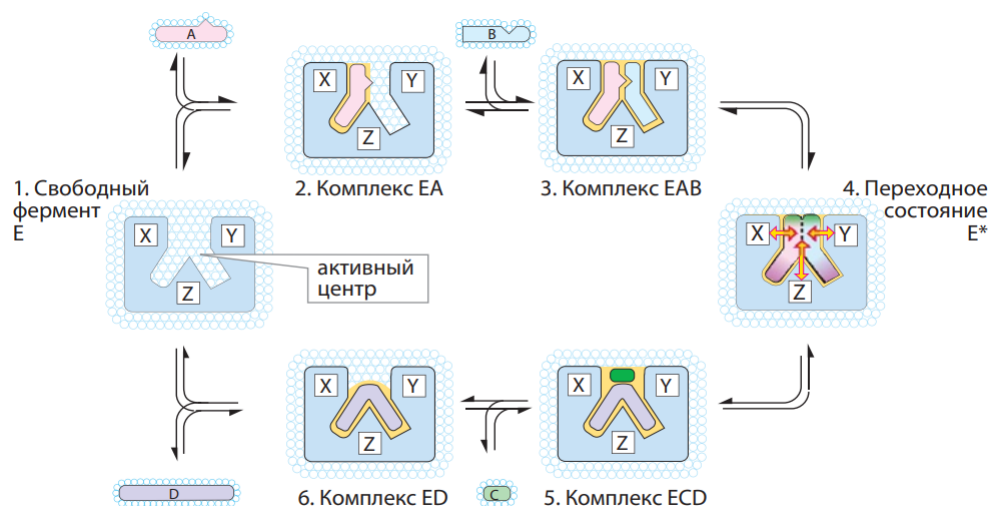


Рисунок 39 – Ферментативные реакции

Ферменты способны связывать реагирующие вещества (субстраты) в своем активном центре. В результате субстраты оказываются в оптимальной ориентации для образования переходного состояния. Таким образом, близость и правильная ориентация субстратов в активном центре фермента значительно повышают вероятность образования продуктивного комплекса А–В. Кроме того, связывание субстратов с ферментом приводит к удалению гидратной оболочки. В результате удаления молекул воды в активном центре фермента возникают совсем иные условия для протекания реакции, нежели в растворе. Третий важный фактор – стабилизация переходного состояния за счет взаимодействия аминокислотных остатков в молекуле фермента и молекул субстрата. В этом процессе часто задействованы косубстраты и другие кофакторы. Это также способствует снижению энергии активации, необходимой для достижения переходного состояния. Кроме того, многие ферменты в процессе катализа переносят специфические группы с субстрата или на субстрат. Особенно часто происходит перенос протонов. Поэтому ферментативные кислотно-основные реакции протекают гораздо более эффективно, чем обмен протонами между кислотами и основаниями в растворе. Во многих случаях химические группы на время присоединяются ковалентной связью к аминокислотным остаткам в молекуле фермента. Этот механизм называют ковалентным катализом.

Трудно количественно оценить вклад каждого этапа каталитического процесса в повышение скорости реакции, однако принято считать, что решающую роль играет стабилизация переходного состояния. Таким образом, для эффективного катализа важно не прочное связывание субстрата (это привело бы к дополнительному повышению энергии активации, а не к ее снижению), а связывание переходного состояния. Это подтверждается очень высоким сродством многих ферментов к аналогам переходных состояний. Приведем простую аналогию из области механики (Рисунок 40). Чтобы перенести металлические шарики (реагирующие вещества) из положения EA (исходное состояние) через переходное состояние с более высоким уровнем энергии в положение EP (продукты реакции), магнит (катализатор) должен быть ориентирован таким образом, чтобы сила притяжения действовала на переходное состояние (внизу), а не на исходное состояние EA (вверху).

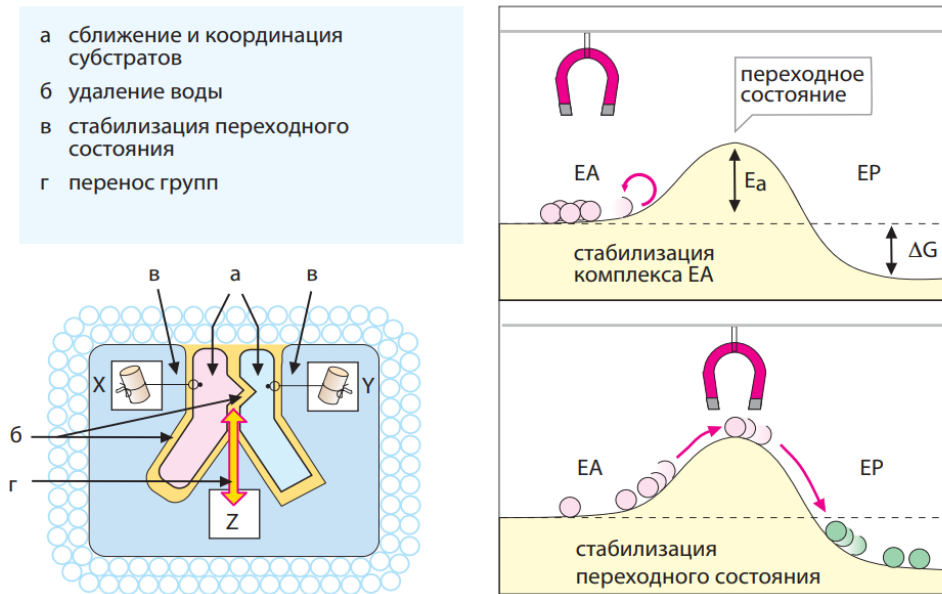


Рисунок 40 – Принципы ферментативного катализа

В большинстве ферментативных реакций участвует больше одного субстрата и образуется больше одного продукта. Кроме того, фермент редко связывает одновременно более двух субстратов. В таких условиях реакция $A + B \rightarrow A C + D$ может идти несколькими путями. Кроме последовательного механизма, когда все субстраты связываются с ферментом до отделения продуктов, существует и другой механизм, при котором сначала связывается и расщепляется первый субстрат (A) с образованием продукта P₁. При этом часть первого субстрата остается связанной с ферментом и переносится на субстрат B. В соответствии с таким механизмом, известным под названием «пинг-понг», действуют ферменты трансминазы (Рисунок 41).

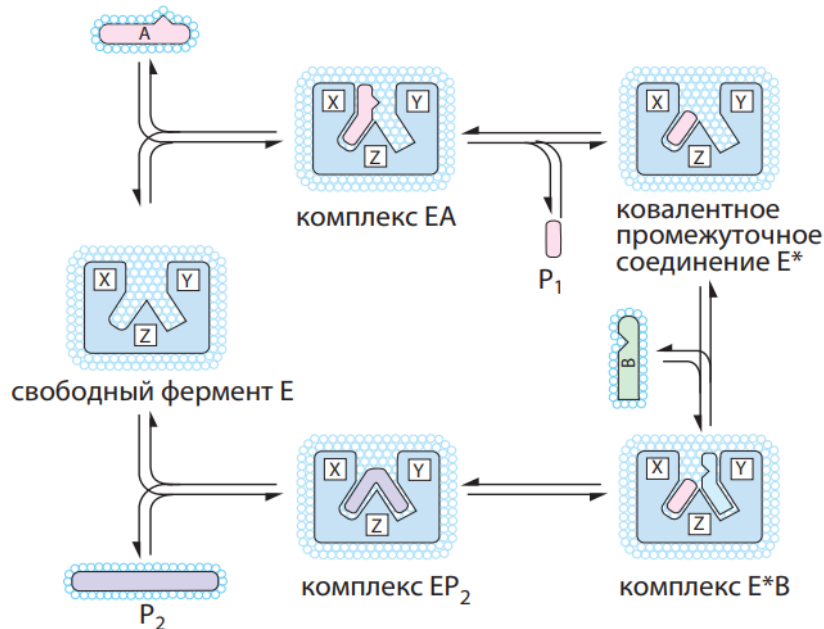


Рисунок 41 – Двухсубстратные ферментативные реакции

На каталитические свойства ферментов и как следствие – на их активность влияют многие факторы. Чтобы точно и воспроизводимо измерить активность

фермента, эти факторы нужно контролировать. Это касается физических параметров (температура и давление), химических свойств раствора (рН, ионная сила) и концентрации всех субстратов, кофакторов и ингибиторов. Зависимость активности ферментов от температуры и рН мы рассматривали ранее, в данном разделе мы опишем влияние кофакторов и косубстратов.

Ферментам, катализирующим реакции с переносом групп, обычно необходимы вспомогательные молекулы, называемые косубстратами. Эти косубстраты на время предоставляют или изымают переносимую группу. В отличие от специфических для каждого данного фермента субстратов, косубстраты работают со многими ферментами с разной субстратной специфичностью. Условно выделяют вид косубстратов (1) (Рисунок 42), которые в процессе реакции связываются подобно субстратам, подвергаются превращению и высвобождаются. Их возвращение в исходную форму происходит в независимой реакции (! отличие от кофакторов). Напротив, другой вид косубстратов (2) (Рисунок 43), прочно связываются с ферментами (иногда ковалентной связью), и остаются в связанном виде на протяжении всей реакции. Часть субстрата, которая остается связанной с косубстратом после отделения первого продукта, в следующей реакции передается на новый субстрат или косубстрат того же фермента.

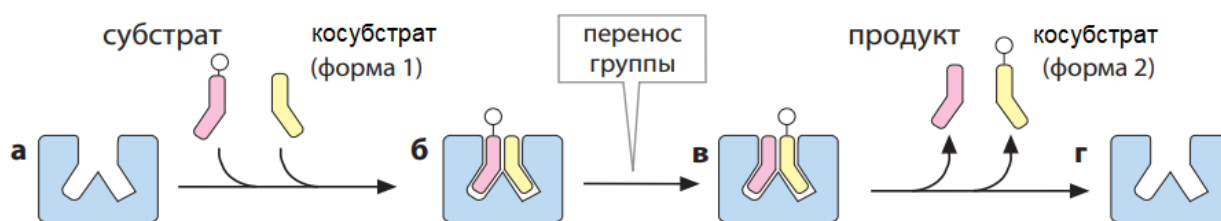


Рисунок 42 – Действие косубстрата (вид 1)

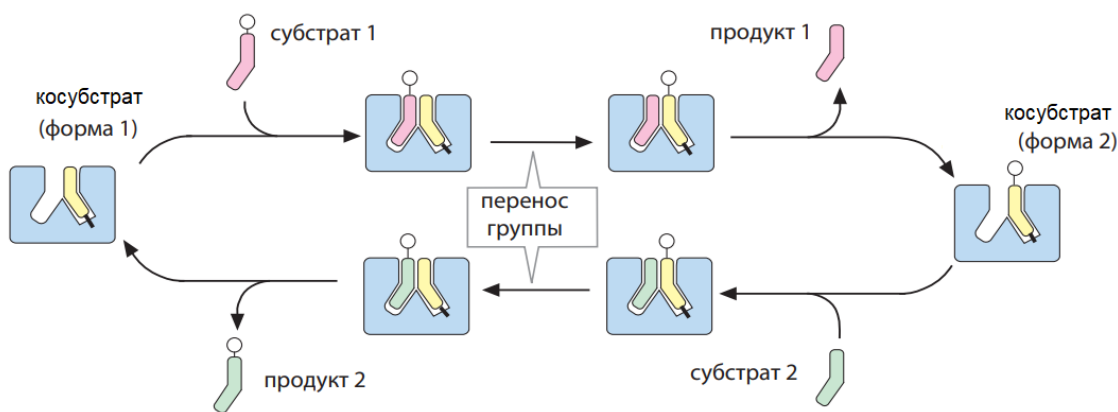


Рисунок 43 – Действие косубстрата (вид 2)

Косубстраты в зависимости от сопутствующей функции делят на 4 типа:

1. Окислительно-восстановительные ферментативные реакции (НАД⁺, НАДФ⁺, НАДФ(Н), ФМН, ФАД, убихинон, L-аскорбиновая кислота, липоевая кислота, глутатион, цитохромы и др.);
2. Реакции переноса групп 1 (нуклеозидфосфаты, Ко-А, ТДФ, ПЛФ, биотин, S-аденозилметионин (SAM));

3. Реакции переноса групп 2 (ТГФ, кобаламины);
4. Реакции активации молекул или групп с низкой реакционной способностью (АТФ и другие нуклеозидтрифосфатные косубстраты).

В роли кофакторов ферментов могут выступать ионы металлов. Их функции весьма различны: некоторые стабилизируют нативную конформацию активного центра, другие участвуют в окислительно-восстановительных реакциях или ускоряют катализ за счет поляризации химических связей в субстрате. На рисунке 44 перечислены важные металлзависимые ферменты. Металлы, выступающие в роли кофакторов, требуются в очень небольшом количестве. Они относятся к микроэлементам.

Кофактор	Фермент (примеры)
Zn ²⁺	карбоангидраза, алкогольдегидрогеназа, пептидазы
Mg ²⁺	АТФ-зависимые ферменты, фосфогидролазы
Mn ²⁺	аргиназа, супероксиддисмутаза, фотосистема II
Fe ²⁺ /Fe ³⁺	цитохром, каталаза, пероксидазы, аконитаза
Cu ²⁺	цитохромоксидаза, аминоксидазы, тирозиназа
Mo ²⁺	ксантиндегидрогеназа
Na ⁺ , K ⁺	Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза, H ⁺ /K ⁺ -АТФаза

Рисунок 44 – Металлы в роли кофакторов

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте неферментативные и ферментативные реакции, используя показатели энергии активации и энергии Гиббса.
2. Опишите механизм ферментативной реакции.
3. Опишите двухсубстратные ферментативные реакции.
4. Что такое косубстраты и кофакторы, их отличия.
5. Приведите примеры косубстратов.
6. Приведите примеры кофакторов.
7. Опишите механизм действия косубстратов в ферментативных реакциях.

4 Основы кинетики ферментативного катализа

Теория Михаэлиса–Ментен. Константы скоростей образования и распада фермент-субстратных комплексов (малые константы). Интегральные константы ферментативной реакции: максимальная скорость реакции, константа сродства и константа Михаэлиса

Кинетика ферментативных реакций (зависимость скорости реакции от времени в определенных условиях) определяется в первую очередь свойствами катализатора. Поэтому кинетические закономерности ферментативных реакций гораздо сложнее, чем закономерности некаталитических реакций. Зависимость скорости ферментативной реакции от времени в определенных условиях отражена в уравнении Михаэлиса–Ментен.

Рассмотрим характеристики, используемые в кинетике химических реакций, начиная с неферментативных как более простых. В отсутствие фермента скорость реакции (v) пропорциональна концентрации вещества А. Константу пропорциональности (k) называют константой скорости некаталитической реакции (Рисунок 45).

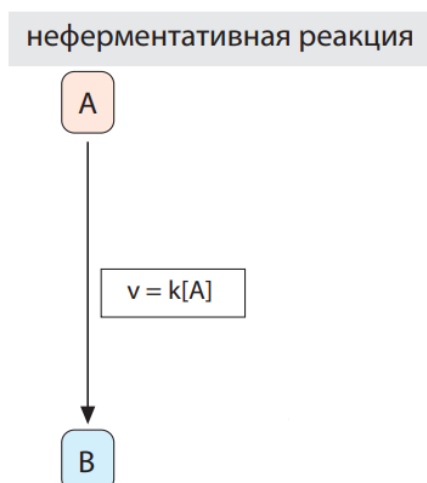


Рисунок 45 – Кинетика неферментативных реакций

Поскольку константа скорости ферментативной реакции (k_{cat}) гораздо выше k , скорость ферментативной реакции (v_e) намного выше v . Разность $v_e - v$ определяет каталитическую активность фермента. Измеряется эта величина в каталах (кат; один катал соответствует такой активности фермента, при которой происходит превращение одного моля субстрата в одну секунду). Но обычно для измерения ферментативной активности используют более практичные международные единицы (МЕ, или U, которые соответствуют превращению одного микромоля субстрата в одну минуту).

Как любой катализатор, фермент Е создает новый путь реакции (Рисунок 46). Сначала А связывается со свободным ферментом. Допустим, что эта реакция равновесная, и применим для определения концентраций [Е], [А] и [ЕА] закон действующих масс. Константу равновесия реакции связывания субстрата называют константой Михаэлиса (K_M).

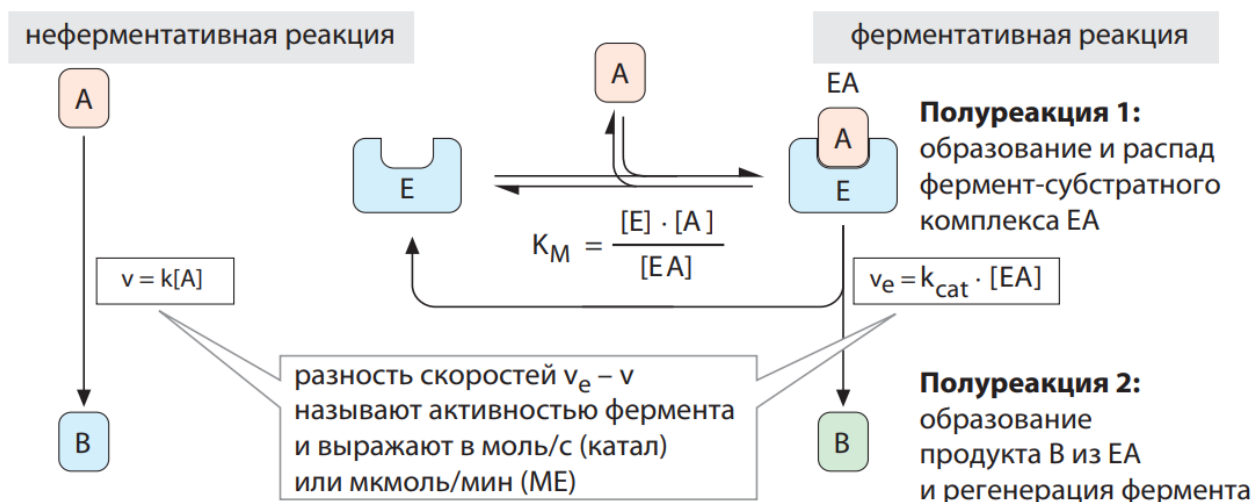


Рисунок 46 – Сравнение кинетики неферментативной и ферментативной реакций

Если ввести в уравнение общую концентрацию фермента $[E]_t$ и исключить текущую концентрацию $[E]$, получаем уравнение для определения концентрации комплекса EA:

$$[EA] = [E]_t \times [A] / (K_M + [A])$$

Как и превращение A в B, образование B из EA является реакцией первого порядка, для которой применимо уравнение $v = k[EA]$. Если объединить это уравнение с только что полученным уравнением для концентрации EA, получим уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$v = k_{cat}[E]_t \times [A] / (K_M + [A])$$

Это уравнение связывает между собой две переменные (v и $[A]$) и два параметра, которые не зависят от концентрации субстрата ($[A]$). При очень высокой концентрации субстрата лимитирующим фактором для скорости реакции становится множитель $k_{cat}[E]_t$, который соответствует максимальной скорости реакции V_{max} (Рисунок 47). Константа Михаэлиса характеризует сродство фермента к субстрату. Она соответствует той концентрации субстрата, при которой скорость реакции v равна половине максимальной скорости ($1/2 V_{max}$).

максимальная скорость V_{max} , моль/с	$v = \frac{V_{max} \cdot [A]}{K_M + [A]}$	константа Михаэлиса K_M , моль/л
---	---	---------------------------------------

Рисунок 47 – Уравнение Михаэлиса-Ментен

Таким образом, высокое сродство фермента к субстрату соответствует низкому значению K_M и наоборот.

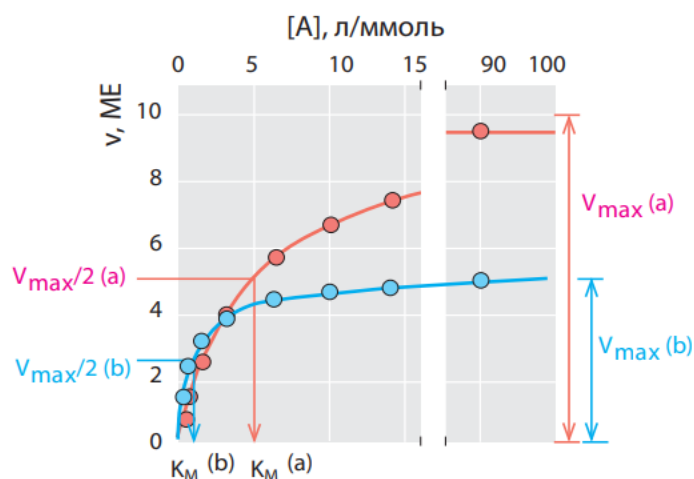


Рисунок 48 – Гиперболическая зависимость v от $[A]$

На рисунке 48 представлены кривые зависимости скорости реакции от концентрации субстрата для двух ферментов; фермент (б) имеет более высокое сродство к А, чем фермент (а), но значение его V_{\max} ниже, чем у фермента (а). При выводе уравнения Михаэлиса–Ментен были сделаны некоторые допущения: связывание субстрата – равновесный процесс, образование В – процесс необратимый, фермент присутствует исключительно в виде форм Е и ЕА. Поэтому константа Михаэлиса соответствует константе диссоциации комплекса ЕА, а k_{cat} – скорости образования продукта только при соблюдении этих условий.

Поскольку скорость реакции v лишь асимптотически приближается к значению V_{\max} , из графика зависимости скорости реакции от концентрации субстрата трудно найти реальные значения V_{\max} и K_M . Для решения этой задачи уравнение Михаэлиса–Ментен можно преобразовать так, чтобы экспериментальные точки укладывались на прямую линию. Например, график Лайнуивера–Берка представляет собой график зависимости $1/v$ от $1/[A]$ (Рисунок 49). В этом случае точки пересечения прямой, полученной путем наилучшей линейной аппроксимации экспериментальных данных, с осями координат соответствуют значениям $1/V_{\max}$ и $-1/K$.

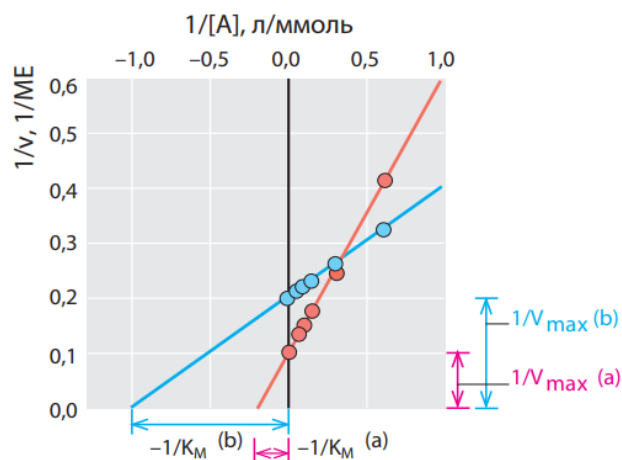


Рисунок 49 – Зависимость $1/v$ от $1/[A]$ в координатах Лайнуивера-Берка

Контрольные вопросы

1. Что такое кинетика?
2. Как выражают скорость ферментативной реакции?
3. В каких единицах (величинах) измеряется ферментативная активность?
4. Охарактеризуйте математическое выражение константы Михаэлиса.
5. Как выражается максимальная скорость ферментативной скорости?
6. Охарактеризуйте уравнение Михаэлиса-Ментен.
7. Перечислите допущения, которые были сделаны при выводе уравнения Михаэлиса-Ментен.
8. Сравните гиперболическую и линейную зависимость (Лайнуивера-Берка) скорости реакции от концентрации субстрата.

5 Регуляция активности ферментов

Способы регуляции активности ферментов. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов. Специфические факторы, повышающие активность ферментов. Классификация, механизмы действия. Аллостерическая регуляция активности фермента, действие промежуточных и конечных продуктов реакции

Возможны два пути регуляции активности ферментов: экстенсивный и интенсивный путь [13].

Экстенсивная регуляция – регуляция путем изменения количества фермента в клетке, т.е. регуляция на генетическом уровне (регуляция биосинтеза ферментов). *Интенсивная регуляция* – регуляция путем модификации молекулы фермента, т.е. регуляция каталитической активности фермента (Рисунок 50).

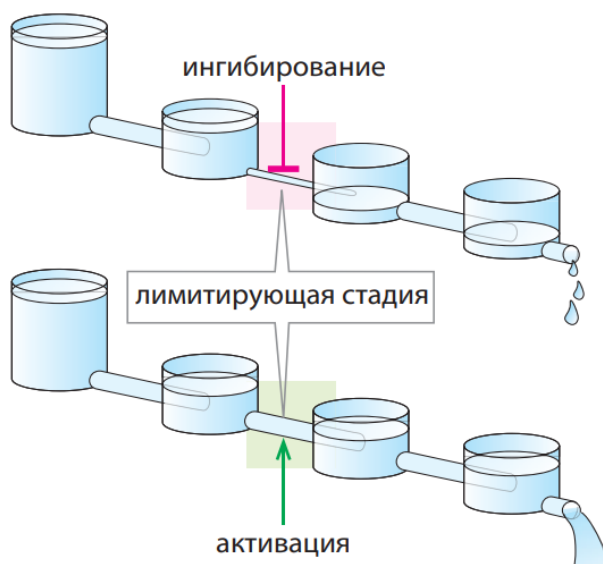


Рисунок 50 – Интенсивная регуляция активности фермента

Экстенсивная регуляция путем биосинтеза ферментов. Теорию регуляции синтеза белка разработали (Ф. Жакоб и Ж. Моно): происходит «выключение» или «включение» генов. Эта теория, доказанная на бактериях, у которых показана возможность индукции ферментов (синтез ферментов *de novo*¹⁵) при добавлении в питательную среду субстратов этих ферментов, т.е. если в среде появился субстрат, ферменты будут вырабатываться, если субстрат отсутствует – синтез ферментов подавлен. Поясним, что у бактерий различают три основные группы ферментов:

Конститутивные – их синтез происходит в течение всего клеточного цикла (т.е. всегда в течение жизни бактерии);

Индукцибельные – их синтез индуцируется соответствующим субстратом;

Репрессибельные – их синтез подавляется в результате избыточного накопления продукта реакции, катализируемой данным ферментом.

¹⁵ *de novo* – латинское выражение, используемое в английском языке для обозначения «с самого начала», «заново»

Согласно теории Ф. Жакоба и Ж. Моно, в биосинтезе белков (ферментов) у бактерий участвуют структурные гены (ген А, ген Б, ген С, Рисунок 51, ген-регулятор (не указан на рисунке 51, не входит в структуру оперона), ген-оператор (входит в промоторную область оперона). Структурные гены определяют первичную структуру синтезируемых белков (фермента). Синтез мРНК контролируется геном-оператором. Группа структурных генов, транскрибируемая одновременно, образует оперон (Рисунки 51, 52).

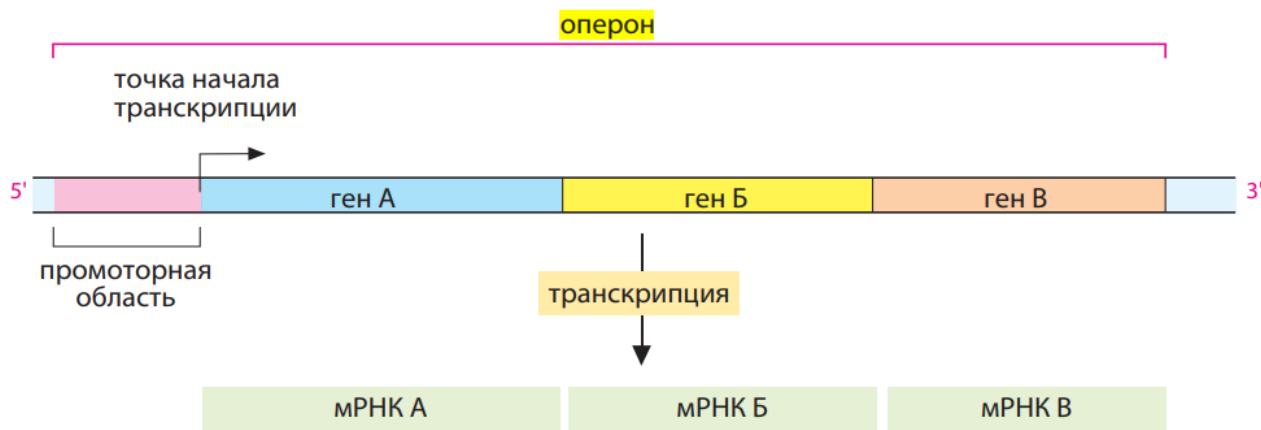


Рисунок 51 – Структура генов прокариотов

Оперон начинается с промотора – участка ДНК, расположенного рядом с геном-оператором, с которым взаимодействует РНК-полимераза. Функционирование оперона находится под контролем гена-регулятора. Связь между структурными генами и геном-регулятором осуществляется при помощи синтезируемого белка-репрессора, который кодируется геном-регулятором. Репрессор имеет сродство к гену-оператору и обратимо образует с ним в комплекс. Образование такого комплекса приводит к блокированию синтеза мРНК (РНК-полимераза не может начать движение по оперону) и, следовательно, синтеза белка, т.е. функция гена-регулятора состоит в том, чтобы через белок-репрессор прекращать деятельность структурных генов, синтезирующих мРНК, являющихся предшественниками полипептидных цепей будущих ферментов (Рисунок 52).

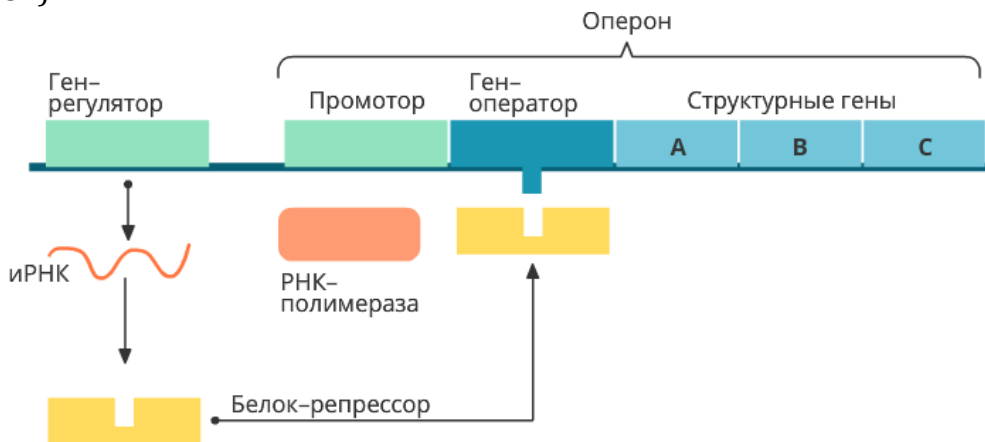


Рисунок 52 – Действие репрессора на оператор

Индукция синтеза ферментов на примере Лас-оперона. Данный механизм был доказан в опытах на *E. coli* на примере синтеза β -галактозидазы (лактазы),

расщепляющей молочный сахар на глюкозу и галактозу. В присутствии глюкозы, как основного углевода, используемого в метаболизме, и отсутствии лактозы белок-репрессор – Lac I-репрессор – взаимодействует с геном-оператором и препятствует транскрипции (оперон не работает). При появлении в среде субстрата – лактозы, и её изофермента аллолактозы – последняя (т-образная синяя фигура) связывается с белком-репрессором и препятствует его взаимодействию с геном-оператором. Однако этого недостаточно для начала транскрипции структурных генов оперона (гена А, В и С, кодирующих β-галактозидазу, пермеазу и трансацетилазу). Чтобы РНК-полимераза смогла связаться с последовательностью гена, необходим индуктор – белок-активатор катаболизма (БАК), который связывается с ДНК (промотором) только тогда, когда находится в комплексе с циклическим АМФ (цАМФ). Клетки *E. coli* синтезируют цАМФ только при отсутствии глюкозы, так что появление цАМФ сигнализирует о недостаточности питательных веществ. (Рисунки 53, 54).

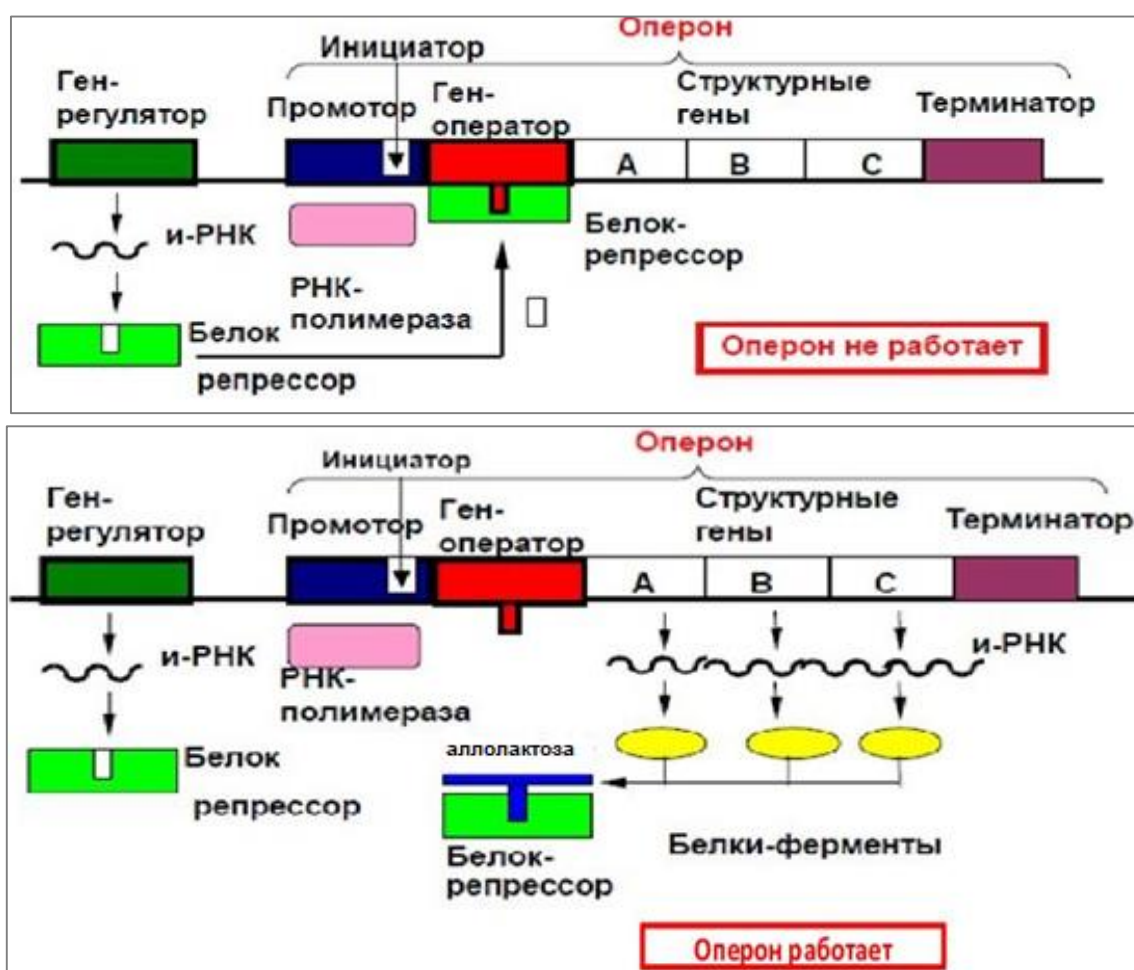


Рисунок 53 – Механизм регуляции на примере Lac-оперона

Когда будут выполнены два условия: аллолактоза свяжется с белком репрессором, а индуктор (БАК+цАМФ) с частью промотора, только тогда возможно присоединение РНК-полимеразы с последующей транскрипцией мРНК и трансляцией, в результате которой синтезируются ферменты.

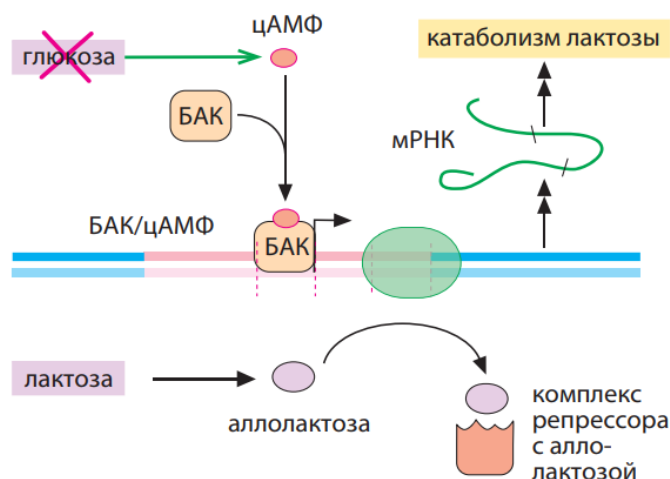


Рисунок 54 – Действие индуктора (БАК+цАМФ) в синтезе ферментов катаболизма лактозы

Интенсивная регуляция путем изменения каталитической активности ферментов. Регуляция каталитической активности ферментов – регуляция активности уже синтезированных ферментов – осуществляется путем:

- аллостерической регуляция;
- ковалентной модификации молекулы фермента;
- ограниченного протеолиза и др.

Аллостерическая регуляция. С аллостерическим центром фермента могут нековалентно связываться низкомолекулярные вещества – эффекторы. Ферменты, активность которых регулируется аллостерически, называются аллостерическими ферментами. Аллостерическая регуляция ферментов обратима. В результате взаимодействия с эффектором изменяется пространственная структура фермента (и самого активного центра). Это сопровождается изменением активности фермента.

Аллостерические эффекторы бывают:

- отрицательные, или *ингибиторы* – снижают активность;
- положительные, или *активаторы* – повышают активность.

Аллостерические эффекты бывают:

- гомotropные – аллостерический эффектором является субстрат;
- гетеротропные – аллостерическим эффектором является «не субстрат».

Возможны 2 конформационных состояния аллостерических ферментов:

- R (relaxed) – расслабленное – активное состояние – высокое сродство к субстрату;
- T (tensed) – напряженное – неактивное состояние – низкое сродство к субстрату.

R и T формы – активная и неактивная формы аллостерических ферментов, которые находятся в равновесном состоянии. Аллостерический активатор – стабилизирует R-состояние, а ингибитор – смещает равновесие в сторону T-состояния. Субстрат, выступая в роли эффектора, смещает равновесие в сторону R-состояния, т.е. гомотропный аллостерический эффект всегда положительный.

Почти все аллостерические ферменты олигомерные, состоят из 2–12 субъединиц. Например, аспартаткарбамоилтрансфераза (АКТаза) состоит из шести каталитических (синие) и шести регуляторных субъединиц (бежевые) (Рисунок 55). Регуляторные

субъединицы связывают ЦТФ и АТФ (зеленые точки). АКТаза может находиться в двух конформациях – менее активной Т-форме (от англ. tense – напряженный) и более активной R-форме (от англ. relaxed – релаксированный).

При увеличении концентрации аспартата равновесие все больше смещается в сторону образования активной R-формы. АТФ также стабилизирует R-конформацию, связываясь с регуляторными субъединицами. Напротив, связывание ЦТФ в тех же самых участках способствует переходу в Т-конформацию.

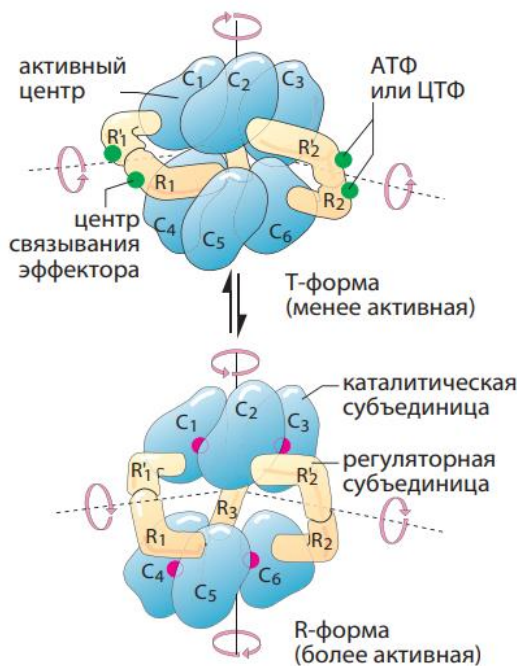


Рисунок 55 – Аллостерическая регуляция АКТазы

В случае АКТазы структурные различия между R- и Т-формами особенно заметны. При переходе от Т- к R-форме каталитические субъединицы удаляются друг от друга на 1,2 нм и поворачиваются вокруг оси симметрии. Однако конформация самих субъединиц изменяется слабо.

Аллостерическая регуляция активности ключевых ферментов – одна из основных форм регуляции интенсивности метаболических путей. Эффекторами выступают метаболиты процессов. Возможно два типа регуляции: ретроингибирование и активация предшественником.

Ретроингибирование, или ингибирование по принципу обратной связи, заключается в следующем: при увеличении концентрации продукта F происходит аллостерическое ингибирование первого фермента метаболического пути (Рисунок 56).

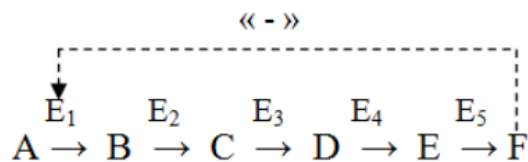


Рисунок 56 – Схема ретроингибирования

Активация предшественником: при появлении первого субстрата А происходит аллостерическая активация ферментов, катализирующих ключевые реакции заключительных этапов метаболизма (Рисунок 57).

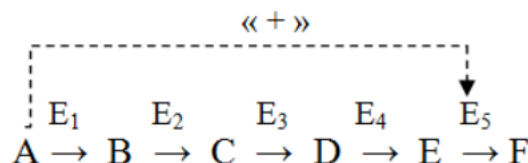


Рисунок 57 – Схема активации предшественником

Аллостерическая регуляция ферментативной активности объясняется на примере аспартаткарбамоилтрансферазы (АКТаза) из бактерии *Escherichia coli*. АКТаза – ключевой фермент биосинтеза пиримидинов, катализирующий перенос карбамоильной группы с карбамоилфосфата на аминогруппу L-аспартата (Рисунок 58).

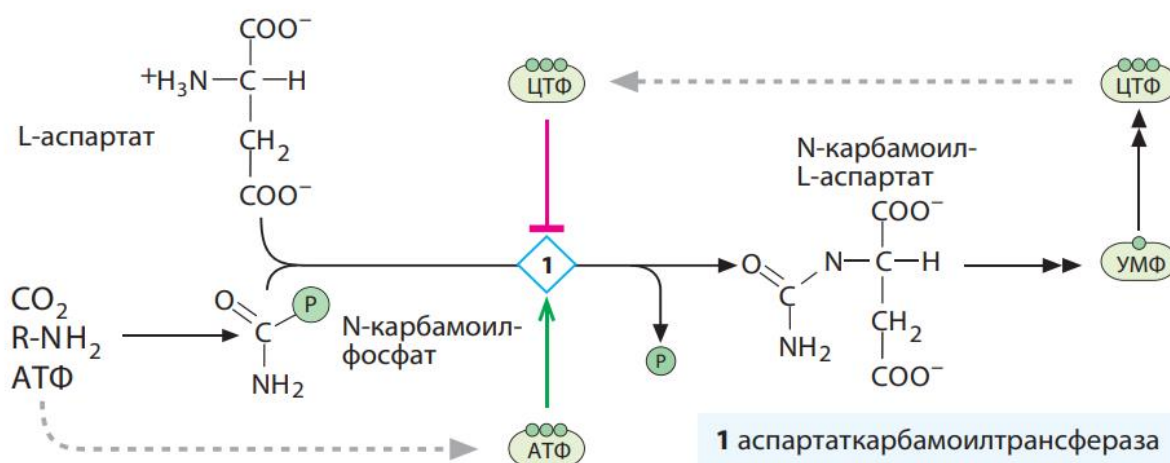


Рисунок 58 – Действие аспартаткарбамоилтрансферазы

Активность фермента ингибируется цитидинтрифосфатом (ЦТФ) – конечным продуктом анаболического пути метаболизма пиримидина и активируется АТФ – начальным участником этого пути.

