

**А.И. Машанов, Н.А. Величко, Е.Е. Ташлыкова**

# **БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

Красноярск 2014

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет»

**А.И. Машанов, Н.А. Величко, Е.Е. Ташлыкова**

## **БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

*Рекомендовано Сибирским региональным  
учебно-методическим центром высшего профессионального  
образования для межвузовского использования в качестве  
учебного пособия для студентов, обучающихся по направлению  
подготовки магистров 260100.68 «Продукты питания  
из растительного сырья»*

Красноярск 2014

ББК 41.8

М 38

*Рецензенты:*

*Л.Н. Меняйло, д-р биол. наук, проф. кафедры товароведения и экспертизы товаров Сибирского федерального университета*

*В.П. Новицкая, д-р биол. наук, вед. науч. сотр. Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера СО РАМН*

М 38 **Машанов, А.И.**  
**Биоконверсия растительного сырья:** учеб. пособие /  
А.И. Машанов, Н.А. Величко, Е.Е. Ташлыкова; Краснояр. гос. аграр.  
ун-т. – Красноярск, 2014. – 223 с.

Обобщены наиболее значительные достижения в области биоконверсии растительного сырья и их применения в различных отраслях пищевой промышленности. Рассмотрены процессы ферментации чая, плодов и овощей; описаны агенты, субстраты и методы биоконверсии растительного сырья, основы биотехнологических процессов. Приведены общие сведения о ферментных препаратах и возможностях их использования в пищевых производствах. Особое внимание уделено технологическим особенностям переработки разнообразного растительного сырья с применением микроорганизмов и продуктов их метаболизма.

Предназначено для магистров, обучающихся по направлению 260100.68 «Продукты питания из растительного сырья».

ББК 41.8

© Машанов А.И., Величко Н.А., Ташлыкова Е.Е., 2014  
© ФГБОУ ВПО «Красноярский государственный аграрный университет», 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ . . . . .	6
1. ТРАДИЦИОННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ . . . . .	7
1.1. Общая характеристика и классификация растительного сырья .	7
1.2. Химический состав и строение растительных клеток . . . . .	10
1.2.1 Химический состав растительных клеток . . . . .	10
1.2.2. Строение растительных клеток . . . . .	42
2. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ . . . . .	45
2.1. Создание и применение генетически модифицированного сырья . . . . .	45
2.2. Обеспечение безопасности пищевой продукции из генетически модифицированных источников . . . . .	49
3. БИОКОНВЕРСИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТОВ . . . . .	52
3.1. Общая характеристика и классификация ферментов . . . . .	52
3.1.1. Сходства и отличия ферментов от неорганических катализаторов . . . . .	52
3.1.2. Классификация и номенклатура ферментов . . . . .	54
3.1.3. Структурная и функциональная организация ферментов . . . . .	56
3.1.4. Механизм действия ферментов . . . . .	58
3.1.5. Свойства ферментов, обусловленные белковой природой . . . . .	69
3.1.6. Механизмы изменения активности ферментов . . . . .	70
3.2. Ферментативная переработка растительного сырья . . . . .	72
3.2.1. Гидролитические процессы . . . . .	72
3.2.2. Негидролитические реакции . . . . .	92
3.3. Ферментные препараты . . . . .	98
3.3.1. Источники сырья для получения ферментов . . . . .	98
3.3.2. Методы количественного определения ферментов или их активности . . . . .	103
3.3.3. Препаративное выделение и очистка ферментов . . . . .	111
3.3.4. Технология получения . . . . .	128
3.3.5. Характеристика отечественных ферментных препаратов . . . . .	159
3.4. Продукты ферментативной биоконверсии . . . . .	165
4. МИКРОБНАЯ БИОКОНВЕРСИЯ . . . . .	174
4.1. Сырье для микробной биоконверсии . . . . .	174
4.2. Технология микробной биоконверсии . . . . .	178
5. ПРИМЕНЕНИЕ БИОКОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ . . . . .	191

5.1. Хлебопекарное производство . . . . .	191
5.2. Кондитерское производство . . . . .	197
5.3. Спиртовое производство . . . . .	199
5.4. Винодельческое производство . . . . .	200
5.5. Пивоваренное производство . . . . .	205
5.6. Производство безалкогольных напитков . . . . .	212
5.7. Консервное производство . . . . .	213
5.8. Производство чая . . . . .	216
ЗАКЛЮЧЕНИЕ . . . . .	220
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК . . . . .	221

## ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Биоконверсия растительного сырья» предусматривает изучение сырья и методов биоконверсии с использованием ферментов и микробной биоконверсии, а также пищевых продуктов, полученных в результате биоконверсии.

Технологии биоконверсии растительного сырья широко применяются в пищевой промышленности с целью получения высококачественной и конкурентоспособной продукции, а также организации малоотходных производств. Так, например, такие отходы пищевых производств, как яблочные выжимки, корзинки подсолнечника, корочки цитрусовых, используют в качестве сырья при получении пектина с помощью ферментативного гидролиза с использованием целлюлаз, гемицеллюлаз и пектолитических ферментов. Стебли, листья, побеги шалфея после экстракции из них эфирного масла применяют в качестве сырья для извлечения красящих веществ, а кожуру незрелого грецкого ореха используют для получения черного красителя.

Разнообразие растительного сырья, его технологических свойств предполагает возможность различных путей его переработки. Основным элементом технологии препаратов растительных жирорастворимых витаминов является способ их извлечения из сырья. Выбор способа извлечения определяет процедуры подготовки сырья к основному технологическому этапу и характер заключительных операций при получении продукта.

При получении витаминизированных масел из свекловичного сырья, такого как зародыши зерновых культур или иные отходы зерна, богатые витаминами, сырье предварительно обогащают путем ферментации гидролитическими ферментами. При ферментации происходит гидролиз нелипидных компонентов сырья, повышаются его масличность, доля свободных липидов, степень экстрагируемости и чистота конечного продукта.

Комплекс гидролитических ферментов для обогащения сырья подбирают в соответствии с составом нелипидных компонентов. В сырье, богатом белком, основным препятствием для экстракции липидов являются белково-липидные взаимодействия. Для расщепления белка используют препараты протеолитических ферментов. Чтобы обеспечить доступ протеиназ к белку и повысить скорость массообмена при гидролизе, необходимо разрушить структуры клеточных

стенок сырья. Соответственно в комплекс ферментов вводят целлюлазы и гемицеллюлазы.

Биоконверсия растительного сырья в своей основе является синтезом теоретических и практических дисциплин таких наук, как микробиология, аналитическая и неорганическая химия, а также включает процессы и аппараты химической и пищевой промышленности.

Учебное пособие состоит из пяти разделов. Первый раздел содержит сведения о традиционном растительном сырье для биоконверсии.

Во втором разделе дана характеристика генетически модифицированного растительного сырья и приведены меры по обеспечению безопасности пищевой продукции из ГМИ (генетически модифицированных источников).

Третий раздел посвящен биоконверсии с использованием ферментов. Дана общая характеристика и классификация ферментов, описаны механизмы действия, методы количественного определения и технология получения ферментов.

В четвертом разделе приведены особенности микробной биоконверсии.

В пятом разделе изложены особенности биоконверсии в различных пищевых производствах.

В конце разделов предлагаются контрольные вопросы для лучшего усвоения материала.

# 1. ТРАДИЦИОННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ

## 1.1. Общая характеристика и классификация растительного сырья

Растительное сырье – это растительные организмы (целые растения или их части), которые используются человеком в различных отраслях промышленности. В зависимости от цели применения различают сырье пищевое, кормовое, лекарственное, техническое.

Пищевое растительное сырье подразделяется на культивируемое и дикорастущее. К культивируемому сырью относится плодоовощное традиционное, плодоовощное генетически модифицированное, зерно и продукты его переработки (традиционное и генетически модифицированное), травянистое; к дикорастущему – плодоовощное традиционное и травянистое.

Для производства продуктов питания используется растительное сырье одного вида, разных видов, а также в комплексе с животным сырьем.

Растения являются источником усвояемых углеводов (глюкозы, фруктозы, крахмала), неусвояемых углеводов (клетчатки), витаминов, органических веществ. Они синтезируют органически активные соединения (эфирные масла, гликозиды и др.). К группе, содержащей моно- и дисахариды, относятся однолетние и многолетние растения. Из однолетних – это сахарная свекла, сахарный тростник, сорго и др. К многолетним в основном относятся плодово-ягодные растения, плоды которых накапливают более 5 % сахаров от общего веса. Сахаросодержащие растения представляют большой интерес для биотехнологических процессов. Но так как плоды этих растений непосредственно используются в пищу, то для биотехнологических целей могут быть использованы только отходы после их переработки. В мировом масштабе количество субстратов этой категории, вероятно, составило бы десятки миллионов тонн. Однако их сбор и переработка обошлись бы дорого, поэтому эти субстраты просто не учитываются.

**Плодоовощное сырье**, используемое для переработки, подразделяют на следующие группы: семечковые (яблоки, груша, айва), косточковые (черешня, вишня, слива, абрикосы, персики, кизил), ягоды (виноград, земляника, крыжовник, смородина и др.), орехи, тропические и субтропические плоды (апельсины, лимоны, мандарины и др.).



