

# Лекция: Ферментные препараты в пищевых биотехнологиях

## План лекции

1. Значение ферментов, источники их получения
2. Промышленные ферментные препараты
3. Факторы, влияющие на биосинтез ферментов
4. Применение ферментативных препаратов

### 1. Значение ферментов, источники их получения

Ферменты (энзимы) - катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах. Ферменты не изменяются и не расходуются в процессе реакции, ускоряют только те реакции, которые могут протекать и без них. Скорость протекания реакции при участии ферментов на несколько порядков выше, чем под влиянием химических катализаторов. Для ферментативных реакций характерен почти 100% выход продуктов. Ферменты обладают узкой специфичностью, действуют только на те же вещества, превращение которых они катализируют. В настоящее время в природе обнаружено свыше 3 тысяч ферментов.

Большинство биотехнологий основано на использовании биокатализаторов, потребность в которых постоянно возрастает. Единственным, неограниченным источником ферментов являются микроорганизмы, из которых можно выделить любые из известных в настоящее время ферментов. Исключение составляет **папаин** (размягчитель мяса), который получают из плодов папайи. Продуктивность штаммов микроорганизмов, производящих ферменты, можно увеличить с помощью мутагенных факторов в 2-5 раз. Пересадкой **плазмид** получают количество ферментов, достигающее 50% массы продуцируемого белка.

Синтезируемые микроорганизмами ферменты подразделяются на внеклеточные и внутриклеточные. К внеклеточным ферментам относятся амилаза, целлюлаза, лактаза, липаза, пектиназа, протеаза, к внутриклеточным - аспарагиназа, каталаза, инвертаза.

Внеклеточные ферменты получают из культуральной жидкости, предварительно отделанной от микроорганизмов. Для выделения внутриклеточных ферментов разрушают клеточные оболочки с помощью механических, физических, химических (действие кислот, растворителей), ферментативных и биологических методов.

Ферменты применяются в пищевой, фармацевтической, текстильной, кожевенной и других отраслях промышленности, в медицине, сельском хозяйстве, химическом синтезе.

Более широкое технологическое применение ферментов до последнего времени сдерживалось рядом причин, из которых важнейшими являются:

- 1) трудоемкость отделения ферментов от исходных реагентов и продуктов реакции;
- 2) неустойчивость ферментов при хранении, различных воздействиях (тепловых);
- 3) трудоемкость очистки ферментов и получения их в активном виде.

## **2. Промышленные ферментные препараты**

Использование микробных ферментов в некоторых отраслях промышленности началось более 70 лет назад. Большую часть, составляют **гидролазы** (реакции гидролиза), так как именно они являются основными в промышленной биотехнологии. От общего количества потребляемых ферментов 99% выпуска приходится на 16 препаратов.

Рассмотрим подробнее некоторые группы ферментов.

К **амилолитическим** ферментам относятся  $\alpha$ -амилаза,  $\beta$ -амилаза, глюкоамилаза. Их действие проявляется при гидролизе крахмала и гликогена.

Крахмал при гидролизе сначала расщепляется на более простые **полисахариды** - декстрины, а затем - до глюкозы.

Эти ферменты применяются в спиртовой промышленности, хлебопечении.

**Протеолитические** ферменты относятся к гидролазам, образуя группу пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках и пептидах. Важная их особенность - выборочный, селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин - только на связь между аргинином и лизином. Из них рН 1,5-3,7 имеют кислые протеазы; рН 6,5-7,5 - протеазы; рН > 8,0 - щелочные протеазы.

Применение **протеаз** широкое: мясная промышленность для умягчения мяса, кожевенная промышленность - при обезволивании (удаление волосяного покрова) и размягчении шкур; кинопроизводство - для растворения желатинового слоя на пленках при их регенерации; парфюмерия - при создании добавок в зубную пасту, кремы, лосьоны, промышленность синтетических моющих средств - при применении моющих добавок для удаления загрязнений белковой природы; медицина - при лечении воспалительных процессов, ожогов, тромбозов.

**Пектолитические** ферменты объединены в одну группу по внешнему проявлению своего действия - уменьшению молекулярной массы и снижению вязкости пектиновых веществ (пектин - пектиновые кислоты и протопектин) представителей полисахаридов. Они содержатся во фруктах, корнеплодах, стеблях (лен). Пектиновые вещества имеют молекулярную массу от 20000 до 200000. Все пектиназы делятся на два вида - гидролазы и трансэлиминазы. Применение в текстильной промышленности - вымачивание льна перед его переработкой, в виноделии - осветление вин,

уничтожение мутности, в консервировании - при приготовлении фруктовых соков.