Ковалентная модификация ферментов является одним из типов регуляции, определяющим интенсивность процессов обмена веществ многоклеточного организма. При ковалентной модификации ферментов изменяется конформация молекулы. В результате этого активность фермента увеличивается или уменьшается.

Возможны следующие виды ковалентной модификации ферментов:

- фосфорилирование, ферменты: киназы, переносят Фн (остаток фосфорной кислоты) от АТФ;
- дефосфорилирование, ферменты: фосфатазы, гидролизуют Фн;

- метилирование и деметилирование, ферменты: метилазы/деметилазы, донор CH_3 -группы – Метионина;
- гликозилирование и дегликозилирование, ферменты: гликозилтрансферазы, переносят остатки моно- и олигосахаридов;
- аденилирование и деаденилирование, ферменты: аденилаттрансферазы, переносят АМФ от АДФ.

А также: гидрокселирование по остаткам Пролина и Лизина; карбоксилирование; ацетилирование; уридилирование и др.

Наиболее быстрый и широко распространённый способ ковалентной модификации ферментов – их обратимое фосфорилирование и дефосфорилирование по ОН-группам аминокислот. Присоединение остатка фосфорной кислоты протеинкиназой или его отщепление фосфатазой приводит к изменению конформации активного центра и его каталитической активности. При этом результат может быть двояким: одни ферменты при фосфорилировании активируются, другие, напротив, становятся менее активными (Рисунок 59).

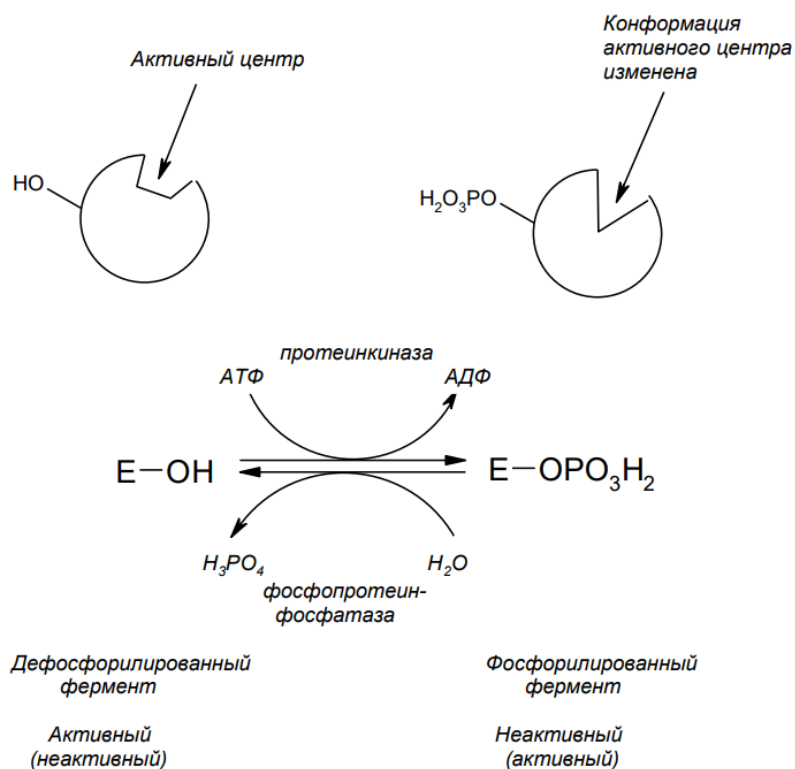


Рисунок 59 – Регуляция активности ферментов фосфорилированием и дефосфорилированием

Регуляция активности ферментов ограниченным протеолизом Некоторые ферменты, функционирующие в желудочно-кишечном тракте и в плазме крови (ферменты системы свертывания крови), синтезируются в виде неактивных предшественников (зимогенов, или проферментов) и активируются только в результате гидролиза одной или нескольких пептидных связей, что приводит к отщеплению части белковой молекулы предшественника. Этот процесс называется ограниченным протеолизом и осуществляется ферментами – специфическими протеазами. В результате ограниченного протеолиза в оставшейся части белковой

молекулы происходит конформационная перестройка и завершается формирование активного центра фермента. Например, таким образом формируется активная форма пищеварительной протеазы – химотрипсина. Поджелудочной железой синтезируется 2 формы химотрипсиногена – А и В, переход в активную форму которых происходит под действием минимального количества трипсина или химотрипсина (аутокаталитический процесс). При активации химотрипсиногена А образуются α-, β-, γ-, δ-, ε-, π-химотрипсины. Химотрипсиноген В при активации переходит в химотрипсин В.

Активация профермента происходит в результате гидролиза четырех пептидных связей (Рисунок 60).

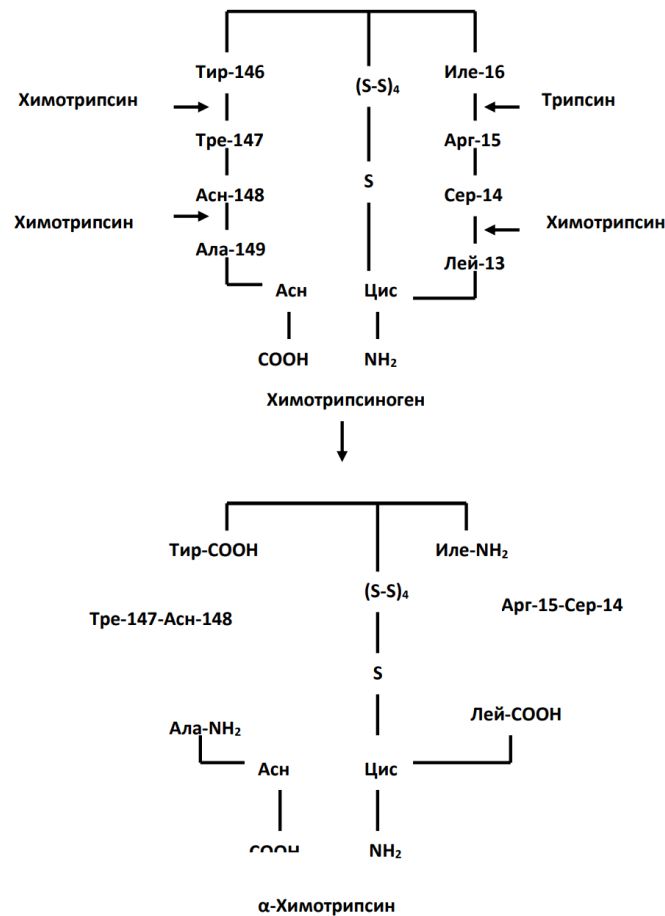


Рисунок 60 – Активация химотрипсиногена путем ограниченного протеолиза

Таким образом, благодаря совместному действию химотрипсина и трипсина из исходного белкового предшественника образуются разные химотрипсины, различающиеся ферментативной активностью и физико-химическими свойствами.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение двум путям регуляции активности ферментов.
2. Приведите примеры конститутивных и индуцибельных ферментов (на примере Лас-опреона).
3. Опишите механизм индукции синтеза ферментов на примере Лас-оперона.
4. Что такое эффекторы? Какую роль они играют в регуляции активности ферментов?

5. Какие различают аллостерические: эффекторы, эффекты, формы ферментов?
6. Дайте определение ретроингибированию и активацию предшественником как видов аллостерической регуляции.
7. Опишите аллостерическую регуляцию на примере фермента АКТаза.
8. Перечислите ковалентные модификации ферментов, приведите пример.
9. Опишите действие ограниченного протеолиза на химотрипсиноген А.

6 Ингибиторы ферментов

Классификация, механизмы действия. Обратимые и необратимые ингибиторы. Константы ингибирования. Конкурентное и аллостерическое ингибирование ферментов. Белковые ингибиторы ферментов

Как отмечалось выше, физические и химические факторы влияют на активность большинства ферментов неспецифическим образом. Сюда относятся температура и pH среды, а также органические растворители и тяжелые металлы. Однако некоторые ингибиторы влияют на активность ферментов весьма специфически. Действие большинства ингибиторов *обратимо* – они не вызывают окончательных изменений в структуре или свойствах ферментов. Но встречаются и *необратимые ингибиторы*, которые связываются с ферментом ковалентной связью (например, β -лактамный антибиотик – пенициллин) (Рисунок 61).

Мишенью антибиотиков, к которым относится пенициллин, является фермент, участвующий в построении клеточной стенки бактерий. Клеточная стенка грамположительных бактерий состоит из длинных цепей полисахарида муреина, скрепленных перекрестными сшивками из коротких пептидов. Одну из стадий образования перекрестных сшивок катализирует мурамоилпентапептид-карбоксипептидаза. Пенициллин и другие β -лактамные антибиотики по строению напоминают субстрат этого фермента и поэтому в ходе нескольких последовательных реакций связываются в активном центре фермента, после чего между ферментом и ингибитором образуется прочная ковалентная связь, блокирующая активный центр. Ингибиторы такого типа называют суицидными субстратами, поскольку они связываются с ферментами подобно субстратам, а затем необратимо их ингибируют. Потеря делящимися клетками карбоксипептидазной активности приводит к синтезу ослабленной клеточной стенки и гибели бактерий.

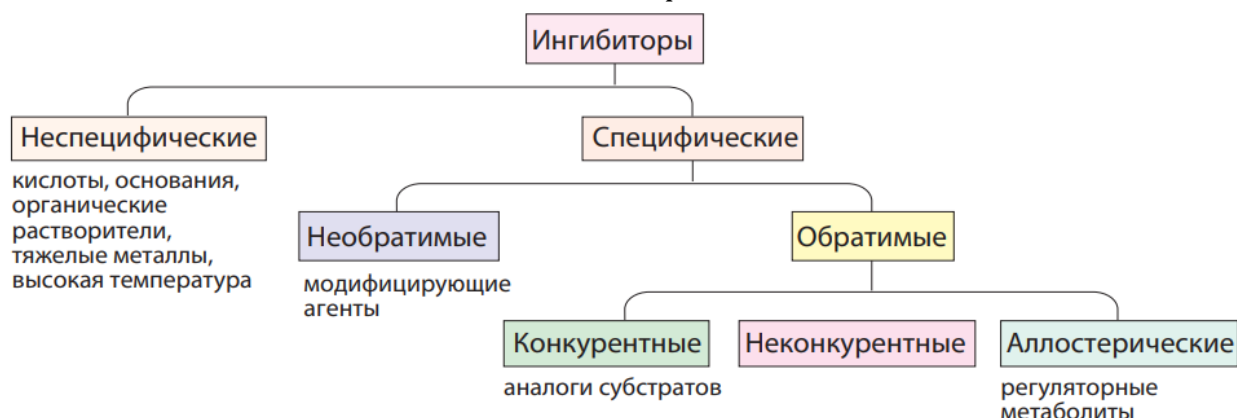


Рисунок 61 – Классификация ингибиторов

К конкурентному ингибированию относят обратимое снижение скорости ферментативной реакции, вызванное с ингибитором, связывающимся с активным центром фермента и препятствующим образованию фермент-субстратного комплекса. Неконкурентным называют такое ингибирование ферментативной реакции, при котором ингибитор взаимодействует с ферментом в участке, отличном от активного центра. Присоединение неконкурентного ингибитора вызывает изменение

конформации молекулы фермента таким образом, что нарушается взаимодействие субстрата с активным центром фермента, что приводит к снижению скорости ферментативной реакции.

Типы ингибирования. Механизм действия ингибитора (тип ингибирования) можно определить, сравнивая кинетику поведения фермента в среде с ингибитором (зеленая и красная линия) и без ингибитора (синяя линия) (Рисунок 62).

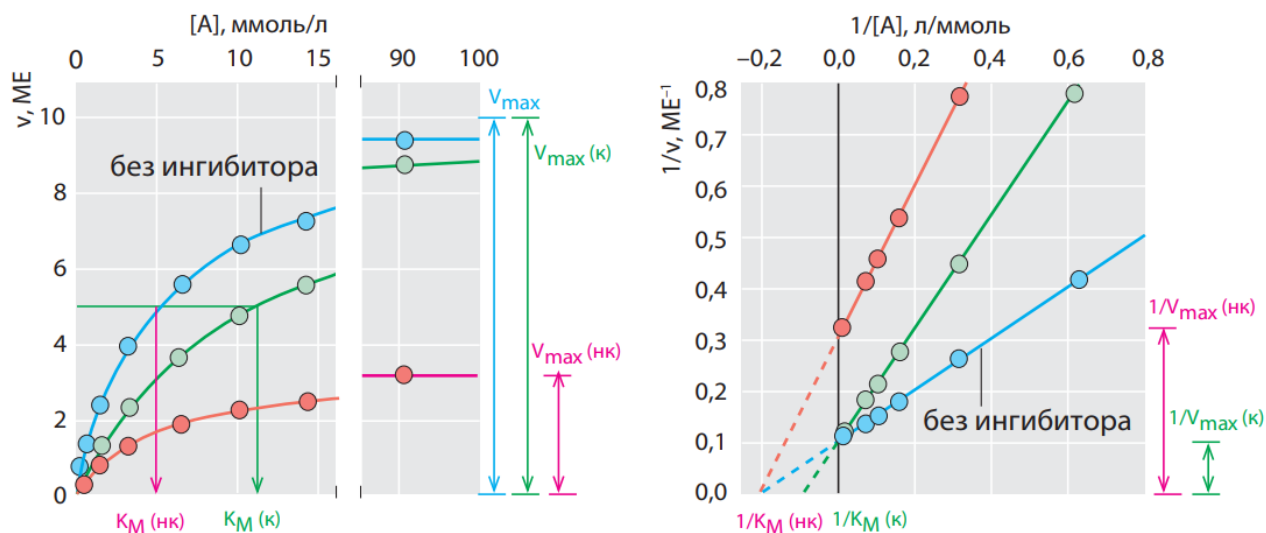


Рисунок 62– Кинетика ингибирования (гиперболическая зависимость и в координатах Лайнуивера-Берка)

Такой эксперимент позволит также отличить, например, конкурентный ингибитор от неконкурентного ингибитора.

В роли конкурентных ингибиторов часто выступают *аналоги субстратов*, т. е. вещества, свойства которых подобны свойствам субстрата данного фермента. Поскольку субстрат и ингибитор конкурируют за связывание в одном и том же центре в молекуле фермента, такой тип ингибирования называют *конкурентным* (Рисунок 63).

Конкурентные ингибиторы связываются с ферментом, но не могут подвергаться дальнейшим превращениям, так что они *обратно* связывают определенную долю всех имеющихся молекул фермента. Поэтому в присутствии ингибитора для достижения половины максимальной скорости требуется более высокая концентрация субстрата, что соответствует повышению константы Михаэлиса. Повышение концентрации субстрата приводит к вытеснению ингибитора из комплекса с ферментом. Таким образом, максимальная скорость реакции не зависит от концентрации конкурентного ингибитора. *Аналоги переходного состояния* обычно тоже действуют как конкурентные ингибиторы.

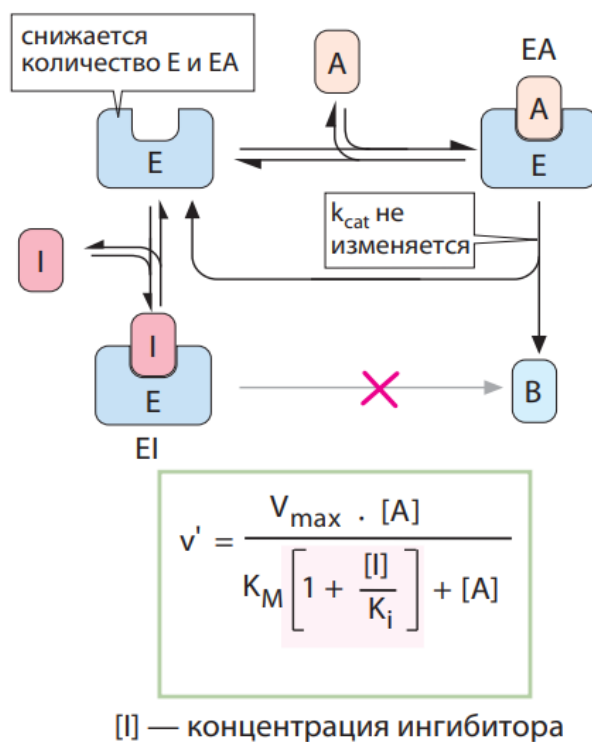


Рисунок 63 – Конкурентное ингибирование

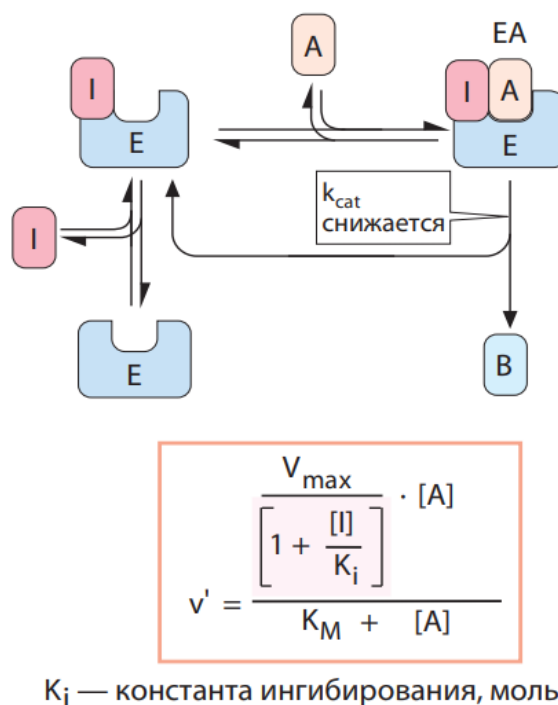


Рисунок 64 – Неконкурентное ингибирование

Если ингибитор взаимодействует с одной из важных для катализа функциональных групп фермента, но не мешает связыванию субстрата, имеет место *неконкурентный тип ингибирования* (Рисунок 64). В данном случае константа Михаэлиса не изменяется, но k_{cat} и V_{max} снижаются. Такой тип ингибирования обычно реализуется в присутствии необратимых ингибиторов, поскольку в этом случае снижается общая концентрация активного фермента.

Смешанный тип ингибирования имеет место, когда ингибитор влияет и на K_M , и на V_{max} . Особый случай смешанного ингибирования называют *бесконкурентным ингибированием*. В этой ситуации ингибитор снижает значения V_{max} и K_M в одинаковой степени. Однако случаи истинного бесконкурентного ингибирования встречаются редко. Возможной причиной такого механизма ингибирования является селективное связывание ингибитора с фермент-субстратным комплексом EA.

Аллостерические ингибиторы связываются с участками фермента, находящимися вне активного центра. Это приводит к *конформационным изменениям* в молекуле фермента, что вызывает снижение его активности. Аллостерический эффект обычно наблюдается только в случае олигомерных ферментов. Кинетику таких процессов нельзя описать с помощью уравнения Михаэлиса–Ментен.

Кинетика ингибирования. Наличие и тип ингибирования легко определить, используя график Лайнуивера–Берка (в координатах $1/v$ от $1/[A]$, Рисунок 62 справа).

Если продолжить экспериментальную прямую до пересечения с осью x , она отсечет на оси y отрезок, соответствующий $1/V_{max}$, а на оси x – $1/K_M$. Вот почему прямые, полученные без ингибитора (синие) и в присутствии конкурентного ингибитора (к; зеленые), пересекаются в точке на оси y ($1/V_{max}$ не меняется). В присутствии неконкурентного ингибитора (нк; красные линии) на оси y отсекается отрезок большей длины, а точка пересечения с осью x не смещается ($1/V_{max}$ увеличивается, K_M не изменяется).

Контрольные вопросы

1. Опишите классификацию ингибиторов.
2. Какие неспецифические ингибирующие факторы влияют на активность ферментов?
3. Приведите пример специфического необратимого ингибитора, опишите механизм действия пеницилина.
4. Охарактеризуйте отличия конкурентных и неконкурентных ингибиторов.
5. Что необходимо изменить в присутствии конкурентного ингибитора с целью повышения K_M ?
6. Как изменяются K_M , k_{cat} и V_{max} при неконкурентном типе ингибирования?
7. Чем отличаются аллостерические ингибиторы от конкурентных и неконкурентных ингибиторов?
8. С помощью графика Лайнуивера-Берка опишите различие действия конкурентных и неконкурентных ингибиторов.

7 Имобилизованные ферменты

Общие принципы иммобилизации ферментов. История создания и развития научного направления. Носители для иммобилизованных ферментов и методы иммобилизации. Влияние иммобилизации на молекулу фермента. Влияние иммобилизации на свойства ферментов

Имобилизованными называют такие ферменты, которые выделены из клетки, искусственно закреплены на носителе и сохраняют свойственную им каталитическую активность.

Согласно определению Брена и др. (2006, 2013) «Имобилизованные ферменты» определяются как «ферменты, физически закреплённые или локализованные в определённой области пространства с сохранением их каталитической активности, которые можно использовать многократно и непрерывно».

Иммобилизация – это технология, согласно которой молекулу фермента включают в какую-либо фазу или соединяют с нерастворимым носителем. Комплекс «фермент – носитель» отделен от раствора, но при этом может обмениваться с ним молекулами субстрата или эффектора. В промышленных целях для иммобилизации используют главным образом энзимы, выделенные из микроорганизмов. Они примерно в 100 раз дешевле, чем ферменты животного или растительного происхождения, и более доступны.

По сравнению со свободными ферментативными препаратами, иммобилизованные ферменты имеют существенные преимущества:

- обладают высокой стабильностью, в несколько тысяч раз превышающей стабильность свободных ферментов, и поэтому достаточно долговечны;
- легко отделимы от реакционной среды, что позволяет получать чистые продукты реакции;
- иммобилизация дает возможность многократно использовать ферментативный препарат;
- иммобилизованные ферменты технологичны, что позволяет либо вести процесс непрерывно, регулировать его скорость и, соответственно, выход продукта, либо в любой момент остановить реакцию;
- с помощью подбора носителей и методов иммобилизации можно целенаправленно изменять некоторые свойства ферментов (специфичность, рН- и температурозависимость, стабильность) для оптимизации процесса.

Процесс иммобилизации как способ сохранения активности выделенного из клетки фермента был открыт еще в начале XX в. В 1916 г. Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что сахараза, адсорбированная на угле, сохраняла свою каталитическую активность. Однако первый патент на применение иммобилизованных ферментов был выдан только в 1939 г. Дж. Пфанмюлеру и Г. Шлейху, которые предложили использовать протеолитические ферменты, адсорбированные на древесных опилках, для обработки шкур животных. В 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт разработали принципиально новый метод для иммобилизации ферментов – ковалентное связывание. Что касается термина «иммобилизованные ферменты», то он был узаконен в 1971 г. на первой конференции по инженерной энзимологии, которая проходила в США.

Классификация иммобилизованных ферментов

Сначала ферменты были разделены на две группы: «нативные ферменты» и «модифицированные ферменты». Иммобилизованные ферменты относятся к классу модифицированных ферментов и в настоящее время делятся на две группы: «иммобилизованные ферменты в ловушке» и «связанные иммобилизованные ферменты».

«Иммобилизованные ферменты в ловушке» или «Захваченные» ферменты – это ферменты, которые могут быть захвачены полупроницаемым гелем или заключены в полупроницаемую полимерную мембрану». Например, глюкоамилаза захватывается полиакриловой кислотой, а инвертаза – поливиниловым спиртом.

«Захваченные» ферменты дополнительно подразделяются на два подкласса:

1. *Ферменты, заключённые в матрице* – это ферменты, которые находятся в межклеточном пространстве сшитых водонерастворимых полимеров, то есть в геле. Например, алкогольдегидрогеназа заключена в полиакриламиде, а инвертаза – в полимере полиэтиленгликоля.

2. *Микрокапсулированные ферменты* – это ферменты, заключённые в полупроницаемые полимерные мембраны.

«Связанные иммобилизованные ферменты» также подразделяются на два класса: адсорбированные иммобилизованные ферменты и ковалентно иммобилизованные ферменты.

Адсорбированные иммобилизованные ферменты – это ферменты, иммобилизованные путем связывания с адсорбентом, таким как активированный уголь и микростеклянные шарики; ковалентно связанные иммобилизованные вещества – это вещества, которые иммобилизованы путём присоединения к матрице посредством ковалентной химической связи.

Ряд авторов (в том числе Хан М.Р.) и его коллеги в свете своих исследований в области иммобилизованных ферментов предложили изменить классификацию иммобилизованных ферментов, предложенную Конференцией по инженерной энзимологии (1971), поскольку его группы работали с протеазами, связанными с клетками семян лекарственных растений, и дали им название «природные иммобилизованные ферменты». Таким образом, автор предложил классифицировать ферменты в основном на «природные иммобилизованные ферменты» и «искусственно иммобилизованные ферменты». Последние следует дополнительно классифицировать, как это было сделано в 1971 году [14].

Автор и его коллеги безоговорочно признают широкий спектр применения иммобилизованных ферментов и сообщают, что, несмотря на его широту, область применения иммобилизованных ферментов заслуживает пристального внимания. Это откроет новые возможности для расширения спектра применения на благо будущих поколений. Это побуждает автора и его коллег дать некоторые рекомендации, основанные на результатах их исследований, в частности, в области иммобилизованных ферментов природного происхождения, исходя из того, что «всё натуральное безопаснее для лечения».

Изменения свойств ферментов после иммобилизации

Иммобилизация приводит к определённым изменениям в характеристиках ферментов, которые служат основой для определения областей применения иммобилизованных ферментов, а также для объяснения структуры и функций, взаимосвязи между ферментом и субстратом, механизма ферментативного действия и т. д. За изменение характеристик ферментов отвечают два фактора: структурные изменения самого фермента и изменения физических и химических характеристик матриц, используемых для иммобилизации.

Ниже перечислены основные свойства ферментов, которые могут изменяться или не изменяться после иммобилизации.

Специфичность субстрата. При иммобилизации ферментов их активность часто снижается, и, соответственно, меняется специфичность субстрата. Например, при иммобилизации ферментов, таких как протеазы и амилазы, действующих на определённые субстраты с более высокой молекулярной массой, методом связывания с носителем. Например, при связывании с пептидами или диазосоединениями наблюдаются значительные изменения специфичности субстрата.

Было замечено, что «при иммобилизации фермента с помощью нерастворимого в воде полимерного носителя активность фермента по отношению к субстратам с более высокой молекулярной массой заметно снижается из-за стерических препятствий, которые мешают субстрату приблизиться к молекуле фермента. Однако активность иммобилизованных ферментов по отношению к субстратам с низкой молекулярной массой существенно не меняется, поскольку субстрат может легко приблизиться к ферменту.

Иммобилизованные ферменты демонстрируют более высокую термическую и химическую стабильность при хранении, чем свободные ферменты. Сообщалось, что значение K_m увеличивается всего в 1,25 раза, а активность ферментов зависит от pH и температуры.

Зависимость ферментативных реакций от температуры. Каталитическая активность ферментов зависит от температуры, как и в случае обычных химических катализаторов. Активность снижается при температуре выше определённого предела из-за денатурации белка фермента. В некоторых случаях после иммобилизации происходит изменение оптимальной температуры ферментативной реакции. Оптимальные температуры иммобилизованных ферментов во много раз выше, чем у нативных ферментов, в случае трипсина и химотрипсина, иммобилизованных путём связывания пептидов с целлюлозой CM.

Конечно, есть много сообщений о том, что «после иммобилизации не происходит изменения оптимальной температуры. В качестве примера можно привести химотрипсин, иммобилизованный с помощью целлюлозной мембраны, активированной CNBr, трипсин, иммобилизованный с помощью агарозы, активированной CNBr, и т. д.

Маркоглу и Вайнер (2003) изучали влияние иммобилизации на термическую стабильность фенилэтанолмин-*N*-метилтрансферазы (PNMT), и было замечено, что иммобилизованный фермент обладает повышенной термической стабильностью. Начальная активность иммобилизованной PNMT была ниже по сравнению с

неиммобилизованным ферментом, и она оставалась сравнительно стабильной в диапазоне экспериментальных температур. По их мнению, «повышенная стабильность может быть результатом того, что иммобилизация ограничивает термическое движение фермента при более высоких температурах. В результате термическая денатурация может не происходить при более высоких температурах с иммобилизованным ферментом. Термостабильные ферменты обеспечивают более высокую скорость реакции, меньшую диффузионную ограниченность, повышенную стабильность и более высокие выходы».

Хомаи и др. (2013) усовершенствовали методы иммобилизации по сравнению со свободными ферментами в растворе и сообщили, что иммобилизованные ферменты «более надёжны и устойчивы к изменениям окружающей среды». По их мнению, «гетерогенность иммобилизованных ферментных систем позволяет легко извлекать как ферменты, так и продукты, многократно использовать ферменты, непрерывно проводить ферментативные процессы, быстро останавливать реакции и использовать более разнообразные конструкции биореакторов».

Зависимость ферментативной активности от pH. Ферменты являются белками по своей природе, и поэтому на их каталитическую активность заметно влияет pH водной среды. Изменения в активности в зависимости от pH, вызванные иммобилизацией ферментов, помогают понять взаимосвязь между структурой и функцией ферментативного белка. Судзуки и Озава (2014) получили нерастворимую в воде дрожжевую инвертазу, связав нативную инвертазу с DEAE-целлюлозой, и сравнили некоторые её характеристики с характеристиками нативного фермента, а также описали непрерывный гидролиз сахарозы с её использованием. «Активность связанной инвертазы составляла примерно половину от максимальной активности свободной формы при pH 3,4 со сдвигом до pH 2 после связывания по сравнению с максимальной активностью свободной формы, и она могла полностью гидролизовать сахарозу до инвертного сахара». Устойчивость связанной инвертазы к температуре, конечно, была немного ниже по сравнению со свободной инвертазой при pH 5,2».

Существует множество случаев смещения оптимального уровня pH без каких-либо изменений в кривой активности pH после иммобилизации. «Оптимальный уровень pH аминоклазы, иммобилизованной путём ионного связывания с DEAE-целлюлозой или DEAE-сефадексом, сместился на 0,5–1,0 единицы pH в сторону кислой среды по сравнению с оптимальным уровнем pH нативного фермента. Аналогичные изменения оптимального уровня pH наблюдались при работе с инвертазой и АТФ, D-аминазой, иммобилизованной с помощью ионного связывания с DEAE-целлюлозой, и НАДН-дегидрогеназой, иммобилизованной с помощью поперечных связей с использованием глутаральдегида. «В настоящее время мировая биотехнологическая промышленность нуждается в повышении производительности ферментов и разработке новых методов увеличения срока их хранения. Эти требования неизбежны для создания крупномасштабных экономичных препаратов. Иммобилизация ферментов обеспечивает отличную основу для повышения доступности ферментов для субстрата с более высокой скоростью реакции в течение длительного периода времени. Было оценено несколько натуральных и синтетических носителей с точки зрения их эффективности для иммобилизации ферментов. В настоящее время иммобилизованные

ферменты предпочтительнее их свободных аналогов из-за их длительного срока хранения, что сокращает количество дополнительных процессов и этапов очистки.

Хассан и др. (2019) провели ковалентную иммобилизацию глюкоамилазы на химически активированной поверхности к-каррагинана. Авторы сообщили, что иммобилизованный фермент показал улучшение температурного профиля, поскольку оптимальная температура для свободного фермента составляла 60 °С, а для иммобилизованного фермента – 60–80 °С: более широкий диапазон и стабильность в кислых условиях. «Кажущаяся константа Михаэлиса иммобилизованного фермента, равная 147,46 мМ, стала выше, чем константа Михаэлиса свободного фермента, равная 110 мМ, а максимальная скорость реакции (V_{max}) иммобилизованного фермента снизилась с 2,28 до 1,11 мкмоль мин⁻¹. Иммобилизованный фермент можно было использовать повторно, и он сохранял свою активность (100%) в течение 11 последовательных циклов». Был сделан вывод, что экономические и биотехнологические преимущества иммобилизации ферментов, особенно в отношении количества повторных использований ферментов, открывают возможности для расширения различных сфер промышленного применения.

Некоторые иммобилизованные ферменты не демонстрируют смещения оптимального рН, но демонстрируют изменения кривой активности в зависимости от рН. Например, в случае β -фруктофуранозидазы, иммобилизованной диазо-связыванием с полиаминополистиролом, оптимальный рН не сместился, но кривая активности в зависимости от рН стала более узкой.

Энергия активации иммобилизованных ферментов. У некоторых ферментов энергия активации не меняется. У некоторых она увеличивается, а у некоторых уменьшается после иммобилизации. Энергия активации некоторых иммобилизованных ферментов почти такая же, как у соответствующих нативных ферментов. Примерами могут служить инвертаза, иммобилизованная путем физической адсорбции на активированном угле, аспарагиназа и инвертаза, иммобилизованные путем ионного связывания с DEAE-целлюлозой.

Сообщалось, что энергия активации аминоксилитазы, иммобилизованной путём ионного связывания с DEAE-целлюлозой и DEAE-сефадексом, увеличивается по сравнению с энергией активации нативного фермента. Также наблюдалось снижение энергии активации.

Стабильность. Повышение стабильности ферментов после иммобилизации наблюдалось во многих случаях. Повышение стабильности даёт некоторые преимущества при промышленном применении иммобилизованных ферментов и является важным показателем пригодности ферментов для конкретных целей. Ниже кратко описаны различные виды стабильности:

Иммобилизация ферментов приводит к изменениям в устойчивости ферментов к различным реагентам. Для некоторых иммобилизованных ферментов наблюдается повышение устойчивости к агентам, денатурирующим белки, или ингибиторам ферментов. Например, иммобилизованная аминоксилитаза и иммобилизованный трипсин не ингибируются мочевиной. Для некоторых иммобилизованных ферментов также наблюдается повышение устойчивости к ингибиторам. Считается, что иммобилизованный трипсин, полученный путем связывания пептидов и сшивки

носителя с азидом СМ-целлюлозы, становится устойчивым к ингибитору трипсина. Звучит вполне убедительно: подход высокомолекулярного ингибитора трипсина к иммобилизованному ферменту прерывается из-за стерических препятствий.

Левитски и др. (1998) сообщили, что протеолитические ферменты, иммобилизованные путём адсорбции на твёрдом носителе, широко используются для синтетических реакций в системах с низким содержанием воды. Однако стабильность таких продуктов необходимо оптимизировать, чтобы избежать обратимой и необратимой инактивации фермента органическим растворителем.

Устойчивость к протеолитическим ферментам. В ферментативных реакциях с использованием неочищенных ферментных препаратов часто наблюдается инактивация фермента из-за загрязнения протеолитическими ферментами. В некоторых случаях устойчивость к различным протеолитическим ферментам повышается за счет иммобилизации.

В случае протеолитических ферментов, таких как трипсин и папаин, стабильность повышается за счёт снижения каталитической активности по отношению к субстратам с высокой молекулярной массой из-за пространственных затруднений, возникающих в результате уменьшения степени автолиза.

Термостабильность. «Каталитическая активность ферментов повышается с увеличением температуры, как и в случае с химическими катализаторами. Однако, поскольку ферменты являются белками и, как правило, чувствительны к нагреванию, ферментативные реакции не могут проводиться при высокой температуре. Если термостабильность ферментов повышается за счёт иммобилизации, потенциальное использование таких ферментов будет обширным».

Эксплуатационная стабильность. «Эксплуатационная стабильность иммобилизованных ферментов является одним из наиболее важных факторов, влияющих на успешность индустриализации иммобилизованных систем. Фримен и Лилли сообщили, что колонка с иммобилизованным папаином, приготовленная путем сшивки носителя с пористым стеклом, сохраняла полную первоначальную активность после 35 дней непрерывной работы при 45 °С с раствором казеина».

Кинетические константы

После иммобилизации могут происходить конформационные изменения в белке-ферменте, и, следовательно, может измениться сродство между ферментом и субстратом. Авторы сообщают, что константа Михаэлиса - Ментен (K_m) практически не меняется, что указывает на наличие сродства между ферментом и субстратом после иммобилизации.

В некоторых случаях «происходят значительные изменения, например, в два раза. Значение K_m для трипсина, иммобилизованного полианионным носителем, сополимером этиленмалеинового ангидрида, было определено с использованием положительно заряженного бензоил-L-аргинин-амида в качестве субстрата при различной ионной силе. Также сообщается, что « K_m для иммобилизованного фермента уменьшалось до 1/10 от K_m нативного фермента при более низкой ионной силе, но приближалось к значению K_m нативного фермента при более высокой ионной силе». В более ранних исследованиях сообщалось о поразительно высоком значении увеличения

примерно в 200 раз для аспарагиназы, заключённой в полиакриламидную микрокапсулу.

Методы иммобилизации ферментов в основном делятся на три категории, как показано ниже (Рисунок 65).

1. *Метод связывания с носителем.* В этом методе ферменты связываются с нерастворимыми в воде носителями: производными полисахаридов, синтетическими полимерами и пористым стеклом.

2. *Метод сшивания.* Этот метод предполагает межмолекулярное сшивание ферментов с помощью бифункциональных или многофункциональных реагентов, таких как глутаральдегид, бисдиазобензидин и гексаметилендиизоцианат.

3. *Метод инкапсуляции.* Здесь ферменты встраиваются в структуру полупроницаемого геля или заключены в полупроницаемую полимерную мембрану: коллаген, желатин, триацетат целлюлозы, полиакриламид, каррагинан и т. д.

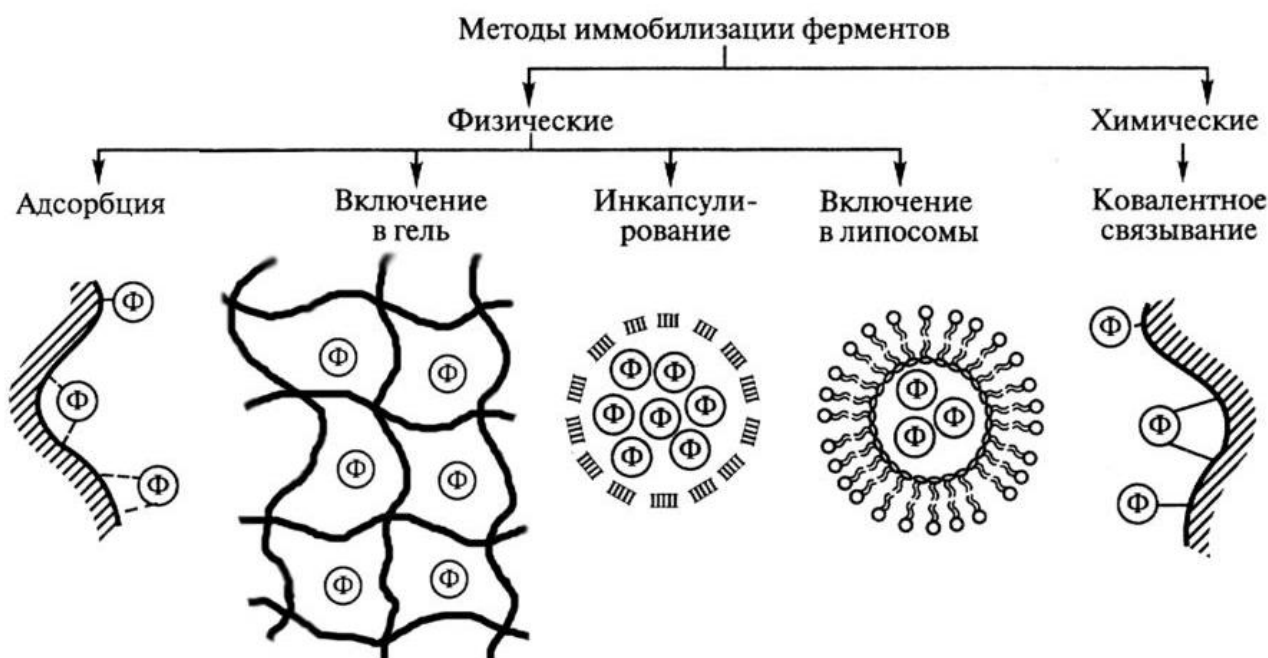


Рисунок 65 – Методы иммобилизации ферментов

Протеолитические ферменты, которые гидролизуют и, таким образом, расщепляют белки на более мелкие единицы, такие как протеозы, пептоны, аминокислоты, могут быть иммобилизованы на различных материалах. Впоследствии они могут быть применены для непрерывного гидролиза белковых субстратов. Ферменты обычно иммобилизуют путем связывания их с некоторыми матрицами, заполненными в хроматографических колонках, и последующего пропускания через них забуференных субстратов и сбора продуктов гидролиза, элюируемых из колонки. Иммобилизованные таким образом ферменты могут повысить устойчивость ферментов к тепловым ударам и экстремальным значениям pH. Ферменты после иммобилизации претерпевают определенные изменения в спектре своей активности. К счастью, многие ферменты остаются в значительной степени активными после их иммобилизации. Таким образом, иммобилизация приводит к легкости извлечения и возможности повторного использования ферментов. Протеазы расщепляют белки на более мелкие

звенья, которые могут рекомбинировать с образованием различных белков, существенно необходимых организму. Этот процесс разрушения и преобразования непрерывно протекает в живых организмах. Процесс расщепления белков протеазами на пептиды, аминокислоты и т.д. – называется протеолизом. Хотя наблюдения за действием протеолитических ферментов на белки позволили обнаружить расщепление пептидной связи в XIX веке, в то время ещё не было чёткого представления о механизме действия ферментов.

Изменение каталитической активности фермента во время иммобилизации во многом зависит от определённых структурных изменений в его активных центрах. Если аминокислотные остатки, входящие в третичную структуру активного центра, изменяются, каталитическая активность может снизиться. Снижение может сопровождаться изменением таких свойств фермента, как субстратная специфичность.

Функциональными группами, участвующими в иммобилизации фермента, являются свободные амино-, карбоновые и активные группы, образованные различными аминокислотами, такими как сульфидрил (-SH), образованный цистеином), имидазол-- гистидином, фенольные и гидроксильные – серином и треонином.

Чтобы сохранить большую часть каталитической активности после иммобилизации фермента, важно, чтобы функциональные группы в активном центре не участвовали в реакции, приводящей к иммобилизации фермента.

Метод связывания с носителем. Это старейший метод иммобилизации фермента. В этом методе «иммобилизация осуществляется путем физического или химического связывания фермента с соответствующим носителем. Носителями, в основном используемыми для иммобилизации, являются физические адсорбенты, такие как уголь, пористое стекло, полиакриламидный гель и т.д.».

При выборе носителей, а также при проведении процедуры связывания требуется особая осторожность. Выбор носителя зависит от природы самого фермента с учётом таких параметров, как размер частиц, молярная доля гидрофобных групп на поверхности и химический состав носителя. Методы связывания с носителем можно разделить на три типа.

А. Метод физической адсорбции. Принцип, лежащий в основе этого метода, заключается в физической адсорбции белков-ферментов на поверхности нерастворимых в воде носителей. Физическая адсорбция практически не вызывает конформационных изменений в молекуле фермента, которые могут привести к разрушению его активного центра. Единственный недостаток этого метода заключается в том, что адсорбированный фермент может вымываться из носителя во время его использования, поскольку сила связывания между белком-ферментом и физическим адсорбирующим носителем невелика. Обычно в качестве носителей используются неорганические материалы: активированный уголь, пористое стекло, кислая глина, отбеливающая глина, оксид алюминия, силикагель, фосфат кальция и т. д. Также используются натуральные полимеры, такие как крахмал и клейковина.

Как указывалось ранее, иммобилизация инвертазы на древесном угле была изучена Нельсоном и Грифффином (1916). Эти исследователи заметили, что «фермент, адсорбированный на активированном угле, сохранил свою каталитическую активность по отношению к сахарозе. В литературе также сообщалось об иммобилизации фермента

липоамиддегидрогеназы путем гидрофобного связывания с носителем. Фермент был иммобилизован путем связывания с носителями, содержащими гидрофобные остатки, такие как бутилсефароза или гексилсефароза. Его можно легко иммобилизовать с помощью адсорбента, содержащего танин в качестве лиганда». Танин-аминогидроксигидроксицеллюлозу можно использовать для иммобилизации многих ферментов, и гидрофобные силы играют важную роль в этой иммобилизации.