Различают плодовую группу овощей, у которых в пищу используются плоды и семена, и вегетативную группу, съедобной частью которых служат корни, клубни, стебель или листья. Каждая группа подразделяется на подгруппы.

К плодовой группе относятся: томатные – томаты, баклажаны, овощной перец; бобовые – горох, фасоль, бобы; тыквенные – огурцы, кабачки, патиссоны, тыква, а также бахчевые – арбузы и дыни; зерновые – кукуруза.

К вегетативной группе относятся: клубнеплоды – картофель, земляная груша, батат; корнеплоды – морковь, свекла, петрушка, пастернак, сельдерей, хрен; капустные – капуста белокочанная, цветная, брюссельская; шпинатные – шпинат, щавель; салатные – различные виды салатов, салатный сельдерей; луковичные – лук, чеснок; пряные листовые – укроп, базилик, майоран, чабер, эстрагон; десертные – спаржа.

**Зерновые культуры** в зависимости от химического состава подразделяются на 3 группы:

- 1) богатые крахмалом – пшеница, рожь, ячмень, овес, кукуруза, рис, просо и семейство гречишных;
- 2) богатые белком (семейство бобовых);
- 3) богатые жиром (масличные культуры).

*Солод* – это пророщенное и высушенное в специально созданных условиях зерно. Солод используют при производстве пива, полисолодовых экстрактов, получаемых из смеси кукурузного, овсяного и пшеничного солодов, концентрата квасного сусла, хлебного кваса, безалкогольных напитков и этилового спирта.

**Основные масличные культуры:** плоды и семена масличных растений. Основные масличные культуры: подсолнечник, хлопчатник, соя, рапс. Лен, клещевину, горчицу и другие масличные культуры перерабатывают в сравнительно небольших объемах. Перспективными источниками получения растительных масел являются маслосодержащие отходы пищевых производств (фруктовые косточки), а также отруби и зародыши, получаемые при производстве муки и крупы.

Из зерновых, бобовых и картофеля получают крахмал, из сахарной свеклы и сахарного тростника – сахарозу, из фруктов, ягод и сахарной свеклы – пектин, из масличных культур – растительное масло, из сои и пшеницы – белковые продукты растительного происхождения.

*Крахмал* – основное резервное вещество, которое скапливается в семенах, клубнях или корнях растений. По химической природе это

полисахарид, в основе строения которого лежит глюкозный остаток. Крахмало-паточная промышленность выпускает сухой картофельный и кукурузный крахмал, глюкозу, различные виды патоки, модифицированные крахмалы, декстрин и другие продукты.

Крахмал с биотехнологической точки зрения отличается от всех растительных биополимеров: во-первых, он состоит только из остатков глюкозы, соединенных друг с другом  $\alpha$ -гликозидной связью; во-вторых, эти связи легко разлагаются ферментативным и кислотным гидролизом с образованием смеси сбраживаемых моносахаридов – глюкозы и незначительного количества (1–2 %) дисахаридов. К числу крахмалосодержащих растений с высоким уровнем содержания полимера принадлежат однолетние растения: злаки всех видов, картофель, сорго, батат и кава. Именно предварительным ферментативным гидролизом крахмала амилазами в субстратах этой категории и дальнейшим сбраживанием получают такие национальные напитки, как русская водка (пшеница, картофель), японское саке (рис), шотландский виски (ячмень, пшеница, кукуруза), немецкий шнапс (картофель, пшеница) и др. Национальные традиции связаны с приготовлением алкогольных напитков разной крепости (20–40 °) из спелых фруктов или отходов винодельческой промышленности. При производстве напитков этого типа, кроме глюкозы, брожению подвергаются фруктоза, галактоза, сахароза, мальтоза и другие сахара, характерные для большинства спелых фруктов. Полученные напитки (сливовица – Чехия, грапа – Италия, чача – Грузия) характеризуются приятным запахом, хотя часто содержат повышенное количество метанола.

Использование *пектина* и сырья, содержащего значительное количество пектиновых веществ, в пищевой промышленности основано на его способности образовывать студни в присутствии сахара и кислоты. Пектин используют при производстве фруктово-ягодного мармелада, желе, джемов, пастилы, фруктово-ягодных начинок и др. Пектиновые вещества – это полисахариды второго порядка, содержатся в ягодах, фруктах, клубнях и стеблях растений в растворимой (растворимый пектин) или нерастворимой (протопектин) форме.

Пектин используют в кондитерском, пищевом концентратном, консервном производствах для получения изделий студнеобразной структуры.

## 1.2. Химический состав и строение растительных клеток

### 1.2.1. Химический состав растительных клеток

**Углеводы** – основной энергетический материал плодов и овощей. Содержание их в расчете на сырую массу невысокое, поэтому и калорийность плодов и овощей невелика. Однако такие распространенные углеводы, как сахароза, фруктоза, глюкоза, хорошо усваиваются организмом, что и обуславливает значение плодов и ягод в питании человека.

**Сахара.** В плодах и овощах содержатся моно-, ди- и полисахариды.

Моносахариды – простые сахара. В молекуле они содержат 3-6 и более атомов углерода и в соответствии с этим называются триозами, тетрозами, пентозами и гексозами. В плодах и овощах наиболее распространены пентозы и гексозы. Пентозы чаще встречаются в качестве веществ, входящих в состав, например, гемицеллюлоз. Это так называемые пентозаны, в основе которых находятся пятиуглеродные моносахара – арабиноза, ксилоза. Шестиуглеродные моносахара входят в состав сложных полисахаридов, в частности, гемицеллюлоз, целлюлозы, крахмала, гликогена, а также в значительных количествах содержатся в свободном виде.

Из дисахаридов в плодах и овощах наиболее распространена сахароза. Молекула сахарозы состоит из одной молекулы глюкозы и одной молекулы фруктозы. В процессе переработки (приготовление компотов, варенья), а также при хранении сахароза подвергается гидролитическому распаду. В результате образуется инвертный сахар – смесь одинаковых количеств глюкозы и фруктозы. В плодах и овощах преимущественно содержатся моносахара – фруктоза (плодовый сахар), глюкоза (виноградный сахар) и дисахарид – сахароза (свекловичный сахар).

Все они хорошо растворимы в воде (растворимость значительно увеличивается с повышением температуры), очень гигроскопичны, особенно фруктоза. В атмосфере, почти полностью насыщенной водяными парами, фруктоза поглощает до 30% воды, глюкоза – 15%, сахароза – 13%.

При высокой концентрации сахаров (варенье) они могут кристаллизоваться, особенно при понижении температуры. Если часть сахарозы при варке варенья гидролизуеться, она не засахаривается. Это

объясняется тем, что сахароза кристаллизуется при значительно меньшей концентрации по сравнению с инвертным сахаром – глюкозой и фруктозой.

При сильном и продолжительном нагревании происходит карамелизация сахаров с образованием продуктов темно-коричневого цвета.

Восстанавливающие сахара могут образовывать с аминокислотами и белками темноокрашенные продукты – меланоидины. Это происходит, например, при хранении картофеля в условиях пониженной температуры в результате накопления большого количества сахаров. То же самое наблюдается при термической обработке многих растительных продуктов. Реакции образования меланоидинов сложны и протекают в несколько этапов, они являются причиной неферментативных потемнений многих плодов и овощей при хранении и переработке.

Сахара служат энергетическим материалом при спиртовом, молочнокислом брожении. От количества и соотношения отдельных их форм зависят количество и состав получаемых при этом продуктов переработки, их вкус и аромат (например, при солении и квашении).

Содержание сахаров и их состав у овощей, плодов и ягод различаются. В одних преобладает фруктоза, в других сахароза или глюкоза и фруктоза. Содержание сахаров в овощах в среднем значительно ниже, чем в плодах и ягодах. Но многие из них довольно богаты сахарами, а некоторые, например, бахчевые, могут быть поставлены в один ряд с плодами.

Степень сладости сахаров разная. Если степень сладости сахарозы принять за 1, фруктоза будет слаще в 1,73 раза, а глюкоза менее сладка – 0,71. Степень сладости инвертного сахара выражается показателем 1,3, сорбита – 0,48. Высокая степень сладости арбузов объясняется тем, что в них содержится преимущественно фруктоза, хотя общее содержание сахаров сравнительно невысокое и составляет в среднем 7–8%.

При созревании плодов и овощей часто наблюдается изменение соотношения сахаров, а общее содержание их может оставаться примерно одинаковым (вкус при этом изменяется). Например, при послеуборочном дозревании зимних сортов яблок возрастает относительное содержание фруктозы и, несмотря на то, что общее количество сахаров несколько снижается, плоды становятся слаще. Следует

иметь в виду, что увеличение сладости объясняется также уменьшением содержания кислот.

Из других сахаров следует упомянуть трегалозу – дисахарид, гидролизующийся на две молекулы глюкозы (содержится в водорослях); мальтозу (солодовый сахар), образующуюся в прорастающих зерновках, например, ячменя, в результате гидролиза крахмала, а также сахара, встречающиеся в связанном виде (чаще всего в составе гликозидов). Так, дисахарид гентибиоза входит в состав амигдалина, моносахариды галактоза, арабиноза, ксилоза являются составными частями высокомолекулярных полисахаридов – слизи, пектиновых веществ, гемицеллюлоз.