**Целлюлолитические** ферменты очень специфичны, их действие проявляется лишь в деполимеризации молекул целлюлозы, обычно они действуют в виде комплекса, который в целом доводит гидролиз целлюлозы до глюкозы. Использование их очень перспективно в гидролизной промышленности - это получение глюкозы из целлюлозы; в медицинской - выделение лекарственных веществ (стероидов) из растений; в пищевой - улучшение качества растительных масел; в сельском хозяйстве - как добавки в комбикорма для жвачных животных. В мире производится около 530 т протеаз, 350 т глюкоамилазы, 350 т L-амилазы, 70 т глюкоизомеразы.

### **3. Факторы, влияющие на биосинтез ферментов**

Существует мнение, что из клеток микроорганизмов можно выделить любые из известных ферментов. Большинство микроорганизмов способно расти на относительно простых и дешевых питательных средах. Преодоление трудностей, связанных с их производством и использованием, связано с получением иммобилизованных ферментов.

Иммобилизация ферментов - это перевод их в нерастворимое состояние с сохранением (частичным или полным) каталитической активности.

Для получения иммобилизованных ферментов обычно применяют следующие методы:

1. Ковалентное присоединение молекул ферментов к водонерастворимому носителю, в качестве которого используют как органические (природные и синтетические) полимеры, так и неорганические материалы. К первым относятся целлюлоза, хитин, агароза, декстрины, бумага, ткани, полистирол, ионообменные смолы и так далее. Ко вторым - пористое стекло, силикагели, хромофоры, керамика, металлы и другие.
2. Захват фермента в сетку геля или полимера.

3. Ковалентная сшивка молекул фермента друг с другом или с инертными белками (при помощи би- или полифункционального реагента).
4. Адсорбция фермента на водонерастворимых носителях (часто на ионитах).
5. Микрокапсулирование (захват раствора фермента в полупроницаемые капсулы размером 5-300 мкм). В результате иммобилизации ферменты приобретают преимущества гетерогенных катализаторов. Их можно удалять из реакционной смеси и отделять от субстратов и продуктов ферментативной реакции) простой фильтрацией.

Иммобилизованные ферменты более устойчивы к внешним воздействиям, чем растворимые ферменты.

Принцип иммобилизации был применен не только к ферментам, но и к их субстратам - веществам, имеющим избирательное средство к ферментам. Это позволило создать метод выделения и очистки ферментов, основанный на **хроматографии** по сродству. Облегчилось выделение чистых ферментов.

В последнее время применяют иммобилизованные клетки микроорганизмов, содержащих естественный набор ферментов. Отпадают стадии выделения, очистки и иммобилизации ферментов. Ферменты в микроорганизме находятся в наиболее естественном окружении, что положительно сказывается на их термостабильности и операционной стабильности (продолжительности работы в условиях опыта). Ферменты в составе клеток микроорганизмов долго сохраняют каталитические свойства. Они также являются гетерогенными биокатализаторами со всеми преимуществами их использования в технологических целях.

Иммобилизация клеток обычно проводится их адсорбцией на водонерастворимых носителях (часто на ионообменных смолах), ковалентной сшивкой с помощью **бифункциональных** реагентов (например, **глутарового**

альдегида) или захвата их в полимер, как правило, с последующим формированием в виде частиц определенного размера и конфигурации.

Иммобилизация целых клеток микроорганизмов предотвращает их размножение и обычно увеличивает сохранность и срок работы в качестве катализатора по сравнению с необработанными клетками.

Состав и количество синтезируемых клетками ферментов зависит от наследственных свойств данного организма. Под действием мутагенных факторов (ионизирующее и неионизирующее излучения, изотопы, антибиотики, химические соединения, обладающие высокой преобразующей способностью по отношению к наследственным элементам клетки), получают промышленно ценные штаммы мутантов.

Производительность технологических процессов по каждому ферменту зависит и от питательной среды, имея в виду наличие в ней не только источников углерода, азота, фосфора и других элементов, но и веществ, играющих роль индукторов или **репрессоров** биосинтеза данного конкретного фермента или их групп. Например, фермент липаза почти не синтезируется грибом на среде без индуктора, внесение кашалотового жира усиливает биосинтез фермента в сотни раз. Этот же вид гриба при добавлении в среду крахмала и полном исключении минерального фосфора интенсивно синтезирует другой фермент - **фосфатазу**.