Б. Метод ионного связывания. Этот метод основан на принципе ионного связывания ферментативного белка с нерастворимым в воде носителем, содержащим ионообменные группы.

Полисахариды и синтетические полимеры, содержащие ионообменные группы, успешно используются в качестве носителей для ионного связывания. Этот метод практически не вызывает изменений в конформации активного центра ферментативного белка и, таким образом, во многих случаях позволяет получать иммобилизованные ферменты с высокой активностью. Недостатком метода является то, что при изменении pH среды в растворах субстрата с высокой ионной силой может произойти утечка фермента из носителя из-за ослабления ионных связей.

О результатах иммобилизации фермента методом ионного связывания сообщает Митц (1956). Он получил иммобилизованную каталазу, пропуская раствор фермента через колонку, заполненную DEAE-целлюлозой. Высокоактивная и стабильная иммобилизованная протеаза была получена с использованием анионных носителей, таких как DEAE-целлюлоза. Об ионном связывании с носителями также сообщалось после химической модификации фермента. Например, анионная глюкоамилаза была модифицирована в полианионное производное путём ковалентной связи с водорастворимым полимером этилена и малеинового ангидрида.

С. Метод ковалентного связывания. Этот метод предполагает связывание ферментов и нерастворимых в воде носителей ковалентными связями. «Функциональные группы, участвующие в ковалентном связывании фермента с носителем: α или β -аминогруппа; α , β или γ карбоксильная группа; сульфгидрильная группа; гидроксильная группа; фенольная группа. Эти функциональные группы вступают в реакцию с носителями, содержащими реактивные группы, такие как диазониевые, изоцианидные, галогенидные и азидные».

2. Метод сшивания Этот метод основан на принципе образования химических связей и межмолекулярных сшивок между молекулами фермента с помощью бифункциональных и многофункциональных реагентов. В этом методе не используются водонерастворимые носители. «В качестве сшивающих реагентов на практике применяются глутаральдегид, изоцианатные производные, бис-диазобензол, *N,N'*-полиэтилен, *N,N'*-этилен, бисмаломид. Функциональными группами ферментативного белка, участвующими в реакциях, являются α -аминогруппа или β -аминогруппа лизина, фенольная группа тирозина, сульфгидрильная группа цистеина и амидазольная группа гистидина. Для сшивания ферментов требуются жёсткие условия. Это приводит к потере активности из-за изменения конформации активного центра фермента. *N,N'*-полиметилен-бис-йодоацетамид использовался для иммобилизации альдолазы в мышцах кролика и α -амилазы и т. д.

3. *Метод иммобилизации.* «Этот метод основан на принципе удержания фермента в решётке полимерной матрицы или в полупроницаемой мембране». Методы иммобилизации бывают двух типов.

Решётчатый тип. Этот метод предполагает «закрепление фермента в межклеточных пространствах сшитого нерастворимого в воде полимера, то есть в матрице геля. Для иммобилизации фермента этим методом используются различные синтетические полимеры, такие как полиакриламид, поливиниловый спирт, и натуральные полимеры, такие как крахмал и порошок конжака. Этот метод был использован Бернфельдом и др., которые поместили трипсин, папаин, амилазу, рибонуклеазу и т. д. в гелевую решётку из полиакриламида.

Тип микрокапсул. Этот метод предполагает помещение фермента в полупроницаемую полимерную мембрану. Полученные микрокапсулы с ферментами обычно имеют диаметр 1–100 мкм. Микрокапсулы широко используются в медицине, пищевой промышленности, косметике, красителях и топливе. Для получения ферментов требуются строго контролируемые условия.

Носители для иммобилизации ферментов должны обладать определенными свойствами:

- высокой биологической и химической стойкостью;
- нерастворимостью;
- высокой механической прочностью;
- значительной гидрофильностью, которая обеспечивает связывание фермента с носителем в водной среде;
- достаточной проницаемостью для ферментов, ко-субстратов, субстратов и продуктов реакции, пористостью, большой удельной поверхностью;
- легкостью активации комплекса «фермент – носитель»;
- возможностью создания различных структур (мембран, пластин, трубочек, гранул);
- низкой стоимостью.

Выполнить все требования невозможно, поэтому необходимо находить компромисс между «идеальным» и «реально возможным». Для приближения к оптимальному варианту необходима разработка научно обоснованных подходов для выбора путей иммобилизации. Выбор путей иммобилизации и материала носителя на эмпирической основе – это надежда на случайную удачу, требующую больших затрат труда, времени и веществ. Поэтому необходимо в этом направлении проведение фундаментальных исследований. Отсутствие носителей, удовлетворяющих одновременно всем требованиям, и разнообразие задач, стоящих перед экспериментаторами, обуславливают широкий набор применяемых для иммобилизации материалов.

В зависимости от структуры, носители подразделяют на природные и синтетические, органические и неорганические, полимерные и низкомолекулярные.

Природные полимерные носители по своей химической природе подразделяют на белковые (кератин, фиброин, коллаген, желатин), полисахаридные (целлюлоза, декстран, агароза, каррагинан, альгиновые кислоты и их соли, аминополисахариды – хитин и хитозан) и липидные (модель «фермент – липид» в виде монослоя или бислоя

сферической формы – липосома), наиболее приближенные к естественным комплексам, существующим в клетке.

Например, целлюлоза отличается высокой степенью гидрофильности, а наличие большого количества гидроксильных групп дает возможность ее легко модифицировать путем введения различных заместителей.

Препараты целлюлозы для придания им химической устойчивости «сшивают» эпихлоргидрином. Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются ее аморфные участки. На их место для сохранения прочности между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированная целлюлоза благодаря простоте получения, сравнительно низкой стоимости относится к удобным носителям для иммобилизации ферментов. К недостаткам целлюлозы как носителя можно отнести ее неустойчивость к воздействию сильных кислот, щелочей и окислителей.

Хитин – основной компонент наружного скелета ракообразных, насекомых, а также клеточных оболочек некоторых грибов. Это соединение является отходом промышленной переработки креветок и крабов, поэтому доступно в больших количествах при относительно низкой стоимости. Хитин обладает пористой структурой, не растворяется в воде, разбавленных кислотах и щелочах, а также в органических растворителях. Для перевода в реакционноспособную форму он может быть модифицирован глутаровым альдегидом, а также солями тяжелых металлов. Обработка хитина концентрированными растворами щелочей (деацелирование) приводит к образованию хитозана. Хитозан имеет свободные аминогруппы, поэтому может использоваться для ковалентной иммобилизации с помощью бифункциональных реагентов: диальдегиды, диизоцианаты. В отличие от хитина хитозан растворяется в минеральных и органических кислотах, поэтому для иммобилизации он часто применяется в виде растворов (рН 3–7). Полученные препараты иммобилизованных ферментов и других биобъектов на основе хитозана обладают высокой каталитической активностью и устойчивостью к микробному воздействию; наблюдается и повышение термостабильности белков, иммобилизованных на хитозане

Альгиновые кислоты и их соли – это полисахариды бурых морских водорослей, состоящие из связанных β -1,4-связями остатков D-маннуроновой кислоты. Они служат основой при получении альгинатных гелей. В присутствии моновалентных катионов эти полисахариды даже в низких концентрациях образуют вязкий раствор, а в присутствии двухвалентных катионов, особенно Ca^{2+} , наблюдается образование геля. В зависимости от присутствующего катиона эти гели и носят различные названия: натрий альгинатный гель, кальций альгинатный гель и т. д. Характерной особенностью этих носителей является зависимость их растворимости от температуры и рН-раствора. Для иммобилизации биопрепаратов широкое распространение получила система с альгинатом кальция. Выбор этого геля для иммобилизации произошел не случайно: условия включения в гель альгината кальция очень мягкие, полимер можно стерилизовать автоклавированием, и кроме того, процесс иммобилизации обратим, что достигается добавлением агента, связывающего Ca^{2+} (например, ЭДТА или лимонной кислоты). Последнее особенно важно было на начальных этапах исследования,

поскольку необходимо было изучать свойства клеток по мере их нахождения в иммобилизованном состоянии. От соотношения концентрации альгината и Ca^{2+} зависит плотность сшивки геля. Стабильность геля возрастает с увеличением концентрации полимера, но при высоких концентрациях альгината масса становится вязкой, что может затруднять процесс образования гранул. Поэтому необходимо подобрать такие условия, которые бы позволили получать стабильный гель.

Липиды. Иммобилизация ферментов на природных липидных носителях (конструирование ансамблей белок – липид) может рассматриваться как приближение к живой клетке. Для такой иммобилизации, как правило, используются природные липиды – компоненты биомембран. Обычно липидные носители применяются в виде монослоев на различных поверхностях или бислоев (как правило, сферической формы). Липиды, имеющие хотя бы небольшую полярную «головку», способны образовывать мономолекулярную пленку на границе раздела фаз (вода – воздух, вода – неполярный растворитель). Липидные молекулы в монослое расположены таким образом, что полярные «головки» погружены в водную среду, а углеводные группы направлены в воздух или неполярную среду. Такая пленка способна сорбировать белковые молекулы. Изучение монослоев липидов, содержащих белок, помогает также установить природу взаимодействия липидов и белков в биологической мембране. Липидный монослой можно нанести на твердую подложку (силикагель, сажа и т. д.). В качестве липидной матрицы используют обычно лецитин, фосфатидилэтаноламин и холестерин. Возможность варьировать структуру и ориентацию молекул в липидных слоях достигается подбором полярности носителя и природы используемого растворителя липида. Если липид с молекулами бифильной природы, растворенный в неполярном органическом растворителе (бензол, гептан), адсорбировать на полярном силикагеле, то в монослое липида углеводородные цепи будут ориентированы наружу. При адсорбции липида из полярного растворителя на неполярной графитовой саже можно получить гидрофильный монослой, в котором полярные головки ориентированы в сторону растворителя.

В качестве природных носителей используются липосомы. Для приготовления липосом наиболее часто используются фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин и др. Размер и форма липосом зависит от способа их приготовления, а также от таких факторов, как кислотность среды, присутствие неорганических солей и природы используемого липида. Существует три различных типа липосом: мультислойные, монослойные и макровезикулярные.

Мультислойные липосомы представляют собой замкнутые упорядоченные структуры, состоящие из нескольких концентрических липидных бислоев, отделенных один от другого водной средой. Расстояние между соседними бислоями составляет 7,5 нм, диаметр центрального водного ядра равен $\sim 0,15$ мкм, а общий диаметр мультислойных липосом колеблется от 1–2 до 50 мкм. Ультразвуковая обработка мультислойных липосом приводит к трансформации их в монослойные. Диаметр таких липосом составляет 20–50 нм. Макровезикулярные липосомы образуются, например, путем слияния малых липосом, индуцируемого ионами Ca^{2+} , а также присутствием фосфолипидов с отрицательно заряженными головными группами. Такие липосомы состоят из одного бислоя и имеют диаметр от 60 нм до

100 мкм. Широкое применение липосом как носителей для ферментов и лекарственных препаратов обусловлено простотой получения, легкостью регенерации иммобилизованного материала, а также возможностью использования *in vivo* благодаря близости свойств этих липидов – носителей и природных биомембран.

Синтетические полимерные носители подразделяют на три группы – полиметиленовые, полиамидные и полиэфирные. Благодаря разнообразию, механической прочности и доступности, они широко используются для иммобилизации. Кроме того, при производстве синтетических полимеров можно значительно разнообразить их форму (гранулы, трубочки и т. д.), варьировать величину пор, вводить различные функциональные группы.

Полимеры на основе стирола являются основой многих промышленных марок ионообменных материалов. Для сорбционной иммобилизации применяются как микропористые, так и макропористые (размер пор 10–1000 нм) материалы. Сополимеры стирола в виде сферических частиц с различными сшивающими агентами можно получить гранульной полимеризацией. Геометрическая структура таких макропористых носителей (размер пор, удельная поверхность) варьирует в широких пределах при изменении количества агента и концентрации растворителя мономеров в реакционной среде. Наиболее часто в качестве сшивающего агента используется дивинилбензол. Пористость сополимеров стирола регулируют полимеризацией в присутствии порообразователей, например добавок, разлагающихся при нагревании с выделением газообразных веществ (NH_4Cl).

В последние годы стали применяться носители, имеющие макросетчатую, изопористую и гетеропористую структуры. Макросетчатые полистиролы подобны стеклам. Они имеют стабильную структуру пор, не набухают в воде, отличаются повышенной механической прочностью. Получают их эмульсионной сополимеризацией стирола с дивинилбензолом в присутствии осаждающего вещества. Изопористый полистирол образуется при сшивании стирола в дихлорэтаноле, содержащем п-ксилилендихлорид. Под действием монохлордиметилового эфира и парообразователя получают гетеропористый полистирол с диаметром пор ~ 1 мкм. Применение гетеропористых носителей обеспечивает высокую остаточную активность биопрепаратов.

Немодифицированные полистирольные носители гидрофобны. Присоединением ионогенных групп в пароположении бензольных радикалов можно придать некоторую гидрофильность, хотя в целом, сохраняется склонность полимера к гидрофобным взаимодействиям. Широкие возможности для разработки новых видов носителей открывает введение реакционноспособных ангидридных групп в состав синтетических полимеров. В этом случае получают носитель при сополимеризации эквимольных количеств стирола и малеинового ангидрида. В присутствии избыточного количества диметилендиамина получают носитель, содержащий аминокгруппы. Последние обладают высокой вместимостью по отношению к белкам, могут применяться как для ковалентной, так и нековалентной иммобилизации.

Полиакриламидный гель получается при сополимеризации производных акриловой кислоты со сшивающими агентами. Полиакриламид – носитель, часто используемый для включения ферментов и клеток, не обладает ионообменными

свойствами, поэтому при иммобилизации рН-профиль активности препаратов практически не меняется. По этой же причине не происходит ни обогащения, ни обеднения носителя заряженными субстратами и продуктами. Однако отсутствие взаимодействия включенных белков с носителем не способствует их удержанию. Для устранения утечки требуется высокая степень сшивки носителя, т. е. желательна как можно более полная полимеризация. К сожалению, мы это уже отмечали, при высокой степени сшивки возникает проблема диффузионных ограничений.

Таким образом, хотя включение препаратов в полиакриламидный гель используется довольно широко, методы иммобилизации, также как ковалентное сшивание с инертным носителем, имеют в этом случае определенные преимущества. Кроме того, полиакриламидный гель вследствие токсичности используемых для его получения мономеров (акриламида, бисакриламида) и выделения тепла при полимеризации снижает жизнеспособность клеток и ферментов. Но поскольку клетки значительно больше ферментов, то высокая степень сшивки необязательна. По этой причине для иммобилизации клеток в последнее время используют поперечносшитый и предварительно полимеризованный линейный полиакриламид. Полиамидные носители – это группа различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой $-C(O)-NH-$. Один из способов получения основан на гомополиконденсации аминокислот, например ϵ -аминокапроновой кислоты

Носители неорганической природы могут быть представлены материалами из глины, стекла, керамики, силикагеля, графитовой сажи, а также оксидами металлов и т. д. Преимущества этой группы носителей состоят в легкости регенерации, возможности получения любой их формы при производстве и варибельности размера пор. Неорганические носители могут быть как пористыми, так и непористыми.

К макропористым кремнеземам относятся силикагели, силохромы и макропористые стекла. Достоинства: механическая прочность, химическая инертность ко многим растворителям, наличие жесткого скелета с заданным размером пор, устойчивость к воздействию микроорганизмов. Поверхность частиц кремнезема покрыта гидрофильными и гидроксильными группами, обладающими слабовыраженными кислотными свойствами. К недостаткам этих носителей следует отнести использование их в ограниченном диапазоне рН и некоторую неспецифическую сорбцию на их поверхности. Можно химически модифицировать кремнеземы путем введения различных реакционноспособных групп ($-CN$, $-NO_2$, $-NH_2$ и др.) или гидрофобизировать поверхность соответствующими реагентами.

Применение различных модифицирующих агентов дает возможность целенаправленного изменения свойства поверхности кремнеземных носителей. Однако стоимость кремнеземных носителей относительно высока, а модификация еще более повышает их стоимость, что является существенным ограничением во внедрении их в промышленности.

Природные алюмосиликаты (глины, цеолиты), а также пористая керамика. Поверхность также может быть модифицирована различными органическими веществами. Они характеризуются высокой плотностью поверхностных групп, связыванием белковых групп, что имеет немаловажное значение для эффективной иммобилизации. Уголь и графитированная сажа. Уголь может быть использован в

качестве носителя, как для адсорбционной, так и для ковалентной иммобилизации. Достоинства графитированной сажи: однородность и электрическая проводимость ее поверхности. Последнее свойство важно при создании биоэлектродокаталитических систем на основе иммобилизованных препаратов. К недостаткам можно отнести низкую механическую прочность.

Весьма перспективны носители на основе металлов и их оксидов. Эти носители характеризуются высокой механической прочностью, относительной дешевизной, стабильностью, хорошими гидродинамическими свойствами.

Металлические поверхности, используемые в качестве носителей, как правило модифицируют, либо создавая оксидную пленку на поверхности матрицы, либо покрывая их слоем полимера (производные полистирола, целлюлозы и т. д.). Это позволяет значительно повысить сорбционную емкость носителя.

Вообще же недостатки, характерные для процесса иммобилизации ферментов, способствовали развитию интереса к использованию потенциальных возможностей клеточного метаболизма, т. е. использованию целых клеток. Действительно, многие примеры иммобилизованных клеток можно найти в природе и впервые их применили в технологическом процессе более 150 лет назад (быстрый способ получения уксуса). Использование иммобилизованных клеток позволяет избежать необходимость выделения и очистки требуемых ферментов. Поскольку клетки микроорганизмов являются поистине бесконечным источником самых разнообразных ферментов, естественно, что в первую очередь именно они были использованы для иммобилизации. Живая клетка, в отличие от фермента представляет собой готовый биотехнологический реактор, в котором реализуются не только процессы, приводящие к образованию конечного продукта, но и ряд других, способствующих поддержанию каталитической эффективности системы на высоком уровне (например, регенерация кофакторов) [15].

Применение иммобилизованных ферментов. Иммобилизованные ферменты находят широкое применение в различных отраслях народного хозяйства:

- в промышленности – в качестве активных компонентов стиральных и моющих средств, в дубильных процессах, в пищевых производствах, например при обработке мяса; в качестве катализаторов при проведении различных технологических процессов, для анализа различных веществ;

- в медицине – в качестве противовоспалительных, тромболитических и фибринолитических препаратов;

- в фармации – в медицинской диагностике при анализе лекарственных веществ белковой природы;

- в качестве биокатализаторов в биотехнологических производствах.

Также примерами первой области являются синтез аминокислот, производство сахарных сиропов, молочных продуктов и т. д. В системе охраны окружающей среды иммобилизованные препараты применяются для очистки сточных вод и гидролиза городских, промышленных и с/х стоков, содержащих целлюлозу, гемицеллюлозу и лигнин. При этих процессах утилизируется энергия в форме метана или этанола, т. е. очевидны социальные и экономические выгоды. Примеры производства лекарств – синтез антибиотиков, алкалоидов и т. д. Препараты микрокапсулированных ферментов испытаны при лечении больных с генетическими нарушениями, у которых отсутствуют

соответствующие ферменты. Такие препараты могут применяться для улучшения пищеварения, удаления токсических метаболитов, предотвращение роста опухолей.

Иммобилизованные ферменты могут быть использованы для анализа, в частности применяются ферментные электроды, например для регистрации концентрации глюкозы или мочевины в биологических или других жидкостях. Кроме того, можно надеяться, что помимо практического применения изучение включенных в носитель или инкапсулированных ферментов и клеток будет способствовать лучшему пониманию их функционирования *in vivo*.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение. Иммуобилизация – это...
2. Перечислите преимущества иммуобилизованных ферментов.
3. Перечислите требования, предъявляемые к материалам, которые используются в качестве носителя для иммуобилизации.
4. Приведите примеры полисахаридных природных носителей.
5. Приведите примеры липидных носителей.
6. Приведите примеры синтетических органических носителей.
7. Приведите примеры неорганических носителей
8. Приведите классификацию методов иммуобилизации.
9. Охарактеризуйте способы физической и химической иммуобилизации.
10. Где применяют иммуобилизованные ферменты?
11. Что такое микрокапсулирование?

8 Источники и технологии получения ферментных препаратов

Номенклатура ферментных препаратов. Источники получения ферментных препаратов. Способы выражения активности ферментных препаратов. Технология выделения ферментных препаратов из сырья растительного и животного происхождения

Существует определенная номенклатура названий ферментных препаратов, в которой учтены основной фермент, источник получения и степень его очистки. Ферментные препараты представляют собой комплекс, содержащий помимо основного фермента еще определенное количество сопутствующих белков и ферментов. Поэтому в технологии ферментных препаратов принято классифицировать их по основному компоненту в смеси ферментов, присутствующих в данном препарате: протеолитические, амилалитические, липолитические и т.д.

Название каждого препарата включает сокращенное название основного фермента, затем добавляется видовое название микроорганизма-продуцента, заканчивается название препарата суффиксом «ин». Например, амилалитические препараты, получаемые из культур *Aspergillus oryzae* и *B. subtilis*, называются соответственно амил-ориз-ин (амилоризин) и амил-о-субтил-ин (амилосубтилин). Мальтаваморин П2× (продуцент *Asp. awamori* содержит в основном мальтазу). Целловиридин Г3× (продуцент *Trichoderma viride* содержит в основном целлюлолитические ферменты). Затем ставят индекс, в котором обозначены способ производства и степень очистки фермента от балластных веществ. При глубинном способе культивирования после названия – букву Г, а при поверхностном – П. После букв Г или П может стоять цифра, обозначающая степень чистоты препарата (×). Индекс 2× обозначает жидкий неочищенный концентрат исходной культуры; 3× – сухой ферментный препарат, полученный высушиванием распыленного неочищенного раствора фермента (экстракта из поверхностной культуры или культуральной жидкости). Технические ферментные препараты с индексами 2× и 3× чаще используют в легкой промышленности и сельском хозяйстве. Для пищевой промышленности, медицины и научных исследований требуются очищенные и высокоочищенные ферментные препараты. Индекс 10× означает сухие препараты, полученные осаждением ферментов органическими растворителями или методом высаливания; цифрами 15×, 18×, 20× обозначают препараты, частично освобожденные не только от балластных веществ, но и от сопутствующих ферментов; выше 20× – высокоочищенные и даже гомогенные ферментные препараты. В нашей стране выпускают следующие ферментные препараты: амилосубтилин и протосубтилин (продуцент – *B. subtilis*), пектофетидин (*Asp. foetidus*), мальтаваморин (*Asp. awamori*), амилоризин (*Asp. oryzae*), глюконигрин (*Asp. niger*) и др.

Источники ферментных препаратов, изготовленных из сырья растительного происхождения. Источниками ферментов могут выступать вегетативные органы некоторых растений, отдельные органы животных, в которых накапливаются ферменты, ряд которых представлен в таблице 3.

Таблица 3 – Источники ферментов растительного происхождения

Ферменты	Источник, из которого получают
Амилазы	Ячмень
Протеазы:	
папаин	Дынное дерево
фицин	Фиговое дерево (плоды–инжир)
бромелаин	Ананас
Кислая фосфатаза	Картофель
Пероксидаза	Хрен
Уреаза	Канавалия мечевидная

Амилазы и папаин растительного происхождения наиболее широко используются в пищевой промышленности. Источником ферментов могут выступать пророщенные зерна различных злаков (например, ячменный солод, содержащий до 1 % амилаз). Источником протеазы выступает папаин, который добывают при переработке плодов дынного дерева. Только в США ежегодно расходуют около 1 т папаина для размягчения мяса. Папаин, а также протеазы фицин и бромелаин при контакте с мясом в течение 2 ч при комнатной температуре расщепляют белки соединительной ткани – коллаген и эластин. Из растительного сырья получают также фосфатазы, пероксидазы, уреазы, гемицеллюлазы и другие ферменты [21, 22].

Источники ферментных препаратов, изготовленных из сырья животного происхождения. На мясоперерабатывающих предприятиях для получения ферментов используют и консервируют органы и ткани животных (поджелудочная железа, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней и т.п.) Некоторые наиболее известные ферменты животного происхождения, а также органы и ткани животных, из которых их получают, представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Источники ферментов животного происхождения

Ферменты	Источник, из которого получают
Сычужный фермент	Крупный рогатый скот – сычуг
Щелочная фосфатаза	Крупный рогатый скот – кишечник
Лактатдегидрогеназа	Крупный рогатый скот – сердце
Гиалуронидаза	Крупный рогатый скот – семенники
Каталаза	Крупный рогатый скот, свиньи – печень
Пепсин	Свинья – желудок
Трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, панкреатин, эластаза	Свинья – поджелудочная железа
Фумараза и трансаминаза	Свинья – сердце
Аминоацилаза	Свинья – почки
Ацетилхолинэстераза	Электрический угорь – мышечная ткань

Пепсин получают из слизистой желудка крупного рогатого скота и свиней, панкреатин, смеси трипсина, химотрипсина, липаз и амилаз получают из поджелудочной железы свиней. Для размягчения мяса применяют пепсин, трипсин и химотрипсин, однако более эффективен при обработке мяса панкреатин. Из сычуга (желудок) молодых телят выделяют реннин (сычужный фермент), используемый при производстве сыра. Сычужный фермент участвует в образовании сырного зерна, т.е.

осуществляет процесс образования сгустка при сквашивании и участвует в протеолизе при созревании сыра.

Получение ферментных препаратов, созданных с помощью микроорганизмов. Получать ферменты из микроорганизмов по экономическим и технологическим соображениям более выгодно, чем из эукариот. В искусственно созданных условиях микроорганизмы способны синтезировать огромное количество разнообразных ферментов. Они легко переключаются с синтеза одного фермента на другой, нетребовательны к составу питательной среды, и имеют сравнительно небольшой период генерации (12–96 ч).

Для промышленного получения ферментных препаратов используют как мутантные, так и природные штаммы микроорганизмов. Микроорганизмы могут синтезировать одновременно как целый комплекс ферментов, так и только один фермент, но в больших количествах (характерно для мутантных штаммов). Микробные клетки способны продуцировать более 2000 различных ферментов, катализирующих биохимические реакции, связанные с дыханием, ростом и образованием различных продуктов. Многие ферменты могут быть легко выделены и проявляют свою активность независимо от того, где они находятся: внутри микробной клетки или в культуральной жидкости.

Производство ферментных препаратов осуществляют как поверхностным, так и глубинным способами. При поверхностном (твердофазном) культивировании в качестве продуцентов чаще всего выступают грибы, а при глубинном – бактерии, актиномицеты и дрожжи. При твердофазном культивировании питательная среда имеет рыхлую или твердую консистенцию, основу которой составляют увлажненные пшеничные отруби. Для придания среде рыхлой консистенции к пшеничным отрубям добавляют солодовые ростки или древесные опилки. Процесс микробного биосинтеза ведут в условиях аэрации. При глубинном способе культивирования принципиальных особенностей нет. Если продукт (фермент) образуется в культуральной среде в процессе биосинтеза, то в этом случае используют питательные среды неопределенного состава. В качестве источника органического углерода и азота, как правило, используют различные сорта крахмала (картофельный, кукурузный, рисовый), соевую муку, гидролизаты биомассы дрожжей или кукурузный экстракт. В случае если ферменты аккумулируются в биомассе продуцента, то использование подобных сред недопустимо, поскольку в биомассе образуются нерастворимые компоненты, затрудняющие выделение и очистку целевого продукта. Большое значение имеет использование того или иного источника углерода. В случае замены одного источника углерода на другой полностью меняет набор накапливаемых ферментов. Например, *Asp. awamori* на средах, содержащих крахмал, преимущественно образует амилазы, при замене крахмала на ксилан синтезирует ксиланазу, а если в качестве источника углерода применяют растительное масло, в культуральной жидкости накапливается липаза.

При получении ферментов высокой степени очистки целесообразно культивировать продуцент в питательной среде строго определенного состава, что обеспечивает направленное получение нужного фермента. Ферментные препараты в своем составе имеют до 50% сухих веществ. В основном они содержат целый комплекс ферментов. Одним из самых трудоемких биотехнологических процессов является выделение и очистка ферментов, поэтому в некоторых случаях ферментные препараты

применяют в неочищенном виде. Однако в пищевой промышленности используют препараты очень высокой степени очистки. Активность ферментного препарата зависит от степени очистки, поэтому чем она выше, тем активнее препарат. В целом ряде случаев необходимо иметь стандартизованные по активности входящих в их состав ферментов ферментные препараты. В этом случае используют различные наполнители: соли серной и соляной кислот, муку, бентонит, крахмал и др.

Способы выражения активности ферментных препаратов. Любой ферментный препарат прежде всего должен быть охарактеризован по его ферментативной активности. IUBMB рекомендует использовать следующие понятия и выражения единиц активности ферментов.

Стандартная единица фермента – это такое количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля данного субстрата за одну минуту при заданных условиях. Стандартная единица фермента обозначается буквой E (от русского слова «единица») или буквой U (от английского слова «unit»).

Удельная активность – это число единиц (E или U), отнесенное к одному миллиграмму белка в ферментном препарате. Количество белка в препарате фермента может быть определено любым известным методом определения белка (метод Кьельдаля, метод Лоури и др.).

Молекулярная активность – число молекул данного субстрата или эквивалентов затронутых групп, превращаемых за одну минуту одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата. Это понятие соответствует числу оборотов, введенных Варбургом. Число оборотов по Варбургу – это число молей превращенного субстрата, приходящееся на моль фермента за минуту. Для определения молекулярной активности фермента нужно знать его молекулярную массу.

Катал – каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью равной 1 моль в секунду в заданной системе измерения активности. Каталитическая активность в 1 катал (кат) при практическом применении оказывается слишком большой величиной, поэтому в большинстве случаев каталитические активности выражают в микрокаталах (мккат), нанокаталах (нкат) или пикокаталах (пкат). Стандартная единица фермента находится с каталом в следующем соотношении: $1 \text{ E (U)} = 16,67 \text{ нкат}$.

Промышленным способом чаще всего получают ферменты группы гидролаз. Рассмотрим их производство на примере протеолитической группы.

Ферменты из растительного сырья. В промышленных условиях ферменты из растений получают в субтропических и тропических странах. Для этого используют такие растения, как папайя, ананас и инжир.

Плоды папайи в стадии молочной зрелости содержат в соке значительное количество протеолитических ферментов. В этот период собирают сок плодов папайи. Для этого острым ножом сверху вниз слегка надсекают плоды, которые на деревьях образуют грозди. Плоды остаются на деревьях, а под гроздь подвешивают ведро, в которое стекает сок в течение суток или нескольких часов. Затем сок, который чаще называют латексом, тонким (1-1,5 см) слоем разливают в плоские емкости и ставят в теплое место, в солнечный день обычно в тени. Латекс быстро высыхает, образуя тонкие пластины, которые легко снимаются. Их можно измельчить для получения технического препарата – папаина, а можно сразу подвергнуть очистке всеми

известными методами: осаждением органическими растворителями, высаливанием, концентрацией с помощью ультрафильтрации. Можно также использовать современные тонкие методы очистки, т. е. использовать общепринятые способы получения высокоочищенных препаратов вплоть до кристаллических и гомогенных ферментов.

Белок, предшественник папаина (пре-про-папаин), состоит из 345 аминокислот, содержит сигнальную последовательность (1-18 аминокислоты). Про-папаин уже состоит из пептида, блокатора активного центра фермента (19-133) и самого фермента. Зрелый папаин – полипептид, состоящий из 212 аминокислотных остатков, на N- конце молекулы которого аминокислотой является изолейцин, на C- конце – аспарагин. Хорошо растворим в воде, водных солевых растворах и в 70 % метиловом и этиловом спиртах. Молекулярный вес папаина – 23406. Папаин стабилизируется тремя дисульфидными мостиками. Его трёхмерная структура состоит из двух различных доменов, между которыми находится активный центр фермента, в состав которого включают аминокислоты цистеин-25 и гистидин-159. Папаин – монотиоловая цистеиновая эндопротеаза. По характеру ферментативного действия её называют «растительным пепсином». Но в отличие от пепсина, папаин активен не только в кислых, но и в нейтральных и щелочных средах (диапазон pH 3–12, оптимум pH 5–8). Он сохраняет активность в широком температурном диапазоне (до 50-60 °C), обладает относительно широкой специфичностью. При pH 5–7,5 папаин гидролизует амиды, пептиды, белки и эфиры основных аминокислот с незамещённой аминогруппой.

Вторым по объёму производства протеолитическим ферментом растительного происхождения является бромелайн (бромелин). Его получают из листьев, стеблей и оболочек плодов ананаса. Экстракт бромелайна представляет собой смесь переваривающих белок (протеолитических) ферментов и ряда других веществ в меньших количествах. Протеолитическими ферментами являются сульфгидрилпротеазы; для функционирования требуется свободная сульфгидрильная группа боковой цепи аминокислоты цистеина. Двумя основными ферментами являются: стволый бромелайн – EC 3.4.22.32; фруктовый бромелайн – EC 3.4.22.33.

После уборки урожая всю зеленую массу, за исключением корневой части растения, измельчают и подвергают водной экстракции. Затем полученный экстракт обрабатывают в зависимости от дальнейшего применения.

Третьим известным препаратом растительной протеиназы является фермент фицин, который получают из листьев и молодых побегов инжирного дерева. Особенность получения препарата заключается в том, что сырьё собирают вручную ранним утром на восходе солнца в деревянную тару. Затем материал давят в любых емкостях, приспособленных для сбора и хранения, исключая контакт с металлом, и экстрагируют водой. Экстракт концентрируют. Жидкий концентрат можно использовать для смягчения мяса непосредственно перед кулинарной обработкой, при производстве специальных колбас и копченых мясных изделий.

В умеренном климатическом поясе растительные амилолитические ферменты для пищевой промышленности получают из проросшего зерна – солода. Солод используют либо сырым в размолотом виде, либо в сухом виде. В промышленных масштабах очищенные ферментные препараты из солодов не производят.

Получение ферментных препаратов из животного сырья. В промышленных условиях при переработке мяса различных животных в самый первый момент разделки туши производят сбор ферментного сырья (поджелудочная железа, слюнные железы, слизистая оболочка желудка и тонкого кишечника, сычуги крупного рогатого скота и овец, семенники половозрелых животных).

Слизистая оболочка желудка свиней и крупного рогатого скота содержит пепсин и липазу, слюнные железы – амилазу, сычуг молодняка – сычужный фермент и т. д. Свежеотобранные органы и ткани животных, содержащие ферменты, очень нестойки при хранении. Поэтому после сбора сырье следует немедленно переработать или законсервировать с помощью низких температур, обработки поваренной солью, уксусом, этиловым спиртом или же высушиванием.

Для получения технических препаратов допускается консервирование животного сырья поваренной солью. Этот метод используется, например, при получении панкреатина. Из заготовленного на мясокомбинатах животного сырья на специальных заводах органопрепаратов получают ферментные препараты различной степени очистки. Процесс получения их складывается из ряда последовательных операций: измельчение сырья, экстракция ферментов, высаливание, отделение белковых осадков от жидкой фазы, очистка, кристаллизация и сушка препаратов.

В зависимости от вида используемого сырья применяют различные методы измельчения и разрушения клеток. К ним относят: попеременное замораживание и оттаивание, автолиз, обработку дубильными веществами, органическими растворителями и др. Клеточные оболочки и ткани, содержащие большое количество влаги, можно разрушить механическим измельчением и прессованием.

В настоящее время используют механическое измельчение сырья на специальных мясорубках, волчках, куттерах и машинах, на которых можно получить тончайшие срезы с замороженного сырья (микротомы). При измельчении животного сырья не обязательно стремиться к очень тонкому помолу, так как это может значительно затруднить дальнейшую переработку сырья. Тонкое измельчение может привести к образованию устойчивых суспензий за счет стабилизации их высокомолекулярных соединений, содержание которых в растворе резко возрастает по мере увеличения степени измельчения сырья. Извлечение ферментов из измельченной животной ткани можно проводить тремя видами экстрагентов: водным раствором кислот при pH 1,0–2,0; водой или водными растворами солей при pH 7,0–8,0; концентрированным водным раствором органических растворителей (этанол, метанол, уксус, глицерин).

Экстракцию проводят ступенчато, 2–3 раза заливая обрабатываемое сырье экстрагентом. Для лучшего извлечения ферментов всю массу в процессе экстракции перемешивают. После каждого настаивания обрабатываемого сырья экстрагент отделяют центрифугированием. Если выделяемый фермент очень нестабилен, то вместо центрифугирования используют фильтрацию под вакуумом.

Методы выделения и очистки ферментов и экстрактов животных тканей незначительно отличаются от получения ферментных препаратов из культур микроорганизмов. Их выделяют осаждением органическими растворителями (этанол, метанол, изопропанол, уксус, хлороформ и др.), солями (сульфат аммония, натрия или

магния, ацетат натрия, хлорид натрия). В дальнейшем для более полной очистки используют диализ, ультрафильтрацию, адсорбцию.

Ферменты микробиологического происхождения. В связи с увеличивающимися потребностями в ферментных препаратах растительное и животное сырье не устраивает производителей. Содержание ферментов в растениях, как правило, низкое. Кроме того, получение ферментов из растений носит сезонный характер. Органы животных также можно получить только на мясокомбинатах, при этом возникают проблемы с консервированием и хранением этого вида сырья.

Единственным неограниченным источником ферментов являются микроорганизмы, из которых можно выделить любые из известных в настоящее время ферментов, за исключением папаина. Синтезируемые микроорганизмами ферменты подразделяют на внеклеточные и внутриклеточные. К внеклеточным относят амилазу, целлюлазу, лактазу, липазу, пектиназу, протеазу, к внутриклеточным – аспарагиназу, каталазу, инвертазу. Внеклеточные ферменты получают из культуральной жидкости, предварительно отделенной от микроорганизмов. Для выделения внутриклеточных ферментов разрушают клеточные оболочки физическими или химико-ферментативными методами (гидролиз, ферментализ, автолиз и др.). Далее выделение ферментов внутриклеточного и внеклеточного происхождения идет по одинаковой схеме. Вначале ферменты выделяют методами экстракции, осаждения, адсорбции, ионного обмена, ультрафильтрации и др., а затем очищают при помощи хроматографии, диализа и кристаллизации. При необходимости ферменты концентрируют, обезвоживают, модифицируют и стабилизируют.

Современные методы генетики и генетической инженерии позволяют целенаправленно увеличивать выход необходимого фермента. Кроме того, среди микроорганизмов можно найти формы, живущие в экстремальных условиях (термофилы, галофилы и др.). Это означает, что из микроорганизмов можно выделить ферменты с улучшенными свойствами – термостабильные, осмоустойчивые, кислото- и щелочеустойчивые.

Контрольные вопросы

1. Назовите особенности формирования названий ферментных препаратов, приведите примеры.
2. Охарактеризуйте источники ферментных препаратов, изготовленных из сырья растительного происхождения.
3. Назовите источники ферментных препаратов, изготовленных из сырья животного происхождения.
4. Назовите особенности получения ферментных препаратов, созданных с помощью микроорганизмов.
5. Дайте определение стандартной единице фермента и удельной активности.
6. Что такое молекулярная активность ферментного препарата и катал?
7. Опишите способ получения протеолитических ферментов из растительного сырья.
8. Перечислите основные этапы получения ферментных препаратов из животного сырья.
9. Перечислите особенности ферментных препаратов микробного происхождения.

9 Технология получения ферментов и ферментных препаратов из культур микроорганизмов

Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Получение посевного материала. Производственное культивирование продуцента. Выделение и стабилизация ферментов. Получение товарных форм ферментных препаратов. Перспективы ферментных технологий

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

Технологический процесс получения микробных ферментных препаратов включает три этапа:

получение посевной культуры продуцента;

производственное культивирование продуцента глубинным или поверхностным способом при параметрах, обеспечивающих максимальный выход целевого продукта или продуктов ферментации;

получение технических или очищенных ферментных препаратов из культур микроорганизмов или культуральной жидкости.

Глубинный метод культивирования продуцентов ферментов предусматривает выращивание микроорганизмов в жидкой питательной среде. Концентрация фермента в среде при глубинном культивировании обычно значительно ниже, чем в водных экстрактах поверхностной культуры. Это вызывает необходимость предварительного концентрирования фильтрата перед его выделением.

При глубинном культивировании продуцентов ферментов выделяют, как и в любом биотехнологическом процессе, следующие этапы:

Приготовление питательных сред, которое зависит от состава компонентов. Основными этапами подготовки питательной среды являются ее составление и стерилизация.

Важнейшим фактором эффективности технологии ферментных препаратов является качество питательной среды. Основное требование к качеству питательной среды – полноценность ее состава, обеспечивающей рост соответствующего продуцента и биосинтез целевого фермента. Для культивирования ферментных продуцентов используют комплексные питательные среды, в состав которых входят отходы пищевых производств. Благодаря использованию отходов комплексные питательные среды доступны, дешевы и обеспечивают безотходность биотехнологических производств;

При составлении питательных сред для глубинного культивирования продуцентов в качестве основы используют гидролизаты растительного сырья, спиртовую барду, свеклосахарную мелассу и гидрол (разбавленные до оптимального

для роста продуцента содержания растворимых веществ), молочную сыворотку. В состав питательных сред могут вводиться малорастворимые источники углерода и других питательных веществ, однако их высокое содержание приводит к повышению вязкости среды, что в свою очередь, затрудняет диффузию растворенных веществ и кислорода, снижает разделяемость системы по завершении ферментации.

В качестве источника углерода в состав жидких питательных сред могут вводиться вещества липидной природы (жирные кислоты, фосфолипиды и др.), в первую очередь, в процессах биосинтеза липаз.

В качестве источников азота используются нитраты калия и натрия; соли аммония (фосфаты различной степени замещения, нитраты, хлориды, сульфаты, цитрат двухзамещенный) и аммиачная вода; мочевины; аминокислоты и пептиды. Дополнительно в качестве источников фосфора в состав сред могут вводиться фосфаты калия и натрия различной степени замещения. Ряд продуцентов требуют наличия в составе питательной среды комплекса витаминов группы В (биотина, инозита, пантотеновой кислоты, тиамина, пиридоксина).

В качестве обогатителей питательных сред в ферментных производствах используют кукурузный экстракт, соевую и кукурузную муку, дрожжевые гидролизаты и автолизаты.

Содержание сухих веществ питательной среды в зависимости от вида продуцента и биохимических особенностей синтеза целевого продукта варьируется в пределах от 2,5 до 20%.

Получение засевого материала. Для засева питательной среды материал готовят также глубинным методом. Вид его зависит от продуцента: для грибов это мицелиальная вегетативная масса, для бактерий – молодая растущая культура на начальной стадии спорообразования. Получение посевного материала состоит в увеличении массы продуцента в 3 – 4 стадии. Объем посевного материала зависит от физиологических особенностей продуцента. Если продуцент размножается только вегетативно, он резко возрастает (до 5 – 20 %).

Необходимо отметить, что засевной материал, а именно микроорганизмы в современных реалиях в большинстве случаев являются генетически модифицированными организмами (ГМО). Использование ГМО в производстве ферментов дает ряд преимуществ, а именно:

возможность получать высокоочищенные ферменты с максимальной специфичностью действия;

возможность получать ферменты, производство которых иным способом невозможно по экономическим, экологическим и токсикологическим причинам;

снижение энергопотребления и количества отходов благодаря высокой эффективности производства;

в пищевой промышленности – повышение эффективности использования сырья (например, в производстве соков), качества готовой продукции и увеличение срока годности, что позволяет снизить количество пищевых отходов (в частности кондитерской и хлебопекарной промышленности) и сократить использование химических веществ (в частности в крахмально-паточной промышленности);

в производстве кормов применение ферментов позволяет снизить загрязнение окружающей среды фосфором, высвобождающимся из отходов животноводства.

На пищевых производствах ферменты и ферментные препараты практически всегда используются как технологические добавки. В готовом продукте они либо отсутствуют, либо не функциональны. В последние 15-20 лет появилось множество пищевых ферментов, полученных с использованием ГМО – например, химозин (молокосвертывающий фермент).