Сахара имеют большое значение в обмене веществ плодов и овощей. Они затрачиваются при дыхании, дают энергию и большое число промежуточных продуктов, которые используются для различных биосинтезов, связанных с процессами дифференциации почек овощей, послеуборочного дозревания плодов, их устойчивости к патогенным микроорганизмам.

Близки к сахарам сахароспирты. Наиболее распространен сорбит, впервые выделенный из сока ягод рябины. Кроме рябины, он содержится в косточковых плодах – персиках, абрикосах, сливе, вишне, а также в яблоках и грушах. Предполагают, что из него в плодах может образовываться сорбоза – сахар высокой степени сладости. Поэтому такие плоды, как слива, хотя и не отличаются способностью дозревать после съема, могут стать слаще в результате превращения сорбита в сорбозу. Из сорбита получают аскорбиновую кислоту. Сахароспирт маннит в большом количестве содержится в манне – засохших выделениях некоторых тропических и субтропических деревьев, а также в ананасах, моркови, луке, сельдерее.

**К р а х м а л.** Высокомолекулярный полисахарид. Его молекула состоит из большого числа остатков глюкозы. При кислотном или ферментативном (при помощи фермента амилазы) гидролизе крахмала получается патока – сложная смесь декстринов, мальтозы – сладкого вкуса, от белого до желтого и коричневого цвета (из-за карамелизации сахаров) разной интенсивности, а также глюкоза (в основном при кислотном гидролизе). Из продуктов гидролиза крахмала получают спирт.

Крахмал – основное запасное вещество в клубнях картофеля (15–18%). В других овощах и плодах содержание его невелико. В бобовых (фасоль, зеленый горошек, бобы) количество крахмала может

возрастать до нескольких процентов, причем оно резко увеличивается при перезревании. Одновременно количество сахаров уменьшается, продукт грубеет, вкус ухудшается. Содержание крахмала в моркови, дыне, капусте не превышает десятых долей процента, а в остальных овощах еще меньше. Количество крахмала в незрелых семечковых плодах зимних сортов может достигать до 4–5%, а при съеме до 1,5–2% (при послеуборочном дозревании крахмал полностью осаживается). По темпам исчезновения крахмала можно судить о созревании, например, яблок. Высоким содержанием крахмала отличаются бананы (до 16% сухого вещества).

В растительных клетках крахмал находится в виде зерен, имеющих характерные размеры и строение для каждой культуры (рис. 1). По форме крахмальных зерен при помощи микроскопа можно обнаружить примесь одного вида муки к другому, например, пшеничной к кукурузной. В картофеле это сферические тела большого размера и неправильной формы (до 100 мк в поперечнике, в среднем 12–35 мк).



Рис. 1. Форма крахмальных зерен

Плотность крахмала равна 1,5–1,6. В воде крахмальные зерна тонут, что используют для их выделения. В воде крахмал нерастворим, но постепенно набухает, а при нагревании образуется коллоидный раствор – крахмальный клейстер (при этом поглощается до 300% воды).

Крахмал неоднороден по химической природе. Картофельный крахмал состоит из 19–22% низкомолекулярной (молекулярная масса около 800–300 тыс.) амилозы и 78–81% высокомолекулярного (молекулярная масса до нескольких миллионов) амилопектина (рис. 2).

Кроме того, в нем содержатся минеральные вещества, в основном фосфорная кислота, и жирные кислоты (десятые доли процента).

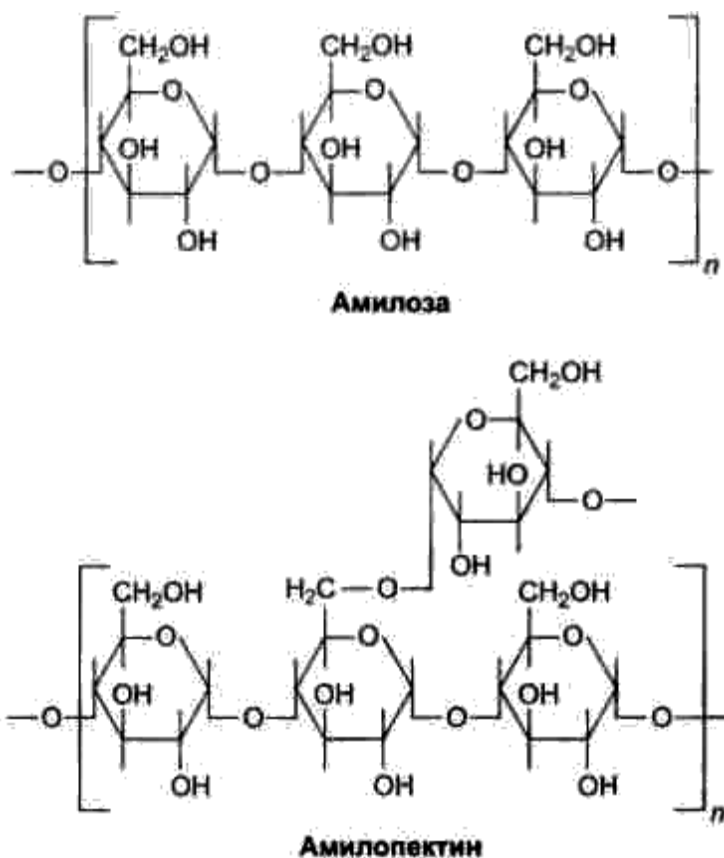


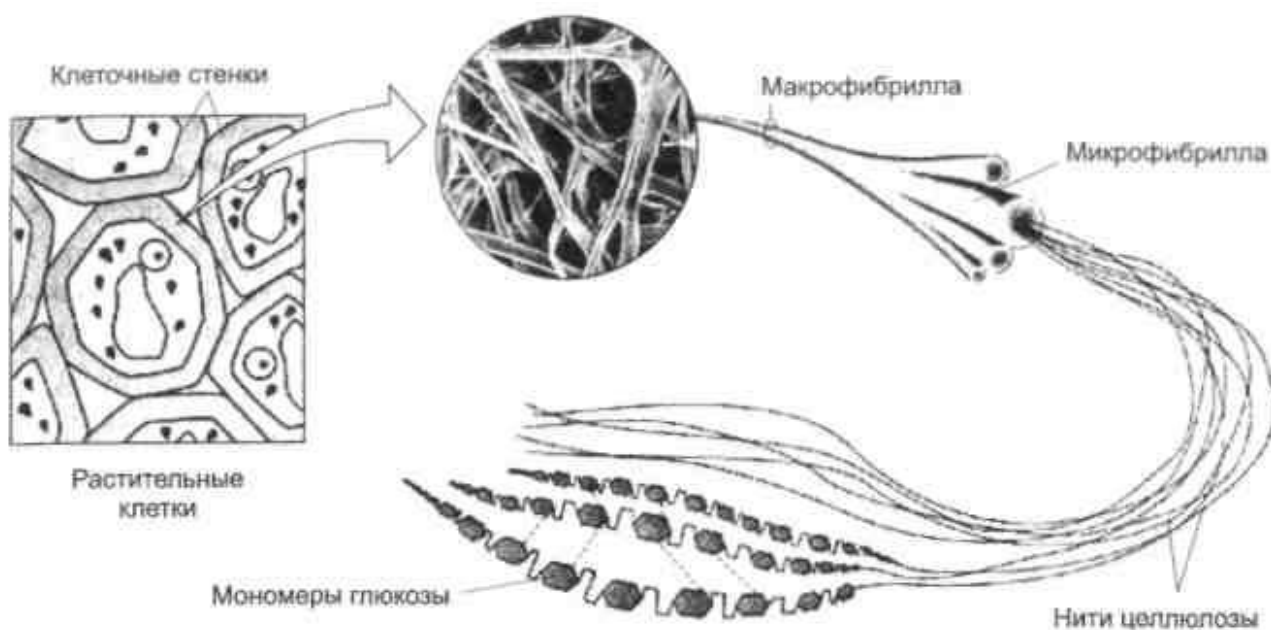
Рис. 2. Углеводная часть крахмала (структурные элементы)

Амилоза легко растворяется в теплой воде, амилопектин – с большим трудом при нагревании и под давлением. Крахмал – запасное вещество растений и используется ими после ферментативного гидролитического и фосфоролитического распада до глюкозы при дыхании. Таким образом, крахмал – резерв пластического и энергетического материала в процессах жизнедеятельности, например, клубней картофеля во время хранения. При пониженной температуре (около  $0^{\circ}\text{C}$ ), а тем более при отрицательной температуре, крахмал в картофеле переходит в сахара (клубни становятся сладкими). Технологические качества такого картофеля ухудшаются, из него, например, получают темноокрашенные чипсы (жареный хрустящий картофель). Но, если после охлаждения клубни выдержать некоторое время при повышенной температуре ( $15\text{--}20^{\circ}\text{C}$ ), накопившиеся сахара снова переходят в крахмал (происходит ресинтез крахмала). Эти превращения объясняются разной чувствительностью «осахариваю-

щих» и «окрахмаливающих» ферментных систем клубней картофеля к температуре хранения.