Для интенсификации процесса роста и синтеза ферментов часто добавляют всевозможные вытяжки или экстракты, содержащие дополнительные факторы роста. К ним относятся, прежде всего, аминокислоты. Они легко проникают внутрь клетки и специфически влияют на образование фермента. Механизм их действия заключается в компенсации недостающих свободных внутриклеточных аминокислот, необходимых для синтеза фермента. Факторами роста являются также **пуриновые** основания и их производные, РНК и продукты ее гидролиза. Все рассмотренные факторы должны учитываться при составлении питательных сред для культивирования продуцентов ферментов. В промышленных средах в качестве источников

органического углерода и азота чаще всего используют различные сорта крахмала (картофельный, кукурузный, рисовый), кукурузный экстракт, соевую муку и т. д. Микроорганизмы для своего роста могут утилизировать и минеральные соединения азота, которые превращаются в аммиак, необходимый для синтеза сложных азотсодержащих органических соединений.

Оптимальный состав питательной среды для каждого продуцента может быть определен двумя способами: методом эмпирического подбора и с использованием математических методов оптимизации (ЭВМ).

Все технологические процессы производства ферментных препаратов делятся на две принципиально отличные группы: в первом случае ферментация ведется глубинным методом в жидкой питательной среде, во втором используется поверхностная культура, растущая на специально подготовленной рыхлой и увлажненной питательной среде.

#### 4. Применение ферментативных препаратов

Ферменты немикробного происхождения находят применение сравнительно реже в силу различных причин, в частности: низкой Лабильности, дороговизны, сезонности получения и других факторов. Но в ряде случаев, в отсутствие микробного аналога, для коммерческих целей выделяют ферменты растительного и животного происхождения. Примерами таких ферментов могут служить ренин животного происхождения, **фицин** выделенный из инжира, **папаин** и др. Для получения в производственном масштабе ферментов растительного и животного происхождения в последнее время с успехом используют культивирование тканей и отдельных органов. Предположительно этот метод должен значительно удешевить и соответственно увеличить удельную долю коммерческих ферментов растительного происхождения.

Хотя промышленные ферменты иногда реализуются в виде технических препаратов, определенная их часть подвергается экстракции и очистке. При этом решается несколько задач: удаляют токсичные и нежелательные метаболиты и микроорганизмы, стандартизуют активность. Таким образом обеспечивается более высокое качество препарата и его стабильность, также можно придать препарату желаемые аромат и цвет. Главная трудность возникает из-за неоднородного состава культуральных жидкостей, которые часто содержат большие количества коллоидов и имеют высокую вязкость.

По данным 1990 г., на мировом рынке коммерческий оборот от реализации технических ферментных препаратов составил 800 млн. долларов. 80% всех производимых технических ферментов используется в следующих трех отраслях промышленности: гидролиз крахмала - 40%, производство детергентов - 30%, производство сыра-10%.

Основу промышленной переработки **крахмала** составляет возможность его превращения в сбраживаемые сахара (глюкоза, мальтоза, изомальтоза), концентрированные сахара-сиропы (глюкоза, фруктоза) и низкомолекулярные олигосахариды-декстрины. Эти соединения используются при производстве ряда пищевых продуктов и напитков. Из существующих методов гидролиза крахмала (кислотный, ферментативный) ферментативный обладает рядом несомненных преимуществ.

**Использование ферментов с детергентами.** Все микробные протеазы можно разделить на три класса: сериновые протеазы, металлопротеазы и кислые протеазы. Сериновые и металлопротеазы образуются бактериальными культурами, кислые протеазы образуют микроскопические грибы.

*Сериновые и металлопротеазы.* Эта группа ферментов довольно широко распространена среди бактерий.



Металлопротеазы используются в пивоваренной и спиртовой промышленности. При производстве пива использование протеаз связано с предотвращением образования мути, являющейся результатом выпадения в осадок белковых компонентов пива. Кроме металлопротеаз для этой цели используются растительные ферменты: бромелин и папаин.

При производстве пищевого спирта ячменный солод заменяют несолодовыми зерновыми. С целью получения сбраживаемых сахаров в среду, предназначенную для сбраживания, добавляют L-амилазу и протеазу.

Кислые протеазы. Ферменты этого типа встречаются у бактерий, но преобладают у высших грибов. Чаще всего эти ферменты, ввиду их способности коагулировать молоко, используются как заменители реннина (фермент получаемый из сычуга молодняка жвачных).

Из культуры *Aspergillus oryzae*, осаждением органическими растворителями получают **такадиастазу**, ферментный препарат, содержащий кислую и нейтральную протеазы, L -амилазу, а также целлюлазы и пектиназы. Препарат используется для гидролиза соевого белка, при изготовлении очень популярного в восточных странах соевого соуса.

У свертывающих молоко ферментов коагулирующая активность должна преобладать над протеолитической активностью. Сущность процесса коагуляции заключается в образовании комплекса казеина с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ . Сычуг — экстракт желудков телят содержит фермент ренин, который считается наиболее подходящим для этой цели протеолитическим ферментом. Замена дорогостоящего и дефицитного сычужного фермента на дешевый и доступный фермент микробного происхождения является фактором, определяющим дальнейшее развитие сыродельной промышленности.