Поскольку телячий химозин довольно дорогой, методами генной инженерии получают микроорганизмы, которые продуцируют химозин, идентичный ферменту, вырабатываемому в желудке жвачных животных, а именно телят-молокопоек. Генно-модифицированный химозин ведет себя аналогично телячьему химозину, при этом его действие более предсказуемо и в нем меньше посторонних примесей. Такой химозин применяют в сыроделии для получения высококачественных сыров без использования плесневых ферментов, а также сычужного Фермента других животных (не телячьего). Химозин, полученный из рекомбинантных микроорганизмов, соответствует более строгим требованиям и подвергается серьезной проверке на чистоту. В настоящее время в США и Великобритании около 90% всех твердых сыров изготавливают с применением химозина, полученного из генно-модифицированных микроорганизмов. Его легче очистить, он более активен (95% по сравнению с 5% у натурального химозина), а его получение обходится дешевле (Рисунок 66).

В 1988 г. химозин стал первым генно-модифицированным ферментом, разрешенным в Великобритании к использованию в пищевых продуктах, а в 1990 г. он был разрешен и в США. Тем самым в Великобритании применение ГМО в пищевой промышленности было разрешено на два года раньше, чем в США.

Существуют прогнозы, согласно которым в будущем практически все пищевые ферменты будут получать с использованием генно-модифицированных организмов. В настоящее время до 90% ферментов, получивших широкое промышленное применение, являются результатом использования технологии рекомбинантных ДНК. Помимо пищевой промышленности ферменты все чаще используют в химическом синтезе. В отличие от неорганических катализаторов (кислот, щелочей, металлов и оксидов металлов) ферменты по своему действию весьма специфичны.

Производственное культивирование. Биосинтез ферментов в глубинной культуре протекает в течение 2–4 суток при непрерывной подаче воздуха и перемешивании. Высокая концентрация питательных веществ на первых этапах может тормозить рост биомассы продуцента, поэтому часто свежая среда или некоторые её компоненты вводятся в ферментер на стадии активного роста. Температурный оптимум находится в интервале 22–32 °С. В современных технологических процессах ведется непрерывное автоматическое определение содержания в среде углеводов, количества образовавшихся метаболитов и концентрации клеток. Этим достигается максимальная производительность и наилучшее качество продуктов.

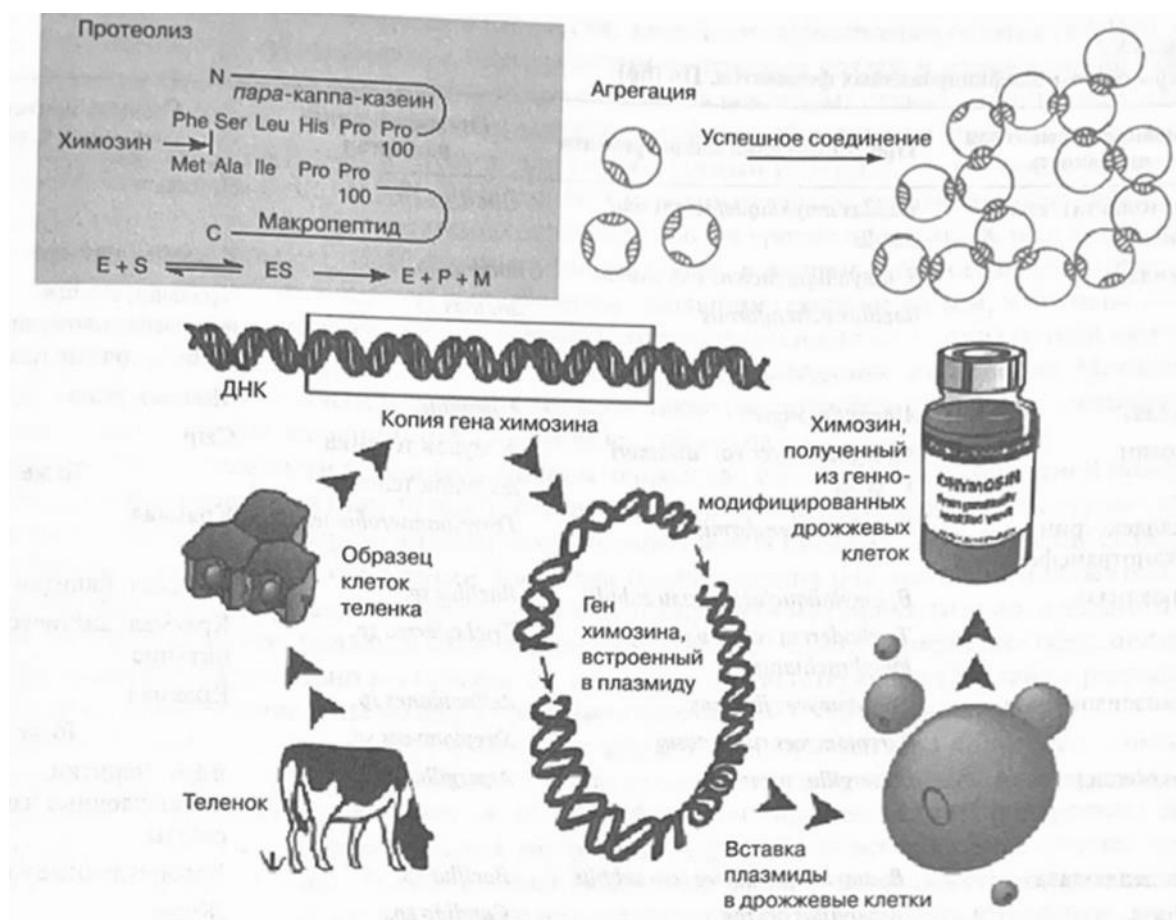


Рисунок 66 – Рекombинантный химозин

Сверху показаны две стадии процесса свертывания молока химозином- протеолиз и агрегация, а снизу – процесс продуцирования химозина генно-модифицированными микроорганизмами, идентичный выработке этого фермента в организме жвачных животных. Сначала из животных клеток выделяется последовательность ДНК, кодирующая белок химозин. Данная последовательность в составе плазмиды встраивается в геном дрожжей. Клетка дрожжей, несущая рекомбинантную ДНК, клонируется и образует культуру клеток с заданными свойствами. Дрожжевые клетки культивируют в биореакторах, где они продуцируют химозин, идентичный химозину животного происхождения. Поскольку такой химозин состоит из одного белка (не из смеси белков), то он чище, чем сычужный фермент животного происхождения

Глубинный способ имеет ряд преимуществ по сравнению с поверхностным способом, так как позволяет значительно сократить производственные площади, исключить тяжелый ручной труд, улучшить гигиену. Он упрощает механизацию и автоматизацию производства, делает возможным переход на непрерывный способ культивирования. При глубинном способе культивирования питательные вещества сред используются более рационально, что дает возможность значительно сократить отходы производства, получать ферментные препараты с меньшим содержанием примесей и большей удельной активностью. Глубинное культивирование проводят в вертикальных емкостях различного размера, называемых ферментаторами (ферментерами). Основное требование к ферментатору – возможность культивирования продуцента в асептических условиях, при интенсивном аэрировании

среды. В процессе культивирования приходится иметь дело со сложной трехфазной системой «жидкость – твердая взвесь – газ», в которой усложняются массообменные процессы и, соответственно, аппаратное оформление на стадии выращивания. Существующие промышленные ферментаторы по способу подвода энергии на аэрирование и перемешивание подразделяют на группы:

- аппараты с механическим перемешиванием и барботажем (комбинированные);
- аппараты с эжекционной системой аэрирования;
- а также барботажные аппараты (с подводом энергии к газовой фазе).

Большой интерес представляет первая группа аппаратов, предназначенная для асептических процессов (Рисунок 67).

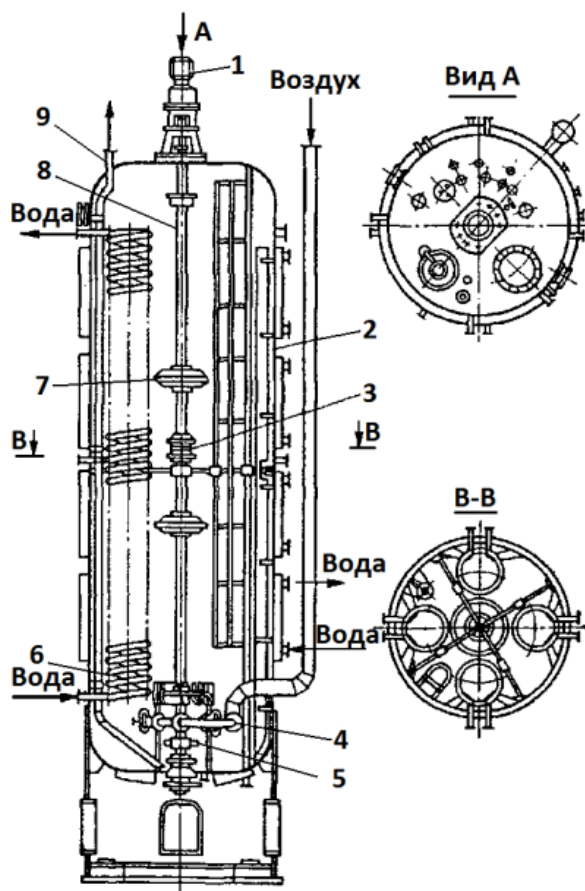


Рисунок 67 – Ферментатор барботажного типа объемом 100 м³:

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

Эти аппараты имеют цилиндрическую форму и отличаются по объему, а также по конструкции отбойников, перемешивающих устройств, уплотнений вала и теплообменников. В нашей стране часто используют герметизированные установки с механическим перемешиванием и барботажем воздуха.

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

В процессе культивирования ведут постоянный контроль за накоплением ферментов, состоянием биомассы и pH среды [16].

Выделение. В мицелии трёхсуточной культуры обычно остается не более 15 % ферментов. Остальные выделяются в окружающую клетки жидкую среду. В этом случае препараты ферментов выделяют из фильтратов после отделения биомассы.

Поверхностный метод культивирования продуцентов ферментов. При поверхностном методе культура растет на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Мицелий полностью обволакивает и довольно прочно скрепляет твердые частицы субстрата, из которого получает питательные вещества. Поскольку для дыхания клетки используют кислород, то среда должна быть рыхлой, а слой культуры-продуцента небольшим. Выращивание производственной культуры происходит обычно в асептических условиях. Преимущества поверхностной культуры: значительно более высокая конечная концентрация фермента на единицу массу среды; поверхностная культура относительно легко высушивается, легко переводится в товарную форму.

Приготовление питательных сред. Основу питательной среды составляют пшеничные отруби, как источник необходимых питательных и ростовых веществ. Кроме того, они создают необходимую структуру среды.

При подборе питательных сред основными требованиями являются полноценность состава среды для роста продуцента и синтеза целевого продукта; дешевизна и доступность сырья, используемого в качестве источников углерода, азота и минеральных веществ; потребность культивируемых микроорганизмов в специфических индукторах синтеза того или иного фермента.

При поверхностном культивировании микромицетов на твердых средах основой большинства производственных питательных сред, как отмечалось ранее, являются пшеничные отруби, имеющие следующий состав (%): крахмал – 16-20; белок - 10-12%, жир – 3-4; клетчатка – 30-40; зола – 2,5-3. Отруби являются дорогостоящим сырьем, поэтому их частично заменяют компонентами выполняющими функции разрыхлителей (например, древесные опилки) или обогатителей питательной среды (солодовые ростки, лузга крупяных культур, свекловичный жом, картофельная мезга, выжимки плодов и ягод).

В качестве основы питательной среды может быть использован нерастворимый остаток культуры после экстракции ферментов (биошрот) при условии его обогащения крахмалом и другими ростовыми веществами.

Среды для поверхностного культивирования стандартизуют по содержанию крахмала (16 – 20 %).

Стерилизуют среду острым паром при помешивании (температура 105–140 °С, время 60–90 минут). После этого среду засевают и раскладывают ровным слоем в стерильных кюветах. Кюветы помещают в растительные камеры. Культивируют в течение 36–48 часов.

Получение засевного (посевного) материала. Посевной материал может быть трех видов:

- культура, выросшая на твердой питательной среде;
- спорный материал;

- мицелиальная культура, выращенная глубинным способом.

Засевной материал получают в три этапа. Сначала музейную культуру продуцента пересевают на увлажненные стерильные пшеничные отруби (1-1,5 г) в пробирку и выращивают в термостате до обильного спорообразования. Второй этап – аналогично, но в колбах, третий – в сосудах с 500 г среды.

Производственное культивирование также делится на три периода, примерно равных по времени. Для создания благоприятных условий роста и развития продуцента необходима аэрация и поддержание оптимальной влажности (55 – 70 %):

- набухание конидий и их прорастание (температура не ниже 28 °С);
- рост мицелия в виде пушка серовато-белого цвета (необходимо выводить выделяемое тепло);
- образование конидий.

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

Принцип поверхностного культивирования можно осуществлять различными способами. Одним из них является кюветный способ. Недостатком его являются достаточно высокие трудозатраты (ручной труд). Другой способ предусматривает выращивание в специальных механизированных установках [17].

Кюветный способ. При этом способе используют элементарную ячейку (кювету) – специальную емкость четырехугольной формы, имеющую площадь 0,3×0,5 м² и высоту 20–50 мм (Рисунок 68, в). Ее изготавливают из листа металла с перфорированным днищем, реже используют сплошной металлический лист. Применяют кюветы открытые и с крышками. Для открытых кювет применяют оцинкованный металл; перфорации делают в виде узких продолговатых щелей размером (1,5–2,0)×20,0 мм. Отверстия располагают в шахматном порядке или подряд с зазором между отверстиями 3–5 мм; расстояние между рядами поддерживают ≈ 10 мм. В кювету загружают слой питательной среды (2 см), и затем переносят кюветы в специальные растительные (растильные) камеры (Рисунок 68, б). В камерах их располагают на многоярусных подвижных этажерках либо стеллажах. В последнем случае расстояние между рядами устанавливают 10 см. Число ярусов может достигать 16–18, а общая высота стеллажа – 2 м. Этажерки выполняют из металла с антикоррозионным покрытием. В целом камера имеет форму коридора с дверями в торцах. Работу в камере осуществляют в следующей последовательности:

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

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

Выращивание в механизированных установках. Одним из важнейших условий успешного роста микроорганизмов является высокая аэрация среды. При этом установка должна работать так, чтобы в случае возникновения инфекции зараженную среду можно было быстро выгрузить. Механизация, в первую очередь, касается загрузки среды в кюветы. Далее кювету перемещают на подвесную этажерку с помощью транспортера, а после загрузки этажерки она входит по монорельсу в растительную камеру, где создаются необходимые условия культивирования. В зависимости от вида микроорганизмов выбирают необходимую скорость перемещения этажерки по коридору. На выходе из коридора осуществляют автоматическую разгрузку. Установки могут предусматривать использование транспортеров скребкового типа. Недостатком в этом случае является необходимость полной остановки в случае инфицирования микроорганизмов и проведение длительной стерилизации.

Чешские установки имеют относительно невысокую производительность (до 400 кг/сут), но в эксплуатации более надежны, по сравнению со скребковыми транспортерами. Они представляют собой камеру, где располагается цепной транспортер с подвешенными к нему лотками. Когда рост микроорганизмов заканчивается, лотки поочередно опрокидываются, и цепная камера сгружается в бункер. Далее лотки моют и стерилизуют, после чего цикл повторяют. Известны американские установки барабанного типа. Внутри барабана располагают специальные рамы для питательной среды. Загрузка в барабан допускает использование 200 кг среды. Барабан вращают со скоростью 100 мин⁻¹, при этом в него подают воздух (расход – до 20000 м³/ч), обеспечивающий необходимое перемещение и аэрирование среды.

В РФ используют установки для выращивания с использованием вертикальных кювет производительностью до 1,5 т/сут. Чертеж такой установки представлен на рисунке 68 а.

Аэрирование происходит через вертикальные каналы, которые находятся между кюветами, а также через стенки кювет. Культура в растительной камере 9 практически не подсыхает, поскольку происходит некоторое увлажнение ее влагой, выделяемой микроорганизмами в ходе роста. Растительная камера представлена на рисунке 68, б, она представляет собой ящик прямоугольной формы, изготовленный из алюминиевого сплава. Перегородки с круглыми отверстиями диаметром 3 мм образуют внутри ящика вертикальные кюветы, а просветы между кюветами (40 мм) играют роль воздушных каналов. Затем культура поступает в сушилку, где она обрабатывается до влажности 10–12 %, фасуется и идет на склад. Свободная от культуры растительная камера по рельсовому пути 10 поступает в моечное отделение, где под действием мощных струй воды из форсунок она промывается и стерилизуется. Культура наиболее интенсивно растет вблизи отверстий в стенках кювет; в результате здесь образуются «коржи» микроорганизмов. Эти «коржи» трудно отделяются от кюветы при разгрузке, поэтому вертикальную стенку кюветы по окончании культивирования отодвигают и затем удаляют их на вибрационном столе 6.

Далее «коржи» разрезают, и частично измельченная культура попадает в бункер со шнеками. Стерилизованную же камеру подают на вибрационный стол для загрузки, и цикл повторяют. Преимуществом этого способа является возможность изоляции растительных камер в случае возникновения инфекции.

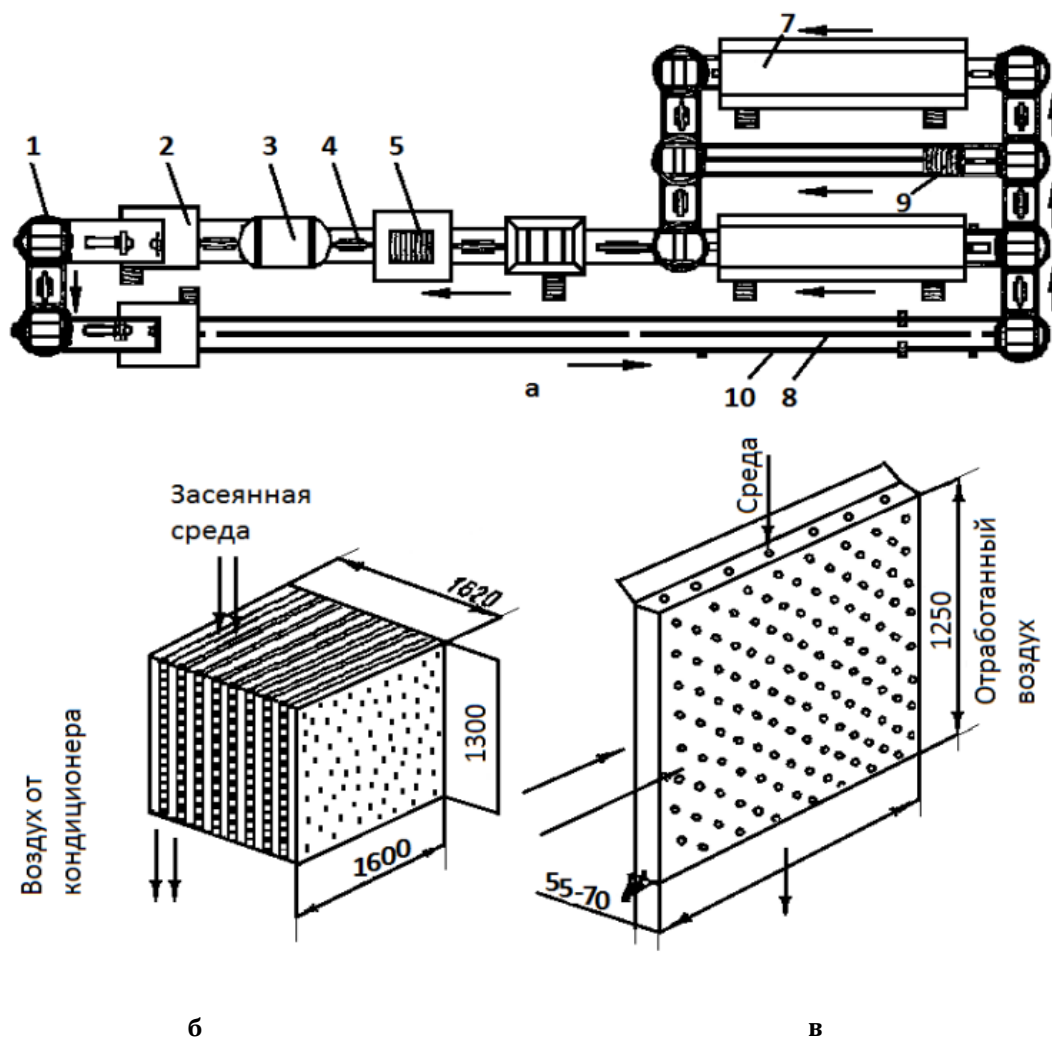


Рисунок 68 – Установка с вертикальными кюветами для выращивания поверхностной культуры:

- а – общая схема; 1 – поворотный круг; 2 – вибрационный стол для загрузки; 3 – стерилизатор камер; 4 – толкатель; 5 – устройство для мойки камер; 6 – стол для разгрузки; 7 – коридор с кондиционерами для выращивания; 8 – транспортер; 9 – растительная камера; 10 – рельсовый путь; б – растительная камера; в – кювета

Получение товарной формы. Выросшая в неподвижном слое при поверхностном культивировании культура представляет корж из набухших частиц среды, плотно связанных сросшимся мицелием. Массу размельчают до гранул 55 мм. Культуру высушивают до 10–12 % влажности при температурах не выше 40 °С.

Получение неочищенных ферментных препаратов. Неочищенные ферментные препараты представляют собой культуру микроорганизма с остатками культуральной жидкости, высушенную до остаточной влажности не более 8-12%. Неочищенный препарат может быть получен на основе поверхностной или глубинной культуры продуцента. Глубинная культура может быть очищена от твердой нерастворимой фракции или высушена вместе с ней. Сушку культур микроорганизмов осуществляют на ленточных, тоннельных, барабанных, вибрационных сушилках. Температура высушиваемого материала не должна превышать 40-45°С (температура воздуха на входе в сушильную камеру 80-85°С).

Выделение и очистка ферментных препаратов. Схема очистки сводится к следующему:

- освобождение от нерастворимых веществ;
- освобождение от сопутствующих растворимых веществ;
- фракционирование (как правило, хроматографическими методами).

Исходным материалом для получения препаратов ферментов служат: биомасса продуцента, фильтрат культуральной жидкости, экстракт из культуры микроорганизма или из тканей и органов растений и животных, из которых готовят препараты различной степени очистки.

Выделение и очистка фермента как из культуры микроорганизма (выращенного любым способом), так и из других природных источников весьма трудоемкая и дорогостоящая процедура, поэтому, если фермент можно использовать в виде неочищенного препарата, его не очищают. В промышленности широко применяют коммерческие препараты ферментов, чистота которых составляет всего 0,1 % (т.е. 99,9 % составляют примеси).

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

Удаление балластных веществ. В зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующих ему балластных веществ при получении очищенных препаратов ферментов комбинируют различные приемы и методы, такие, как термическое фракционирование, осаждение органическими растворителями, солями и тяжелыми металлами, фильтрация на молекулярных ситах, ионообменная хроматография, электрофорез, изоэлектрофокусирование.

На заключительных этапах очистки часто используют аффинную хроматографию (биоспецифическая хроматография, хроматография по сродству), основанную на способности ферментов избирательно связывать те или иные лиганды – субстраты, кофсубстраты, конкурентные ингибиторы, аллостерические эффекторы и т.п. Такое связывание весьма специфично, что позволяет выделить тот или иной фермент из множества других белков. Например, из желудочного сока человека методом одноэтапной аффинной хроматографии выделена кислая липаза, используемая в заместительной терапии при заболеваниях печени.

Для синтеза аффинного сорбента, соответствующего специфичности данного фермента, лиганд (субстрат или его аналог) присоединяют к инертной матрице (макропористые гидрофильные гели, синтетические полимеры, неорганические носители). Для уменьшения пространственных трудностей при взаимодействии

фермента с матрицей лиганд присоединяют к носителю через промежуточное звено (вставку, ножку, спейсер).

В процессе выделения повышается доля фермента в массе тотальных белков, т.е. увеличивается его *удельная активность*. В производственных условиях *активность* получаемого ферментного препарата оценивается количеством субстрата, преобразованного 1 мг (1кг) препарата при оптимальных условиях за 1 мин, и измеряется в моль/мг или каталах/кг белка.

Очищенные ферментные препараты хранят при низкой температуре (до -80°C). Для стабилизации ферментов в их препараты добавляют ко субстраты и субстраты. Ферментные препараты для промышленного применения стабилизируют, добавляя глицерин, моносахариды, дисахариды (глюкоза, сахароза, лактоза), HS-соединения (цистеин, глутатион, меркаптоэтанол, дитиотреитол и др.), отдельные аминокислоты, желатину и другие белки-наполнители.

Получение сухих ферментных препаратов, полученных из глубинных культур микроорганизмов. Сухие формы ферментных препаратов получают из разбавленных или концентрированных культуральных жидкостей, пастообразной массы, образующейся при осаждении ферментов. Для сушки разбавленных и концентрированных растворов применяют процессы сублимационной и распылительной сушки; пастообразные массы высушивают в вакуум-сушильных шкафах.

Примеры производственного культивирования продуцентов ферментных препаратов глубинным и поверхностным способами представлены в таблицах 5 и 6 [23].

Таблица 5 – Примеры производственного культивирования продуцентов ферментов поверхностным способом

Тип препарата	Продуцент	Состав среды	Параметры ферментации
1	2	3	4
Препараты α -амилазы	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus niger</i>	Пшеничные отруби с добавлением до 25% солодовых ростков; влажность среды (40-50) %	$t = (40-45)^{\circ}\text{C}$, $\tau = (36-48)$ час, $\text{pH}_{\text{нач.}} = 4,0-5,0$
Пектолитические препараты	<i>Aspergillus awamori</i> , <i>Aspergillus foetidus</i>	Жом свекловичный (66-70%), отруби (30-35%), добавки $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; влажность среды (55-60) %	$t = 30^{\circ}\text{C}$ первые 40 час., затем 24°C , $\tau = (36-48)$ час., $\text{pH}_{\text{нач.}} = 4,0-5,0$
Целлюлолитические препараты	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma lignorum</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Пшеничные отруби (60-80%), солодовые ростки (20%), добавки свекловичного жома; лузги зерновых; соломы и др.; влажность среды (60-65)%	$t = (35-40)^{\circ}\text{C}$, $\tau = (55-65)$ час. $\text{pH}_{\text{нач.}} = 4,0-4,5$

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4
Гемицеллюлазные	<i>Aspergillus foetidus</i> , <i>Trichoderma roseum</i>	Зерновая шелуха (45%), солодовые ростки (45%), дрожжевой автолизат (10%); влажность среды (55-60)%	t = (23-25)°C, τ = (50- 65) час. pH _{нач.} = 5,0- 5,5
Препараты протеиназ	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	Пшеничные отруби с добавлением до солодовых ростков, соевой муки и др.; влажность среды (62-65)%	t = (40-45)°C, τ = (36- 48) час. pH _{нач.} = 5,6- 6,2

Таблица 6 – Примеры производственного культивирования продуцентов ферментов глубинным способом

Тип препарата	Продуцент	Состав среды	Параметры ферментации
Препараты α-амилазы	<i>Bacillus subtilis</i>	2%-й раствор крахмала с добавками (NH ₄) ₂ HPO ₄ , KCl, MgSO ₄ ×7H ₂ O, CaCl ₂ , 5% щелочного экстракта соевых бобов	t = (50-55)°C, τ = (48-60) час, pH = 7,2
Препараты полигалактуроназы	<i>Zygofabospora marxiana</i>	Молочная сыворотка (2%), добавки (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ ×7H ₂ O, NaCl, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O	t = (30-34)°C, τ = (80-96) час., pH = 3,3-3,5
Целлюлолитические препараты	<i>Trichoderma reesei</i>	Крахмал (1,5%), отруби (1,25%), 20%-й р-р NH ₄ OH (0,6%), добавки (NH ₄) ₂ SO ₄ , K ₃ PO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂	t = (35-40)°C, τ = 96 час., pH = 4,0- 4,5
Препараты липаз	<i>Rhizopus oryzae</i>	Крахмал (4%), добавки соевой муки, дрожжевого автолизата, MgSO ₄ , кормовых дрожжей на основе биомассы <i>Candida guilliermondii</i> (с повышенным содержанием липидов)	t = (27-30)°C, τ = (48-50) час., pH = 5,0-6,0

Стандартизация ферментных препаратов. Для большинства готовых форм ферментных препаратов в технологических расчетах и нормативных документах устанавливают средний уровень активности, превышающий на (20-30)% активность стандартного ферментного препарата. В качестве наполнителей применяют крахмал, хлориды натрия и калия, желатин, диатомит, бентонит. Наполнитель может одновременно выполнять функцию стабилизатора ферментного препарата, например, за счет высокой водосвязывающей способности. Стандартизацию можно проводить не только для сухих препаратов, но и для разбавленных или концентрированных растворов.

Перспективы ферментных технологий. Традиционный способ получения ферментов зачастую требует больших затрат времени. Сначала пытаются получить фермент с требуемыми свойствами из почвенных и водных микроорганизмов. После выявления такого фермента продуцирующий микроорганизм культивируют и

идентифицируют. Затем вызывают мутацию генома данного микроорганизма (химическими или радиологическими способами) в целях получения таких полезных свойств, как высокая скорость роста и размножения на простых средах, а также для удаления нежелательных побочных продуктов. После этого необходимо определить оптимальные условия для ферментации и провести токсикологические исследования, получив разрешение регламентирующих органов на промышленное применение полученных веществ.

Развитие генной инженерии и накопленные знания о штаммах трех типов микроорганизмов – бактерий рода *Bacillus*, грибов рода *Aspergillus* и дрожжей рода *Saccharomyces* во многом изменили промышленное производство ферментов. Эти микроорганизмы хорошо изучены и безопасны в производстве, быстро растут и размножаются, а также дают большой выход ферментов, зачастую выделяя их в культивируемую среду. Еще одним преимуществом является то, что среда для их выращивания и жизнедеятельности хорошо изучена, что позволяет избежать дорогостоящих экспериментов по оптимизации условий ферментирования. В настоящее время после выявления у нового микроорганизма полезного фермента ген, кодирующий этот фермент, можно быстро перенести в один из вышеперечисленных микроорганизмов. Достижения в области идентификации промоторов и использования кодонов позволяют получать большие количества высокочистых ферментов без побочной ферментативной активности. Это позволяет лучше контролировать катализируемые процессы и производить пищевые продукты более высокого качества.

В последнее время растет интерес к промышленному ферментативному синтезу органических химических веществ. Ферменты можно использовать для создания из простых молекул более сложных или для выборочного разделения смесей крупных молекул. Например, специфические гликозилтрансферазы (в частности, циклодекстрин-гликозилтрансферазу) можно использовать для получения циклодекстринов из простых молекул крахмала. Такие циклодекстрины служат хорошими носителями для некоторых чувствительных и нестабильных веществ типа витаминов или ароматизаторов. Химических методов создания этого класса веществ не существует, и в этом смысле ферментативный способ их получения уникален.

Существуют также возможности получения «искусственных» ферментов, представленных, как правило, синтетическими полимерами или олигомерами с ферментивно-подобной активностью. Эти вещества называют иногда «синзимами», то есть синтетическими энзимами или синтетическими ферментами, которые обладают характерными для ферментов свойствами. У них должно быть два структурных компонента: сайт связывания субстрата и каталитический сайт. Оказалось, что способность связывать субстрат обеспечивается довольно простым механизмом, однако каталитические сайты устроены сложнее. Сайты могут конструироваться независимо друг от друга, но если у «синзима» есть сайт связывания для переходных состояний, то выполняются сразу две этих функции. Некоторые синзимы – это белки, получить которые не сложно. Примером может служить дериватизация миоглобина, носителя кислорода в мышечной ткани, путем присоединения аминовых зондов рутения к трем поверхностным остаткам гистидина. Тем самым носитель кислорода превращается в оксидазу, окисляющую аскорбиновую кислоту (витамин С) и одновременно снижающую

содержание молекулярного кислорода. Эффективность этого синзима практически аналогична натуральным аскорбатоксидазам. Гарантировать успешность создания белковых синзимов «с нуля» невозможно, поскольку в настоящее время нельзя предсказать их конформацию по первичной структуре. После появления таких белковых синзимов можно будет преодолеть очевидные недостатки природных ферментов, в частности, их подверженность денатурации, окислению и гидролизу. Наряду с другими сферами применения биотехнологий новые инструменты для исследований в области промышленного производства и использования ферментов предоставляет ускоренное развитие функциональной геномики (биоинформатики, перестановки доменов и др.) [18].

Контрольные вопросы

1. Какие этапы включает технологический процесс получения микробных ферментных?
2. Охарактеризуйте особенности приготовления питательных сред.
3. Опишите производственное культивирование при биосинтезе ферментов в глубинной культуре.
4. Охарактеризуйте особенности культивирования и состава питательных сред при поверхностном культивировании микромицетов.
5. Опишите кюветный способ поверхностного культивирования микромицетов.
6. Опишите технологию получения неочищенных ферментных препаратов.
7. Как выделяют ферменты из клеток продуцентов?
8. Назовите способы удаления балластных веществ.
9. Приведите примеры продуцентов ферментов поверхностным и глубинным способами.

10 Применение ферментных препаратов в хлебопечении

Основные задачи, решаемые с помощью ферментов в хлебопечении.

Амилолитические ферменты. Целлюлазы и гемицеллюлазы. Протеолитические ферменты. Липаза. Окислительно-восстановительные ферменты [18]

Основные задачи, решаемые с помощью ферментов в хлебопечении, следующие: корректировка хлебопекарных свойств пшеничной и ржаной муки при нестабильном ее качестве (укрепление клейковины, расслабление, «структуризация» клейковины, увеличение сахарообразующей способности и ферментативной активности муки и др.);

приготовление специальных полуфабрикатов;

улучшение биотехнологических свойств хлебопекарных дрожжей;

интенсификация технологического процесса, реализация ускоренных технологий приготовления хлеба;

формирование заданных реологических свойств теста, увеличение его стабильности;

улучшение качества хлеба и хлебобулочных изделий по физико-химическим и органолептическим показателям;

экономия сырья, повышение водопоглотительной способности теста, увеличение выхода готовых изделий;

продление срока сохранения свежести хлеба;

введение в комплексные хлебопекарные улучшители для решения многофакторных технологических задач.

Ферментные препараты в технологии хлебопечения используют для корректировки хлебопекарных свойств муки в нужном направлении, регулирования метаболизма дрожжевых клеток и молочнокислых бактерий, достижения желаемых реологических свойств полуфабрикатов, получения изделий с улучшенными свойствами и замедления процесса их черствения, получения качественных компонентов хлеба из нетрадиционных видов сырья и вторичных пищевых продуктов. Ферментные препараты увеличивают объем хлеба и сжимаемость мякиша, усиливают окраску корки, улучшают вкус и аромат, повышают содержание сахара в мякише. В хлебопечении применяют препараты амилолитических (α -амилазы, глюкоамилазы) и протеолитических ферментов, β -галактозидазы, β -фруктофуранозидазы, препараты целлюлаз и гемицеллюлаз, липазы, окислительно-восстановительных ферментов (липоксигеназы, глюкозооксидазы, каталазы).

Более подробно остановимся на ферментах, катализирующих превращения углеводов. Большинство промышленно применяемых для воздействия на углеводы ферментов являются гидролитическими и относятся к гликозилгидролазам (гликозидазам). Ферменты этой группы в стоимостном выражении составляют примерно 50% всех ферментов, используемых в пищевых технологиях.

Гликозидазы как ферменты, действующие на гликозидные связи, обладают рядом общих структурных и каталитических свойств. Многие гликозидазы представляют собой мультидоменные белки, отдельные части которых выполняют разные функции, в частности каталитическую и связывающую. Активные центры гликозидаз содержат

двойные карбоксильные/карбоксилатные остатки (аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота). Эта группа ферментов действует по механизмам общего кислотно-основного и/или нуклеофильного катализа. В обоих случаях кислотный остаток отдает H^+ гликозидному атому кислорода, при этом в качестве переходного состояния образуется оксокарбониевый ион. Карбоксилатный остаток или депротонирует и активирует воду с образованием нуклеофильной группы OH^- для завершения гидролиза, или действует непосредственно как нуклеофил; и в том, и в другом случае отщепляется спиртовая группа (Рисунок 69).

Все гликозидазы можно разделить на два типа – «удерживающие» и «инвертирующие» – в зависимости от того, что происходит с аномерной конфигурацией (α или β) гидролизующейся гликозидной связи (Рисунок 69).

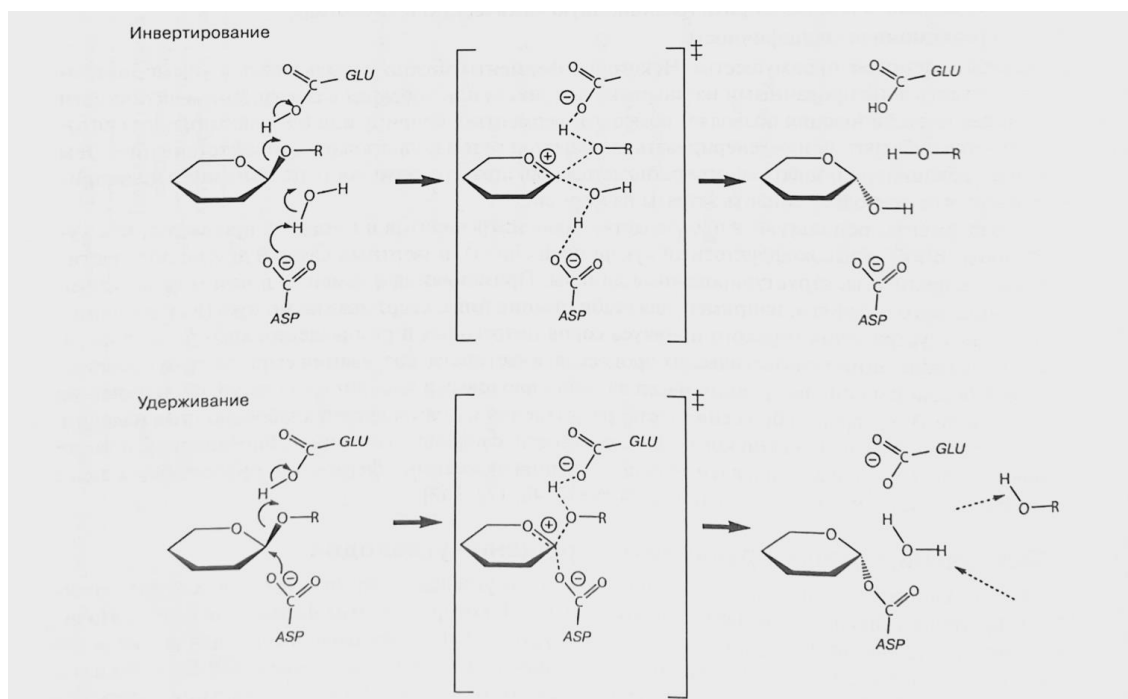


Рисунок 69 – Разнообразие механизмов реакций гликозилгидролаз

В гликозидазах инвертирующего типа расстояние между кислотными каталитическими остатками превышает примерно $9,5 \text{ \AA}$, что дает возможность активированной молекуле воды (нуклеофилу) получить доступ к альтернативному аномерному участку, а не к участку RON , высвобождаемому из гликозидной связи. В «удерживающих» гликозидазах расстояние между каталитическими центрами составляет менее $5,5 \text{ \AA}$, и вода достигает активного центра только после того, как спиртовая группа его покинет, то есть протекает реакция двойного замещения. При реализации механизма «удерживания» гликозил-ферментный ковалентный интермедиат с карбоксилатным остатком служит для направления нуклеофильной воды в то же аномерное положение, которое занимала отщепляемая спиртовая группа, и поэтому аномерная конфигурация остается без изменений. Только «удерживающие» гликозидазы катализируют и гидролиз, и перенос гликозила, тогда как «инвертирующие» гликозидазы катализируют лишь реакцию гидролиза.

Гликозидазы подразделяют также на «экзо»- и «эндо»-активные. Первые связывают терминальный (преимущественно, но не всегда нередуцируемый) конец субстрата как расщепляющую связь в активном центре, тогда как вторые случайным образом атакуют внутренние участки субстрата. Тривиальное обозначение гликозидаз греческими буквами α и β (подобно амилазам и глюкозидазам) указывают соответственно на аксиальную и экваториальную аномерную конфигурацию высвобождающейся редуцированной группы.

Ферменты, катализирующие превращения крахмала. Неглубокие превращения крахмала используются в хлебопечении. Для замедления черствения хлебобулочных изделий и улучшения разрыхления применяют экзогенные гликозидазы. Гидролиз крахмала с помощью α -амилазы, β -амилазы и глюкоамилазы повышает содержание сбраживаемых сахаров в тесте, что интенсифицирует процессы брожения, замедляет черствение хлеба. Только совместное действие амилаз приводит к полному гидролизу крахмала. Все препараты амилаз инактивируются в процессе выпечки хлеба и не вызывают образования липкого мякиша.

α -Амилаза. Амилазы используют в процессах гидролиза крахмала до более мелких декстринов и, следовательно, для получения «тонких» суспензий крахмала. α -Амилаза (ЕС 3.2.1.1, 1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза) представляет собой эндоактивный, $\alpha \rightarrow \alpha$ -удерживающий фермент, быстро снижающий среднюю молекулярную массу полимеров крахмала. Это типичный представитель семейства из 13 гликозидаз. Ферменты этой группы имеют не менее трех отдельных доменов внутри белка – один для катализа, второй для связывания зерен крахмала, а третий необходим для связывания кальция и образования мостика между двумя другими доменами. Молекулярная масса ферментов из различных источников составляет обычно 50-70 кДа, достигая иногда 200 кДа. α -Амилазы связывают Ca^{2+} с помощью нескольких сайтов, наиболее важным из которых является центр, располагающийся около активного «клешнелоподобного» сайта, что стабилизирует вторичную и третичную структуры. Ca^{2+} связывается ферментами достаточно прочно, что позволяет повысить стабильность амилаз в диапазоне pH от 6 до 10. Термостойкость α -амилаз существенно зависит от их источника. Активный центр фермента состоит не менее чем из пяти субсайтов, а длина субстрата должна быть не менее трех глюкозных единиц.

α -Амилазы в большом количестве находятся в проросших зернах пшеницы, ржи, ячменя, а также входят в состав комплексных ферментных препаратов – «Амилосубтилина Г10х», «Амилосубтилина Г20х» и других, полученных из плесневых грибов, особенно *Asp. oryzae*. Среди α -амилаз различного происхождения (грибной, солодовой и бактериальной) в технологическом процессе приготовления хлеба предпочтение отдают α -амилазе бактерий. Это объясняется термостабильностью данного фермента.

Известно несколько источников α -амилаз, большинство из которых являются микробными, хотя поставляются и солодовые амилазы (из ячменного или пшеничного солода). Типичными конечными продуктами действия α -амилаз являются разветвленные предельные α -декстрины и мальтоолигосахариды с 2-12 глюкозными единицами (в основном ближе к 12). В присутствии амилаз вязкость крахмала быстро снижается благодаря случайному характеру гидролиза; уменьшается и средняя

молекулярная масса амилозных и амилопектиновых цепей. Оптимальными условиями для микробных амилаз являются pH 4-7 и температура от 30 до 130 °С. К типичным промышленным источникам α -амилаз относятся микроорганизмы *Bacillus* и *Aspergillus*, α -Амилазы, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, термостойки, и их можно использовать при температурах 80-110 °С (pH 5-7) и при содержании Ca^{2+} 5-60 мг/кг. Оптимальными условиями для α -амилаз, продуцируемых грибами рода *Aspergillus*, являются температура 50-70 °С, pH 4-5 и содержание Ca^{2+} около 50 мг/кг. Хотя грибковые α -амилазы относятся к эндо-группе, при их действии накапливаются в основном более короткие мальтоолигосахариды ($n=2-5$). Обнаружена также уникальная «мальтогенная» α -амилаза, продуцируемая *Bacillus* (ЕС 3.2.1.133). Хотя получение мальтозы обычно ассоциируют с действием β -амилаз, применение мальтогенных α -амилаз, по-видимому, дает возможность получить больше мальтозы за счет продолжительного (полного) или многократного гидролиза крахмала.