Из других полисахаридов в растениях встречается инулин, состоящий из остатков фруктозы. В большом количестве он содержится в клубнях земляной груши (13–20%), в корнях цикория (до 17%), клубнях георгина, из которых его и получают, в артишоках. Легко гидролизуется с образованием фруктозы (этот способ используют для ее получения). В корнях спаржи содержится полисахарид аспаргозин.

**Клетчатка (целлюлоза).** Полисахарид высокой степени полимеризации, из которого в основном построены клеточные стенки растительных тканей (рис. 3). Молекула клетчатки состоит из большого числа остатков глюкозы (от 2 до 10 тыс., в среднем), прочно связанных между собой. Молекулярная масса клетчатки равна 2 млн и более.



*Рис. 3. Строение целлюлозы на различных уровнях организации*

Химическая стойкость клетчатки высокая. Она не растворяется в воде даже при кипячении, растворяется в аммиачном растворе окиси меди. Гидролизуется под действием сильных кислот при нагревании и под давлением. Этот процесс используют для получения спирта.

Повышенное содержание клетчатки коррелирует с механической прочностью тканей овощей и плодов, их транспортабельностью



и лежкостью. При хранении клетчатка не претерпевает каких-либо изменений.

Особый интерес представляют гранулы, которые встречаются в мякоти недозрелых плодов груши, айвы. Они состоят из групп клеток с толстыми одревесневшими клеточными стенками (склеренхима). При хранении плодов, по мере их дозревания, происходит «раздревеснение» гранул, т. е. гидролиз клетчатки и сопутствующих веществ. Возможно, что клетчатка в минимальной степени вовлекается в обмен веществ, частично гидролизуясь. Содержание клетчатки в плодах колеблется в среднем от 0,5 до 2%, в овощах – от 0,2 до 2,8%. Количество клетчатки в разных тканях плодов и овощей неодинаково. Например, в покровных тканях (кожице, кожуре), а также в элементах семенных камер плодов ее во много раз (10 и более) больше, чем в паренхимных (мякоти).

В белых внутренних листьях кочана капусты количество клетчатки доходит до 0,94%, в зеленых покровных – до 1,1%, в кочерыге – до 1,33 %.

В одревесневших тканях растений клетчатке сопутствует лигнин – высокомолекулярное вещество ароматической природы. Лигнин устойчив, растворяется под действием сернистой кислоты.

В заметном количестве (десятые доли процента) накапливается в столовой свекле при перезревании и огрубении сосудисто-волокнистых пучков (колец). В других овощах и плодах его содержание незначительно.

**Г е м и ц е л л ю л о з а.** Высокомолекулярное вещество. Наряду с клетчаткой гемицеллюлоза входит в состав клеточных оболочек растений. В воде нерастворима, но растворяется в щелочах и гидролизуется в более слабых растворах кислот. В состав гемицеллюлоз могут входить как остатки гексоз (тогда их называют гексозаны), так и пентоз (пентозаны). В плодах и овощах распространен пентозан арабан, состоящий из многих остатков арабинозы. Арабан набухает в воде и образует клейкие коллоидные растворы. В бобовых овощах содержится гексозан галактан. Общее содержание гемицеллюлоз в плодах и овощах, как правило, тем выше, чем больше содержится в них клетчатки. Обычно оно колеблется в пределах от 0,2–0,3% до 2,7–3,1%.

При различных видах переработки плодов и овощей гемицеллюлозы подвергаются более или менее полному гидролизу. При созревании плодов они вовлекаются в обмен веществ, что отражается как на вкусе, так и на консистенции плодов.

**Пектиновые вещества.** Высокомолекулярные соединения углеводной природы. Однако молекулярная масса их значительно ниже, чем клетчатки и гемицеллюлозы, и колеблется от 20 до 50 тыс. Различают протопектин (нерастворим в воде), пектин (растворим в воде) и пектиновую кислоту. Пектин представляет цепочку соединенных между собой остатков галактуроновой кислоты; протопектин – различным образом связанные цепочки метилированных полигалактуроновых кислот (рис. 4). Протопектин образует комплексы с гемицеллюлозами и клетчаткой. Он нерастворим в воде, но довольно легко подвергается кислотному и ферментативному гидролизу до пектина. При действии на пектин разбавленных щелочей или фермента пектиноэстеразы легко отщепляются метоксильные группы, образуются метиловый спирт и полигалактуроновая (пектовая) кислота. Далее под действием фермента полигалактуроназы полигалактуроновая кислота распадается на молекулы галактуроновой кислоты.

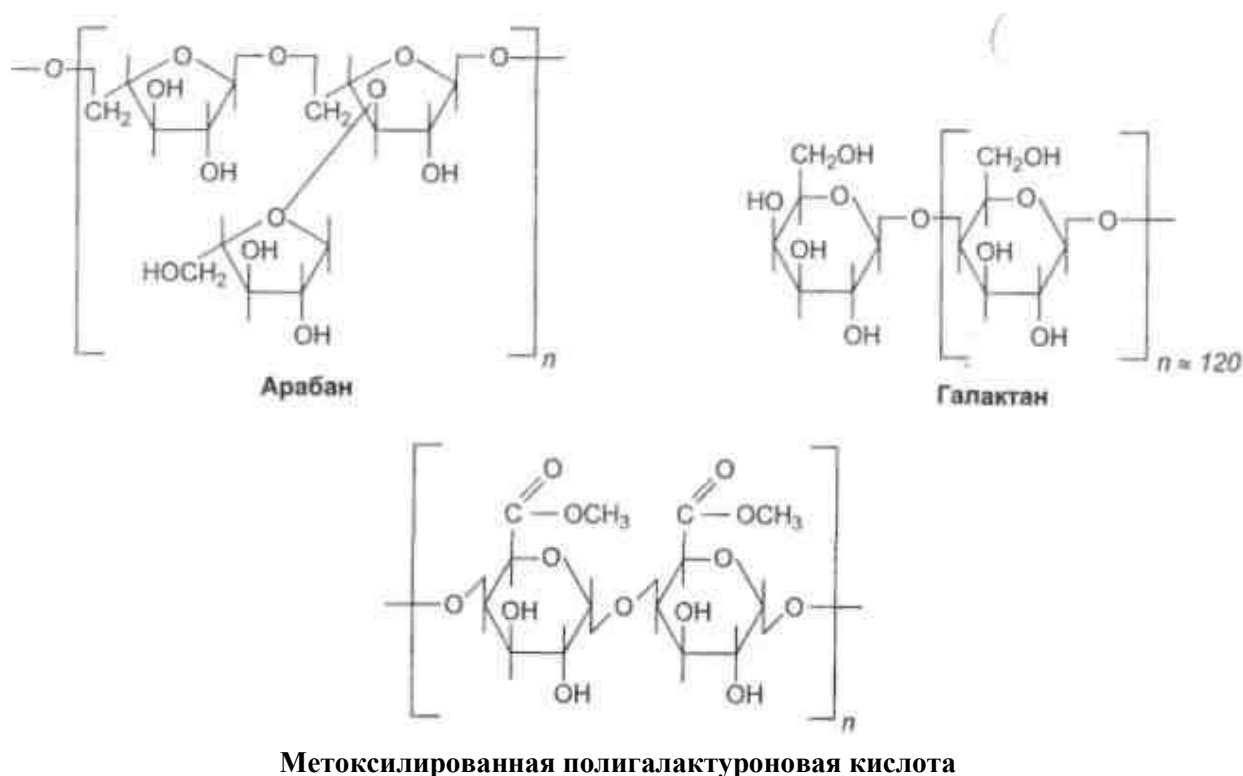


Рис. 4. Основные структурные элементы пектиновых веществ

Содержание пектиновых веществ в плодах и ягодах сравнительно высокое, особенно в яблоках, айве, абрикосах, сливах, черной смородине, крыжовнике.

В овощах пектиновых веществ меньше: в репе, моркови, тыкве – около 1%, в капусте, дыне – около 0,4%, в свекле, томатах, картофеле – не более 0,1–0,2%. Состав и свойства пектиновых веществ из разных объектов неодинаковы.

Основная особенность пектиновых веществ (пектина) – образовывать желе в присутствии необходимого количества сахара и кислоты. Это учитывают при получении желе, джема, мармелада, конфитюра, пастилы. Быстрое желирование и образование плотного желе наблюдается при использовании цитрусовых плодов (во внутренней белой части кожуры их – альbedo – содержится большое количество пектиновых веществ), многих сортов яблок. Хорошо образуется желе при использовании слив, абрикосов, персиков, смородины, крыжовника, клюквы, земляники, хуже – из вишни, груши, винограда. Пектин из овощей желирует слабее.

Желирующие свойства пектина повышаются при увеличении размеров (длины цепочки) молекул и степени метоксилирования полигалактуроновой кислоты.

Разваривание плодов и овощей при варке, стерилизации связано с гидролитическим расщеплением пектиновых веществ. Интенсивность такого распада зависит от кислотности плодов: более кислые (слива, вишня, алыча) развариваются быстрее, чем менее кислые. Яблоки сорта Антоновка, кислотность которых высокая, сильно развариваются при варке. Если снизить кислотность внесением соды, разваривание уменьшается. Малоокислотные сорта яблок, а также груши (кислотность их в общем ниже, чем яблок) развариваются не столь сильно. Разваривание уменьшается с возрастанием концентрации сахара. В сахарном сиропе концентрации 40–60% степень гидролиза протопектина в 5–10 раз ниже, чем в чистой воде.