Грибные протеазы широко используются для деградации клейковины до постоянного уровня. Это позволяет стандартизовать операцию процесса хлебопечения и сократить периоды замешивания и выдержки.

Использование других ферментов (глюкозооксидаза, фруктофуранозидаза, галактозидаза, пектиназы, папаин, трипсин, химотрипсин, а также некоторые протеазы грибного и бактериального происхождения) значительно увеличилось и практически удваивается каждые 10 лет.

В ближайшем будущем значительный рост использования ферментных препаратов связан с возможностью ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных субстратов с целью получения сахара для пищевых целей. В этом направлении ведется большая работа: селективно отобрано свыше 200 культур микроскопических грибов, характеризующихся суперсинтезом внеклеточных целлюлаз; получено более 20 бактериальных культур-трансформантов, осуществляющих синтез отдельных компонентов целлюлаз (в основном эндоглюканазы); налажены технологии, позволяющие производить около 50 разных коммерческих препаратов целлюлаз, отличающихся составными целлюлазными активностями, разработаны различные технологии предобработки лигноцеллюлозных материалов, увеличивающие выход глюкозы в результате ферментативного гидролиза и др. Существующее положение вселяет надежду на то, что в ближайшем будущем эта важнейшая проблема будет все-таки решена. В таком случае ожидается массовый выпуск разных типов целлюлаз (термостабильных, действующих в щелочной среде; целлюлаз, обогащенных отдельными компонентами, и др.) в количестве, превосходящем все существующие масштабы современной ферментной индустрии.

Что касается производства ферментных препаратов высокой чистоты, то это магистральное направление всей отрасли, тем более что за последнее десятилетие значительно усовершенствованы методы очистки ферментов в промышленном масштабе. Это способствовало более широкому использованию ферментов в медицине, хотя надо отметить, что число используемых в медицинской практике ферментов высокой степени чистоты не превышает нескольких десятков.

**Иммобилизованные ферменты.** Лет 20-25 тому назад считалось, что использование иммобилизованных ферментов может коренным образом изменить ферментную индустрию, в особенности проблемы, связанные с дороговизной и сложностью выделения ферментов. Иммобилизованные ферменты нашли самое разнообразное использование в медицине, фармацевтической, химической и пищевой промышленности, в аналитических целях, в качестве ферментных электродов для определения концентрации Сахаров, аминокислот и других соединений. Кроме того, возможность использования иммобилизованных ферментов привела к созданию таких новых направлений, как радиоиммунный и ферментативный иммуносорбентный анализ. Однако, несмотря на это, иммобилизованные ферменты не применяются в практических целях в таких масштабах, которые предполагались.

Методы получения и типы иммобилизованных ферментов многократно описаны; кроме того, им посвящен ряд обзоров и многочисленные оригинальные публикации как на русском, так и на английском языках, поэтому, по мнению авторов, нецелесообразно в рамках этой книги детально рассматривать эти вопросы. Ограничимся тем, что лишь отметим те преимущества, которыми обладают иммобилизованные ферменты по сравнению со своими растворимыми аналогами:

- иммобилизованные ферменты легко отделяются от реакционной среды и могут быть использованы повторно;
- ферменты в иммобилизованном состоянии проявляют повышенную стабильность к экстремальным условиям и сохраняют активность в течение более длительного времени;
- использование иммобилизованных ферментов позволяет разрабатывать непрерывные технологии;

—методами иммобилизации возможно создание **мультиферментных** иммобилизованных композиций, это, в свою очередь, позволяет осуществлять последовательные ферментные реакции разных процессов.

Иммобилизованные ферменты характеризуются и некоторыми недостатками. В результате иммобилизации в ряде случаев наблюдается уменьшение удельной активности системы. Происходит это в силу разных причин. Например, ковалентное связывание фермента с носителем может вовлекать во взаимодействие какой-нибудь из аминокислотных остатков, находящийся в непосредственной близости от активного центра. Иммобилизованные ферменты, ввиду фиксации ферментов на носителе, не действуют на неподвижные или нерастворимые субстраты (целлюлоза, ксилан, лигнин и др.).

Еще одним недостатком иммобилизованных ферментов является стоимость иммобилизации, которая может оказаться неприемлемо высокой. Таким образом, при использовании иммобилизованных ферментов приходится решать комплекс вопросов, связанных с экономической обоснованностью их практической реализации.

Вопросы для самопроверки

1. Какие существуют источники получения ферментов?
2. В каких отраслях промышленности применяются ферментативные препараты?
3. Что значит иммобилизованные ферменты, как их получают?
4. При производстве каких продуктов используются ферменты?