β -Амилаза. β -Амилаза (1,4- α -D-глюканмальтогидролаза, ЕС 3.2.1.2) представляет собой $\alpha \rightarrow \beta$ инвертирующую, экзоактивную гликозидазу, высвобождающую мальтозные единицы с нередуцированных концов амилозных цепей. Продолжительное действие β -амилазы на крахмал приводит к образованию смеси мальтозы и β -декстринов; последние сохраняют α -1,6-точки разветвления и линейные участки, недоступные для фермента из-за стерических барьеров. β -декстрины характеризуются большей средней молекулярной массой, чем α -декстрины, так как экзоактивная β -амилаза не активна за α -1,6-точками разветвления, а эндоактивная α -амилаза проявляет активность.

β -Амилазы из сои, батата и продуцируемые бактериями рода *Bacillus* относятся к числу наиболее изученных. Молекулярная масса ферментов растений составляет примерно 56 кДа (фермент из батата представляет собой тетрамер), тогда как молекулярная масса микробных ферментов – 30-160 кДа. Уникальность β -амилазы заключается в том, что она, в отличие от других мультидоменных амилитических гликозидаз, имеет однодоменную структуру. В отличие от растительных ферментов, не способных связывать и расщеплять сырой крахмал, некоторые микробные ферменты обладают отдельными белковыми доменами, обладающими этой способностью. β -Амилаза подвергается конкурентному ингибированию α -циклодекстрином. β -Амилазы обычно характеризуются более щелочным оптимальным значением pH (pH 5,0-7,0), чем α -амилазы; они не требуют присутствия Ca^{2+} , а оптимальный температурный диапазон для них составляет 45-70 °С (микробные ферменты более термостойки).

β -Амилазы содержат растения, в частности проросшие зерна злаков (пшеницы, ржи, ячменя). В качестве источника глюкоамилаз используют препараты «Глюкаваморин П10х», «Глюкаваморин Г20х», «Глюкоделемарин П10х», «Глюкобататин П10х», а также «Амилоризин П10х», в котором глюкоамилазы содержатся в небольших дозах. Существует также ферментный препарат «Глюкоамилаза очищенная», полученный из культуры гриба *Asp. awamori*. При производстве хлеба из ржаной муки целесообразно использовать амилитический препарат «Глюкаваморин Г20х». Его внесение в густую закваску или тесто снижает содержание декстринов, уменьшает липкость и заминаемость теста. Сохранить свежесть хлебобулочных изделий в течение более длительного срока позволяет применение амилитических препаратов в сочетании с ксиланазой. Использование комплекса бактериальной α -амилазы (препарат

«Новамил»), мальтогенной α -амилазы и ксиланазы (препарат «Фунгамил») в дозе 0,01 % к массе муки увеличивает набухаемость мякиша на 30–40 %, вязкость суспензии мякиша – на 13–30 %, сжимаемость мякиша – на 17–44 % (интервал значений дан за период хранения 12–96 ч, без упаковки).

Пуллуланаза. Пуллуланызы I типа (ЕС 3.2.1.41, пуллулан 6-глюканогидролаза) относятся к «деразветвляющим» ферментам или «предельным декстриназам», так как они гидролизуют декстрины с α -1,6-глюкозидными связями, составляющими точки разветвления амилопектина. Пуллуланаза присутствует во многих бактериях, некоторых дрожжах и злаках. Свое тривиальное название пуллуланаза получила благодаря способности воздействовать на пуллулан – повторяющуюся единицу в [α -D-глю-(1→4)- α -D-глю-(1→6)- α -D-глю-(1→4)- α -D-глю]. Пуллуланаза может действовать и на фрагменты большие, чем пуллулан (но не на меньшие). Она также медленно действует на амилопектин и несколько быстрее на предельные декстрины, образующиеся на поздних стадиях разжижения и осахаривания крахмала. Продуктами действия пуллулаза являются линейные глюкоолигосахариды, по длине такие же небольшие, как мальтоза. Эти ферменты получают обычно из бактерий родов *Klebsiella* и *Vacillus*. Их молекулярная масса составляет около 100 кДа, верхняя температурная граница их активности – 55–65°C, оптимальным диапазоном – pH 3,5–6,5, а требования к кофакторам неизвестны (хотя некоторые пуллуланызы активируются ионом Ca^{2+}). Пуллуланызы растительного происхождения являются примерами предельных декстриназ, самыми богатыми источниками которых являются проросшее и соложеное зерно, особенно соложенный ячмень.

Пуллуланызы II типа или амилопуллуланызы (ЕС 3.2.1.41 или 3.2.1.1) имеют в основном микробное происхождение и проявляют комбинированную α -амилазно-пуллулазанную активность, гидролизуя и α -1,4-, и α -1,6-связи в крахмале. Родственными пуллулазама ферментами являются неопуллуланаза (ЕС 3.2.1.125) и изопуллуланаза (ЕС 3.2.1.57), которые действуют на α -1,4-мостики в пуллулане по направлению соответственно к нередуцированному и редуцированному концам точки разветвления, образуя α -1,6-разветвленные трисахариды – панозу и изопанозу.

Глюкоамилаза. Глюкоамилаза (1,4- α -D-глюкан-глюканогидролаза, ЕС 3.2.1.3, тривиальное название – амилоглюкозидаза) представляет собой α → β -инвертирующий, экзоактивный фермент, гидролизующий линейные участки крахмала до глюкозы с нередуцирующего конца. Хотя глюкоамилаза селективна по отношению к α -1,4-глюкозидной связи, она может медленно действовать на α -1,6-связь, характерную для амилопектина и пуллулана. Единственным продуктом полного глюкоамилазного расщепления является глюкоза.

Структурные и механистические особенности глюкоамилазы аналогичны таковым для α -амилазы.

Источниками глюкоамилаз являются преимущественно бактерии и грибы. Молекулярная масса глюкоамилаз составляет 37–112 кДа, причем они могут существовать в нескольких изоформах, не имеют кофакторов, а оптимальными значениями pH и температуры являются соответственно 3,5–6,0 и 40–70°C. Широкое распространение получила глюкоамилаза из *Aspergillus*, которая наиболее активна и стабильна при pH 3,5–4,5 и температуре 55–60°C. Весьма интересна глюкоамилаза

Rhizopus, поскольку одна ее изоформа способна эффективно гидролизовать α -1,6-точки разветвления. По сравнению с другими модифицирующими крахмал ферментами глюкоамилазы действуют довольно медленно, и это обстоятельство следует учитывать при разработке технологических процессов.

Цикломальтолекстринглюканотрансфераза (тривиальное название – цикломальтодекстринтрансфераза) – *CGT*, 1,4- α -D-глюкан-4- α -D-[1,4- α -D-глюкано]-трансфераза [циклизирующая], ЕС 2.4.1.9 – катализирует гидролиз, а также реакции внутри- и межмолекулярного трансгликозилирования. Продуктами реакций циклизации являются гекса- (α), гепта- (β), и окта(γ)-сахариды, более известные как циклодекстрины. *CGT* представляет собой $\alpha \rightarrow \alpha$ -удерживающий, эндоактивный фермент.

Несмотря на то, что циклодекстрины являются основными промышленно выпускаемыми продуктами, благодаря весьма невысокой селективности этого фермента относительно субстратов и продуктов он способен катализировать различные реакции, в том числе гидролиз, циклизацию, диспропорционирование и соединение. Например, *CGT* может реагировать с глюкозой и крахмалом с образованием мальтоолигосахаридов с различной длиной цепи, а также соединять сахара (в частности, моносахариды) со спиртовыми группами в таких соединениях, как аскорбиновая кислота и флавоноиды. Последние процессы весьма перспективны для пищевых систем, поскольку позволяют получать соединения с уникальными функциональными группами. Оптимальным pH рассматриваемых ферментов находится в диапазоне 5-6, а оптимальные температуры в последние годы увеличились с 50-60 до 80-90 °C благодаря использованию термостабильных форм. Применение *CGT* из разных источников дает возможность получать в качестве основного продукта различные циклодекстрины (гекса-, гепта- или окта-олигомеры).

Фактически все упомянутые выше гликозидазы, особенно α -амилазы, используются в хлебопечении. Ранее считалось, что амилазы «активируют» сбраживаемые углеводы перед действием на них дрожжей. Амилазы добавляли в тесто для расщепления поврежденных зерен крахмала и/или повышения недостаточной активности эндогенной амилазы муки (для хлебопечения). В настоящее время показано, что внесенные в тесто амилазы снижают его вязкость, увеличивают объем хлеба, размягчают мякиш (замедляют черствение) и улучшают цвет корочки. Большая часть этих эффектов обусловлена частичным гидролизом крахмала при выпечке. Понижение вязкости (разжижение) приводит к увеличению объема и улучшению текстуры изделия за счет создания более благоприятных условий для ускорения реакций при кондиционировании теста и выпечке. Считается, что замедление черствения обусловлено частичным гидролизом амилозы и особенно амилопектина, что замедляет скорость их ретроградации. Именно для этого α -амилазы вносят в выпечные изделия.

Передозировка α -амилаз является основной причиной, почему хлебобулочные изделия становятся «резиновыми» или липкими. Это обусловлено накоплением разветвленных мальтодекстринов со степенью полимеризации 20-100 СП. Таким образом, для каждого изделия следует подобрать оптимальное количество амилазы – после завершения выпечки ее не должно оставаться в продукте, чтобы она не проявляла остаточную ферментативную активность в конечном продукте. Необходимо учитывать

термостойкость амилазы и вводить только то ее количество, которое необходимо для конкретного случая. С недавних пор наилучшими агентами, замедляющими черствение, считаются мальтогенные α -амилазы, поскольку они образуют более короткие мальтоолигосахариды (СП 7-9) и длинные декстрины (пластификаторы), чем получающиеся при использовании обычных эндоактивных α -амилаз. Мальтогенные амилазы сохраняют неповрежденной сетку клейстеризованного крахмала в мягком, но не липком хлебобулочном изделии, а небольшое уменьшение длины крахмальных цепочек придает мякишу упругость и одновременно замедляет черствение.

Расширенный выпуск хлеба с повышенным содержанием структурных полисахаридов и длительным сроком хранения возможен за счет применения препаратов целлюлаз и гемицеллюлаз в хлебопечении. Наиболее перспективными в этом отношении являются препараты «Вильзим АК Г20х», «Поликанесцин Г20х», «Ультразим», «Целловиридин Г20х», «Пентопан», «Фунгамил».

Ксиланазы (ЕС 3.2.1.8, β -1,4-D-ксиланксилогидролаза) являются в основном $\beta \rightarrow \beta$ -удерживающими гликозидазами, гидролизующими линейные β -1,4-связанные полимеры ксилозы (с различными замещающими группами, например арабинозу). Известен ряд изоформ этих ферментов, которые могут быть как эндо-, так и экзоактивными (первые более важны для пищевых технологий). Ксиланы – это основной компонент гемицеллюлозы, составляющие вместе с целлюлозой основной материал клеточных стенок растений. Ксиланазы обнаружены в растениях (особенно в злаковых культурах), бактериях и грибах. Их молекулярная масса составляет 16-40 кДа. Источниками бактериальных ферментов являются *Bacillus*, *Erwinia* и *Streptomyces spp.*, ферменты грибов получают из *Aspergillus* и *Trichoderma spp.* Оптимум pH бактериальных ферментов составляет 6,0 - 6,5, а из грибов – 3,5 - 6,0 (в зависимости от источника). Большинство ксиланаз стабильны в широком диапазоне pH (от 3 до 10). Оптимальный интервал температур для активности составляет 40-60 °С.

Ксиланазу целесообразно использовать для деполимеризации не экстрагируемого водой арабиноксилана с образованием водорастворимых пентозанов, обладающих высокой влагоудерживающей способностью (ВУС). Это обеспечивает увеличение вязкости теста и повышение его эластичности, получение сильной клейковины и, в конечном итоге, увеличение объема изделия. Использование слишком больших количеств ксиланаз или добавление ксиланаз, действующих преимущественно на водорастворимые арабиноксиланы, либо не дает вообще никакого эффекта, либо приводит к получению липкого теста (из-за чрезмерно разложения влагоудерживающих пентозанов), что нежелательно. Совместное использование амилаз и ксиланаз имеет большое значение в производстве замороженного теста.

Гемицеллюлазы и ксиланазы из *Trichoderma* и *Penicillium spp.* нашли применение в процессе мокрого помола для отделения в зерне (особенно пшеницы) крахмала от глютена.

При производстве хлеба из ржаной муки, из смеси ржаной и пшеничной муки, а также хлеба с добавками отрубей и других компонентов с повышенным содержанием структурных полисахаридов применяют целлюлазы и гемицеллюлазы. Гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз непосредственно повышает количество моно- и дисахаров в тесте и интенсифицирует процесс брожения. Расщепление β -(1 \rightarrow 3) и β -(1 \rightarrow 4)-глюкана

(линейный некрахмалистый полисахарид муки зерновых, состоящий из D-глюкопиранозы) снижает вязкость теста, что особенно важно при выпечке хлеба из ржаной муки. Повышается пористость и удельный объем хлеба, мякиш становится менее липким. В качестве источников целлюлаз и гемицеллюлаз используют ферментные препараты: «Амилосубтилин Г10х», «Ксилоглюканофоеитин П10х», «Цитороземин П10х», «Целлоконингин П10х», «Целловиридин Г10х», «Целлокандин Г10х» и др.

Ферментные препараты с преобладанием протеолитического действия используют в основном для приготовления теста из муки твердых сортов пшеницы. Воздействие протеаз на недостаточно эластичную клейковину в этом случае дает положительный эффект. При выпечке хлеба из мягких сортов пшеницы, наоборот, используют комплексные ферментные препараты с низкой протеолитической активностью.

Сила и реологические свойства теста, а также качество получаемого изделия зависят от состава теста и различных видов хлебопекарной муки. Тесто обычно характеризуется рН около 6,0, однако в некоторых случаях значение рН может достигать 8,0. Оптимум рН бактериальных (*Bacillus spp.*) протеаз находится в области щелочных значений, а для ферментов грибов (*Aspergillus spp.*) он сдвинут в область кислых значений. Протеазы применяют для изменения и оптимизации силы теста, необходимой в приготовлении того или иного изделия. Внесение протеаз сокращает продолжительность замеса, необходимой для получения требуемой эластичности, а также улучшает технологические свойства муки с пониженным содержанием клейковины (глютенем), делающей тесто менее эластичным и более жестким. Внесение экзогенных протеаз вызывает контролируемый гидролиз глютена на стадии кондиционирования теста и при хлебопечении до тех пор, пока они термически не дезактивируются. Гидролиз глютена ослабляет глютеную сетку, что повышает пышность и эластичность теста, увеличивает объем и мягкость хлеба, а также однородность мякиша. Для контролируемого гидролиза используют протеазы со средней селективностью по отношению к пептидным связям (полный гидролиз нежелателен). Дозируют протеазы со скоростью, необходимой для обеспечения требуемой степени гидролиза до их дезактивации при выпечке. Избыточный протеолиз уменьшает объем изделия и обуславливает дефекты текстуры. Для слабой муки, используемой в приготовлении коржей для пиццы, вафель и печенья более предпочтительны менее специфичные протеазы (или смесь протеаз). Выбор протеаз очень важен, поскольку они обладают разной специфичностью к основным белкам клейковины – глиадину и глютеину. Эти особенности экзогенных протеаз являются причиной разных технологических свойств получаемого теста.

В хлебопекарной промышленности широко применяется комплексный грибной ферментный препарат «Амилоризин П10х» – эффективный биологический улучшитель качества пшеничного и ржаного хлеба. Аналогичные «Амилоризину» препараты выпускаются под названиями «Амилототоризин Г10х» и «Амилототоризин Г10х» из различных штаммов *Asp. oryzae*. «Амилототоризин», обладающий повышенной, по сравнению с «Амилоризином», протеолитической активностью, целесообразнее использовать при выпечке хлеба из твердых сортов пшеницы. «Амилототоризин»

имеет оптимум действия при рН 4,0–6,5 и температуре 50 °С, препарат стабилен при температуре не выше 60 °С.

Окислительно-восстановительные ферменты обеспечивают эффект, обратный действию протеаз: укрепление клейковины путем образования дополнительных дисульфидных связей за счет окисления SH-групп белков. Укреплению клейковины сопутствует снижение протеолитической активности муки, вызванное переходом активатора протеаз – глутатиона – в неактивную окисленную форму. В качестве окислительных ферментов используют системы, включающие липоксигеназу или комплекс глюкозооксидазы и каталазы. Липоксигеназу вводят в тесто в виде необезжиренной соевой муки, в количестве около 1 % к массе пшеничной муки. Под действием липоксигеназы образуются гидроперекиси ненасыщенных жирных кислот, которые затем окисляют другие соединения, в частности белки по сульфгидрильным группам, а также каротиноидные пигменты. Последнее приводит к осветлению теста. При наличии в системе аскорбиновой кислоты происходит образование дегидроаскорбиновой кислоты, которая выполняет роль окислителя сульфгидрильных групп белков. Это усиливает эффект липоксигеназы. Поскольку субстратами липоксигеназы служат ненасыщенные жирные кислоты, целесообразно вносить препарат липазы, а процесс окисления проводить в полной рецептуре теста, включающей жиры.

Липазы также являются важными ингредиентами теста для хлебопечения. Они дополняют эндогенные липазы злаковых культур и вносятся в качестве улучшителей для увеличения объема изделий, повышение однородности мякиша и размера пор в нем, а также для предотвращения черствения без ухушения реологических свойств теста. Эти положительные эффекты обусловлены возникновением при гидролизе липидов (муки или добавленных) моно- и диацилглицеринов, обладающих эмульгирующими свойствами и стабилизирующих мелкие поры в тесте. Моноацилглицерины могут также образовывать комплексы включения с амилозой, что замедляет ретроградацию крахмала (черствение) после выпечки. Использование липаз вместо синтетических эмульгаторов повышает привлекательность продукта для потребителя. Источниками используемых в хлебопечении липаз являются *Rhizomucor* и *Rhizopus ssp.*; эти липазы помимо ацилглицеринов гидролизуют также гликолипиды и фосфолипиды. Лизофосфолипиды и лизогликолипиды обладают ярко выраженными поверхностно-активными свойствами. Липазы применяют для выпуска макаронных изделий, улучшая их белизну, что очень важно для потребителя. Этот эффект достигается благодаря окислению выделяющихся ненасыщенных жирных кислот и обесцвечиванию теста за счет вторичных реакций.

Чаще всего липоксигеназы оказывают негативное влияние на пищевые продукты и качество жиров. К положительным свойствам липоксигеназ можно отнести их окисляющее воздействие при кондиционировании теста. Они окисляют ненасыщенные жирные кислоты, образующиеся при гидролизе липидов под действием липаз, что при этом приводит к упрочнению клейковинной (глутеновой) сетки за счет дисульфидных сшивок внутри глютена и повышению вязкости и эластичности теста. Наиболее предпочтительным способом внесения липоксигеназ в тесто является добавление соевой или бобовой муки, что позволяет свести к минимуму внесение в

тесто других окислителей (например, броматов). Вторичные реакции окисления могут также разлагать эндогенные каротиноиды и обесцвечивать или отбеливать готовые изделия, что весьма желательно для макаронных и некоторых сортов хлебобулочных изделий.

Комплекс окислительно-восстановительных (глюкозооксидазы и каталазы) и гидролитических (амилаз и ксиланаз) ферментов в присутствии аскорбиновой кислоты увеличивает (по сравнению с контролем, где использовалась только аскорбиновая кислота) удельный объем хлеба на 33–34 %, пористость – на 3–4 %, сжимаемость мякиша – на 40–41 %. Рекомендуются следующий порядок внесения компонентов в тесто: отдельно готовится суспензия ферментативно активных дрожжей с добавлением сахара, аскорбиновой кислоты и препарата, содержащего глюкозооксидазу и каталазу, отдельно – раствор амилаз и ксиланазы. Эти композиции вводятся в тесто, приготавливаемое по интенсивной технологии. Ферментативные гидролизаты, полученные из сырья различного происхождения, – один из потенциальных и перспективных источников белково-углеводных и вкусовых добавок к пищевым продуктам. Их целесообразно применять для улучшения биотехнологических характеристик хлебопекарных дрожжей, интенсификации процессов созревания полуфабрикатов, повышения пищевой ценности, улучшения органолептических и физико-химических показателей качества хлеба.

В последние годы в хлебопечении используются высокоосахаренные фруктозные гидролизаты, полученные гидролизом полифруктозанов, накапливающихся в топинамбуре, цикории, георгине и других растениях. Инулин из топинамбура извлекают прессованием и экстрагированием. Гидролиз полифруктозанов может быть осуществлен ферментными препаратами, содержащими инулиназу, например «Инулоаваморином П10×». Полученный высокофруктозный сироп улучшает биотехнологические характеристики теста. Интенсификация метаболизма микроорганизмов теста обусловлена наличием в данном продукте легкосбраживаемых сахаров. Стимулирующее действие на сбраживающую активность дрожжевых клеток оказывают витамины, органические соединения азота, в частности аминокислоты и их амиды, и минеральные вещества высокофруктозного сиропа. Период брожения теста сокращается на 20–30 мин.

Пористость мякиша у белого хлеба, приготовленного на сиропе, по структуре на 7 % лучше, чем у изготовленного по традиционной технологии, у более сахароемких изделий этот эффект ниже. При переработке топинамбура с целью получения высокоосахаренных сиропов в качестве остаточного сырья накапливается мезга, которая также представляет определенную ценность для хлебопекарного производства. Основные компоненты мезги – целлюлоза и гемицеллюлоза. Эффективность использования целлюлозосодержащего сырья обеспечивается ферментативной обработкой, поэтому из нативной мезги топинамбура целесообразно готовить гидролизат. Для гидролиза мезги используют ферментные препараты «Пектофоетидин П10×» и «Целлобранин ГЗ×», которые содержат активные пектолитический, целлюлазный и протеолитический комплексы. На эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы и гемицеллюлозы влияет состав целлюлазного комплекса ферментного препарата. По современным данным, он представлен

эндоглюканазой, целлобиогидролазой, экзоглюкозидазой и целлобиазой. Добиться глубокого гидролиза целлюлозы трудно из-за нерастворимости субстрата, высокой степени кристалличности и значительного содержания примесей. Это затрудняет доступ фермента к реакционноспособным гликозидным связям субстрата. При ферментативном гидролизе целлюлозосодержащих субстратов образуются глюкоза и целлобиоза. Наилучший эффект гидролиза мезги топинамбура достигается при использовании композиции ферментных препаратов, составленной из «Целлобранина ГЗ» и «Пектофоептидина П10» в соотношении 4 : 7.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные задачи, решаемые с помощью ферментов в хлебопечении.
2. Охарактеризуйте ферменты, катализирующие превращения углеводов.
3. Что такое «удерживающие» и «инвертирующие» гликозидазы?
4. Что означает «экзо»- и «эндо»-активные гликозидазы?
5. Перечислите ферменты, катализирующие превращения крахмала.
6. Охарактеризуйте α -амилазу, принцип ее действия, источники ее получения, в каких ферментных препаратах она присутствует.
7. Опишите особенности β -амилазы.
8. Охарактеризуйте фермент пуллуланаза, отличия пуллуланаза I и II типа.
9. Опишите особенности действия глюकोамилазы и CGT.
10. Перечислите особенности ферментов, воздействующих на целлюлозу и гемицеллюлозу.
11. С какой целью в хлебопечении используют протеолитические ферменты, а также липазы и липоксигеназы?

11 Применение ферментных препаратов в пивоварении, производстве плодово-ягодных соков, безалкогольных и спиртных напитков

Ферменты играют ключевую роль на всех этапах пивоварения. Классическая технология пива основана на использовании ферментов солода и дрожжей-сахаромицетов. Получение сусла из солода высокого качества не требует дополнительного введения ферментных препаратов. В солоде присутствуют гидролитические ферменты, необходимые для перевода в растворенное состояние основных групп полимеров: крахмала, некрахмальных полисахаридов и белка. В отличие от спиртового производства в пивоварении не стремятся достичь максимально возможной степени расщепления полимеров сырья, поскольку для создания полноты вкуса и пенообразования пива необходимы продукты неполного гидролиза крахмала, глюкана, белка.

Со времени открытия в 1833 г. «диастатической» активности пророщенных (соложенных) зерен, положившего начало промышленному использованию α - и β -амилаз, крахмальные гидролазы считаются необходимыми в пивоварении. Тем не менее, эндогенных (собственных) амилаз пророщенных зерен недостаточно для активации всех сбраживаемых углеводов – концентрация этих ферментов невелика, а термостойкость низка. Кроме того, в зерне присутствуют эндогенные ингибиторы, в связи с чем для повышения эффективности сбраживания углеводов используют намеренное внесение α - и β -амилаз, глюкоамилазы, пуллулаказы и ферментов, гидролизующих клеточные стенки (почти исключительно микробного происхождения). Глюканазы и ксиланазы используются для гидролиза глюканов (подобных целлюлозе, но с β -1,3- и β -1,4-мостиками) и ксиланов (преимущественно полимеров ксилозы – основных гемицеллюлозных компонентов клеточных стенок). Добавление α - и β -амилаз используют для завершения расщепления крахмала до α - и β -декстринов, чего невозможно достичь с помощью термолабильных амилаз солода. Эти остаточные предельные декстрины обеспечивают «тело» готового продукта. Вместе с тем предельные декстрины можно сбраживать путем добавления глюкоамилазы и/или пуллулаказы, получая низкокалорийное («легкое») пиво. Экзогенные ферменты вносят на стадии или сразу после получения сусла, проводимого при умеренных температурах (45-65 °С), и при последующем кипячении сусла они разрушаются.

В производстве пива, как указывалось ранее, наряду с солодом используют несоложенные материалы. Например, при производстве массовых сортов пива используют до 60 % несоложенных материалов – риса, кукурузы, пшеницы и др. При высокой ферментативной активности солода не снижает качества пива введение в состав сырья до 15 % ячменя, до 20 % кукурузной крупы или рисовой сечки. При замене значительной части солода несоложенным ячменем снижение ферментативной активности сырья можно компенсировать введением гидролитических ферментов. При замене 50 % солода ячменем активность α -амилазы и β -глюканазы в сырье снижается в 2 раза, протеазы – в 1,5 раза. Необходимый уровень активности достигается при добавлении 0,025 % мультиэнзимной композиции «МЭК ПП-1», в состав которой входят «Амилосубтилин», «Протосубтилин» и «Амилоризин». Комплекс обладает активностью α -амилазы, эндо- и экзопептидаз, эндо- и экзоглюканаз. Экзопептидазы «Амилоризина»,

имеющие оптимум в слабокислой среде, обеспечивают глубокий протеолиз сырья. Сусло, предназначенное для сбраживания в цилиндрических танках, должно содержать не менее 18 мг/100 см³ α-аминного азота. Недостаток продуктов глубокого расщепления белка можно компенсировать введением осадочных пивных дрожжей – нативных или автолизированных, в количестве соответственно 2–6 % или 1 % к массе сырья. Несоложенный ячмень осахаривают совместно с солодом, вводя препарат «МЭК ПП-1» в начале затириания, которое проводят по одноотварочному способу. Сусло, полученное из 50 % солода и 50 % ячменя, энергично сбраживается. Основные качественные показатели готового пива соответствуют стандарту.

В некоторых технологических схемах затириания используют щелочную протеазу, с помощью которой гидролизуют щелочерастворимые белки, оставшиеся в дробине. Гидролиз щелочной протеазой проводят как отдельную технологическую стадию, поскольку по pH-оптимуму (10,5) фермент значительно отличается от других, применяемых при затириании. Совершенствование технологии пива из смешанного сырья идет по пути использования цитолитических ферментных препаратов. На их основе создаются мультиэнзимные композиции (МЭК) с высокой активностью ферментов, расщепляющих некрахмальные полисахариды. В таких МЭК препараты с амилолитической и протеолитической активностью сочетают с цитолитическими – «Целловиридином», «Ксилакомом», «Целлоконином», «Целлокандином», «Цитореземином» и др. Применение цитолитических ферментных препаратов сокращает продолжительность осахаривания затора, снижает вязкость сусла, повышает скорость его фильтрации, выхода экстракта и конечной степени сбраживания. Хорошие результаты получены при использовании комплекса «Амилосубтилина Г20» и «Ксилакома» в соотношении 1 : 1. При замене 40–60 % солода ячменем рекомендована дозировка этого МЭК – 0,025–0,09 % к массе сырья. Затириание проводят одноотварочным способом. Для повышения содержания аминного азота в сусле вводят гидролизат пивных дрожжей. Сопоставление качества охмеленного сусла, полученного из 85 % солода и 15 % ячменя без ферментных препаратов (контроль), и из 50 % солода и 50 % ячменя с добавлением 0,04 % МЭК и 8 % гидролизата дрожжей показало, что сусло опытного варианта не уступает, а по ряду показателей превосходит контрольное. Для затириания смеси 50 % солода и 50 % ячменя применяют комплекс «Целлокандина», «Амилоризина» и «Амилосубтилина». «Целлокандин» вносят в общий затор при 45 °С. После 1 ч выдержки затор доосахаривают с помощью «Амилоризина» (0,2 %) и «Амилосубтилина» (0,01 %). Последовательность внесения ферментов определяется тем, что активность целлюлаз подавляется глюкозой. Выход экстракта в сусле повышается на 1,5–2,5 %, мальтозы – на 2–7 % по сравнению с вариантом без «Целлокандина». При использовании сусла из смеси солода и ячменя в соотношении 70 : 30 (с содержанием белка в ячмене и солоде из него соответственно 11,4 и 11,1 % к СВ, экстрактивностью 70,5 и 76,5 % при влажности 11,9 и 5,1 %) эффективно сочетать «Целловиридин» с «Амилосубтилином» и «Протосубтилином». Эти ферментные препараты повышают выход экстракта из смеси солода с ячменем на 8,6– 9,6 %, содержание редуцирующих сахаров – на 25,7–37,3 %, аминного азота – на 5,2–25,6 %. Обработка «Амилотротосубтилином», имеющим при высокой α-амилазной и β-1,3-1,4-глюканазной низкую целлюлазную активность, дает высокий прирост редуцирующих

сахаров и аминного азота, но выход экстракта ниже, чем в варианте с одним «Целловиридином». Увеличение выхода экстракта – наиболее характерный эффект целлюлазы. При замене 20–50 % солода ячменем обработку «Целловиридином Г20» проводят в дозировке 0,05 % от массы несоложенного ячменя (при активности препарата 1000 ед./г) в сочетании с амилолитическими ферментными препаратами («Амилосубтилином Г10» или «Амилоризином П10») в дозировке 0,005–0,01 % от общей массы зерна.

Использование несоложенных материалов имеет особенности, связанные с физической структурой сырья. В отличие от солода, который в процессе ращения приобретает пористость за счет потери запасных веществ, несоложеное зерно имеет плотную структуру. Плотная структура затрудняет диффузию экстрагента внутрь частиц и экстракта – в среду. Константа скорости проникновения экстрагента для частиц ячменя в 100 раз ниже, чем для частиц солода. Скорость диффузионных процессов лимитирует ферментативный гидролиз несоложенного сырья. Константа скорости ферментативного гидролиза крахмала в частицах несоложенного ячменя на три порядка выше коэффициента диффузии экстрактивных веществ из внутренних областей частиц на поверхность. Лимитирование скоростью диффузии увеличивает необходимую продолжительность гидролиза, степень инактивации ферментов и их расход на единицу сырья. Для интенсификации процесса затиранья несоложенного зерна применяют такие способы, как получение обогащенных фракций сырья и повышение его пористости.

Различные фракции молотого зерна отличаются по содержанию белков, липидов и по ферментативной активности. Наиболее богаты белками и липидами фракции с диаметром частиц менее 1 мм. Для приготовления пивного сусла выделяют фракции тонкого помола, обогащенные ферментами. При тонком помоле ячменя осаживающая способность повышается на 4–5 %, степень гидролиза крахмала и количество свободной мальтозы – в 1,4 раза. Амилолитическая и протеолитическая способность наиболее высока во фракциях с диаметром частиц менее 500 мкм. Максимум выхода экстракта дает помол солода с размером частиц 13–300 мкм, ячменя – 29–300 мкм, получаемый при температуре не выше 100 °С. Чрезмерное воздействие на зернопродукты приводит к деструкции белков, в том числе ферментов. Отрицательное влияние при измельчении оказывают не только сдвиговые усилия, но и повышение температуры до 70–100 °С. Использование зерна тонкого помола может ухудшить белковый состав сусла, для повышения эффективности обогащения сырья необходимо совершенствование техники помола. Охмеленное сусло перед засевом дрожжей не имеет ферментативной активности. На стадии главного брожения необходимо создать условия для активного размножения дрожжей, их высокой бродильной активности, а также для расщепления высокомолекулярных коллоидов (белков, глюканов), выделяющихся в среду в процессе жизнедеятельности и автолиза дрожжевых клеток. При внесении в сусло препаратов с протеолитической активностью, таких как «Протосубтилин», «Протофетидин», «Проторизин», сусло обогащается свободными аминокислотами. Экзогенные протеазы стимулируют автолиз дрожжей, что выражается в увеличении скорости роста молодых клеток и отмирания старых. Протеолитическая активация автолитических пептидаз и неспецифической дрожжевой (β -1,3-1,6-глюканазы способствует более глубокому

протеолизу белков сусла и расщеплению секретируемого в среду дрожжевого глюкогена, освобождающегося при автолизе дрожжей. Снижение концентрации высокомолекулярных коллоидов увеличивает коллоидную стабильность пива. Бройдильная активность дрожжей и качественные показатели пива определяются физиолого-биохимическими признаками используемых рас дрожжей. Выделены новые расы (Н, 129П, В и Россошанская), отнесенные к виду *S. carlsbergensis*. По сравнению с контрольной расой 8а (М) новые расы имеют существенно более высокую активность гидролитических ферментов – α -глюкозидазы и β -фруктофуранозидазы. Бройдильная активность на 24,6–30,2 % выше контрольной, за счет этого продолжительность главного брожения может быть сокращена на 1–2 сут. Новые расы *S. carlsbergensis* – типичные дрожжи низового брожения, высокосбраживающие, флокулирующие.

С помощью ферментов осуществляют стабилизацию пива – основную цель заключительного этапа пивоварения. В основе коллоидных помутнений пива при охлаждении лежит образование комплекса нейтральных полисахаридов, белков, полифенолов и ионов поливалентных металлов. Доля углеводов в коллоидных частицах мути составляет до 80 %, это преимущественно глюкоген. В белковый компонент частиц входят β -глобулин, альбумин и гордеин ячменя. В глобулине много серосодержащих аминокислот (9,4% суммы цистеина и цистина и 3,2 % метионина), что способствует образованию перекрестных дисульфидных связей между белками. В частицах мути находят 16 видов щелочноземельных и тяжелых металлов. Зольность коллоидного осадка составляет до 14 %, обычно в пределах 0,7–3,3 %. Металлы участвуют в образовании комплексов белков, белков и дубильных кислот, катализируют окисление дубильных веществ, предшествующее их полимеризации. Существенный вклад в скрепление коллоидных частиц вносит образование водородных связей между гидроксильными группами полифенолов и кислородными атомами карбонильных групп белков. Основной путь укрупнения коллоидных частиц – через окислительную полимеризацию полифенолов в присутствии растворенного кислорода. Для предотвращения коллоидных помутнений пива необходимо гидролизовать полимеры, входящие в состав коллоидных частиц. Большинство ферментативных способов стабилизации основано на применении протеолитических ферментов. Наряду с этим используются препараты амилаз, глюкогеназ, целлюлаз. За рубежом в качестве протеазы широко применяют папаин, на основе которого созданы различные коммерческие препараты для стабилизации пива. Помимо папаина, применяются бромелаин, фицин, пепсин. В отечественной практике пиво стабилизируют с помощью «Протосубтилина», «Амилоризина», «Пектофоетидина», «Целлонигрина», «Коллагеназы».

Существуют различные способы введения стабилизирующих препаратов. По американской схеме ферменты вводят на стадии дображивания пива, после форфилтрации. Применение такой схемы обработки пива возможно лишь при достаточно высокой степени очистки ферментных препаратов от спор и клеток микроорганизмов. В отечественной практике обрабатывают не выбродившее пиво, а сусло. Такой способ обработки позволяет избежать нежелательных последствий внесения обсемененных препаратов, а также сочетать эффекты стабилизации пива и интенсификации жизнедеятельности дрожжей за счет действия протеолитических ферментов. Ферментные препараты вносят в охмеленное сусло при температуре 30–

40 °С, действие препаратов приостанавливают охлаждением суслу до температуры брожения.

При производстве плодовых соков используют пектиназы, целлюлазы, гемицеллюлазы, амилазы и протеиназы. Эти ферменты применяются не только в давно освоенных производствах; с их помощью удалось расширить ассортимент и добиться большего выхода продукции из сырья.

Ферменты используются на стадии обработки мезги для разрушения мякоти при выработке фруктовой кашицы или нектаров; увеличения выхода сока; лучшего отделения веществ, ответственных за цвет и вкус. Обработка сока с участием ферментных препаратов способствует уменьшению вязкости; облегчает изготовление концентратов; упрощает процедуры осветления, фильтрования и стабилизации сока.

Выбор ферментов и способов их применения для получения наилучших результатов при выработке соков производится с учетом следующих факторов: активности фермента; условий (температуры и продолжительности) обработки; необходимости гидролиза пектиновых веществ; механизма осветления.

По назначению все ферментные препараты, используемые при выработке плодовоовощных соков, можно разделить на три основные группы:

предназначенные для получения неосветленных соков, увеличивающие выход сока в результате воздействия на мезгу;

мацерирующие (разрушающие до отдельных клеток плодовую ткань) для получения гомогенизированных соков с мякотью;

обеспечивающие полный гидролиз пектиновых веществ и белков, предназначенные для получения осветленных обеспектиненных соков. В такие препараты, кроме пектолитических ферментов, должны входить протеолитические ферменты, гидролизующие белки.

В зависимости от роли в технологическом процессе можно выделить четыре группы ферментов, используемых в ферментных препаратах:

I группа – ферменты, обуславливающие эффективность действия препаратов;

II группа – ферменты, наличие которых в препаратах желательно, но не обязательно;

III группа – ферменты, наличие которых в препаратах не желательно, но они допустимы в незначительных количествах;

IV группа – ферменты, наличие которых в препаратах недопустимо.

Требования к составу ферментных препаратов всех групп в зависимости от целей их использования приведены в таблице 7.

Ведущее место в производстве соков принадлежит ферментным препаратам пектолитического действия. В 1 дм³ виноградного сока содержится 0,2–0,4 г пектина, еще больше его в яблочном соке.

Обработка мезги ферментными препаратами. Большинство плодов и ягод содержат пектиновые вещества, это затрудняет выделение сока и снижает его выход. Эффективно обработать плодовое и овощное сырье можно при помощи пектолитических ферментных препаратов. В отечественной промышленности эти данные широко используют для обработки мезги в целях облегчения прессования, повышения выхода сока, снижения количества осадка, а также для улучшения

осветляемости и фильтруемости соков. Наиболее часто применяют ферментные препараты для обработки мезги айвы, алычи, брусники, клюквы, крыжовника, рябины, яблоч, черной смородины, слив, абрикосов, шиповника и др.

Таблица 7 – Ферментные препараты для обработки плодового сырья

Группа ферментов	Яблоки, айва, груши, сливы, лимоны	Клубника, земляника, кизил, черника, ежевика, красные сорта слив, ткемали, черная смородина
Препараты для повышения выхода соков		
I	Пектинэстераза, эндополигалактуроназа	Пектинэстераза, эндополигалактуроназа, пектинтрансэлиминаза
II	Протеаза, целлюлаза, экзополигалактуроназа, гемицеллюлаза	Протеаза, целлюлаза, экзополигалактуроназа, гемицеллюлаза
III	Пектинтрансэлиминаза, аскорбинатоксидаза; ферменты, разрушающие антоцианы	Пероксидаза, полифенолоксидаза, каталаза
IV	Пероксидаза, полифенолоксидаза, каталаза	Ферменты, разрушающие антоцианы; аскорбинатоксидаза
Препараты для повышения выхода и осветления соков с полным гидролизом пектиновых и белковых веществ		
I	Пектинэстераза, эндо- и экзополигалактуроназа, протеиназа	Пектинэстераза, эндо- и экзополигалактуроназа, протеиназа, пектинтрансэлиминаза
II	Протеаза, целлюлаза, гемицеллюлаза	Целлюлаза, гемицеллюлаза
III	Аскорбинатоксидаза; ферменты, разрушающие антоцианы	Пероксидаза, полифенолоксидаза, каталаза, протеиназа
IV	Пероксидаза, полифенолоксидаза, каталаза, пектинтрансэлиминаза	Ферменты, разрушающие антоцианы; аскорбинатоксидаза

При производстве осветленных соков широко используют такие препараты микробного происхождения, как «Пектаваморин» и «Пектофоеитидин». Для обработки плодов лучше использовать очищенные ферментные препараты: «Пектаваморин П10х», «Пектофоеитидин П10х», «Пектонигерин П10х» и др. Обработку проводят при температуре 40–50 °С в течение 2–10 ч, дозировка препаратов 0,010–0,075 % к массе сырья. Ферментация особенно эффективна для дикорастущих ягод (шиповника, черемухи, рябины, боярышника, кизила и др.), из которых трудно выделить сок без ферментативной обработки. Высокий эффект получают при ферментации ягод с большим содержанием пектина. Выход сока из черной смородины при обработке «Пектаваморином» увеличивается в 4 раза, из крыжовника – в 3 раза.

Ферментные препараты с цитолитической и протеолитической активностью применяются при выработке соков, пюре, экстрактов, препаратов пектина из свежего плодового сырья и вторичных продуктов консервной промышленности.

При исследовании влияния цитолитических препаратов («Пектофоеитидина П10х», «Целлофоеитидина П10х», «Инвертаваморина П10х» и зарубежных препаратов пектиназы) на выход и качество сока из цитрусовых наилучшие результаты получены

при обработке сырья «Пектофоетидином». Оптимальная доза препарата составила 0,03–0,05 % к массе мезги. Ферментацию проводили при 40–45 °С в течение 6 ч при получении лимонного и мандаринового сока, 12 ч – апельсинового и грейпфрутового. Сиропы, полученные из ферментированных цитрусовых соков, стабильны в течение года.

Комплексные ферментные препараты и препараты с выраженной активностью одного фермента могут использоваться для извлечения и осветления соков. Примерами последних являются препараты «Полигалактуроназа Г10» и эндополигалактуроназа из винных дрожжей, которые применяют при переработке сырья с относительно небольшой долей грубых целлюлозосодержащих структур, например винограда.

При переработке более грубого сырья, к примеру яблок, оптимально сочетание эндополигалактуроназы, эндо- и экзоглюканазы и кислой протеазы. При этом для наибольшего выхода яблочного сока должны быть достаточно активны как пектолитический, так и целлюлолитический компоненты. Сопоставление эффективности цитолитических ферментных препаратов («Целловиридина», «Пектофоетидина» и «Целлюлазы-100») показало, что наибольший выход яблочного сока можно получить при действии «Целлюлазы-100» – препарата с активной целлюлазой и пектиназой.

Гидролиз структурных элементов клеточных стенок, прежде всего целлюлозы, обуславливает выход органических кислот. При действии «Целловиридина» (1,84 ед. целлюлазы/г сырья и следы пектиназы) выход органических кислот составил 0,37 %, «Пектофоетидина» (0,4 ед. пектиназы/г сырья, следы целлюлазы) – 0,35 %, «Целлюлазы-100» (1,84 ед. целлюлазы и 0,4 ед. пектиназы/г) – 0,4 %. При дозировке «Целлюлазы-100» в количестве 0,2 % к массе мезги и температуре 45 °С основные изменения происходят в течение первого часа гидролиза.

Пектолитические ферментные препараты с невысокой целлюлазной активностью достаточно эффективны при переработке в соки, пюре вторичного сырья консервной промышленности (шроты, выжимки). Структура растительных клеточных стенок такого сырья в значительной мере разрушена механически.