В редких случаях пектиновые вещества необходимо удалять (приготовление осветленных соков, вина). Пектиновые вещества в таких продуктах могут образовывать осадки, помутнения при взаимодействии с другими компонентами сока, например, с дубильными веществами. Среди других технологических приемов для предотвращения помутнения применяют обработку сока препаратом фермента полигалактуроназы, получаемого из гриба *Aspergillus niger*. В этом случае цепочки молекул пектиновых веществ распадаются до галактуроновой кислоты, которая не осаждается.

Значение пектиновых веществ в пищевой промышленности настолько велико, что организовано производство пищевого пектина из

вторичного сырья, например, жома сахарной свеклы. Выход пектина доходит до 12–18%, причем желирующие свойства его достаточно высокие. Но более ценен яблочный пектин.

Характерны превращения пектиновых веществ при созревании плодов. Протопектин срединных пластинок как бы цементирует клетки растительной ткани. По мере созревания он переходит в растворимый пектин клеточного сока, в результате изменяется консистенция плодов. На распад протопектина влияет температура хранения в зависимости от вида и сорта плодов. У яблок превращения пектиновых веществ с заметной скоростью идут при 0°C, у груш при этих условиях пектиновые вещества остаются без изменения. С распадом пектиновых веществ связано появление различного типа потемнений кожицы и мякоти плодов.

**Белки.** Все разнообразие признаков и свойств живых организмов определяется особенностями обмена веществ каждого данного вида, а в конечном счете набором и активностью структурных и ферментных белков, синтезируемых его клетками. Само возникновение жизни на земле было бы невозможно при отсутствии условий для образования молекул белка. Первостепенная роль белков в процессе жизнедеятельности любого организма, каждого его органа и клетки дала основание назвать их протеинами (от греч. *протос* – первый). Для класса белков характерно чрезвычайное разнообразие функций.

Самую большую и наиболее важную по биологическому значению представляет собой группа белков – ферменты, каждый из которых катализирует строго определенную химическую реакцию.

Вторая большая группа белков участвует в построении структурных элементов клеток. Например, нерастворимые белки в комплексе с липидами образуют внутриклеточные мембраны. Белки мембран принадлежат к числу наиболее распространенных клеточных белков.

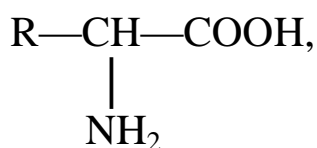
Кроме того, белки служат запасными питательными веществами в клетках, средством для транспортировки различных соединений, некоторые из них играют роль гормонов.

Белки обладают очень большим молекулярным весом. Его величина от 6000 (условно принятый нижний предел молекулярного веса белков) до 1 000 000 и выше.

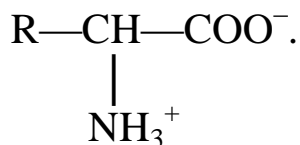
Важным биологическим свойством белков является их специфичность для данного организма. Каждый организм характеризуется строго индивидуальным качественным и количественным набором

белковых молекул. Сходство белков у определенных видов растений может явиться одним из важных таксономических признаков. В процессе индивидуального развития организма, например, при прорастании семян, набор белковых молекул количественно и качественно меняется.

Биологические свойства белковых молекул определяются их химическим строением. Белок – это высокомолекулярный полимер. Как любой полимер, он состоит из отдельных звеньев – мономеров. В белковой молекуле такими мономерами являются аминокислоты, т.е. органические кислоты, содержащие аминную группу. Следовательно, общая формула аминокислот



где R – аминокислотный остаток (радикал), от строения которого зависит химическая индивидуальность аминокислоты. Из общей формулы видно, что аминокислоты содержат как кислотные группы –COOH, так и щелочные –NH<sub>2</sub>. В водном растворе в зависимости от pH среды происходит диссоциация либо групп –COOH (–COOH ⇌ ⇌ COO<sup>–</sup> + H<sup>+</sup>), либо групп –NH<sub>2</sub> (–NH<sub>2</sub> + H<sup>+</sup> ⇌ NH<sub>3</sub><sup>+</sup> + OH<sup>–</sup>). При промежуточных значениях pH в аминокислоте присутствуют одновременно как положительно заряженные, так и отрицательно заряженные группы:



В зависимости от природы радикала (R) аминокислоты могут содержать различное число карбоксильных и аминных групп. Во всех случаях количество отрицательно заряженных –COO<sup>–</sup> групп и положительно заряженных –NH<sub>3</sub><sup>+</sup> групп будет зависеть от величины pH: в кислой среде будут преобладать группы –NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, а в щелочной – COO<sup>–</sup>.

В настоящее время в живых организмах в свободном и связанном виде найдено более 150 аминокислот. Но лишь 20 из них встречаются в составе белков: триптофан, лейцин, изолейцин, валин, треонин, лизин, метионин, фенилаланин, глицин, цистин, цистеин, серин,

тирозин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, аланин, пролин, гистидин, оксипролин. Первые восемь аминокислот из числа перечисленных являются незаменимыми. Человек и животные сами не могут их синтезировать и должны получать в готовом виде в составе пищи. Отсутствие же одной из аминокислот может сделать невозможным синтез ряда необходимых белков, включая гормоны и ферменты. Между тем далеко не во всех белках встречаются все 20 аминокислот, включая и незаменимые. Белки, в составе которых отсутствует хотя бы одна из названных кислот, рассматриваются как неполноценные. Аминокислоты различаются не только по количеству карбоксильных групп. Они могут содержать группы  $-SH$ ,  $-OH$ ,  $-CH_3$ , фенольные, бензольные и индольные кольца, а также гетероциклы. Наличие всех этих функциональных групп обуславливает химические и биологические свойства как самих аминокислот, так и состоящих из них белков.

Соединение отдельных аминокислот в гигантскую цепочку молекулы белка происходит путем образования пептидной связи, т.е. связи между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминной группой другой аминокислоты.

Концевые  $NH_2$  и  $COOH$ -группы реагируют с другими молекулами аминокислот, образуя аналогичные пептидные связи. В результате возникает неразветвленная цепочка, которая состоит из многих аминокислот, соединенных пептидной связью, – полипептид.

Молекула белка может состоять из одной или нескольких полипептидных цепей.

Свойства белка и его специфичность зависят от качественного состава входящих в него аминокислот и последовательности их расположения в полипептидной цепи белка. Последовательность расположения аминокислот в полипептидной цепи белка обуславливает первичную структуру белковой молекулы.

Пептидные связи не являются единственным типом связи в молекуле белка. Аминокислоты, соединенные пептидными связями в полипептидную цепь, могут взаимодействовать между собой с помощью различных функциональных групп. Если в состав молекул исходных аминокислот входит больше одной карбоксильной или аминной группы, то после образования пептидных связей часть этих групп остается несвязанной и сохраняет способность к ионизации. Этим и обуславливается наличие в белках ионных связей и общий заряд белковой молекулы. Имеющаяся в молекуле аминокислоты цистеина

SH-группа может окисляться с образованием дисульфидной связи – S–S– с другой молекулой цистеина в иной полипептидной цепи. При восстанавливающих условиях эти связи могут разрываться с образованием –SH-групп. Дисульфидные связи могут соединять как отдельные полипептидные цепи, так и различные участки одной цепи.

Наряду с прочными ковалентными связями (пептидные и дисульфидные) в белковой молекуле имеются многочисленные лабильные водородные связи. Это связи между водородом группы –NH– и кислородом группы –CO, возникающие за счет того, что в группе –NH связь между азотом и водородом, осуществляемая за счет пары общих электронов, слегка полярна, т.е. эта пара электронов находится ближе к атому азота. В результате на атоме водорода возникает небольшой избыточный положительный заряд. В группе –CO тоже происходит поляризация связи между атомами углерода и кислорода, в результате которой атом кислорода получает избыточный отрицательный заряд. Явление поляризации связи зависит от строения атомов, образующих эту связь. Возникновение водородных связей между отдельными участками полипептидной связи приводит к тому, что цепь, закручиваясь, приобретает форму спирали. Таким путем образуется вторичная структура белковой молекулы. Полипептидные цепи белка заспирализованы не по всей длине – имеются определенные неспиральные участки. Укладка в пространстве спиральных и аморфных участков полипептидной цепи определяет третичную структуру молекулы белка. При объединении двух или нескольких полипептидных цепей в единый агрегат образуется четвертичная структура молекулы белка. Белки, состоящие более чем из одной полипептидной цепочки, называют олигомерными, а отдельные цепи полипептидов в их составе носят название протомеров. Если молекулярный вес белка превышает 50 000, то имеются все основания считать, что в молекуле такого белка имеется более двух полипептидных цепей.

То обстоятельство, что более крупные белки состоят из нескольких полипептидных цепей, а не из одной длинной цепи, создает для организма определенные преимущества. В процессе самосборки в олигомеры могут объединиться только правильно подогнанные белковые протомеры, поскольку объединение происходит в результате взаимодействия между отдельными функциональными группами аминокислот, входящих в данный протомер. Дефектные протомеры отбраковываются, так как неспособны объединяться в олигомер. Та-

ким образом, организм избегает возможных ошибок при образовании полипептидных цепей.