Получение соков с мякотью из свежего сырья основано на мацерации растительных тканей. Ткань, разделенная на клетки, должна образовывать нерасслаивающуюся систему, чему способствует высокая вязкость пектиновых веществ. Для мацерации тканей используют ферментные препараты, не обладающие эндополигалактуроназной способностью, так как при действии эндополигалактуроназы быстро снижается степень полимеризации и вязкость пектина.

Из отечественных препаратов подходит «Пектоклостридин Г10», в комплексе которого сочетаются пектаттрансэлиминаза и ксиланаза. Следует предположить, что важна не только способность такого препарата расщеплять протопектин межклеточников, но и отсутствие целлюлазной способности, что гарантирует целостность клеточных стенок мацерированных тканей. При значительной степени разрушения клеток и выделении клеточного сока мацерированная масса не сохранила бы однородности.

Препараты, применяемые для извлечения соков, получения пюре и соков с мякотью, не должны содержать (эндогенных ферментов) активных окислительных ферментов (пероксидазы, дифенолоксидазы), действие которых вызывает

окислительное потемнение растительного сырья, изменение цвета и вкуса соков, образование коллоидных помутнений осветленных соков.

Дозы ферментных препаратов, вносимых в обрабатываемую мезгу, зависят от вида сырья. Чем больше содержание пектиновых веществ в сырье, тем выше доза вносимого препарата. Общее количество ферментных препаратов не должно превышать 0,03 % массы сырья (в пересчете на стандартную активность 9 ед./г). Ферментные препараты вносят в мезгу в виде суспензии, которая готовится следующим образом. Рассчитанное количество ферментного препарата смачивают небольшим количеством теплой воды (температурой 35–40 °С), заливают 5–10-кратным количеством осветленного сока, подогретого до 30–45 °С (или 45–50 °С, в зависимости от температуры ферментативной обработки) и тщательно перемешивают. Полученную суспензию настаивают 30 мин, затем мезгу в ферментаторах смешивают с суспензией препарата.

Обработку проводят по одному из распространенных в настоящее время способов: ферментативное расщепление при комнатной температуре в течение 6–36 ч (холодная ферментация); ферментативное расщепление при комнатной температуре с последующим нагреванием; ферментативное расщепление мезги при температуре 35 °С; ферментативное расщепление при температуре до 50 °С в течение 30–150 мин (горячая ферментация); ферментативное расщепление при температуре 50 °С с последующим нагреванием до 80–85 °С и др. Для инактивации ферментного препарата мезгу по окончании обработки нагревают до температуры 80–85 °С.

Мезгу до ферментации нельзя долго выдерживать, особенно это условие должно соблюдаться для сырья, содержащего повышенное количество полифенолов и пектиновых веществ. В результате выдержки может произойти реакция их соединения, это приведет к затруднению процесса прессования даже при обработке ферментными препаратами (например, черная смородина). Плохое прессование может наблюдаться также и при неправильно рассчитанной дозе препарата. Полифенолы сырья могут образовывать комплексы с ферментами и блокировать их действие.

Главным недостатком способа ферментативной обработки является длительное воздействие на мезгу, в результате чего возможно микробиологическое загрязнение продукта, повышение содержания метанола (в 3–10 раз) по сравнению с соком, полученным обычным способом (например для яблочной мезги – с 30–100 мг/дм³ до 300–400 мг/дм³ после обработки).

В последние годы разработаны новые виды ферментных препаратов, обладающих «разжижающим» действием. Они состоят из смеси пектинметилэстеразы и целлюлазы. Их рекомендуется использовать для разжижения мезги. Под действием целлюлазы происходит гидролиз клеточных стенок. Благодаря гидролизу пектиновых веществ, полисахаридов происходит увеличение содержания растворимых сухих веществ. Одновременно за счет накопления галактуроновой кислоты происходит понижение pH. Применение разжижающих ферментов позволяет повысить выход сока до 95 %.

Осветление сока с использованием ферментных препаратов. Осветление сока предусматривает освобождение сока от взвесей и большей части коллоидных веществ. Свежеотжатый сок содержит в различных количествах крупные и мелкие взвеси, а

также коллоидно-растворимые вещества (пектин, белки, дубильные вещества) и истинно растворимые вещества (сахара и молекулярные соединения). Осветление сока преследует три основные цели: предварительное осветление для облегчения последующего фильтрования; стабилизацию сока от веществ, являющихся потенциальными мутеобразователями; улучшение органолептических свойств (в некоторых случаях).

Способы осветления сока с использованием ферментных препаратов основаны на разрушении коллоидных веществ, вызывающих мутность сока (пектиновых веществ, крахмала, белков, полифенолов), ферментными препаратами. Пектиновые вещества обладают водоудерживающей способностью, образуют гидратную оболочку вокруг взвесей, действуют как защитные коллоиды для взвешенных частиц, задерживают их выпадение в осадок и увеличивают вязкость сока. Поэтому разрушение молекул пектина способствует отделению и оседанию частиц.

Для осветления соков используют преимущественно пектолитические ферментные препараты. Под их действием пектиновая молекула разрушается до растворимых в воде галактуроновых кислот. Для этой цели используют, например, «Пектофоетидин П10». Этот препарат содержит, кроме пектолитических и протеолитических ферменты.

Если мутность сока обусловлена наличием крахмала, то используют амилолитические ферментные препараты. Крахмал содержится в соках из летних и незрелых сортов яблок. При тепловой обработке большая часть крахмала клейстеризуется, переходит в раствор и при розливе и хранении может вызвать помутнение сока за счет образования комплексов с полифенолами. Для обработки таких соков используют ферментные препараты с преобладанием амилолитического действия, например «Амилоризин П10». Условия обработки: температура 50 °С; pH 4,5–5,5. При наличии в соке пектиновых веществ и крахмала рекомендуется использовать ферментные препараты как с пектолитическим, так и с амилолитическим действием.

Оптимальную дозу вносимого препарата определяют на основании пробного осветления. Сначала определяют наличие в соке пектина (по спиртовой пробе) и крахмала (по йодной пробе). Затем по количеству образовавшегося сгустка или по интенсивности окраски определяют дозу вносимого препарата. Правильность выбранной дозы проверяют пробным осветлением в пробирках.

Производство спирта основано на конверсии сбраживаемых органических соединений в этанол с помощью культур дрожжей, реже – грибов и бактерий. В России этанол производится из зернового сырья и картофеля, а в качестве возбудителей брожения используются дрожжи-сахаромицеты.

Для того чтобы увеличить выход спирта, следует решить две задачи: первая – полностью гидролизовать крахмал и некрахмальные полисахариды в сбраживаемые сахара; вторая – обеспечить дрожжи питательными элементами, необходимыми для быстрого размножения и синтеза ферментов.

Осахаривание крахмала осуществляют с использованием солода и микробных ферментных препаратов – α -амилазы и глюкоамилазы. Применение α -амилазы на стадиях разваривания и осаживания позволяет снизить вязкость замесов, достичь

высокой полноты клейстеризации крахмальных гранул, предотвратить ретроградацию крахмала, препятствующую его осахариванию.

Для разжижения крахмала целесообразно применять препараты термостабильной α -амилазы, которые выделяют из культуры *B. licheniformis* (импортные – «Термамил», «Така-Терм», «Зимаджунт», отечественный – «Амилолихетерм»). Различные штаммы бактерии *B. licheniformis* продуцируют амилазу с оптимумом действия в интервале от 76 до 95 °С. В средах с высокой концентрацией крахмала, в присутствии микродобавок соли CaCl_2 , «Термамил» стабилен в течение 3 ч при 100 °С. С помощью термостабильных амилаз можно осуществлять непрерывный процесс клейстеризации разжижения вплоть до температуры полной желатинизации крахмальных гранул. Совмещение разжижения и разваривания существенно повышает эффективность процесса.

Непрерывный гидролиз клейстеризуемого крахмала, переход продуктов реакции в раствор способствуют более быстрому набуханию крахмала во внутренних областях частиц сырья. За счет этого может быть сокращена продолжительность процесса, а его максимальная температура понижена до 110–115 °С (температуры полной желатинизации крахмальных гранул).

Ферментные препараты с относительно низкой оптимальной температурой действия целесообразно использовать на стадии осахаривания. Это относится к препаратам с основной активностью α -амилазы («Амилосубтилин», «Амилоризин», солод) 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 увеличивает степень сбраживания на 1,3–1,5 % по сравнению с вариантом осахаривания солодом.

В качестве препаратов глюкоамилазы обычно применяют «Глюкаваморин Г×» или «Амилоглюкаваморин Г×» – культуральную жидкость гриба *Asp. awamori*, получаемую в ферментных цехах спиртзаводов. Оптимум действия «Глюкаваморина» (рН 4–5,5) соответствует активной кислотности бражки (рН 4,2–5,2). Это важно, поскольку на стадии осахаривания сырья в закрытой системе, где из сферы реакции не выводится глюкоза, процесс гидролиза крахмала проходит неполностью. Он продолжается в процессе брожения, по мере потребления глюкозы дрожжами, что сдвигает равновесие реакции гидролиза, катализируемой глюкоамилазой. Общая продолжительность брожения зависит от дозировки глюкоамилазы: при 6 ед./г крахмала сырья брожение длится 72 ч, при повышении дозы до 15 ед./г крахмала процесс заканчивается за 48 ч.

При приготовлении сусла в аппаратах гидродинамической обработки замесы нагревают лишь до 75–95 °С, что позволяет сохранить в недеградированном состоянии моносахариды, аминокислоты, пептиды, органические кислоты, витамины и некоторую часть ферментативной активности. При низкотемпературной обработке замеса крахмал не может быть полностью клейстеризован, часть его остается «сырым». В этих условиях необходимо использовать ферментативные комплексы, способные воздействовать на сырой крахмал.

α -Амилаза некоторых штаммов *B. subtilis* гидролизует сырой крахмал на 28–39 %, в зависимости от источника крахмала. В сочетании с глюкоамилазой такая α -амилаза

гидролизует неклеysterизованный картофельный крахмал на 95 %. Целесообразно исследовать осахаривающую способность комплексов α -амилазы и глюкоамилазы из различных источников в отношении сырого крахмала, для реализации в низкотемпературной технологии спирта. Существенным резервом сбраживаемых углеводов являются некрахмальные полисахариды – целлюлоза, β -1,3-1,4-глюкан, ксилоглюкан и другие разновидности гемицеллюлоз, в состав которых входит глюкоза. За счет сбраживания глюкозы некрахмальных полисахаридов выход спирта из зернового сырья может быть повышен на 10–12 %.

Гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз не только дает непосредственно сбраживаемую глюкозу, но и повышает доступность крахмала ферментативному гидролизу. Особенно важно гидролизовать β -1,3-1,4-глюкан – существенный элемент клеточных стенок эндосперма злаков (у ячменя и овса глюкан составляет 75 % массы клеточных стенок эндосперма). В свою очередь, гидролиз крахмала повышает доступность целлюлозы, и в присутствии амилолитических ферментов степень расщепления целлюлозы несколько повышается. Поэтому цитолитические ферментные препараты целесообразно применять на стадии осахаривания замесов, совместно с β -амилазой и глюкоамилазой.

При сбраживании сырья с высоким содержанием β -глюканов (ржи, ячменя) рекомендуют применять препараты β -глюканазы не только для осахаривания, но и для разжижения замеса, при общем расходе в смесителе и осахаривателе от 3 до 6 ед. β -глюканазы/г сырья. В качестве препаратов β -глюканазы могут использоваться «Целловиридин», «Зимафилт», «Вискозим», «Ультрафло».

Интенсивное сбраживание сырья дрожжами возможно лишь при создании условий для их активного размножения. Лимитирующим фактором роста на гидролизатах сырья, полученных с применением ферментов карбогидразного действия, является низкое содержание свободных аминокислот. С целью обогащения суслу аминокислотами используют ферментные препараты грибного происхождения, имеющие высокую экзопептидазную активность.

Ферментативный комплекс препаратов из культур различных штаммов *Asp. oryzae* («Проторизин», «Амилоризин», «Амилопроторизин») включает, наряду с эндопептидазами (сериновой, карбоксильной и металлопротеиназой), экзопептидазы – лейцинаминопептидазу и карбоксипептидазу. Этот комплекс обеспечивает более глубокий гидролиз белка, чем комплекс бактериального препарата «Протосубтилина», основная активность которого определяется металлопротеиназой.

При обработке осахаренного суслу и ячменной болтушки препаратами грибного и бактериального происхождения, при дозировке этих препаратов по протеолитической активности 5 ед./г белка, очевидно преимущество грибных препаратов. Наиболее полно расщепляется белок в картофельном сусле: при действии грибных препаратов – на 75,7–85,7 %, при действии «Протосубтилина» – на 47,7 %. В ячменном сусле доля свободных аминокислот от их суммы составила соответственно 5,3–7 и 3,9 %. Прирост свободных аминокислот происходит в основном за счет глутаминовой, аспарагиновой кислот и пролина. Обработка пшеничного замеса на стадии осахаривания амилолитическими ферментами совместно с «Проторизином Г10х» (5 ед./г белка) увеличивает накопление биомассы дрожжей в 2 раза, сокращая продолжительность главного брожения с 32–36 ч до 18–20 ч, а продолжительность дображивания – с 36–42 ч до 20–24 ч. Интенсивное

сбраживание сахаров сопровождается повышением степени гидролиза крахмала глюкоамилазой.

Наличие в среде свободных аминокислот, их прямое включение в клетки дрожжей снижает затраты глюкозы на энергетический и конструктивный метаболизм. Более экономичное использование глюкозы увеличивает выход спирта на 2,8 %. Параллельно снижается количество побочных продуктов брожения на 19 %, а в пересчете на клетку – в 2,4 раза. При дозировке глюкоамилазы 6 ед./г крахмала и протеазы 1 ед./г крахмала (или 5 ед./г белка) брожение заканчивалось за 42–46 ч, при повышении дозировок соответственно до 15 и 1,6 ед./г крахмала продолжительность брожения сокращалась до 28 ч.

Дрожжи, выращенные на среде с богатым азотистым питанием, имеют повышенную осмофильность и толерантность к продуктам брожения, что позволяет сбраживать за 72 ч сусло с содержанием СВ 22 % вместо обычных 16 %, получая соответствующие технологические показатели.

Крахмалосодержащее сырье является основным в производстве этанола. Наряду с ним могут использоваться другие виды углеводного сырья. Некоторые виды дрожжей родов *Candida* и *Kluuyveromyces* обладают способностью сбраживать лактозу в этанол, что связано с наличием β - галактозидазной активности. При исследовании способности различных штаммов этих родов дрожжей к образованию этанола при ферментации на молочной сыворотке выбран штамм *K. marxianus var. lactis SK*.

Штамм *K. marxianus var. lactis SK* сбраживает как обычную, так и концентрированную молочную сыворотку с содержанием лактозы до 19,5 %. Оптимальная концентрация лактозы в начале процесса – 10,2 %, при этом выход этанола составляет 53,1 % к потребленной лактозе.

Контрольные вопросы

1. Перечислите причины использования экзогенных амилолитических ферментов в пивоварении.
2. Какие способы повышения ферментативной активности среды применяют при использовании в производстве пива несоложенного сырья?
3. Охарактеризуйте состав МЭК, используемого в производстве пива.
4. Какие ферментные препараты могут использовать при затирании в случае добавления несоложенного сырья?
5. Как влияет степень размола (размер частиц) несоложенного сырья на технологический процесс производства пива?
6. С помощью каких ферментов осуществляют стабилизацию пива?
7. Какие ферменты используют при производстве фруктовых соков?
8. Классифицируйте ферментные препараты в производстве соков по назначению и в зависимости от роли в технологическом процессе.
9. Какие ферментные препараты используют для обработки мезги?
10. Охарактеризуйте ферментные препараты, используемые при осветлении соков.
11. Какие ферментные препараты используют при производстве спирта?

12 Производство крахмала и крахмалопродуктов

Гидролиз крахмала. В промышленности трансформация крахмала начинается с приготовления крахмальной взвеси с содержанием СВ 30-40% и значением pH 4,5 (Рисунок 70). Последующее разжижение при доведении pH до 6,0-6,5 достигается за счет непродолжительного нагревания до 105 °С (для клейстеризации крахмала); затем смесь выдерживают при 90-95 °С в течение 1-3 ч в присутствии термостабильной (бактериальной) α-амилазы и добавленного Ca²⁺. При этом образуется смесь линейных и разветвленных декстринов (мальтодекстринов) со степенью гидролиза 8-15ДЭ (ДЭ – декстрозный эквивалент), что достаточно для предотвращения образования крахмального геля при нагревании на последующих стадиях (отсюда и термин «разжижение»).

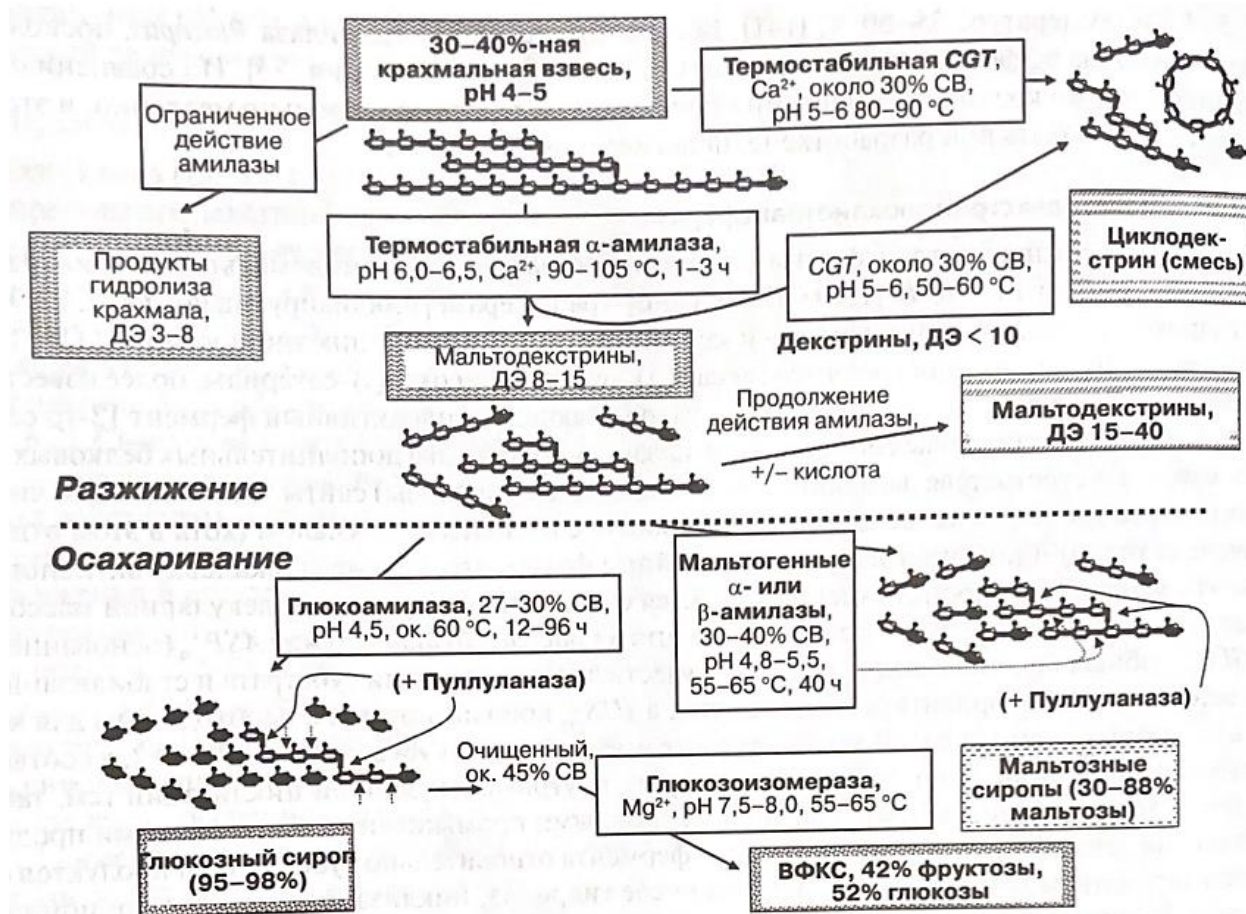


Рисунок 70 – Трансформация крахмала с использованием ферментов в пищевой промышленности. Темными глюкозными обозначены редуцирующие концы, по которым определяется ДЭ

Далее возможны три альтернативных варианта. Один из них – это получение мальтодекстринов с ДЭ 15-40 (кукурузного сиропа, используемого как загуститель или наполнитель, а также для обеспечения требуемой вязкости), осуществляемое путем дальнейшего действия амилазы, причем в некоторых случаях для начального разжижения клейстеризованного крахмала используют соляную кислоту (НСI). Два других варианта используются в производстве подсластителей путем уменьшения температуры до 60 °С и pH до 4,5-5,5 для достижения оптимальных условий для

проведения ферментативной реакции. Для получения 95-98 %-ного глюкозного сиропа (ДЭ 95) концентрацию СВ снижают до 27-30 % и вносят глюкоамилазу (зачастую в иммобилизованном виде) с добавлением или без добавления пуллуланызы, выдерживая в течение 12-96 ч. Полученный глюкозный сироп с концентрацией более 95 % затем очищают, концентрируют до содержания СВ 45% и обрабатывают иммобилизованной ксилозо(глюкозо)изомеразой при рН 7,5-8,0 и температуре 55-65 °С, добавляя Mg^{2+} для получения высокофруктозного кукурузного сиропа с содержанием фруктозы 42% (52% глюкозы). Впоследствии содержание в нем фруктозы может быть доведено до 55%. Получению из ожиженного крахмала другого подслащивающего вещества (30 - 88%-ного мальтозного сиропа, использующегося в производстве конфет) способствует добавление грибковых (мальтогенных) α - или β -амилаз с добавлением или без добавления пуллуланызы. Длина мальтоолигосахаридов в смеси обычно составляет от двух до пяти глюкозных единиц и зависит от выбранного источника мальтогенной амилазы.

Ксилозо(глюкозо)изомераза (ЕС 5.3.1.5, D-ксилозокетолизомераза) широко используется в производстве подслащивающих веществ из кукурузного крахмала; источником этого фермента являются исключительно микроорганизмы. Хотя наибольшей селективностью он обладает по отношению к ксилозе, достаточно эффективно он катализирует равновесную реакцию изомеризации с глюкозой (продуктом здесь является фруктоза), что делает этот фермент одним из наиболее важных ферментов в производстве высокофруктозного кукурузного сиропа (ВФКС). Существует этот фермент в виде гомотетрамеров с молекулярной массой 170-200 кДа и с двумя металлами-кофакторами (каталитическим и структурным) на 1 субъединицу (обычно Mn^{2+} , Mg^{2+} и Co^{2+}). Промышленно производится фермент главным образом из *Streptomyces. spp.* В иммобилизованном виде его наносят на колонну, через которую пропускается глюкозный сироп. Для очистки глюкозного сиропа, полученного при осахаривании крахмала (Рисунок 67) и содержащего 40-50 % СВ (93 % СВ составляет глюкоза), используется ион-обменный процесс и обработка активированным углем. Затем значение рН доводят до примерно 7,5 (значения между интервалом максимальной стабильности (рН 5-7) и максимальной активности (рН 7-9), добавляют 1,5 мМ Mg^{2+} и пропускают патоку через реактор (за время, необходимое для достижения нужной степени конверсии при 55-65 °С, хотя оптимальными температурами являются 75-85 °С). Указанный температурный интервал является своего рода компромиссом и определяется необходимостью получить стабильный в течение нескольких недель и месяцев фермент, снизить его вязкость, а также ограничить рост микроорганизмов и реакции Майяра, инактивирующие фермент. Основным недостатком глюкозоизомеразы, ограничивающим ее промышленное применение, является недостаточная термостабильность. В зависимости от условий глюкозный сироп (ДЭ 95) можно превратить в 42-45 %-ный фруктозный сироп. Использование более высоких температур дает возможность получать высокий выход фруктозы (константа равновесия увеличивается с ростом температуры). В настоящее время усилия молекулярных биологов направлены на повышение термостабильности этого фермента.

Из крахмальной взвеси под действием различных α -амилаз, вносимых до нагревания крахмала до точки клейстеризации, получают два других типа неподслащающих веществ. Тем самым регулируется модель осахаривания (ДЭ 3-8) и степень гидролиза, что дает возможность получать большие декстрины (обычно называемые продуктами гидролиза крахмала), образующие термообратимые гели и обладающие свойствами имитаторов жира. Подробности получения этих продуктов описаны в патентах, но общим является ограниченное использование амилаз в заданном интервале температур. К взвеси нативного крахмала (рН 5-6 температура инкубации 80-90 °С) можно добавлять термостойкую CGT. Общий выход циклодекстринов при действии CGT обратно пропорционален концентрации крахмала и степени разжижения. Таким образом, в промышленности циклодекстринов зачастую получают при содержании СВ крахмала в смеси около 30 %. В патентной литературе сообщается об использовании 1-33 % СВ как компромисс между процентом выхода (эффективностью) и общим выходом (продукцией). Термостабильная CGT способна как гидролизовать нативный (клеястеризованный) крахмал в присутствии добавленного Ca^{2+} , так и трансгликозилировать (циклизовать) получающиеся фрагменты. Можно использовать и нетермостойкую CGT, однако в этом случае для предотвращения гелеобразования крахмал необходимо подвергнуть ограниченному перевариванию (примерно до ДЭ 10), после чего при пониженной температуре (50-60 °С) добавляют CGT. Выход циклодекстринов можно повысить за счет предварительной или одновременной обработки крахмала деразветвляющим ферментом и использования комплексирующих агентов (растворителей или детергентов), способствующих реакции образования одного и более видов циклодекстринов [18].

Контрольные вопросы

1. Что означает термин «разжижение» крахмала?
2. Опишите различные варианты получения подсластителей.
3. Охарактеризуйте D-ксилозоксилизомеразу.
4. Как получают термообратимые гели?
5. Какова роль цикломальтодекстринглюканотрансферазы в получении циклодекстринов?

13 Применение ферментов и ферментных препаратов в молочном и мясном производствах

С момента появления сельского хозяйства, а произошло это больше 10 тысяч лет назад, люди неуклонно прикладывают силы, чтобы эта отрасль процветала и продолжала бесперебойно снабжать нас необходимым питанием. Наращивание объемов выпускаемой продукции, захват новых территорий под пахотные земли, неуклонный рост животноводческой отрасли даже с учетом появления альтернативных источников пищевого белка – всё это необходимо для того, чтобы прокормить растущее население планеты. И население это не маленькое. В 2011 году количество людей на Земле превысило 7 млрд, в 2022 была преодолена планка 8 млрд, а 2055 год и вовсе обещает стать знаменательным – к этому времени общее число людей должно достигнуть круглых 10 млрд [19].

Столь быстрый рост населения – это серьезная проблема, если мы занимаемся обеспечением людей продовольствием. И если раньше достаточно было просто сеять больше пшеницы и выращивать больше коров, то теперь такой подход не работает. Времена изменились, и нам приходится думать об экологии и глобальном потеплении, а значит, экстенсивный путь развития аграрного сектора должен заменяться интенсивным, где ставка делается на увеличение эффективности уже существующих процессов. Иными словами, нам необходимо постоянно увеличивать урожайность растений, которые мы едим, и продуктивность животных, которых разводим. И тут на помощь человеку приходят современные технологии.

Так искусственно вносимые (экзогенные) ферменты широко применяются для кормления животных, а именно для удаления из корма антипитательных факторов, а также для улучшения переваримости присутствующих в корме питательных веществ, для повышения активности эндогенных ферментов в организме птицы.

Использование экзогенных ферментов в кормлении жвачных животных изучалось еще в 1960-х гг., однако полученные результаты сильно варьировались, а попытки определить механизм действия этих ферментов так и не были предприняты. Экзогенные ферменты могут оказывать различное воздействие как на микробиоту желудочно-кишечного тракта, так и на общее состояние жвачных животных, поскольку физиологические реакции организма на действие экзогенных ферментов зависят от многих факторов.

Представленные на рынке ферменты для животных кормов исчисляются сотнями, однако все они получены почти исключительно от четырех видов бактерий (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, и *Streptococcus faecium, spp.*) и трех видов грибов (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, и *Saccharomyces cerevisiae*).

В составе добавок для кормов жвачных животных ферменты служат катализаторами деструктивных реакций, при которых субстраты (т.е. компоненты корма) перевариваются, расщепляясь до их химических составляющих (напр., до моносахаридов, аминокислот и жирных кислот). В свою очередь, продукты расщепления используются для клеточного роста либо микроорганизмами рубца, как важного отдела желудка коровы, либо организмом хозяина.

На рынке ферментные препараты для жвачных известны, в первую очередь, благодаря своей способности разрушать стенки растительных клеток, из-за чего их часто приравнивают к целлюлазам или ксиланазам. Однако ни в одном из этих препаратов не используется только лишь один фермент – в каждом из них неизменно присутствуют и другие (вторичные) ферменты, такие как амилаза, протеаза или пектиназа. Для разрушения одной только целлюлозы и гемицеллюлозы требуется работа нескольких ферментов, и от того, насколько различаются относительная доля и активность каждого из них, зависит эффективность препарата в разрушении клеточных стенок. В зависимости от выбора штамма, питательного субстрата и условий выращивания бактериальной культуры, полученные ферменты даже в пределах одного вида микроорганизмов могут сильно различаться по своему типу и активности.

Наличие нескольких ферментов в составе реализуемых на рынке препаратов является их преимуществом, поскольку один и тот же препарат можно использовать для широкого спектра субстратов. В то же время, эта особенность затрудняет контроль качества и экстраполяцию результатов исследований на другие препараты. Производство ферментных препаратов для кормов жвачных животных, как правило, стандартизировано. Неочищенные экстракты ферментов смешивают, чтобы обеспечить определенный уровень активности одного или двух конкретных ферментов, например, ксиланазы и/или целлюлазы. При этом активность остальных (вторичных) ферментов никак не стандартизируется. Несмотря на то, что наличие нескольких ферментов может существенно повлиять на общую эффективность ферментного препарата, определение их активности проводится редко.

Первое подтверждение того, что экзогенные ферменты способны улучшить среднесуточный привес и конверсию корма *мясного скота*, было получено в ходе десяти опытов, проведенных почти 60 лет назад. После того как в корма из размолотых кукурузных початков, овсяного и кукурузного силоса, а также сена люцерны, добавили комплекс амилотических, протеолитических и целлюлозолитических ферментов, привес животных с таким рационом вырос на 6,8–24,0%, а коэффициент конверсии корма – на 6,0–21,2% по сравнению с показателями контрольной группы.

Дальнейшие исследования подтвердили, что добавление ферментов способно улучшить показатели среднесуточного привеса (ССП) и конверсии корма у животных, получающих богатый силосом рацион. Однако после добавления в рацион ферментов показатели животных на откорме не всегда менялись в лучшую сторону, так фермент грибкового происхождения смешанный с зерновой добавкой для телят, рацион которых состоял преимущественно из сена люцерны, не привел к увеличению СПП или коэффициента конверсии корма. Два ферментных препарата, состоявшие преимущественно из амилазы и протеазы, также не смогли увеличить СПП животных, получавших рацион из концентратов (80%) и измельченного сена люцерны (20%).

Влияние экзогенных ферментов на количество молока у *молочных коров* было впервые исследовано в 1990-х гг., и продолжилось исследовательским бумом в этой области. Как и в случае с мясным скотом, изучение влияния экзогенных ферментов на продуктивность молочного скота дало неоднозначные результаты. Добавление смеси ферментов в сорговые корма не улучшило выработку молока у коров гольштинской породы. Тот же результат был получен при смешивании экзогенных ферментов с

рационами на основе ячменя. Включение комплекса целлюлазы и ксиланазы в рацион, содержащий от 45% до 50% концентрата, люцернового силоса, сена люцерны или смеси люцернового силоса, сена и кукурузного силоса, тоже не помогло улучшить выработку молока. Обработка кукурузного силоса в составе 50% кормового концентрата двумя идентичными ферментными препаратами, напротив, увеличила выработку молока на 2,5 кг/д без изменения его состава. Исследования показали, что эти ферментные препараты способны увеличить выработку молока у коров, получавших кормовые смеси из сена люцерны и силоса, но такое увеличение во многом зависит от дозировки препарата. К примеру, согласно исследованиям научного центра в г. Летбридж, при повышении дозировки добавляемых к прессованной люцерне ферментов с различной активностью с 1 г/кг до 2 г/кг выработка молока выросла с 23,7 кг (у контрольной группы) до 24,6 кг и 25,6 кг соответственно. Результаты применения этого ферментного препарата в начале периода лактации коров были еще более впечатляющими: добавление ферментов в рацион из кукурузного силоса (24%), сена люцерны (15%) и ячменного концентрата (61%) повысило выработку молока на 4 кг/д. Эффективность данного фермента, скорее всего, зависела от способа его применения, так как при нанесении его на конечную кормовую смесь выработка молока оставалась прежней, а при добавлении его в концентрат – заметно увеличивалась (на 4 кг).

Механизмы действия ферментов тесно взаимосвязаны с их действием на корм до его потребления, что влияет на рубцовое и послерубцовое переваривание. Воздействие экзогенных ферментов на корм может заключаться не только в выделении растворимых углеводов, так и в комплексном действии – устранении структурных барьеров, которые ограничивают микробиальное расщепление в рубце. В самом рубце экзогенные ферменты могут воздействовать непосредственно на корм или косвенным образом стимулировать пищеварительную деятельность, действуя совместно с микроорганизмами рубца. Экзогенные ферменты могут оставаться активными и в нижнем отделе ЖКТ, участвуя в послерубцовом переваривании клетчатки, или косвенно улучшать всасывание питательных веществ в нижнем отделе, снижая вязкость содержимого кишечника. Кроме того, эти ферменты могут усиливать активность ферментов в помете, что способствует более быстрому разложению отходов. В конечном итоге, цель использования любых ферментов – улучшить усвояемость корма у жвачных и снизить количество отходов [20].

Традиционно при обработке *пищевого сырья* используют эндо- и экзогенные биокаталитические процессы. При этом эндогенные процессы протекают в сырье естественным путем, медленно, в основном за счет тканевых ферментов, а экзогенные – за счет использования предварительно выделенных из различных источников ферментов и разработанных на их основе препаратов, отвечающих требованиям по специфичности и условиям биокаталитической реакции.

Процессы, протекающие под действием собственных ферментов, называют *созреванием (хотя не всегда)*. Это ключевой этап пищевой технологии, который часто определяет инфраструктуру отрасли в целом. Механизм действия эндоферментных систем при переработке пищевого сырья определяется режимами и условиями, обеспечивающими целенаправленный распад биополимерных систем с образованием химических предшественников вкуса и аромата, формирование необходимых

реологических и функционально-технологических свойств пищевых систем и в итоге – достижение желаемых органолептических показателей, высокого уровня качества, пищевой и биологической ценности готовых продуктов.

Процесс *созревания* традиционно используется при обработке сырья и продуктов животного происхождения с целью получения колбас, копченостей, деликатесов, кисломолочных продуктов, разнообразных сыров, соленой, копченой рыбы и других рыбопродуктов.

Выделение, очистка и исследование физико-химических свойств ферментных систем пищевого сырья, идентификация продуктов распада биополимерных систем позволили использовать *экзогенные ферменты* для интенсификации технологических процессов производства, повышения качества сырья и продуктов питания. Многие аналоги ферментов, получаемых из растений и микроорганизмов, успешно применяются в реальном производстве.

Роль протеолитических ферментов в процессах созревания сыров

Ферменты, катализирующие гидролиз белков, называют протеиназами или протеазами. Можно использовать оба эти термина, однако правильнее их называть экзо- и эндопептидазами. Кристиан Хансен еще в 1874 г. начал выпускать сычужный телячий фермент «ренин», применяемый в производстве сыра. Добавление химозина телят (сычужного фермента, «ренина») и его производных приводит к свертыванию молока, что используется в производстве сыра. Его свертывающая активность обусловлена специфическим гидролизом связи РНЕ₁₀₅ – МЕТ₁₀₆ в каппа-казеине, в результате которого выделяется гликомакропептид, а на мицеллах формируется гидрофобная поверхность, способствующая агрегации. Микроорганизмы закваски вносят в молоко при определенной температуре, значение рН при этом снижается до 5,8-6,5, после чего для свертывания молока вносят химозин. По завершении последующих стадий производства сыра ферментативная активность частично сохраняется, что влияет на созревание сыра и его вкус. На протеолиз и формирование вкуса при созревании сыра влияют также протеазы молочнокислых бактерий закваски.

Созревание сыра – это совокупность сложных биохимических изменений составных частей сырной массы, в результате которых улучшаются органолептические свойства и повышается физиологическая ценность продукта. Биохимические превращения протекают в строго определенной последовательности, продукты распада исходных веществ при взаимодействии друг с другом дают вторичные продукты, играющие большую роль в формировании вкуса сыра. В образовании специфических вкуса и аромата сыров изменения, которые претерпевают белковые вещества, имеют первостепенное значение. В процессе созревания параказеин распадается на более простые азотистые соединения. Ферментативный распад параказеина протекает под действием двух факторов – сычужного фермента и ферментов молочнокислых бактерий, причем преобладающее значение имеют ферменты молочнокислых бактерий.

Биохимические изменения белков под действием сычужного фермента и ферментов молочнокислых бактерий, интенсифицирующих процесс постоянного распада белковых систем с образованием специфических продуктов, набор которых регулируется условиями реакции и видовыми особенностями заквасок, создают вкус, аромат, консистенцию и другие свойства продукта. Например, содержание растворимых

соединений в мягких сырах выше, чем в твердых сырах. Это объясняется тем, что в мягких сырах содержание влаги и микрофлоры, вызывающей распад белков, выше. В их созревании кроме молочнокислых стрептококков и палочек участвуют также культурные грибы и бактерии сырной слизи, выделяющие активные протеиназы. В мягких сырах среди продуктов распада преобладают пептиды, а в твердых – аминокислоты и аммиак. Накапливающиеся пептиды и свободные аминокислоты существенно влияют на вкус готового продукта. Так, в первой половине созревания преобладают пептидные фракции различной молекулярной массы, которые придают горький вкус продукту, а по мере гидролиза пептидов горечь исчезает. Поэтому для получения хорошего качества следует строго соблюдать технологические режимы, управляющие биокаталитическими процессами. Установлено, что набор аминокислот в сырах зависит от конкретно выбранной технологии и продолжительности обработки (возраста) сыра. При производстве мягких и твердых сыров количество аминокислот постоянно возрастает.

Большинство аминокислот под действием дегидрогеназ, декарбоксилаз, трансминаз и других ферментов микроорганизмов дезаминируются, декарбоксилируются, вступают в реакцию переаминирования и подвергаются другим изменениям. В результате образуется целый ряд химических соединений, играющих большую роль в формировании вкуса и аромата сыра: карбоновые кислоты, окси- и кетокислоты, альдегиды, кетоны, амины, азотистые гетероциклы и т. д. Очевидно, что специфика ферментативных процессов и продуктов реакций обуславливает консистенцию и другие свойства сыров.

Роль ферментов мышечной ткани в созревании мяса

Известно, что в послеубойный период свойства всех тканей животного организма значительно изменяются, особенно мышечной ткани. Наступает *автолиз*. Состояние автолиза тканей легко определить визуально по внешним признакам.

Автолитическими называются процессы распада компонентов тканей под действием собственных ферментных систем. Автолитические преобразования в мясе зависят от особенностей метаболизма, концентрации и локализации ферментов, которые не инактивируются после убоя. Современные представления о механизме автолитических процессов базируются на ферментативной природе посмертных изменений мышечной ткани, установленных И.А. Смородинцевым в 30-х годах XX в. Наибольшее значение отводится *двум основным ферментным системам*. Одна из них связана с функцией движения и регулирует сокращение – расслабление, другая – катализирует непрерывный распад главных структурных элементов мышечного волокна по типу гидролиза. Роль каждой из этих двух систем в развитии этапов автолиза различна, но их функции тесно связаны между собой.

Разрешение мышечной ткани связывают с ослаблением поперечных связей между *актином* и *миозином* с последующей диссоциацией комплекса. Полной диссоциации, как показывают результаты исследований, не происходит, однако частичного распада миозин-актин достаточно, чтобы волокна растянулись. Изменения свойств белков, предшествующие релаксации мышцы, тесно связаны с деятельностью протеолитических ферментов – *катепсинов*, которые во втором периоде автолиза освобождаются из лизосом, и под воздействием кислой реакции среды клетки активируются. Катепсины являются типичными протеиназами и вызывают деструкцию высокомолекулярных белков. Разделяют пять основных типов *катепсинов* – *A, B, C, D* и

E, которые отличаются специфичностью действия на белки и в настоящее время достаточно изучены. Отличительной чертой *катепсина А* является его способность гидролизовать синтетический субстрат карбобензоксиг-л-глутамил-л-тирозин с оптимумом действия рН 5,6. Фермент синергетически с *катепсином D* действует на белки и вызывает гидролиз в лизосомах.

При исследовании свойств в *катепсине В* была установлена папаинтиоловая протеиназа растительного происхождения, широко используемая для мягчения мяса. *Катепсин С* является типичной сульфгидрильной протеиназой, и его действие направлено на отщепление – N-концевых дипептидных остатков в белках, пептидах и их производных. По субстратной специфичности *катепсин С* является своеобразной *аминопептидазой*, которая может участвовать не только в пептидном гидролизе, но и может действовать как активная трансфераза. Таким образом, действуя на разные субстратные фрагменты, *катепсины* оказывают существенное влияние на структуру белковых компонентов. Это вносит вполне определенный вклад в диссоциацию образовавшихся белковых агрегатов, ведет к появлению свободных гидрофильных групп и частичному восстановлению свойств мышечной ткани, утраченных в результате окоченения.

В технологии получения мясопродуктов нет установленных показателей полной зрелости мяса, а следовательно, и точных сроков созревания. Это объясняется, прежде всего, тем, что вышеперечисленные свойства мясного сырья формируются одновременно. Развивается окоченение, распадаются белковые, углеводные, липидные системы, нуклеозиды и т. д.

В целом же следует отметить, что *процесс созревания* – одно из «узких» мест в промышленной переработке мясного сырья. Это вызвано значительной длительностью процесса, необходимостью использования больших производственных площадей, недостаточной эффективностью развивающихся биохимических реакции. Для интенсификации процессов созревания, улучшения и сбалансированности показателей сырья разработаны физические, химические и биохимические методы. Наиболее распространенным и перспективным приемом является использование протеолитических ферментных препаратов, отвечающих следующим требованиям:

- высокий температурный оптимум действия;
- кислая и нейтральная области рН эффективного гидролиза;
- специфичность к гидролизу миозина и особенно белков внутримышечной соединительной ткани – коллагена и эластина (т. е. сходность действия *катепсинами*, *коллагеназой* и *эластазой*);
- безвредность для здоровья человека.

Опыт показывает, что искусственно внесенные в сырье препараты протеаз обеспечивают аналогичный *автолитическому* эффект образования белковых структур, однако процессы созревания мяса под их влиянием протекают в 3–5 раз интенсивнее и заканчиваются в более короткий срок.

Ферментные препараты отличаются специфичностью действия на такие белки мяса, как миозин, коллаген и эластин, конечные результаты этих процессов имеют много общего. При этом интенсивность и глубина превращения белковых структур зависят от дозировки препаратов, физико-химических условий, продолжительности обработки. Действие ферментов в итоге вызывает существенные изменения белков

мяса и системы экстрактивных веществ, что соответственно придает сырью необходимую консистенцию (нежность), вкус и аромат.

Так, для тендеризации мяса используют папаин и другие сульфгидрильные эндопептидазы (бромелаин и фицин). Эффективность использования этих ферментов для тендеризации обусловлена их способностью гидролизовать коллаген и эластин – белки соединительной ткани, присутствие которых обуславливает жесткость мяса. Применение экзогенных эндопептидаз, однако, не лишено недостатков. Так, возможна их «передозировка»; кроме того, обусловленная ими тендеризация отличается от «естественного» созревания мяса из-за различий в избирательности протеолитической активности ферментов. Фермент, обычно «папин», в порошкообразной форме наносят или непосредственно на поверхность мяса в виде порошка (в качестве носителя используется соль или другой безвредный носитель), или вносят в виде солевого раствора путем инъецирования (можно также погружать мясо в этот солевой раствор). Чистый солевой раствор фермента вводят внутривенно за 2-10 мин до убоя, иногда после оглушения, что способствует распределению фермента по мышечной ткани. Более комфортны для животных инъекции инактивированного папаина (его дисульфидной формы) – активируется такой фермент уже после убоя. Благодаря относительно высокой термостабильности рассматриваемых эндопептидаз более эффективная тендеризация зачастую достигается при кулинарной обработке мяса, а не при его хранении в условиях охлаждения.