Поскольку в составе многих олигомеров содержатся идентичные протомеры, их синтез может кодироваться одной и той же матрицей, а следовательно, связан с меньшим расходом нуклеиновых кислот.

Почти все ферменты относятся к олигомерным белкам, свойственная им четвертичная структура помогает осуществлять регуляторные функции.

Биологические свойства белков, в частности их ферментные свойства, зависят в первую очередь от первичной структуры белка, так как в конечном счете ею определяется та или иная вторичная, третичная или четвертичная структура.

Пространственная структура белковой молекулы носит название конформации. При нормальных физиологических условиях молекулы белка имеют нативную конформацию. Изменение нативной конформации, не сопровождающееся разрывом ковалентных связей, называют денатурацией белка. Денатурация заключается в развертывании полипептидной цепи, строго определенным образом уложенной в пространстве, и образовании беспорядочного клубка. Это явление может происходить под действием различных факторов: повышенной температуры, органических растворителей, изменения рН реакции среды, ионов тяжелых металлов и веществ, вызывающих разрыв водородных связей. В зависимости от степени денатурации происходит нарушение четвертичной, третичной и вторичной структуры молекулы белка, сопровождающееся изменением реактивности отдельных химических групп и вследствие этого изменением биологических свойств белка. Белковая молекула хотя и обладает довольно жесткой структурой, но ее жесткость относительна. Под влиянием различных слабых воздействий могут происходить обратимые конформационные изменения молекулы белка, сопровождающиеся снижением или повышением его биологической активности. Подобные обратимые изменения играют важную роль в регулировании биохимических процессов в живой клетке.

Белки характеризуются высокой реактивной способностью, благодаря чему они могут взаимодействовать со многими соединениями и образуют сложные белки, или протеиды. Они состоят из простого белка и связанного с ним другого соединения небелковой природы, называемого простетической группой. К таким соединениям относятся нуклеопротеиды, фосфопротеиды, липопротеиды и гликопротеиды.



Несмотря на то, что разные белки сильно различаются по свойствам, их элементарный состав более или менее одинаков. В них содержится 51–55% углерода, 6,5–6,7 % водорода, 21,5–23,5 % кислорода, 15,0–18,6 % азота, 0,3–2,5 % серы; в некоторых белках имеется до 0,5 % фосфора. Например, в белках пшеницы содержится в среднем 17,5 % азота, в белках картофеля его находится 16,0 % и т.д.

Во многих растениях значительная часть белков откладывается в запас, благодаря чему они служат важным, а нередко единственным источником белков в пищевом рационе человека. Но ни один животный организм не может включать в свой состав тот белок, который поступает к нему с пищей. Поступающий белок в организме распадается до аминокислот, а затем уже из образовавшихся аминокислот синтезируются все необходимые организму вещества, в том числе и собственный белок, присущий только данному организму и во многом обуславливающий его биологическую специфичность.

В связи с этим при оценке того или иного продукта как источника белков первостепенное значение приобретает не только общее содержание в нем белков, но и их аминокислотный состав.

Содержание белков и аминокислот в плодах и овощах невелико. Исключение составляют зеленый горошек, в котором на долю этих соединений приходится 5 % сырой массы (веса), овощная фасоль – 4 %, плоды маслин – 7 %. Но так как по сравнению с другими овощами их потребление незначительно, они не играют заметной роли в белковом балансе питания.

В картофеле же, хотя общее содержание белков невелико (в среднем 2 % сырой массы), но во многих районах его потребление достигает 150 кг и более на человека в год. Поэтому картофель как источник белков имеет большое значение.

**Липиды.** К липидам (от греч. *липос* – жиры) относится обширная группа органических веществ: жиры, воски, фосфатиды, терпеноиды, эфирные масла. Все они очень различны по химическому строению (рис. 5) и биологическому действию, однако обладают и некоторыми общими свойствами: не растворимы в воде и поэтому из живых клеток могут быть экстрагированы лишь некоторыми (неполярными) растворителями – хлороформом, эфиром, бензолом и др. Общебиологическая роль липидов обусловлена тем, что они являются обязательным компонентом клеточных мембран, представляют собой самый концентрированный из всех пищевых веществ источник энергии и выполняют ряд защитных функций.

Ж и р ы. Жиры являются эфирами трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот, главным образом олеиновой, линолевой и линоленовой.

При окислении жиров происходит их распад на глицерин и жирные кислоты, после чего они подвергаются дальнейшим превращениям. В свободном виде жирные кислоты в большинстве клеток и тканей содержатся лишь в виде следов.

Свойства различных жиров обусловлены в первую очередь составом присутствующих в них жирных кислот. Будучи составной частью мембран, жиры участвуют в регулировании проницаемости отдельных органоидов и целой клетки.

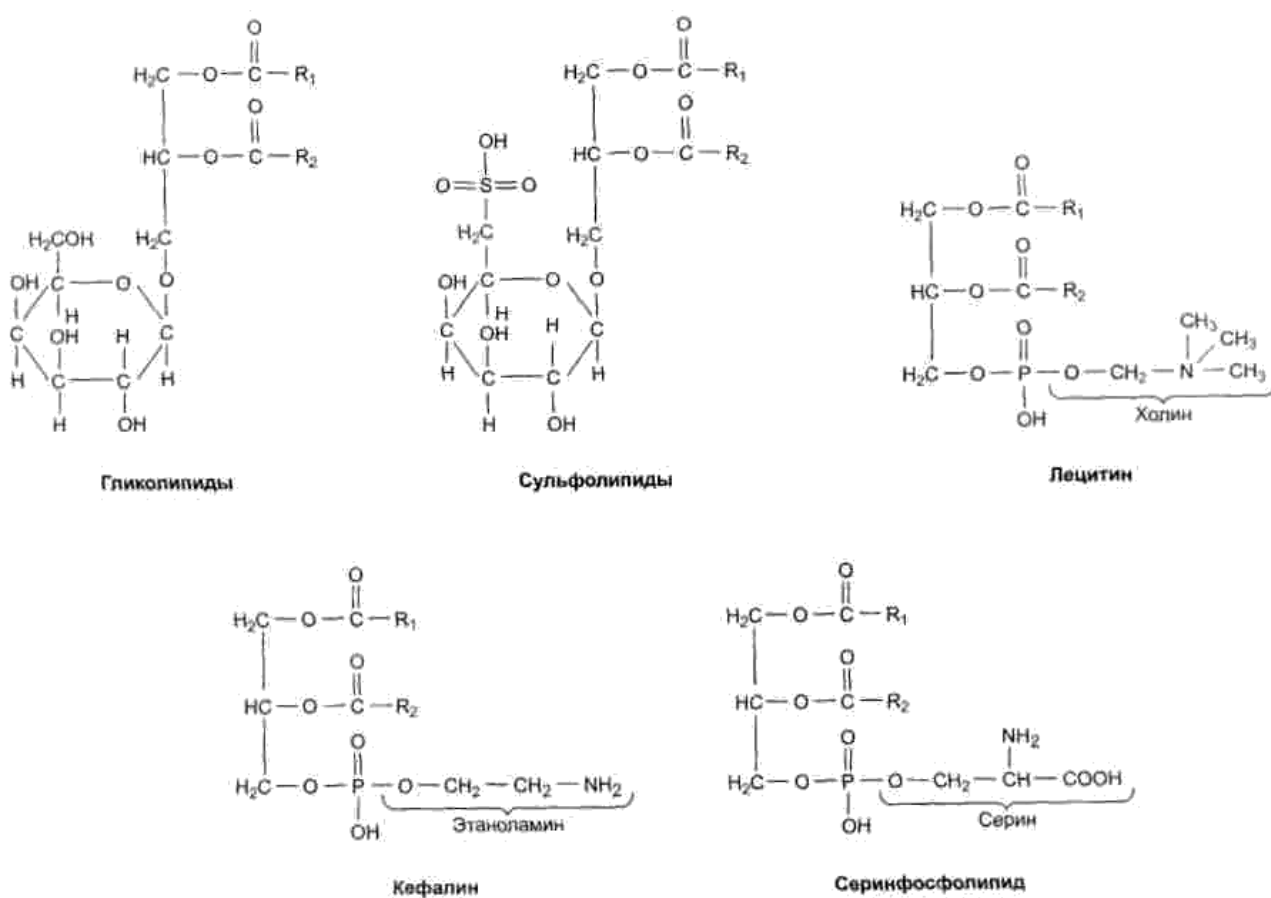


Рис. 5. Строение липидов

В о с к и. Воски – жироподобные вещества, представляющие собой сложные эфиры жирных кислот и высокомолекулярных одноатомных спиртов. Часть жирных кислот и спиртов присутствует в восках в свободном виде. Кроме того, воски содержат некоторые углеводороды парафинового ряда, например, нонакозан и его производные.

водные – нонакозанон, нонакозанол. Из жирных кислот в восках, кроме присутствующих в растительных маслах, содержатся еще жирные кислоты с более высоким молекулярным весом, например карнаубовая, церотиновая и др.