В промышленных целях в качестве источника получения протеиназ используются животные ткани, растения и микроорганизмы. Среди них наибольшее распространение получили препараты, вырабатываемые на мясокомбинатах из ферментно - эндокринного сырья: поджелудочной железы (панкреатин, трипсин и химотрипсин) и слизистой оболочки желудка (пепсин). Наилучшие результаты получены при обработке мяса смесью этих ферментов. В связи с дефицитом в рационах питания людей пищевых веществ, особенно белков, разрабатываются новые инженерные решения для максимального вовлечения вторичных ресурсов перерабатывающих отраслей АПК в производство продуктов питания на базе управляемого биокатализа. Эти технологии подразумевают включение в технологический процесс такого нетрадиционного сырья, как субпродукты 2 категории тканей и отходы с высоким содержанием коллагена [22].

Контрольные вопросы

1. Что такое промышленный биокатализ?
2. Охарактеризуйте строение однокомпонентных и двухкомпонентных ферментов.
3. Каковы источники и свойства протеолитических ферментов?
4. Какова классификация протеолитических ферментов?
5. Что понимают под активностью ферментного препарата и активностью условного препарата?
6. Какова технологическая схема получения ферментных препаратов из животного сырья?
7. Приведите примеры обработки пищевого сырья и производства продуктов с применением ферментных препаратов.
8. Какие требования предъявляются к протеолитическим ферментам, используемым при обработке мясного сырья.

Практическая часть

Правила техники безопасности при выполнении лабораторных работ

Общие требования техники безопасности

К работе в лаборатории допускаются студенты, прошедшие инструктаж по технике безопасности (ТБ). Лица, допустившие нарушение инструкции по ТБ подвергаются внеочередной проверке знаний норм и правил охраны труда.

При проведении лабораторных работ по дисциплине «Биотехнология ферментных препаратов» необходимо соблюдать следующие правила техники безопасности:

1) проведение лабораторных занятий разрешается только в присутствии преподавателя или лаборанта;

2) каждый работающий должен знать, где находятся в лаборатории средства противопожарной защиты и аптечка, содержащая все необходимое для оказания первой помощи;

3) запрещается входить в лабораторию в верхней одежде, головном уборе, вносить посторонние вещи;

4) студент должен работать в белом халате из хлопчатобумажной ткани, волосы должны быть подобраны, не падать на плечи;

5) на каждом занятии назначается дежурный, который отвечает в течение всего занятия за порядок и чистоту рабочих мест, за оборудование общего пользования. По окончании работы дежурный сдает лабораторию преподавателю. Рабочее место, не приведенное в порядок, убирает сам дежурный;

6) каждый студент в лаборатории работает на постоянном месте, на котором не должно быть посторонних предметов;

7) в лаборатории категорически запрещается курение, прием пищи, хранение продуктов питания;

8) никакие вещества в лаборатории нельзя пробовать на вкус. Нюхать вещества необходимо крайне осторожно, направляя на себя пары или газы легким движением руки, а не наклоняясь к сосуду и не вдыхая полной грудью;

9) приступать к выполнению каждой работы следует только после ознакомления с методикой проведения исследования и с разрешения преподавателя;

10) запрещается проводить опыты в грязной или битой посуде, пользоваться реактивами из банок без этикеток;

11) соблюдать правила работы с химическими реактивами. При работе с химическими реактивами необходимо избегать попадания на руки, не трогать лицо и глаза руками;

12) категорически запрещается нагревать или охлаждать воду или растворы в герметически закрытых сосудах. Нельзя также герметически закрывать колбу с горячей жидкостью;

13) при нагревании жидкостей следить за тем, чтобы посуда была термостойкая и заполнена не более, чем на треть. Растворы с осадком нагревать с наибольшей осторожностью во избежание выброса жидкости из сосуда;

14) запрещается использовать нагревательные приборы с открытой спиралью;

15) для нагревания горючих и летучих реактивов нужно пользоваться водяными банями. Нельзя их нагревать на открытом огне или вблизи пламени;

16) нельзя наклоняться над сосудом, в котором что-либо кипит или куда наливается жидкость, так как брызги могут попасть в глаза;

17) при закрывании тонкостенного сосуда пробкой следует держать его за верхнюю часть горла как можно ближе к пробке, руки при этом должны быть обернуты полотенцем; нельзя закрывать пробкой колбу, держа последнюю на ладони, - колба может лопнуть и вызвать глубокие порезы;

18) перед началом работы обязательно проверяют наличие и исправность приборов, посуды, горелок и др. О замеченных недостатках, неисправностях сообщают преподавателю или лаборанту;

19) запрещается работать на неисправном оборудовании, пользоваться неисправными приборами и инструментами;

20) нельзя уходить с рабочего места при проведении исследования и оставлять без присмотра включенные приборы и электрооборудование;

21) не касаться металлическими и другими предметами проводов и контактных частей электросети. Не включать без ведома преподавателя или лаборанта любую электроаппаратуру;

22) при работе с электроприборами не отключать прибор мокрыми руками, не соприкасаться металлическими и другими предметами контактных частей электросети. В случае неисправности прибора (нагревание, искрение, замыкание) его необходимо тотчас же обесточить и сообщить о случившемся преподавателю. Запрещается переносить и ремонтировать включенное оборудование, находящееся под током;

23) нельзя набирать жидкости в пипетки всасывая их ртом. Следует пользоваться грушей;

24) запрещается совместное хранение реактивов, отличающихся по химической природе;

25) запрещается хранить реактивы и растворы в таре без этикеток, растворы щелочей в склянках с притертыми пробками, а легковоспламеняющиеся и горючие жидкости в сосудах из полимерных материалов. Запрещается хранить горючие жидкости и концентрированные кислоты в тонкостенной посуде;

26) не допускается выбрасывать в канализацию реактивы, сливать в нее растворы. Их необходимо собирать для последующего обезвреживания в стеклянную тару с крышкой емкостью не менее 3 л;

27) запрещается хранить любое оборудование в непосредственной близости от реактивов и растворов;

28) приготавливать растворы из твердых щелочей, концентрированных кислот и водного раствора аммиака разрешается только с использованием средств индивидуальной защиты в вытяжном шкафу с включенной вентиляцией в фарфоровой посуде. Причем жидкость большей плотности следует вливать в жидкость меньшей плотности;

29) все опыты с концентрированными кислотами, щелочами и газообразными веществами производить под вытяжкой. Опыты с эфиром, ацетоном, бензолом и

другими воспламеняющимися веществами надо проводить под вытяжкой. Категорически запрещается в это время пользоваться в лаборатории огнем;

30) при приготовлении растворов кислот необходимо строго придерживаться следующего правила: серную и азотную кислоту необходимо осторожно приливать по стенкам сосудов в воду, но не наоборот!

31) запрещается отгонять воспламеняющиеся вещества на открытом огне. Нельзя работать с огнеопасными веществами в одиночку;

32) твердые реактивы разрешается брать из склянок только с помощью совочков, ложечек, шпателей, пинцетов;

33) после окончания работы запрещается оставлять на лабораторном столе химические стаканы и склянки с растворами кислот, щелочей и другими жидкостями;

34) посуду после работы с минеральными кислотами, крепкими щелочами и ядовитыми веществами следует немедленно и тщательно вымыть;

35) после окончания работы привести в порядок рабочее место (все реактивы закрыть пробками и убрать на свои места, расставить чисто вымытую посуду на место, стол вымыть, протереть сухой тряпкой) и сдать дежурному;

36) перед уходом из лаборатории дежурный должен проверить, выключены ли газ, вода, электроприборы, вентиляция вытяжного шкафа;

37) перед уходом из лаборатории снять халат и средства индивидуальной защиты и тщательно вымыть руки с мылом.

Требования безопасности в аварийных ситуациях

1) разлитый водный раствор кислоты или щелочи засыпать сухим песком, совком переместить адсорбент от краев разлива к середине, собрать в полиэтиленовый пакет и плотно завязать. Место разлива обработать нейтрализующим раствором, а затем промыть водой;

2) при разливе легковоспламеняющейся жидкости или органических веществ, погасить открытый огонь, отключить систему электроснабжения помещения, разлитую жидкость засыпать сухим песком, влажный адсорбент собрать деревянным совком в закрывающуюся тару и проветрить помещение до полного исчезновения запаха;

3) 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;

4) если разбилась лабораторная посуда, осколки собрать щеткой в совок;

5) следует особенно осторожно обращаться с приборами, заполненными ртутью (термометры, манометры, электроды и пр.), так как пары ртути токсичны. Случайно пролитую ртуть следует немедленно собрать при помощи стеклянной ловушки с резиновой грушей. Мельчайшие частицы ртути собирают при помощи амальгамированных пластинок, кисточками из белой жести, листочками станиоли или

бумагой, смоченной 0,1 %-ным раствором перманганата калия с добавлением 5 см³ концентрированной соляной кислоты на 1 дм³ раствора. Необходимо собрать всю пролитую ртуть, а затем удалить ее химическим способом. Для этого на загрязненную ртутью поверхность наносят 5 %-ный раствор хлорной извести, а затем 5 %-ный водный раствор многосернистого натрия. Через 8-10 часов поверхность промывают водой. Хорошим демеркуризатором является и раствор хлорного железа. На загрязненную поверхность наносят его раствор и при помощи мягкой кисти или щетки смешивают с капельками ртути. При этом она деформируется и теряет свои жидкие свойства, превращаясь в тонкий серый порошок. После демеркуризации в помещении необходимо провести качественный анализ воздуха на содержание ртути. Фильтровальную бумагу, покрытую тонким слоем йодида меди, выдерживают в помещении, где была пролита ртуть, в течение 4 часов. Если бумага не порозовеет, то концентрация паров ртути в воздухе не превышает допустимой (0,01 мг/м³);

б) при получении травмы немедленно сообщить преподавателю и оказать первую помощь:

При порезах необходимо соблюдать следующие правила:

- промывать рану только в случае попадания в нее едких или ядовитых веществ;
- нельзя прикасаться к ране руками, даже если они чисто вымыты; нельзя смазывать рану мазями или засыпать порошком – это препятствует ее заживлению;
- при загрязнении раны следует осторожно удалить грязь с кожи вокруг раны по направлению от краев раны наружу; очищенный участок перед наложением стерильной повязки смазывают настойкой йода (нельзя допускать попадания йода внутрь раны).

При сильном кровотечении выше раны накладывают жгут, рану покрывают стерильной марлей до прихода врача. Жгут можно держать не более 2 ч.

При химических ожогах, вызванных концентрированными кислотами или гидроксидами, пораженный участок кожи немедленно обильно промывают водой под краном. Затем на обожженное место накладывают примочку: при ожогах кислотами – из 2 %-ного раствора NaHCO₃ или слабого раствора аммиака, при ожогах гидроксидами – из 1 %-ного раствора лимонной или уксусной кислоты. После этого обожженное место завязывают сухим бинтом.

При химических ожогах глаз щелочами их следует сразу же их промыть водой. Для этого направляют небольшую струю воды то в один, то в другой глаз в течение 3–5 минут. Затем глаза необходимо промыть 2-3 %-м раствором борной кислоты. После этого нужно немедленно обратиться к врачу.

При химических ожогах полости рта щелочами рот прополаскивают 3 %-ным раствором уксусной кислоты или 2 %-ным раствором борной кислоты, а при ожогах кислотами – 5 %-ным раствором гидрокарбоната натрия.

При термических ожогах на обожженное место накладывают повязку, пропитанную 5 %-ным раствором перманганата калия или 5 %-ным водным раствором танина.

При ожогах первой степени обожженное место присыпают крахмалом или тальком. При ожогах второй и третьей степени допустимы только примочки из раствора перманганата калия. При тяжелых ожогах следует немедленно обратиться к врачу.

При отравлении сильнодействующими ядами пострадавшего необходимо вынести из лаборатории в хорошо проветриваемое помещение.

При отравлении гидроксидами необходимо выпить 1 %-ный раствор уксусной кислоты или сок лимона, а при отравлении кислотами принять внутрь жженую магнезию MgO (две столовые ложки на стакан воды).

При отравлениях используют также белковую воду (два яичных белка на три стакана воды), молоко (три стакана), крахмальный клейстер, мучную болтушку, чай, кофе, а также адсорбирующие вещества – активный уголь (одна столовая ложка на два стакана воды) с последующим принятием слабительного.

При поражении электрически током необходимо в первую очередь отключить ток, пересечь провод, отвести его от пострадавшего сухой палкой, веревкой или другим неметаллическим предметом, отделить пострадавшего от провода, взяв его за сухие части одежды, и изолировать от земли, положив под него сухую доску, одежду, одеяло. Оказывающий помощь пострадавшему должен оградить себя от действия электротока до размыкания цепи, защитив руки резиновыми перчатками, а на ноги надеть резиновую обувь или встать на сухую доску. Пострадавшему необходимо сделать искусственное дыхание.

Требования к оформлению и порядку защиты отчетов по лабораторным работам

Проведение лабораторного занятия включает:

- внеаудиторную подготовку студентов по теме конкретной лабораторной работы;
- входной контроль готовности студентов к выполнению лабораторной работы;
- выполнение студентом лабораторной работы (индивидуальное, в составе бригады, подгруппы);
- оформление студентом отчета о результатах выполнения работы и защиту отчета;
- подведение преподавателем итогов выполнения лабораторной работы.

Каждый студент ведет рабочую тетрадь, оформление которой должно отвечать следующим требованиям:

на титульном листе указывают предмет, по которому делаются записи, кем они делаются (курс, группа, подгруппа, фамилия, имя, отчество);

каждое занятие отмечают порядковым номером, указывают его дату;

в отчете по лабораторной работе указывают тему, цель работы, краткое описание методик анализов и экспериментов, результаты и выводы.

результаты фиксируют в виде рисунков с обязательными подписями к ним, описывают текстом или оформляют в виде таблиц;

в конце каждой работы делают вывод или заключение, которые обсуждаются при подведении итогов занятия.

При сдаче отчета студент должен уметь пояснить выполнение каждого этапа работы и ответить на вопросы преподавателя. Оценка по лабораторной работе выставляется с учетом срока ее выполнения, качества сдачи и оформления отчета. По окончании лабораторного практикума тетради сдаются на кафедру для хранения в течение установленного срока.

Лабораторная работа № 1 «Обнаружение ферментов»

Цель работы: освоить качественные реакции, обнаруживающие ряд ферментов в тканях животного и растительного происхождения.

Материалы, реактивы	Посуда, оборудование
сырой и вареный картофель	нож
молоко сырое и кипяченое	штативы с пробирками
соевая мука	пипетки на 1 мл, 5 мл
слюна, (или раствор α -амилазы)	водяная баня
5 %-й спиртовой раствор гваякола (2-метоксифенола), (либо 1% раствор гидрохинона)	стеклянные палочки
0,5%, 3 %-й раствор H_2O_2	часовые стекла
2 %-й раствор мочевины	вата
1 %-й раствор фенолфталеина	воронка
крахмал, раствор крахмального клейстера	стаканы на 100 мл
1 %-й раствор I_2 в 2% йодиде калия	колбы на 100 мл
дистиллированная вода	термометр до 100 °C
	фарфоровая (или стеклянная) пластинка
	терка
	марля

Практическая часть

Присутствие ферментов в тканях животного и растительного происхождения можно обнаружить по их активности при помощи качественных реакций.

Обнаружение активности пероксидазы в картофеле

Окислительно–восстановительный фермент *пероксидаза* широко распространен в природе. Особенно в больших количествах этот фермент находится в растительных тканях (хрен, картофель и др.). Пероксидаза – сложный железосодержащий белок, кофактор которого близок к гемоглобину: железо в пероксидазе находится в трехвалентном состоянии (Рисунок 71). Пероксидаза катализирует окисление многих фенолов (например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамина и др.) с помощью перекиси водорода, так, при окислении гваякола с участием пероксидазы картофеля образуется продукт коричневого цвета в реакции.

Ход определения

а. На тонкий срез картофеля (сырого и вареного) наносят по 1–2 капли растворов гваякола и пероксида водорода. На сыром картофеле образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. На вареном картофеле пятно не образуется. Необходимо отметить результаты и объяснить различия в опытах с сырым и вареным картофелем.

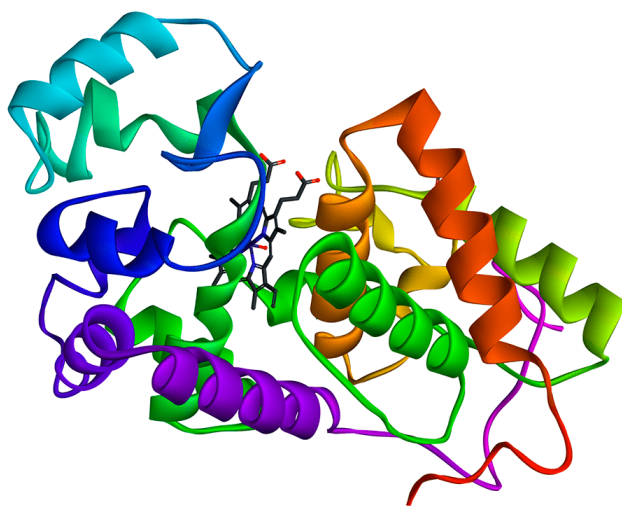
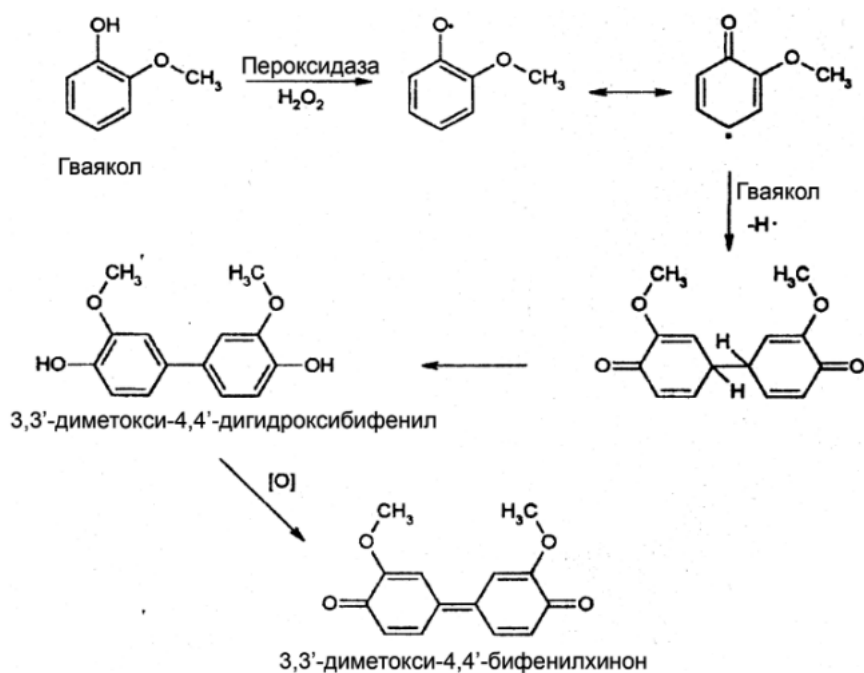


Рисунок 71 – Ленточная диаграмма пероксидазы

Кусочек клубня (сырой картофель) разных сортов примерно 30 г, измельчить на терке. Полученную кашу отжать через два слоя марли. Сок собрать в стакан и разбавить водой 1 к 2, т.е. к 1 части (объему) сока картофеля добавить 2 части H_2O дистиллированной. В три пробирки (для каждого сорта) налить по 5 мл 1%-ного раствора гидрохинона, приготовленного на прокипяченной дистиллированной H_2O (перед началом опыта). В первую пробирку добавить по 1 мл 3%-ного раствора перекиси водорода и

б. сока картофеля, во вторую – внести только перекись водорода, а в третью – только сок клубня картофеля.

Интенсивное изменение окраски (побурение) наблюдается только в первой пробирке, где происходит окисление гидрохинона в хинон за счет кислорода перекиси (при участии пероксидазы). Во второй пробирке окраска раствора почти не изменяется, но при длительном стоянии может появиться слабое побурение, так как гидрохинон окисляется кислородом, образующимся при спонтанном разложении перекиси водорода. Медленное побурение может наблюдаться и в третьей пробирке за счет

окисления гидрохинона кислородом воздуха при участии полифенолоксидазы, также в небольшом количестве содержащейся в соке клубня картофеля.

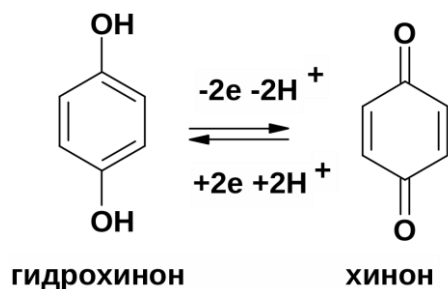


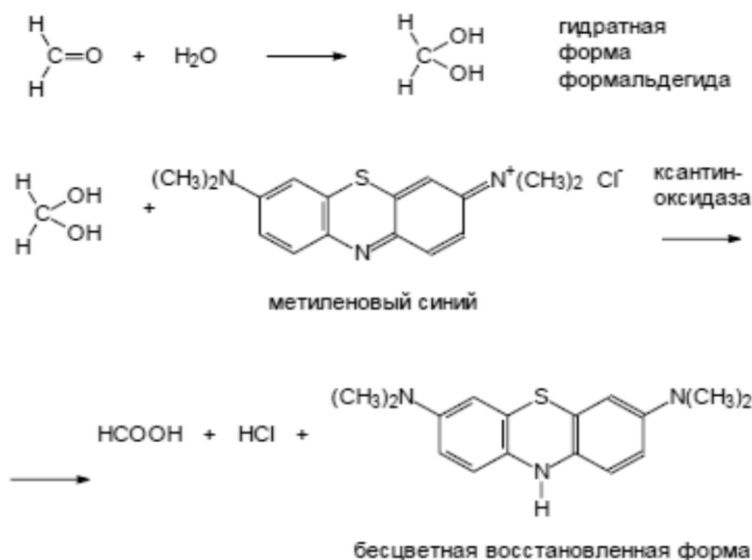
Таблица 8 – Схема записи опыта

Вариант	Состав смеси в пробирках			Окраска раствора в пробирках
	гидрохинон	H ₂ O ₂	сок клубня	
1				
2				
3				

Результаты наблюдений записать в таблицу (таблица 8), на их основании сделать вывод о характере действия фермента пероксидазы.

Обнаружение активности пероксидазы в молоке (по ГОСТ 3623)

Пероксидаза – фермент молока, относящийся к оксиредуктазам и инактивирующийся при температуре пастеризации не ниже 80°C с выдержкой (20-30) С. *Пероксидаза* относится к группе окислительно-восстановительных ферментов, называемых *оксидазами*. Оксидазы катализируют окисление многих органических веществ с участием кислорода. Так, содержащаяся в крови и в коровьем молоке (сыром, не обработанном термически) пероксидаза окисляет пуриновые основания (гипоксантин и ксантин) до мочевой кислоты, а также различные альдегиды до соответствующих карбоновых кислот, например, формальдегид до муравьиной кислоты. При этом акцептором атомов водорода окисляющегося субстрата может быть как кислород, так и другие вещества, например метиленовый синий в соответствии со схемой:



Определение пероксидазы молока с йодистокалиевым крахмалом

Метод определения пероксидазы по реакции с йодистокалиевым крахмалом. Метод основан на разложении перекиси водорода ферментом пероксидазой, содержащейся в молоке и молочных продуктах. Освобождающийся при разложении перекиси водорода активный кислород окисляет йодистый калий, освобождая йод, образующий с крахмалом соединение синего цвета.

Приготовление раствора йодистокалиевого крахмала. В стакан вместимостью 250 см³ помещают (3,00 ± 0,01) г крахмала, добавляют 5 - 10 см³ дистиллированной воды и тщательно перемешивают до получения однородной массы. В конической колбе доводят до кипения 100 см³ дистиллированной воды и при непрерывном помешивании кипящую дистиллированную воду добавляют к разведенному крахмалу, постоянно перемешивая и не допуская образования комков. Полученный раствор (крахмальный клейстер) доводят до кипения и охлаждают до температуры (20 ± 2) °С. К приготовленному раствору крахмала прибавляют (3,00 ± 0,01) г йодистого калия, перемешивая до растворения кристаллов йодистого калия. Раствор йодистокалиевого крахмала является нестойким. Раствор хранят при температуре (20 ± 5) °С не более 2 сут в склянке из темного стекла.

Проверка пригодности раствора йодистокалиевого крахмала. При применении раствора йодистокалиевого крахмала, хранившегося более 2 сут, перед использованием проверяют его пригодность. Для этого 5 см³ молока доводят до кипения, охлаждают до температуры (20 ± 2) °С, добавляют 5 капель раствора йодистокалиевого крахмала и 5 капель раствора перекиси водорода массовой долей 0,5 % и аккуратно перемешивают. Появление темно-синей или серовато-синей окраски указывает на непригодность раствора.

Ход определения

Проводят два параллельных измерения. В пробирку помещают анализируемый продукт (молоко сырое и кипяченое) и дистиллированную воду в количествах по 5 см³ и тщательно перемешивают, перемешивая стеклянной палочкой. Добавляют 5 капель раствора йодистокалиевого крахмала и 5 капель раствора перекиси водорода массовой долей 0,5 %, перемешивая вращательными движениями содержимое пробирки после добавления каждого реактива. Затем наблюдают изменение окраски содержимого пробирки.

Обработка результатов. При отсутствии фермента пероксидазы в молоке цвет содержимого пробирки не изменится. Следовательно, молоко подвергалось пастеризации при температуре не ниже 80 °С. При наличии пероксидазы в молоке, содержимое пробирок приобретает темно-синее окрашивание. Следовательно, молоко не подвергалось пастеризации или подвергалось пастеризации при температуре ниже 80 °С, или было смешано с непастеризованным молоком. Появление окраски в пробирках более чем через 2 мин после добавления йодистокалиевого крахмала и перекиси водорода не указывает на отсутствие пастеризации, так как может вызываться разложением реактивов. Чувствительность метода позволяет обнаружить добавление не менее 5 % непастеризованного молока к пастеризованному.

Обнаружение активности амилазы в слюне

Гидролитический фермент слюны α -амилаза катализирует реакцию гидролиза α -1,4-гликозидных связей крахмала с образованием декстринов и мальтозы. Расщепление крахмала идет через стадии образования промежуточных продуктов гидролиза, называемых декстринами, которые дают с раствором йода различное окрашивание. В таблице 9 приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом.

Таблица 9 – 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

Ход определения

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 9 пронумерованных пробирок наливают по 2 мл дистиллированной воды и по 1 капле 1% раствора йода. Отдельно в стаканчик наливают 5 мл 0,5% раствора крахмала, прибавляют 5 капель слюны, энергично перемешивают и замечают по секундомеру время; немедленно отбирают 2 капли этой смеси из стаканчика и вносят в пробирку 1. Если жидкость в пробирке окрашивается в синий цвет, то через 20 с 2 капли смеси из стаканчика вносят в пробирку 2. Если жидкость в пробирке 2 окрасится в синий цвет, то в следующие пробирки нужно вносить по 2 капли смеси через более длительные промежутки времени, например через каждые 30 с; но если жидкость в пробирке 2 станет фиолетовой или красной, то смесь нужно вносить в остальные пробирки через каждые 20 с.

Когда в одной из пробирок желтый цвет раствора йода не изменится, гидролиз крахмала считают законченным. Результаты опыта можно записать в виде таблицы 10.

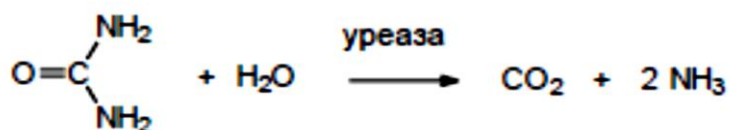
Таблица 10 – Гидролиз крахмала амилазой слюны

№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Окраска жидкости									
Название продукта реакции									

Окраска с йодом проб жидкости из пробирки со слюной меняется от синей к сине-фиолетовой, буро-красной, красной, оранжевой и, наконец, желтой, т.е. сохраняется цвет йода.

Обнаружение активности уреазы в соевой муке

Уреаза содержится в соевых бобах, синтезируется некоторыми микроскопическими грибами и бактериями. Уреаза – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз мочевины до диоксида углерода и аммиака в реакции:



Ход определения

В две пробирки наливают по 5 мл раствора мочевины и вносят по 0,5 г соевой муки. Во вторую пробирку добавляют 2 капли фенолфталеина. Содержимое обеих пробирок встряхивают и пробирки ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С на 5–10 минут. Активность уреазы определяют путем обнаружения аммиака. Выделение аммиака в первой пробирке определяют по характерному запаху или по посинению влажной лакмусовой бумажки у отверстия пробирки. Содержимое второй пробирки приобретает малиновую окраску вследствие смещения реакции среды в щелочную сторону за счет образования аммиака.

Контрольные вопросы

1. Что такое ферменты, их биологическая роль?
2. Приведите общие свойства и отличия ферментов от катализаторов небелковой природы.
3. Номенклатура и классификация ферментов.
4. Химическая природа ферментов.
5. Строение простых и сложных ферментов.
6. Охарактеризуйте активный центр фермента. Что такое аллостерический центр фермента? Ответ проиллюстрируйте схемой.
7. В чем состоят функции контактного и каталитического участков активного центра фермента?
8. Приведите схему, демонстрирующую механизм катализа.
9. Определение активности амилазы в слюне.
10. Опишите метод определения наличия пероксидазы в сыром молоке.
11. С помощью какой реакции и с каким ферментом в молочной промышленности с помощью реакции на пероксидазу контролируют эффективность пастеризации молока?
12. Какие промежуточные продукты гидролиза крахмала Вы знаете и какое окрашивание они дают с йодом?
13. К какому классу ферментов относится уреаза и какие реакции, катализирует данный фермент?
14. Приведите примеры растительных и животных тканей, в которых встречается фермент пероксидаза.

Лабораторная работа № 2: «Влияние температуры и pH среды на активность ферментов»

Цель работы: установить влияние температуры и pH среды на активность ферментов.

Материалы, реактивы

0,5%, 1 %-й раствор крахмала
фильтрованная и разбавленная
(1:10) слюна
1 %-й раствор I_2 в 2% йодиде калия
0,2% раствор соляной кислоты
индикаторная бумага

Посуда, оборудование

бюретка на 50 мл
штативы с пробирками
пипетки на 1 мл, 2 мл, 5 мл
водяная баня
стеклянные палочки
термометр до 100 °С
фарфоровая (или стеклянная) пластинка

Практическая часть

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 (продолжительность воздействия).

Ход определения

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.

Для большинства ферментов, выделенных от теплокровных животных, такой температурой является 30–40 °С. Уменьшение скорости ферментативной реакции при более высоких температурах объясняется термолабильностью ферментов, т.е. чувствительностью к действию высокой температуры. 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 (или стеклянную) пластинку несколько капель раствора йода в йодистом калии и смешивают их с каплями гидролизуемой смеси из каждой пробирки, используя пробы через 1, 2, 4, 6, 8 мин. По изменении окраски крахмала с йодом судят о степени гидролиза. Схема опыта приведена в таблице 11.

Таблица 11 – 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		

Влияние pH на активность ферментов

Все ферменты проявляют максимальную активность при определенном значении pH, называемом оптимумом pH ($pH_{\text{опт}}$). Ниже и выше оптимума pH наблюдается снижение активности ферментов. Зависимость активности от pH объясняется влиянием на степень ионизации ионогенных групп фермента, а также субстрата.

Оптимальное значение pH для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях pH среды. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции крахмала с раствором йода. При оптимальном значении pH расщепление крахмала произойдет полностью (окраска с йодом отсутствует, желтая). По мере удаления от оптимального значения pH в кислую или щелочную зоны расщепление крахмала произойдет только частично до стадии декстринов или крахмал вообще не подвергнется расщеплению.

Ход определения

В 8 пронумерованных пробирок приливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку №1 вносят 1 мл 0,2% раствора соляной кислоты, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку №2. Перемешивают, отбирают 1мл и переносят в пробирку №3 и так далее. Из пробирки №8 отбирают 1мл и выливают. Таким образом, получают различные разведения соляной кислоты, которые соответствуют разным значениям pH среды. Показатели pH среды измерить при помощи универсального бумажного индикатора или pH-метра, результаты записать.

ВВ! Если для определения pH раствора используете pH-метр, то объем раствора соляной кислоты необходимо увеличить, учитывая размер электрода.

После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат или на водяную баню на 15 минут при 37°C. Затем охладить и добавить во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия.

Отметить, в каких пробирках произошел полный гидролиз крахмала, какому это уровню pH соответствует, т.е. определить оптимальные значения pH для амилазы.

Таблица 12 – Влияние рН на активность фермента α-амилазы слюны

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8
рН								
Результат реакции								

Делают выводы по работе.

Контрольные вопросы

1. Опишите график зависимости активности фермента от температуры раствора. Анализ кривой.
2. Охарактеризуйте зависимость фермента от температуры
3. Отличие термостабильных и термолабильных ферментов, приведите примеры.
4. Как влияет низкая температура на активность ферментов.
5. Опишите зависимость скорости реакции от значения рН раствора.
6. Как влияет рН на заряд ионогенных групп в молекулах белка.
7. Охарактеризуйте изменения структуры фермента и реакционной способности активного центра при разных значениях рН.
8. Что такое оптимальное значение рН для ферментов и его биологическое значение.

Лабораторная работа № 3: «Изучение специфичности ферментов»

Цель работы: определить виды специфичности ферментов и то, как они проявляются.

Материалы, реактивы

1 %-й раствор крахмала
 мясо молодых животных
 0,9 %-й раствор поваренной соли
 3 %-й раствор янтарной кислоты
 3 %-й раствор яблочной кислоты
 0,02 %-й раствор метиленовой сини
 5 %-й раствор мочевины
 5 %-й раствор ацетамида
 1 %-й раствор сычужного фермента
 2 %-й раствор сахарозы
 10 %-й раствор NaOH
 5 %-й раствор CuSO₄
 реактив Люголя
 фильтрованная и разбавленная (1:5) слюна
 1 %-й раствор I₂ в 2% йодиде калия
 индикаторная бумага
 дистиллированная вода
 раствор сахарозы*

Посуда, оборудование

бюретка на 50 мл
 термостат
 электроплитка
 штативы с пробирками
 пипетки на 1 мл, 5 мл
 водяная баня
 стеклянные палочки
 термометр до 100 °С

**Приготовление раствора сахаразы: 100 г дрожжей прессованных (свежих) растирают и заливают водой (400 мл), через 2 часа отфильтровывают готовый раствор. Хранить в холодильнике.*

Практическая часть

Каждый фермент действует только на одно веществ или на группу сходных субстратов, что обусловлено соответствием структуры фермента, точнее его активного центра и структуры субстрата. Например, амилаза действует только на крахмал, сахараза – только на сахарозу и т. п.

Ход определения

В две пробирки (№1 и №2) вносят по 10 капель 1% раствора крахмала, в две другие (№3 и №4) – по 10 капель 2% раствора сахаразы. Затем в пробирки №1 и №3 добавляют по 4 капли раствора слюны, а в пробирки №2 и №4 – такое же количество раствора сахаразы. Перемешивают и оставляют в термостате или на водяной бане на 15 минут при температуре 37–38°C. Затем содержимое каждой пробирки делят пополам и проводят реакции с йодом и Троммера.

Реакция с йодом. К гидролизату добавляют 1 каплю 1% раствора йода в йодиде калия.

Реакция Троммера. К гидролизату добавляют 1 каплю 5% раствора сульфата меди и 4 капли 10% раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают до кипения

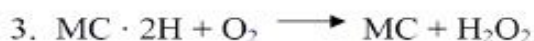
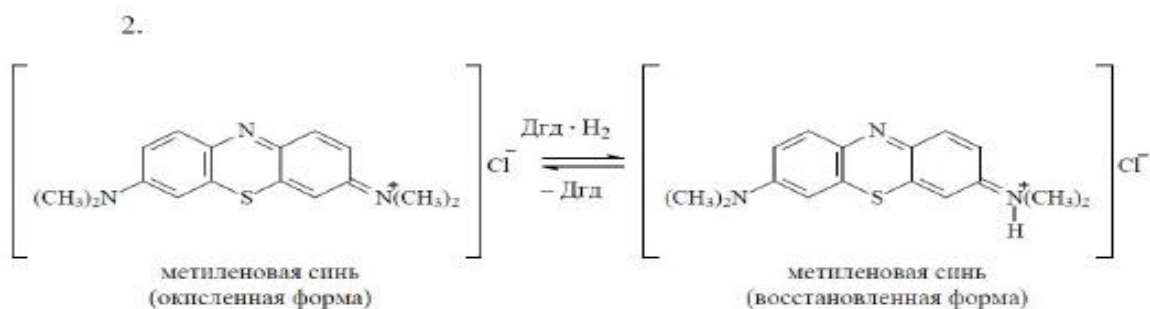
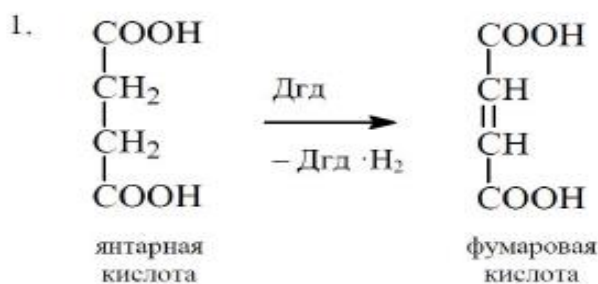
Таблица 13 – Результаты исследования

пробирка	Субстрат	Фермент	Реакция с йодом	Реакция Троммера
1	Крахмал	амилаза		
2	Крахмал	сахараза		
3	Сахароза	амилаза		
4	Сахароза	сахараза		

В выводе следует отметить, в какой пробирке и при каких условиях обнаружено действие ферментов и почему.

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:



Ход определения

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 окрашивание вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини (восстановленной формы – $\text{MC} \cdot \text{H}_2$) кислородом воздуха.

Специфичность действия уреазы

Уреаза обладает высокой специфичностью, субстратом для нее является мочевины – карбамид.



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 синее 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.

Субстратная специфичность действия сычужного фермента

Ферменты *специфичны в отношении как типа катализируемых реакций, так и субстратов*, на которые они действуют. Так, амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на белки. Сычужный фермент действует на казеин молока, но не действует на полисахариды и т. д.

Ход определения

Берут 2 пробирки, нумеруют их. В пробирку №1 наливают 5 мл раствора крахмала, а в пробирку №2 – 5 мл молока. Затем в обе пробирки вносят по 1 мл раствора сычужного фермента. Пробирки ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С на 10–15 минут. По истечении указанного времени наблюдают произошедшие изменения в пробирке с молоком, а расщепление крахмала проверяют прибавлением в пробирки 2–3 капель раствора йода в йодиде калия. Полученные результаты заносят в таблицу 14.

Таблица 14 – Состав реакционной среды

Компоненты	Пробирка №1	Пробирка №2
Крахмал	+	–
Молоко	–	+
Сычужный фермент	+	+
Изменение цвета раствора		

Результаты опыта объясняются тем, что створаживание белка молока происходит вследствие частичного гидролиза казеина при участии сычужного фермента, который не действует на крахмал, что доказывает его субстратную специфичность.

Контрольные вопросы

1. Какие факторы влияют на скорость химической реакции?
2. Что такое энергия активации? Что такое константа химического равновесия?
3. Какой принцип положен в основу классификации ферментов? Назовите основные классы ферментов.
4. Каковы основные свойства ферментов? В чем заключается механизм ферментативного катализа?
5. Каково строение ферментов? Что называют косубстратом, апоферментом? Какова роль этих структурных компонентов фермента в ферментативном катализе?

6. В чем сущность активации и ингибирования ферментов? Какие факторы оказывают активирующее и ингибирующее действие на ферменты?

Лабораторные работы № 4-5: «Получение сахаразы из дрожжей и определение специфичности её действия»

Цель работы: освоить метод выделения фермента сахаразы (инвертазы) из дрожжей, научиться проводить качественную реакцию на присутствие фермента и определять специфичность его действия».

Материалы, реактивы

1 %-й раствор крахмала
1 %-й раствор сахарозы
10 %-й раствор NaOH
5 %-й раствор CuSO₄
реактив Люголя
ацетон
тимол
1 %-й раствор J₂ в 2% йодиде калия
индикаторная бумага
дистиллированная вода
раствор сахаразы*из дрожжей
Фелингова жидкость

Посуда, оборудование

бюретка на 50 мл
термостат
электроплитка
штативы с пробирками
пипетки на 1 мл, 5 мл
водяная баня
стеклянные палочки
термометр до 100 °С
фильтровальная бумага

Практическая часть

Ход определения

Опыт 1. Выделение фермента сахаразы из дрожжей

100 г пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке, 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.

Опыт 2. Качественная проба на сахаразу

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. Сахараза не обладает

Лабораторная работа № 6: «Методы количественного определения активности ферментов»

Цель работы: освоить методики количественного определения активности трипсина, каталазы, α -амилазы слюны и сычужного фермента.

Материалы, реактивы

раствор казеина
раствор трипсина
0,1н раствор гидроксида натрия
раствор формалина
1 %-й раствор фенолфталеина;
молоко сырое, разведенное в 2 раза
(5 мл молока смешивают с 5 мл воды)
1 %-й раствор сычужного фермента
1 %-й раствор перекиси водорода
10 %-й раствор серной кислоты
0,1н раствор перманганата калия
0,1 % раствор крахмала
1 % раствор йода в йодиде калия
раствор слюны (1:10)

Посуда, оборудование

стаканы химические на 100 мл
термостат
водяная баня
штативы с пробирками
пипетки на 1 мл, 5 мл и 10 мл

Практическая часть

Активность фермента обычно определяют по скорости убыли субстрата или по скорости накопления продуктов реакции. За единицу активности фермента принят *катал* (кат), равный количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата за 1 с. Кроме того, применяются кратные единицы, например, 1 нкат (нанокатал), т.е. 1×10^{-9} кат. Более широко употребляется международная единица активности ферментов. *Активность* в международных единицах соответствует количеству субстрата в микромолях, превращенного за 1 мин: 1Е = 1 мкмоль/мин. *Удельная активность* – это отношение активности к массе очищенного фермента или к массе белка. Она выражается в кат/кг или Е/мг.

Ход определения

Опыт 1. Определение активности трипсина

Трипсин относится к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз (протеолитические ферменты). Он катализирует реакцию расщепления пептидных связей в белках и полипептидах. Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в казеине, который инкубируют с данным ферментом.

В колбу отмеривают 50 мл раствора казеина, подогревают на водяной бане до 35–37 °С и прибавляют 2 мл трипсина. Сразу отбирают 10 мл раствора и определяют в нем аминный азот методом формольного титрования, записывая значение аминного азота как V_0 в момент времени t_0 . Колбу с казеином и трипсином ставят в термостат при 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин отбирают по 10 мл раствора и в отобранных пробах определяют содержание аминного азота (V_{30} , V_{60} , V_{90} через промежутки времени t_{30} , t_{60} и

t_{90}). Прирост аминного азота (мкг) выражают графически, откладывая по вертикали количество аминного азота, а по горизонтали – время инкубации).

Вычисляют активность A в мкг/мин по формуле:

$$A = \frac{(V_{90} - V_{30})}{(t_{90} - t_{30})}$$

Определение аминного азота методом формольного титрования. К 10 мл исследуемого раствора прибавляют 5–6 капель фенолфталеина и титруют 0,1н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (не записывая объем). Затем в раствор добавляют 2 мл раствора формалина и вновь титруют 0,1н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (записывая объем). Количество израсходованной щелочи после добавления раствора формалина умножают на 1,4 и получают количество аминного азота в мг (1 мл 0,1н раствора NaOH соответствует 1,4 мг аминного азота).