Воски покрывают тонким слоем листья, стебли, плоды, защищая их как от увядания, так и от смачивания, а следовательно, в какой-то мере и от поражения фитопатогенными микроорганизмами, поскольку для прорастания спор, всегда имеющихся на поверхности листьев и плодов, необходима капельная вода. Поэтому с удалением воскового слоя с поверхности плодов и овощей они быстрее заболевают при транспортировании и хранении.

В восковом слое, покрывающем поверхность ягод винограда, обнаружены свободная пальмитиновая кислота, ее эфир с высокомолекулярным спиртом энакопролом, цериловый спирт, мирициловый спирт, церотиновая кислота. Воски, покрывающие поверхность белокочанной капусты, состоят главным образом из нонакозана и нонакозанола.

**Ф о с ф а т и д ы.** От жиров фосфатиды отличаются тем, что содержат фосфорную кислоту и связанные с ней азотистые соединения, чаще всего холин. Под действием соответствующих ферментов холин может передавать содержащиеся в нем метильные группы другим веществам и тем самым играть важную роль в обмене веществ.

Значительная часть фосфатидов соединена с белками в виде так называемых липопротеидов. В растительных фосфатидах содержатся сахара: глюкоза, галактоза или пентоза.

В отличие от жиров фосфолипиды не откладываются в запас и, будучи существенными компонентами клеточной мембраны, играют весьма важную регуляторную роль в метаболизме клетки.

**Т е р п е н о и д ы.** Терпеноиды представляют собой класс соединений, построенных из нескольких молекул углеводорода изопрена. Основным специфическим веществом, дающим начало всем терпеноидам, является изопентенилпирофосфат. Все терпеноиды по числу атомов углерода в их молекуле можно разделить на монотерпены ( $C_{10}$ ), сесквитерпены ( $C_{15}$ ), дитерпены ( $C_{20}$ ), тритерпены ( $C_{30}$ ), тетратерпены ( $C_{40}$ ), политерпены ( $C_n$ ). Такая классификация является весьма условной, так как в одну и ту же группу могут войти соединения, различающиеся по химической природе и биологическому действию. Ниже приводятся некоторые представители каждой из перечисленных групп.

К монотерпенам относятся многие эфирные масла – мирцен, гераниол и др. Из сесквитерпенов следует назвать абсцизовую кислоту, являющуюся самым сильным из известных эндогенных ингибиторов ростовых процессов в растениях. Присутствием абсцизовой кислоты в значительной мере объясняется пребывание семян и клубней в состоянии покоя. Сесквитерпенами являются фитоалексины картофеля, перца и томата, которыми во многом определяется их устойчивость к фитопатогенным микроорганизмам.

Сесквитерпеновый углеводород фарнезен ( $C_{15}H_{24}$ ) может инициировать поверхностное побурение тканей яблок, известное под названием «загара». В эфирных маслах уже давно обнаружен  $\beta$ -фарнезен. В яблоках содержится  $\alpha$ -изомер фарнезена. Он синтезируется в живых клетках эпидермиса и выделяется в кутикулу. Его содержание в покровном воске яблок обычно в 4–5 раз больше, чем в эпидермисе. В зеленых плодах фарнезен отсутствует или содержится в виде следов. Его накопление является признаком созревания и старения плодов. Фарнезен, как любое соединение с сопряженными двойными связями, легко окисляется, образуя гидроперекиси, которые и участвуют в побурении тканей плодов.

К дитерпенам относятся гиббереллины и, в частности, гибберелловая кислота, которая в отличие от абсцизовой является самым сильным эндогенным ростстимулирующим веществом. Гибберелловая кислота усиливает процесс деления клеток. С ее биосинтезом в меристематических тканях связано прорастание клубней, луковиц, корнеплодов во время хранения.

Важнейшим представителем тритерпенов является сквален, который в свою очередь дает начало многим другим тритерпенам, например, урсоловой кислоте, а также обширной группе соединений, которые называют стероидами.

Стероиды подразделяются на стерины, стероидные алкалоиды, сапонины и сердечные гликозиды. Большое число различных соединений входит в состав стеринов. Еще сравнительно недавно предполагалось, что среди стеринов растений отсутствует холестерин, который в животном организме выполняет очень важную роль как компонент клеточных мембран и источник образования ряда активных веществ, включая половые гормоны и гормоны надпочечников. Сейчас хорошо известно, что холестерин присутствует и в растениях. Правда, в растениях на его долю приходится лишь небольшая часть всех стеринов, но и в растительных клетках так же, как и в животных, он

входит в состав мембран. Например, в мякоти клубней картофеля содержится около 20 мкг стероидов на грамм сырой ткани, причем отдельные стероиды составляют (в %): холестерин – 9;  $\beta$ -ситостерин – 50; стигмастерин – 32; кампастерин – 5; брассикастерин – 4.

Важную роль в фитоиммунитете играют стероидные гликоаллоиды – соланин и чаконин, которые в большом количестве присутствуют в перидермальных тканях клубней картофеля и тем самым защищают паренхимные ткани от паразитарных микроорганизмов. В картофеле, как и в некоторых овощах семейства пасленовых (баклажаны и др.), обнаружены по три соланина и чаконина, у которых один и тот же агликон – соланидин, но различные связанные с ними остатки сахаров:

$\alpha$ -соланин: соланидин + галактоза + глюкоза + рамноза;

$\beta$ -соланин: соланидин + галактоза + глюкоза;

$\gamma$ -соланин: соланидин + галактоза;

$\alpha$ -чаконин: соланидин + глюкоза + рамноза + рамноза;

$\beta$ -чаконин: соланидин + глюкоза + рамноза;

$\gamma$ -чаконин: соланидин + глюкоза.

На долю  $\gamma$ - и  $\beta$ -форм приходится не более 5 % соланина, в то время как  $\alpha$ -форма составляет 95 % всех соланинов.

К важнейшим представителям тетратерпенов относятся каротиноидные пигменты, обуславливающие оранжевую окраску моркови и многих растений.

**Эфирные масла.** Не все эфирные масла являются липидами. Например, к липидам можно отнести эфирные масла цитрусовых, но этого нельзя сделать в отношении эфирных масел лука. Подобно всем липидам, эфирные масла в большинстве случаев не растворимы в воде, но растворяются в различных органических растворителях. Они являются легколетучими соединениями и вызывают специфический аромат плодов и овощей.

Все эфирные масла представляют собой смесь различных веществ, главным образом терпенов и кислородсодержащих производных – альдегидов и спиртов. Отдельные компоненты, входящие в состав эфирных масел, проявляют свое действие уже при концентрации 1 мг% и даже ниже.

**Красящие и дубильные вещества.** Красящие вещества в растениях представлены флавоноидами (рис. 6), каротиноидами (рис. 7), хлорофиллами и др. Флавоноиды в зависимости от структуры связующего трехуглеродного фрагмента в молекуле и степени окислен-

ности подразделяются на катехины, лейкоантоцианиды, флаваноны, флаванолы, антоцианидины, флавоны, флавонолы и др. Наиболее восстановленные соединения – катехины (рис. 8), наиболее окисленные – флавонолы.

Катехины – бесцветные соединения, легко поддающиеся окислению, в ходе которого они приобретают разную окраску. Например, различный цвет чая (черный, красный, желтый) обусловлен степенью окисления катехинов, содержащихся в чайном листе. Существует несколько форм катехинов: простейший катехин и более сложный по строению галлокатехин, галлокатехингаллат и др.