Опыт 2. Определение активности каталазы молока по методу А.Н. Баха и С.Р. Зубковой

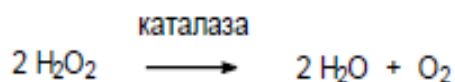
Оксидоредуктазы – класс ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Окисление мономеров, образующихся в процессе катаболизма полимеров, представляет собой сложный многоступенчатый процесс.

Окисление веществ в клетках протекает, в основном, путем отщепления водорода (дегидрированием) или отщеплением электронов или путем присоединения кислорода к молекуле окисляемого соединения.

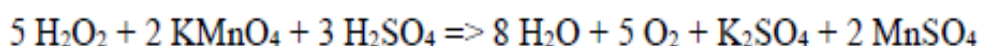
Акцепторами водорода у дегидрогеназ является НАД+, НАДФ, ФАД и ФМН, у некоторых флавиновых – кислород (их называют оксидазами), у гемсодержащих (пероксидаз и каталазы) – H_2O_2 (пероксид водорода).

Акцепторами и переносчиками электронов являются цитохромы, содержащие гем (гемопротеины).

Фермент *каталаза* содержится в сыром молоке, особенно много каталазы находится в молозиве и в молоке, полученном от животных, больных маститом. Каталаза присутствует также в крови человека и животных, и в любых в растительных и животных тканях, являясь одним из компонентов антиоксидантной системы организма. Каталаза относится к гемопротеинам, катализирует процесс разрушения ядовитого для клеток пероксида водорода на воду и молекулярный кислород:



Активность каталазы может быть выражена количеством миллиграммов перекиси водорода, разрушенной за 30 мин при определенных условиях опыта. Для определения наличия перекиси водорода используется титрование ее раствором перманганата калия в кислой среде:



Выполнение работы. В две конические колбы отбирают по 7 мл дистиллированной воды. Затем в одну из них прибавляют 1 мл разведенного в 2 раза сырого молока, а в другую 1 мл разведенного молока, но предварительно прокипяченного. В обе колбы добавляют по 1 мл 1 %-го раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин. Затем в каждую колбу прибавляют по 3 мл 10 %-й серной кислоты для прекращения действия каталазы и оттитровывают остаточное количество пероксида водорода 0,1н раствором перманганата калия до появления светло-розового окрашивания. По разности между контрольным и опытным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству расщепленного с участием фермента пероксида водорода.

Пример. Допустим, что на титрование контрольной пробы пошло 8 мл, опытной – 2 мл 0,1н раствора KMnO_4 . Количество пероксида водорода, разложенного каталазой, содержащейся в 1 мл разведенного в 2 раза молока, составит $8-2 = 6$ мл, или $6 \times 1,7 = 10,2$ мг (1 мл 0,1н раствора KMnO_4 эквивалентен 1,7 мг пероксида водорода). Следовательно, в 1 мл сырого молока содержится количество каталазы, способное за 30 мин разложить $10,2 \times 2 = 20,4$ мг пероксида водорода.

Опыт 3. Определение активности сычужного фермента

Сычужный фермент обладает способностью свертывать молоко и широко применяется при получении творога и сыра. Активность сычужного фермента выражается в условных единицах, характеризующих количество молока, которое свернется под действием 1 г фермента при 35 °С в течение 40 мин.

Выполнение работы. В химический стакан наливают 50 мл молока и ставят в водяную баню с температурой 35 °С. Через 3–5 мин к молоку прибавляют 0,5 мл 1 %-го раствора сычужного фермента, быстро перемешивают и включают секундомер. Наблюдают за свертыванием молока легким покачиванием стакана или прикосновением к молоку стеклянной палочкой; появление хлопьев и сгустка показывает начало свертывания. По секундомеру отмечают продолжительность свертывания, то есть время с момента внесения в молоко сычужного фермента до появления хлопьев. Активность сычужного фермента вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 40}{0.005 \cdot n}$$

где X – активность сычужного фермента в условных единицах (у.е.);

a – количество взятого молока, мл;

n – продолжительность свертывания молока, минуты.

Пример. К 50 мл молока прибавляем 0,5 мл 1 %-го раствора сычужного фермента, что соответствует 0,005 г. Молоко свернулось в течение 4 мин. Активность фермента будет равна:

$$X = \frac{50 \cdot 40}{0.005 \cdot 4} = 100\,000 \text{ у.е.}$$

Следовательно, 1 г сычужного фермента свертывает 100 кг молока в течение 40 мин при температуре 35 °С.

Опыт 4. Количественное определение активности α -амилазы слюны по Вольгемуту

Метод основан на определении наименьшего количества амилазы (при максимальном разведении слюны), полностью расщепляющего весь добавленный крахмал. Амилазная активность слюны выражается количеством 0,1% раствора крахмала в миллилитрах, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны при 38°C в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны равна 160–320. Амилазная активность обозначается «А 38°/30/».

Цель работы: познакомиться с методом количественного определения активности амилазы слюны по Вольгемуту и определить амилазную активность собственной слюны.

Выполнение работы. В 8 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл воды. В 1-ю из них добавляют 1 мл разведенной в 10 раз слюны. Содержимое этой пробирки перемешивают, несколько раз втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси и переносят ее во 2-ю пробирку. Содержимое этой пробирки перемешивают и 1 мл смеси переносят в 3-ю пробирку и т. д. до 8-й пробирки. Из 8-й пробирки отбирают 1 мл смеси и выливают.

Во все пробирки добавляют по 1 мл воды и по 2 мл 0,1% раствора крахмала, перемешивают, встряхивая пробирки, и помещают в термостат при 38°C на 30 мин. После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой, добавляют по 1 капле 1% раствора йода и перемешивают.

При реакции с йодом жидкость в пробирках окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвета. Полученные данные заносят в таблицу 16.

Таблица 16 – Результаты исследования

	Разведение слюны							
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
	Пробирки							
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	6-я	7-я	8-я
Окраска раствора с йодом								

Отмечают последнюю пробирку с желтой окраской, где гидролиз крахмала прошел полностью и делают расчет.

Вывод.

Расчет. Отметив пробирку, где гидролиз крахмала прошел полностью при наименьшем количестве фермента (желтая окраска раствора), по количеству неразведенной слюны в данной пробирке рассчитывают амилазную активность слюны по следующей пропорции:

А мл слюны расщепили 2 мл 0,1% раствора крахмала;

1 мл слюны расщепил *X* мл 0,1% раствора крахмала,

где *A* — количество неразведенной слюны.

Например, желтая окраска появилась в 4-й пробирке, где слюна была разведена в 160 раз;

1/160 мл слюны расщепила 2 мл 0,1% раствора крахмала;

1 мл неразведенной слюны расщепил X мл 0,1% раствора крахмала:

$X = 2 \cdot 1 \cdot 160 / 1 = 320$ мл 0,1% раствора крахмала.

Следовательно, амилазная активность А 38°/30' равна 320.

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.
9. К какому классу ферментов относится трипсин, каков механизм его действия?
10. В чем заключается значение гидролаз для пищевой промышленности?
11. Какие вам известны ферментные препараты протеолитического действия?
12. Какова сущность метода определения активности сычужного фермента?
13. Какова сущность количественного определения активности α -амилазы слюны по Вольгемуту?

Лабораторные работы № 7-8: «Изучение активности α - и β -амилаз, выделенных из солода. Определение общей осаживающей активности ферментной системы»

Цель работы: освоить методику выделения и изучения активности амилолитических ферментов из зерновых продуктов.

Материалы, реактивы

0,3 %-й раствор I_2 в 3% йодиде калия ***
индикаторная бумага
дистиллированная вода
вытяжка из солода
ацетатный буфер рН 5,5*
раствор с массовой долей крахмала 2 %**
0,1М, 1М раствор HCl
ацетат кальция порошок
гидрофосфата натрия (Na_2HPO_4)
0,15 моль/л

Посуда, оборудование

бюретка на 50 мл
термостат
электроплитка
штативы с пробирками
пипетки на 1 мл, 5 мл
водяная баня
стеклянные палочки
термометр до 100 °С
фильтровальная бумага
рН-метр
мерные колбы на 50 мл
холодильник (лед, снег)
ФЭК

* 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;

**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;

***0,3 г йода кристаллического и 3 г йодида калия смешивают с 3–5 мл воды и после растворения йода объем доводят водой до 100 мл

Практическая часть

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.

Ход определения

Опыт 1. 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.

Опыт 2. 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.

Опыт 3. 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.

Опыт 4. 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 гидролизует в крахмале и родственных полисахаридах α -1,4-гликозидные связи без определенного порядка. В результате образуются декстрины и незначительное количество мальтозы. β -амилаза 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 таблицей 17.

Таблица 17 – 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, рН 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

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.

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 (Таблица 17), 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 №9 «Амилолитическая активность ферментного препарата»

Цель: определить амилолитическую активность ферментного препарата амилосубтилин.

Материалы, реактивы

1 М ацетатный буфер (рН 4,7)
1/15 М фосфатный буфер (рН 6,0)
дистиллированная вода
0,5М раствор HCl
1 % раствор крахмала
Основной, рабочий раствор йода
Ферментный препарат
амилолитический

Посуда, оборудование

штативы с пробирки размером
21×200 мм
пипетки
водяная баня или термостат
стеклянные палочки
секундомер
ФЭК, кюветы толщиной 10 мм
рН-метр
колбы на 50 мл, 100 мл, 200 мл, 1000 мл

Теоретическая часть

Действие ферментов отличается высокой специфичностью действия. Специфичность действия – способность выбирать определенный субстрат (субстратная специфичность) и катализировать строго специфическую реакцию (реакционная специфичность). Более того, большинство ферментов способны различать стереоизомеры (стереоспецифичность).

Субстратная специфичность может быть широкой, как например для амилаз, и «узкой», абсолютной, высокоспецифичной, примером которой является химозин.

Отдельные амилазы характеризуются широкой субстратной специфичностью по отношению к углеводным субстратам (крахмалу, гликогену). Специфичность действия гидролизующих крахмал ферментов изучается вторую сотню лет и до настоящего

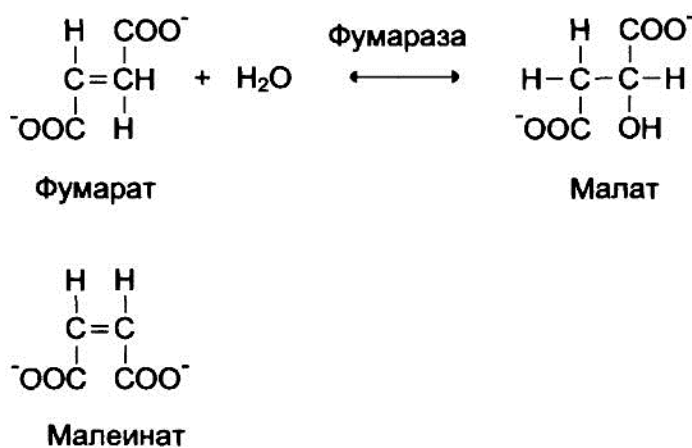
времени не объяснены различия в характере действия и на основе строения активных центров и пространственных структур их молекул.

К амилазам относят широкий ряд ферментов: альфа-амилазу, бета-амилазу, экзо-1,4-альфа-глюкозидазу (глюкоамилазу или гамма-амилазу), олиго-1,6-глюкозидазу, амило-1,6-глюкозидазу, пуллуланазу, изоамилазу. Установлено, что они гидролизуют альфа-1,4- и/или альфа-1,6-гликозидные связи в крахмале, гликогене и в родственных им олиго- и полисахаридах.

Широко распространенный в природе фермент альфа-амилаза (КФ 3.2.1.1, альфа-1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) является эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление альфа-1,4-гликозидных связей, случайным образом внутри высокополимеризованного субстрата и освобождает глюкозу в α -аномерной форме. При этом происходит стремительное уменьшение молекулярной массы полисахарида и вязкости его растворов, а также потеря способности крахмала реагировать с йодом [23].

В отличие от амилаз химозин (аспартатная пепсиноподобная эндопептидаза) (КФ 3.4.23.4) широко применяемый в сыроделии для свертывания молока, избирательно и с высокой скоростью гидролизует «ключевую» пептидную связь – F105-M106 – в молекуле каппа-казеина, что приводит к дестабилизации казеиновых мицелл и образованию сычужного сгустка (F (фенилаланин), M (метионин)).

Примером стереохимической субстратной специфичности является фумаратгидратаза (фумараза), которая катализирует превращение только одного стереоизомера субстрата.



Фермент катализирует присоединение молекулы воды к кратной связи транс-аниона фумаровой кислоты (фумарата), но не к ее стереоизомеру – цис-аниону малеиновой кислоты (малеината). Фермент лактатдегидрогеназа катализирует превращение только L-формы молочной кислоты, но полностью инертен к ее D-форме.

Биотехнологам по специфике своей деятельности необходимо работать с ферментными препаратами. На примере ферментного препарата амилосубтилина ГЗ× разберем свойства, состав, правила приемки и отбора проб, а также методы определения одной из ферментативных активностей данного ферментного препарата.

Технические условия на препарат ферментный амилосубтилин ГЗ× рассматривает ГОСТ 57232.

Область применения

Настоящий стандарт распространяется на ферментный препарат амилосубтилин ГЗ×, предназначенный для применения в животноводстве в качестве добавки к кормам, комбикормам, в премиксы, а также в других отраслях, где необходим гидролиз крахмалсодержащих субстратов.

Препарат представляет собой гигроскопичный порошок, получаемый высушиванием на распылительной сушилке культуральной жидкости при глубинном культивировании *Bac. subtilis*, штаммы которого должны иметь разрешение к применению, утвержденное в установленном порядке.

Технические требования

Препарат амилосубтилин ГЗ× должен быть изготовлен в соответствии с требованиями настоящего стандарта по технологическому регламенту, утвержденному в установленном порядке.

Характеристики. Для изготовления препарата амилосубтилин ГЗ× применяют сырье и вспомогательные материалы в соответствии с технологическим регламентом. В качестве наполнителей используют: соль поваренную пищевую, мел химически осажденный, муку кукурузную.

В зависимости от амилолитической активности препарат амилосубтилин ГЗ× выпускают трех групп: I, II и III.

Для применения в качестве добавки к кормам используют препарат второй и второй групп.

По физико-химическим и биологическим показателям препарата амилосубтилина ГЗ× должен соответствовать требованиям, указанным в таблице 18.

Препарат хорошо растворим в воде, но допускается выпадение в осадок нерастворимого наполнителя

Таблица 18 – Физико-химические и биологические показатели препарата амилосубтилин ГЗ×

Наименование показателя	Норма для групп		
	I	II	III
Внешний вид и цвет	Порошок от светло-бежевого до светло-коричневого		
Массовая доля остатка после просеивания для препарата с наполнителями:			
с мелом и солью поваренной на сите из проволочной сетки № 025, %, не более	20,0		
с кукурузной мукой на сите из проволочной сетки № 067, %, не более	5,0		
Массовая доля влаги препарата с наполнителями: мелом и солью поваренной, %, не более	8,0		
Мукой кукурузной, % не более	15		
Амилолитическая активность (АС), ед/г	600±60	1000±100	1500±150
Протеолитическая активность (ПС), ед/г	4,6	5,0	5,4
Безвредность в тест-дозе	безвреден		
Массовая доля поваренной соли, %, не более	50,0	–	–

Правила приемки

Приемка — по ГОСТ Р 57248. Настоящий стандарт распространяется на технические и очищенные ферментные препараты микробного происхождения и устанавливает правила приемки и методы отбора проб.

Ферментные препараты принимают партиями.

Партией считают однородные по физико-химическим и биохимическим показателям ферментные препараты, оформленные одним документом о качестве.

В документе о качестве должны быть указаны:

- наименование предприятия-изготовителя и товарный знак;
- наименование продукта;
- номер партии;
- количество мест в партии;
- дата выработки;
- показатели качества;
- дата выдачи документа.

Для контроля качества ферментного препарата отбор упаковочных единиц в выборку проводят методом случайного отбора в соответствии с таблицей 19.

Таблица 19 – Нормы выборки от общего количества упаковочных единиц

Объем партии ферментного препарата, упаковочная единица	Объем выборки, упаковочная единица
От 2 до 15	2
»16»25	3
»26»90	5
»91»150	8
»151»500	13
»501»1200	20
Св. 1200	32

При получении неудовлетворительных результатов испытания хотя бы по одному из показателей проводят повторные испытания на удвоенной выборке. Результаты повторных испытаний распространяются на всю партию.

Метод отбора проб

Из каждой отобранной упаковочной единицы отбирают точечную пробу. Пробоотборник автоматический по нормативно-технической документации.

Точечные пробы отбирают для:

- концентрированных ферментных препаратов и препаратов, полученных на распылительной сушилке при помощи специального мешочного щупа, погружаемого на всю глубину единицы упаковки по вертикальной оси;
- ферментных препаратов в виде упаренных сиропов после тщательного перемешивания пробоотборником, погружаемым на всю глубину единицы упаковки по вертикальной оси.

Отобранные точечные пробы соединяют вместе и получают объединенную пробу для:

- концентрированных ферментных препаратов и препаратов, полученных на распылительной сушилке, массой не менее 150 г,
- упаренных сиропов – не менее 1 дм³;
- сухих культур – не менее 1 кг,
- гранулированных препаратов – не менее 1 кг.

Объединенные пробы тщательно перемешивают, делят квартованием (Рисунок 72) на две части и помещают в сухие чистые стеклянные банки с притертыми пробками или полиэтиленовые мешочки, которые затем запаивают.

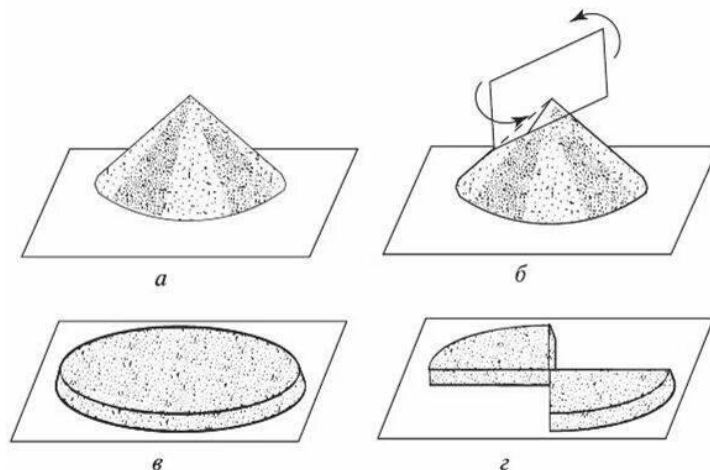


Рисунок 72 – Схема квартования средней пробы (для сыпучих объектов)

a – перемешанная куча, *б* – расплющивание кучи, *в* – расплющенная куча, *г* – куча, разделенная на секторы

Одну банку или мешочек передают в лабораторию для проведения микробиологического и физико-химического анализов; другую банку или мешочек хранят в течение 1 года – для очищенных препаратов; 6 мес. – для технических препаратов; 3 мес. – для сиропов.

На каждую банку или мешочек с пробой наклеивают этикетку с указанием:

- наименования препарата;
- даты выработки. - номера партии;
- даты отбора пробы;
- общего количества единиц упаковки.
- массы нетто партии;
- должности и подписи лица, отобравшего пробу

В удостоверении о качестве указывается фактическое содержание поваренной соли для препарата группы II, используемого в комбикормовой промышленности.

Безвредность в тест-дозе определяется в каждой десятой партии препарата, предназначенного для животноводства. При получении неудовлетворительных результатов испытания переводят в приемосдаточные до получения положительных результатов на трех партиях.

Методы анализа

Определение безвредности в тест-дозе

Для определения безвредности препарата амилосубтилин ГЗ× пяти мышам массой тела 20–24 г перорально вводят ежедневно в течение 5 дней по 0,5 см³ раствора с массовой долей препарата 0,5 %. (Препарат с наполнителем кукурузной мукой предварительно измельчают до порошкообразного состояния и фильтруют.) Наблюдение продолжают в течение двух последующих суток. Препарат считают безвредным, если все мыши остаются живыми. При гибели хотя бы одного животного проверку проводят на удвоенном количестве мышей. При повторном опыте в случае гибели хотя бы одного животного препарат считают не соответствующим требованиям стандарта.

Методы определения амилолитической активности (ГОСТ 54330)

Настоящий стандарт распространяется на ферментные препараты и ферментсодержащие смеси (источники α-амилазы и глюкоамилазы с использованием в качестве субстрата крахмал), используемые в пищевой промышленности, и устанавливает методы определения амилолитической активности.

Примечания.

1 Амилолитическую активность исследуемых ферментных препаратов (ФП) обеспечивают ферменты: α-амилаза и глюкоамилаза, катализирующие гидролиз крахмала.

2 Системные названия ферментов:

– α-1,4-глюкан-4-глюканогидролаза (ЕС 3.2.1.1) – α-амилаза – фермент с эндогенным механизмом действия, катализирующий гидролиз α-1,4-гликозидных связей крахмала с образованием α-декстринов, олигосахаридов и мальтозы;

– α-1,4-глюкан-глюкогидролаза (ЕС 3.2.1.3) – глюкоамилаза – фермент с экзогенным механизмом действия, катализирующий гидролиз α-1,4 и α-1,6-гликозидных связей крахмала, декстринов, олигосахаридов, последовательно отщепляя при этом остатки молекулы глюкозы от нередуцирующих концов субстрата с образованием глюкозы.

Термины и определения. В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

гидролиз: Расщепление исходного соединения на более простые в присутствии молекул воды.

ферментативный гидролиз: Расщепление высокомолекулярных соединений при участии катализаторов белковой природы – гидролитических ферментов

субстрат: Соединение или вещество, на которое воздействует данный фермент.

крахмал: Высокомолекулярный полисахарид, в котором остатки глюкозы соединены α-гликозидными связями, состоящий из амилозы и амилопектина.

прогидролизованный крахмал: Крахмал, подвергнутый действию амилолитических ферментов, различной степени деструкции в зависимости от активности фермента.

системные названия ферментов: Названия, указывающие природу химической реакции, катализируемой данным ферментом, в соответствии с современной классификацией (КФ, либо ЕС), принятой Международной комиссией по ферментам.

амилолитический комплекс: α -амилазы микробного происхождения, катализирующие гидролиз крахмала, продуцентами которых являются бактерии и мицелиальные грибы.

бактериальные α -амилазы: Ферменты, которые катализируют гидролиз крахмала до декстринов различной степени полимеризации.

Примечание – действие мезофильных α -амилаз проявляется при температуре 60 °С–70 °С; термостабильных α -амилаз – при температуре более 80 °С.

грибные α -амилазы: Ферменты, которые катализируют расщепление субстрата с более глубокой степенью гидролиза, чем бактериальные; при этом образуются как низкомолекулярные декстрины, так и мальтоза и глюкоза.

ферментативная активность: Количество фермента, катализирующее гидролиз 1 мкмоль субстрата в определенных условиях.

Сущность метода Метод основан на количественном определении прогидролизованного крахмала в результате его гидролиза ферментами амилолитического комплекса до декстринов различной молекулярной массы в стандартных условиях (температура 30 °С, значение pH 6,0 – для бактериальных и 4,7 – для грибных α -амилаз, продолжительность гидролиза 10 мин).

За единицу амилолитической активности (АС) принято такое количество фермента, которое при определенных значениях pH (6,0 – для бактериальных и 4,7 – для грибных α -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/см³ (для жидкого) анализируемого ферментного препарата.

Количество прогидролизованного крахмала определяется колориметрическим методом по степени окраски остаточного крахмала раствором йода.

Подготовка к анализу. Приготовление раствора крахмала с массовой долей 1,0 % (субстрат) 1,00 г крахмала в пересчете на абсолютно сухое вещество, учитывая влагу по ГОСТ Р 55802, помещают в мерную колбу вместимостью 100 см³, добавляют 25 см³ дистиллированной воды и перемешивают. Затем добавляют в колбу еще 25 см³ дистиллированной воды, помещают колбу в кипящую водяную баню не менее чем на 15–20 мин, непрерывно перемешивая содержимое до полного растворения крахмала. После этого содержимое колбы охлаждают, добавляют 10 см³ ацетатного буферного раствора с pH 4,7 (см. далее) (для препаратов грибного происхождения) или фосфатного буферного раствора с pH 6,0 (см. далее) (для препаратов бактериального происхождения), объем жидкости доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и содержимое колбы перемешивают. Для полученного раствора крахмала характерна легкая опалесценция. Раствор крахмала готовят в день проведения анализа.

Приготовление ацетатного буферного раствора молярной концентрации 1,0 моль/дм³ с pH 4,7 из растворов уксуснокислого натрия и уксусной кислоты

Приготовление раствора уксуснокислого натрия молярной концентрации 1,0 моль/дм³ (раствор А). В мерную колбу вместимостью 1 дм³ помещают (82,00 ± 0,01) г (или (136,00 ± 0,01) г CH₃COONa × 3H₂O) безводного уксуснокислого натрия и растворяют приблизительно в 300 см³ дистиллированной воды. Затем доводят до метки

дистиллированной водой при температуре 20 °С и перемешивают. Срок хранения раствора в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С – не более четырех недель.

Приготовление раствора уксусной кислоты молярной концентрации 1,0 моль/дм³ (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 1 дм³ вносят 58 см³ ледяной уксусной кислоты, приливают около 300 см³ дистиллированной воды, доводят до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и снова перемешивают. Срок хранения раствора в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С – не более четырех недель.

Для приготовления ацетатного буферного раствора в колбе смешивают растворы уксуснокислого натрия (раствор А) и уксусной кислоты (раствор Б) в равных объемах, создавая значение рН смеси, равное 4,7. При необходимости доводят рН раствора до 4,7 одним из исходных растворов. Срок хранения буферного раствора в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С – не более четырех недель.

Приготовление фосфатного буферного раствора молярной концентрации 1/15 моль/дм³ с рН 6,0 из растворов натрия фосфорнокислого двузамещенного и калия фосфорнокислого однозамещенного.

Приготовление раствора фосфорнокислого натрия двузамещенного 12-водного молярной концентрации 1/15 моль/дм³ (раствор А). В мерную колбу вместимостью 1 дм³ помещают (23,87 ± 0,01) г натрия фосфорнокислого двузамещенного, содержащего 12 молекул воды, растворяют в 300 см³ дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С.

Приготовление раствора фосфорнокислого калия однозамещенного молярной концентрации 1/15 моль/дм³ (раствор Б). В мерную колбу вместимостью 1 дм³ помещают (9,087 ± 0,001) г калия фосфорнокислого однозамещенного, растворяют в 300 см³ дистиллированной воды и доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С.

Для приготовления фосфатного буферного раствора молярной концентрации 1/15 моль/дм³ с рН 6,0 растворы А и Б смешивают в соотношении 1:9. Величину рН проверяют на рН-метре. В случае отклонения рН фосфатного буферного раствора от 6,0 его доводят до нужного значения раствором А или Б. Срок хранения буферного раствора в закрытой стеклянной посуде при температуре 4 °С – не более четырех недель.

Приготовление раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм³. 41,0 см³ концентрированной соляной кислоты наливают в мерную колбу вместимостью 1 дм³ и доводят объем до метки при температуре 20 °С дистиллированной водой (не забываем правило, кислоту в воду!).

Приготовление раствора йода. Приготовление основного раствора йода (0,50 ± 0,01) г йода и (5,0 ± 0,01) г йодистого калия растворяют в стаканчике для взвешивания с притертой пробкой в небольшом количестве воды. Содержимое перемешивают на магнитной мешалке при плотно закрытой крышке бюкса. Раствор после полного растворения йода переносят количественно в мерную колбу с притертой крышкой вместимостью 200 см³ и объем доводят дистиллированной водой при температуре 20 °С до метки. Раствор йода хранят в склянке из темного стекла с притертой пробкой – не более 1 мес.

Приготовление рабочего раствора йода 20 см³ основного раствора йода (см. выше) разводят раствором соляной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм³ при анализе препаратов грибного и бактериального происхождения в мерной колбе объемом 1 дм³. Перед употреблением рабочего раствора проверяют его оптическую плотность на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре в диапазоне длин световых волн $\lambda = 440$ нм в кюветах с толщиной поглощающего свет слоя 10 мм. Оптическая плотность рабочего раствора йода, измеренная в сравнении с дистиллированной водой, должна иметь значение $0,22 \pm 0,01$. В случае отклонения от этого значения добавляют раствор соляной кислоты молярной концентрации 0,5 моль/дм³ или основного раствора йода до достижения нужной величины оптической плотности.

Подготовка пробы. Отбор проб – по ГОСТ Р 57248. Анализируемые пробы ферментных препаратов в форме порошка или жидком виде используют без предварительной подготовки.

Приготовление основного раствора анализируемой пробы ферментного препарата. В стаканчик для взвешивания помещают 0,100 г порошкообразного ферментного препарата или 1,00 г жидкого ферментного препарата и суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды. Суспензию количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят объем до метки дистиллированной водой при температуре 20 °С и тщательно перемешивают.

Приготовление рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата Рабочий раствор анализируемого ферментного препарата готовят из основного раствора путем дальнейшего разведения его в дистиллированной воде таким образом, чтобы при определении активности коэффициент С (см. далее), характеризующий степень гидролиза крахмала, находился в пределах 0,02 – 0,07. Каждую пробу ферментного препарата анализируют дважды при соблюдении условий повторяемости по ГОСТ Р ИСО 5725-1–2002. Раствор готовят в день определения. Длительность использования рабочего раствора ферментного препарата не должна превышать 1 ч с момента приготовления во избежание потерь его ферментативной активности.

Ход работы.

В две пробирки размером 21×200 мм вносят по 10 см³ субстрата 1 %-ного раствора крахмала (субстрат). Содержимое пробирок прогревают в ультратермостате при температуре $(30,0 \pm 1,0)$ °С в течение 5 мин.

В две пробирки с субстратом добавляют по 5,0 см³ рабочего раствора анализируемой пробы ферментного препарата по, предварительно прогретого при температуре 30 °С, тщательно перемешивают и включают секундомер, отмечая начало ферментативной реакции. Реакционную смесь инкубируют при температуре $(30,0 \pm 1,0)$ °С в течение 10 мин (с точностью, определяемой по секундомеру от начала ферментативной реакции).

По окончании реакции отбирают 0,5 см³ инкубационной смеси и вносят в колбу с 50 см³ рабочего раствора йода.

Содержимое колбы перемешивают и измеряют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине световой волны $\lambda = 670$ нм в кюветах при толщине поглощающего свет слоя 10 мм в сравнении с дистиллированной водой, получая значение оптической плотности D_2 (см. далее).

В качестве контроля используют 1 %-ный раствор крахмала объемом 10 см³, в который вместо раствора анализируемого фермента добавляют 5,0 см³ дистиллированной воды. Полученную смесь прогревают при температуре 30 °С в течение 10 мин. По окончании реакции отбирают 0,5 см³ инкубационной смеси и вносят в колбу с 50 см³ рабочего раствора йода, получая значение оптической плотности D_1 .

После добавления к рабочему раствору йода инкубационной смеси раствор приобретает фиолетовую окраску различной интенсивности в зависимости от количества непрогидролизованного крахмала; цвет контрольного раствора – синий.

Обработка результатов

Степень гидролиза крахмала C определяют по разности оптической плотности контрольного раствора и анализируемого раствора. C вычисляют по формуле

$$C = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1$$

где D_1 – оптическая плотность контрольного раствора;

D_2 – оптическая плотность анализируемого раствора;

0,1 – масса крахмала, взятого на анализ, г.

Если коэффициент C , характеризующий степень гидролиза крахмала, меньше 0,02 или больше 0,07, то анализ повторяют, подбирая другое разведение анализируемой пробы так, чтобы раствор содержал большее или меньшее количество фермента соответственно.

Расчет амилолитической активности в анализируемой пробе.

Расчет амилолитической активности в анализируемом препарате бактериального происхождения:

а) Амилолитическую активность препаратов бактериальной мезофильной α -амилазы (AC_{6M}), ед. AC/g (для порошкообразного препарата) или ед. AC/cm^3 (для жидкого препарата), рассчитывают по формуле

$$AC_{6M} = \frac{5,885 \cdot C + 0,0017}{n} \cdot d$$

где 5,885; 0,0017 – коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости массы прогидролизованного крахмала от массы фермента, взятого для анализа, в пересчете на 1 ч действия фермента;

C – коэффициент, характеризующий степень гидролиза крахмала;

n – масса ферментного препарата с учетом разведения, взятая для испытания, г;

d – плотность ферментного препарата по ГОСТ 18481 (для жидкого препарата), г/см³,

б) Амилолитическую активность для препаратов бактериальной термостабильной α -амилазы ($АС_{бт}$), ед. АС/г (для порошкообразного препарата) или ед. АС/см³ (для жидкого препарата), рассчитывают по формуле

$$АС_{бт} = \frac{6,6138 \cdot C - 0,0192}{n} \cdot d$$

где 6,6138; 0,0192 – коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости массы прогидролизованного крахмала от массы фермента, взятого для анализа, в пересчете на 1 ч действия фермента;

C – коэффициент, характеризующий степень гидролиза крахмала;

n – масса ферментного препарата с учетом разведения, взятая для испытания, г;

d – плотность ферментного препарата по ГОСТ 18481 (для жидкого препарата), г/см³.

Расчет амилолитической активности в анализируемом препарате грибной α -амилазы.

Амилолитическую активность для препаратов грибной α -амилазы ($АС_{г}$), ед. АС/г (для порошкообразного препарата) или ед. АС/см³ (для жидкого препарата), рассчитывают по формуле

$$АС_{г} = \frac{7,264 \cdot C - 0,0377}{n} \cdot d$$

где 7,264; 0,0377 – коэффициенты расчетного уравнения, полученные при математической обработке экспериментальных данных зависимости массы прогидролизованного крахмала от массы фермента, взятого для анализа, в пересчете на 1 ч действия фермента.

Вычисления проводят до второго десятичного знака с последующим округлением до первого десятичного знака, если полученное значение амилолитической активности 100 ед. АС/г (см³) и менее. Вычисления проводят до первого десятичного знака с последующим округлением до целого числа, если полученное значение амилолитической активности более 100 ед. АС/г (см³).

Оформление результатов измерений. За окончательный результат принимают среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, выполненных в условиях повторяемости, если выполняется условие приемлемости. Результат анализа представляют в виде

$$\bar{X} \pm \Delta \text{ при } P = 0,95,$$

где X – среднеарифметическое значение результатов двух параллельных определений, признанных приемлемыми, ед. АС/г (для порошкообразного препарата) или ед. АС/см³ (для жидкого препарата);

Δ – значение границ абсолютной погрешности измерений, ед. АС/г (для порошкообразного препарата) или ед. АС/см³ (для жидкого препарата), определяемое по формуле

$$\Delta = 0,015 \delta \cdot \bar{X},$$

где δ – границы относительной погрешности результата анализа амилолитической активности в анализируемой пробе при $P = 0,95$ составляют $\pm 8 \%$.

Сходимость и воспроизводимость результатов. Результаты измерений, полученные в условиях повторяемости (сходимости), признаются удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \cdot 100 \leq r$$

где X_1 и X_2 – окончательные результаты измерений, полученные в двух лабораториях в точном соответствии с методикой, ед. АС/г (для порошкообразного препарата) или ед. АС/см³ (для жидкого препарата);

\bar{X} – среднеарифметическое значение двух окончательных результатов измерений, полученных в условиях воспроизводимости, ед. АС/г (для порошкообразного препарата) или ед. АС/см³ (для жидкого препарата);

r – предел повторяемости (сходимости) при $P = 0,95$, равный 8 %.

Результаты измерений, полученные в условиях воспроизводимости по ГОСТ Р ИСО 5725-2, признаются удовлетворительными, если выполняется условие приемлемости

$$\frac{|X_1 - X_2|}{\bar{X}} \cdot 100 \leq CD_{0,95}$$

$CD_{0,95}$ – критическая разность, равная 10 %.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте понятие «специфичность действия ферментов», назовите виды специфичности.
2. Что собой представляют амилолитические ферменты? Каковы различия в характере их действия на крахмал?
3. Каково значение амилаз в хлебопечении; в бродильных производствах?
4. Какие ферментные препараты применяются в бродильных производствах? Что они собой представляют?
5. Как оценивают активность амилолитических ферментов? В чем ее выражают?
6. Назовите системное (систематическое) название ферментов, проявляющих амилазную активность.

Список литературы

1. Пищевые ингредиенты в продуктах питания: от науки к технологиям : монография / под редакцией В. А. Тутельяна [и др.]. – 2-е изд., испр. и доп. – Москва : МГУПП, 2021. – С. 411 – ISBN 978-5-9920-0377-2. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/277136> (дата обращения: 28.05.2024).
2. **Биссвангер, Х.** Практическая энзимология : учебное пособие / Х. Биссвангер ; перевод с английского Т. П. Мосоловой. – 3-е изд. – Москва : Лаборатория знаний, 2017. – 331 с. – ISBN 978-5-00101-470-6.
3. **Паевский, А.** Нобелевские лауреаты: Эдуард Бухнер / А. Паевский. – Текст электронный // Индикатор.ru : [сайт]. – 2017. – 6 апр. – URL: <https://indicator.ru/chemistry-and-materials/nobelevskie-laureaty-eduard-buhner.htm> (дата обращения 12.08.2024).
4. **Дейхман, У., Шустер, С., Мазат, Дж.П., Корниш-Боуден А.** В память о работе Михаэлиса-Ментена 1913 года "Кинетика инвертированного мира: три перспективы". // FEBS J. 2014 Jan; 281 (2): 435-63. doi: 10.1111/febs.12598. Epub 2013, 13 декабря. PMID: 24180270. Deichmann U, Schuster S, Mazat JP, Cornish-Bowden A. Commemorating the 1913 Michaelis-Menten paper Die Kinetik der Invertinwirkung: three perspectives. FEBS J. 2014 Jan;281(2):435-63. doi: 10.1111/febs.12598. Epub 2013 Dec 13. PMID: 24180270. URL: https://www.researchgate.net/publication/258248284_Commemorating_the_1913_Michaelis-Menten_paper_Die_Kinetik_der_Invertinwirkung_Three_perspectives (дата обращения 13.08.2024).
5. Maud Menten – Wikipedia : [сайт]. URL: [https://w.wiki/Bp\\$с](https://w.wiki/Bp$с) (дата обращения 12.08.2024).
6. Большая Медицинская Энциклопедия (БМЭ), под редакцией Петровского Б.В., 3-е издание. – Т.28. URL: <https://бмэ.орг/index.php/ЭНЗИМОЛОГИЯ> (дата обращения 10.09.2024)
7. **Паевский, А.** Нобелевские лауреаты: Джеймс Самнер. Однорукий биохимик / А. Паевский. – Текст электронный // Индикатор.ru : [сайт]. – 2018. – 24 июня. – URL: <https://indicator.ru/chemistry-and-materials/dzhejms-samner.htm> (дата обращения 12.08.2024).
8. **Шлейкин, А.Г., Скворцова, Н.Н., Бландов, Н.Н.** Прикладная энзимология. – СПб: Университет ИТМО, 2019. – 160 с.
9. **Маурина, О.Н.** Химия белка и ферментов. Часть I. Химия белка [Текст]: учебное пособие / О.Н. Маурина. – Самара : Изд-во «Универс групп», 2007 – 100 с. ISBN 978-5-467-00133-3
10. **Кольман, Я.** Наглядная биохимия [Электронный ресурс] / Я. Кольман, К.-Г. Рём ; пер. с англ. Т. П. Мосоловой. — 6-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 514 с.). — М. : Лаборатория знаний, 2019. — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10". ISBN 978-5-00101-645-8.
11. IUBMB.ORG: Международный союз биохимии и молекулярной биологии URL: <https://iubmb.org/>(дата обращения 12.08.2024). – Текст электронный.

12. **Шомбург, Д., Шомбург, И.** Базы данных ферментов. Методы молекулярной биологии. 2010;609:113-28. doi: 10.1007/978-1-60327-241-4_7. PMID: 20221916.
13. Энзимология : электронный учебно-методический комплекс для специальности: 1-31 01 02 «Биохимия» / БГУ, Биологический фак., Каф. биохимии ; сост. Т. А. Кукулянская. – Минск : БГУ, 2022. – 71 с.
14. **Хан, М.Р.** Иммуобилизованные ферменты: всесторонний обзор. *Bull Natl Res Cent* **45**, 207 (2021). URL: <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00649-0>
15. **Юрин, В. М.** Иммуобилизованные клетки и ферменты: курс лекций / В.М. Юрин. Минск: БГУ, 2006.
16. **Разговоров, П.Б.** Биосинтез ферментов и получение ферментных препаратов: учеб. пособие / П.Б. Разговоров, Е.В Кудрик; Иван. гос. хим.- технол. ун-т. – Иваново, 2012. – 124 с.
17. **Яровенко, В.Л.** Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий/ В.Л. Яровенко, К.А. Калунянц, Л.И. Гоглер – М.: Пищ. пром-сть, 1970. – 444 с.
18. Химия пищевых продуктов [Текст] : перевод с англ. яз. 4-го издания / ред.-сост.: Шринивасан Дамодаран, Кирк Л. Паркин, Оуэн Р. Феннема. – Санкт-Петербург : Профессия, 2012. – 1039 с. ISBN 978-5-904757-24-3.
19. Толлефсон, Дж. Семь миллиардов и не предел // *Nature*. – 2011. – №478. –Р. 300. URL: <https://doi.org/10.1038/478300a>. (дата обращения 12.08.2024). – Текст электронный.
20. **Агафонова Е. А., Шейда Е. В., Кван О. В.** Использование ферментов в кормлении крупного рогатого скота, последствия для здоровья и продуктивности // *Животноводство и кормопроизводство*. 2023. – №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ispolzovanie-fermentov-v-kormlenii-krupnogo-rogatogo-skota-posledstviya-dlya-zdorovya-i-produktivnosti> (дата обращения: 22.10.2024).
21. Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения : учебник / А. Ю. Просеков, О. А. Неверова, Г. Б. Пищиков, В. М. Позняковский. — 2-е изд., перераб. и доп. — Кемерово : КемГУ, 2019. — 262 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/135193> (дата обращения: 12.08.2024). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
22. **Голубцова, Ю. В.** Биотехнология пищевого сырья и продуктов питания : учебное пособие / Ю. В. Голубцова, О. В. Кригер, А. Ю. Просеков. — Кемерово : КемГУ, 2017. — 111 с. — ISBN 979-5-89289-123-2. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/103935> (дата обращения: 12.08.2024). — Режим доступа: для авториз. пользователей.
23. **Кабанов, А. В.** Структура и субстратная специфичность амилаз грибов рода *Aspergillus* / А. В. Кабанов, Н. А. Горбатовская, А. Г. Шлейкин // *Механика и технологии*. – 2014. – № 2(44). – С. 47-56. – EDN VLBXOT.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Приготовление 1М калий-фосфатного буфера			Приготовление 1М натрий-фосфатного буфера		
Требуемое значение рН	мл K_2HPO_4 , 1М	мл KH_2PO_4 , 1М	Требуемое значение рН	мл Na_2HPO_4 , 1М	мл NaH_2PO_4 , 1М
5,8	8,5	91,5	5,8	7,9	92,1
6,0	13,2	86,8	6,0	12,0	88,0
6,2	19,2	80,8	6,2	17,8	82,2
6,4	27,8	72,2	6,4	25,5	74,5
6,6	38,1	61,9	6,6	35,2	64,8
6,8	49,7	50,3	6,8	46,3	53,7
7,0	61,5	38,5	7,0	57,7	42,3
7,2	71,7	28,3	7,2	68,4	31,6
7,4	80,2	19,8	7,4	77,4	22,6
7,6	86,6	13,4	7,6	84,5	15,5
7,8	90,8	9,2	7,8	89,6	10,4
8,0	94,0	6,0	8,0	93,2	6,8

Учебное издание

**Вистовская Виктория Петровна,
Каменская Елена Петровна**

БИОТЕХНОЛОГИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Учебное пособие

Издано в авторской редакции

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Алтайский государственный
технический университет им. И.И. Ползунова»,
656038, г. Барнаул, пр-т Ленина, 46

[В начало](#)