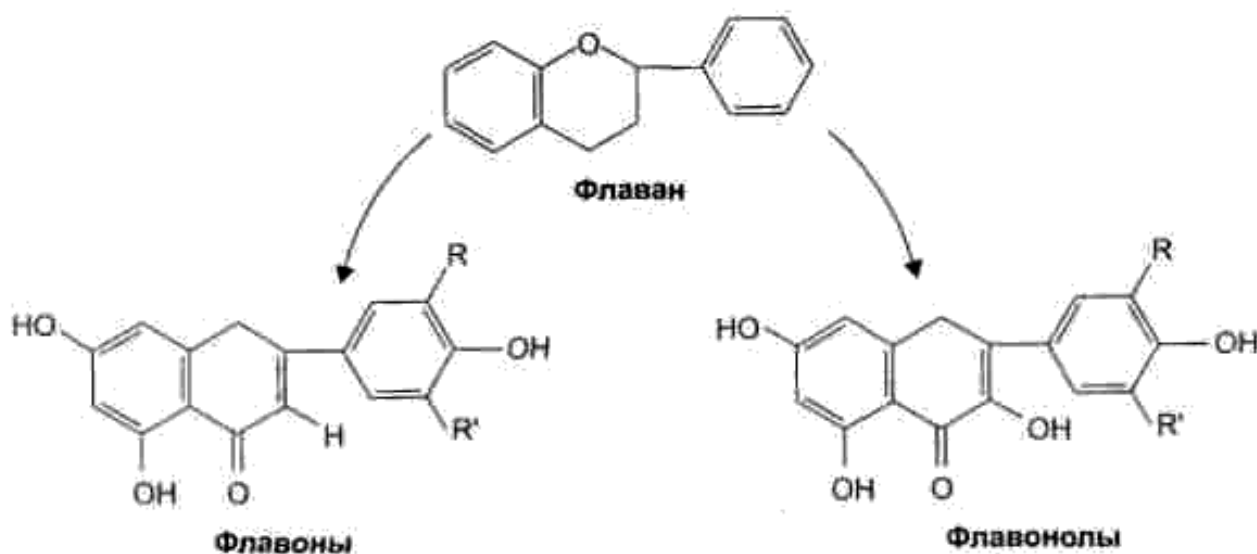


Рис. 6. Строение флавоноидов

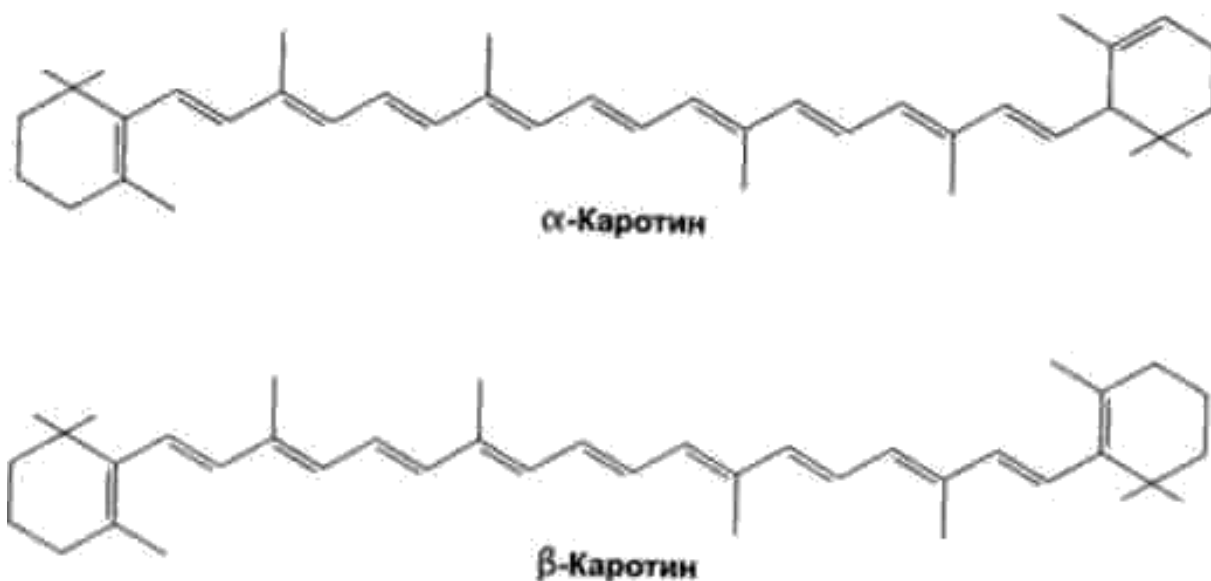


Рис. 7. Строение каротиноидов



*Рис. 8. Структура катехинов*

Такие флавоноиды, как антоцианы, флаваноны и флаванолы, являются окрашенными соединениями и вместе они составляют одну из трех групп растительных пигментов, обуславливающих окраску растений. Две другие группы – это хлорофиллы, окрашенные в зеленый цвет, и каротиноиды – в оранжевый.

Антоцианы имеют фиолетовый цвет, флавоны и флаванолы – желтый. С ионами K, Na, Fe и других металлов антоцианы дают соединения синего цвета, а с кислотами (фосфорной и др.) – красного. Поэтому в зависимости от pH клеточного сока окраска антоцианов может измениться.

Из всех названных соединений наиболее распространены антоцианы. Они представляют собой гликозиды, в которых остатки сахаров (глюкозы, галактозы и рамнозы) связаны с окрашенными агликонами, принадлежащими к группе антоцианидинов. Последние по строению относятся к флавоноидам. Различают шесть антоцианидинов, составляющих агликоны антоцианов, – пеларгонидин, цианидин, пеонидин, дельфинидин, петунидин, мальвидин. Присутствием того или иного антоциана обусловлена основная окраска плодов. Наиболее распространенным пигментом плодов является антоциан цианидин. Он содержится в землянике, яблоках, сливах и других плодах. В некоторых плодах антоцианы находятся только в кожуре (виноград, слива), в других – в кожуре и мякоти (смородина, малина, черника).

Хлорофилл содержится в хлоропластах листьев и обуславливает их зеленый цвет. В хлоропластах происходит фотосинтез – синтез органического вещества из углекислого газа, воды при участии световой энергии. Существуют две формы хлорофилла зеленых растений – А и В.

По мере созревания плодов (как и при старении листьев) содержание хлорофилла уменьшается, в то время как количество каротиноидов возрастает. Происходят взаимные превращения пигментов. Это обуславливает, например, изменение окраски яблок и многих других плодов при созревании – от зеленых и бело-зеленых тонов к желтым и оранжевым.

Изменение окраски при консервировании и кулинарной обработке плодов и овощей также связано с превращениями хлорофилла. Так, в кислой среде магний хлорофилла замещается водородом и образуется феофитин, при этом окраска переходит из зеленой в зелено-бурую. Это наблюдается при длительной варке листовых овощей, однако в первый момент зеленая окраска в горячей воде проступает ярче, что связано с удалением воздуха из межклетников растительной ткани. В присутствии ионов металлов цвет хлорофилла изменяется в результате замещения ими магния. В присутствии железа появляется коричневая окраска, олова и алюминия – сероватая, меди – ярко-зеленая.

Каротиноиды – группа ненасыщенных углеводородов терпенового ряда с 40 атомами углерода в молекуле. Их характерная особенность – наличие ионового шестичленного кольца. Известно более 50 каротиноидов.

Их физиологические функции выяснены не до конца. Поглощая сине-фиолетовые лучи спектра, они защищают хлорофилл от разрушения, участвуют в явлении фототропизма. Установлено, что наибольшее искривление побегов наблюдается при той же длине волны, что и максимум поглощения света  $\beta$ -каротином (460 нм). Кроме того, с каротиноидами связывают функцию полового размножения растений (в пыльце и рыльце пестика растений содержится повышенное количество каротиноидов).

Каротин – провитамин А, из него в организме животного и человека образуется витамин А. Наиболее распространен  $\beta$ -каротин. Оранжевая окраска моркови, абрикосов, персиков обусловлена в значительной степени каротином. Он содержится также в листовых овощах, где его присутствие маскируется хлорофиллом. В среднем в зеленых листьях содержится 0,1–0,2% каротиноидов, главным образом каротина, в то время как количество хлорофилла примерно в десять раз выше и достигает 0,5–1,5% сухой массы.

Ксантофилл – желтый пигмент листьев, продукт окисления каротина. Его аналоги содержатся также в кожуре цитрусовых плодов, жел-



тозерной кукурузе, цветках анютиных глазок, розы и в значительной степени обуславливают их окраску. Дополнительное включение в молекулу зеаксантина двух атомов кислорода по двойным связям  $C_5-C_6$  (эпоксидные группы) ведет к образованию виолаксантина (рис. 9).

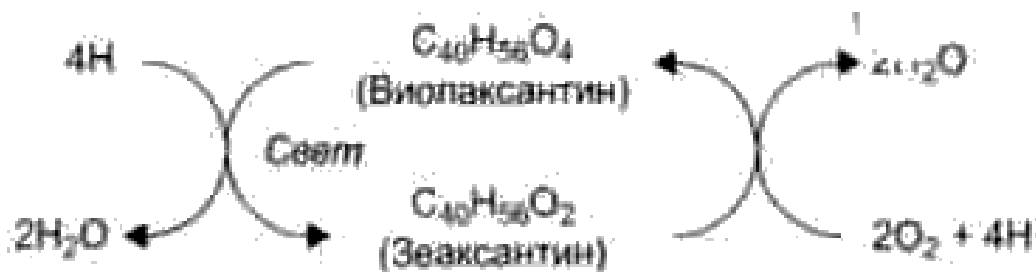


Рис. 9. Виолаксантинный цикл

Ликопин – изомер каротина. В красно-оранжевом пигменте плодов томатов его содержание доходит до 5–8 мг%. Биосинтез ликопина происходит по мере созревания томатов и характеризует этот процесс. Оптимальные условия для созревания – доступ кислорода и температура 22–24 °С. При более низкой и более высокой температуре образование ликопина замедляется. В агрономической практике известны случаи, когда плоды томатов из-за высокой температуры в период созревания (30 °С и выше) оставались желтыми, не краснели, хотя остальные показатели зрелых плодов, в частности вкус, консистенция, проявлялись.

В плодах перца содержится каротиноид капсантин. Обнаружены также бесцветные каротиноиды.

**Дубильные вещества** широко распространены в плодах, в овощах их меньше. Дубильные вещества – полиоксифенольные соединения с молекулярной массой порядка 500–3000. В растворах осаждают белки, растворимы в воде. Обладают вяжущим свойством и придают характерный терпкий оттенок вкуса.

Различают гидролизуемые и негидролизуемые конденсированные дубильные вещества. Первые при гидролизе распадаются на углеводы и фенольные кислоты. К ним относятся галлотанниды и эллаговые дубильные вещества. Конденсированные дубильные вещества содержат мало углеводов и образуют в присутствии минеральных кислот нерастворимые аморфные соединения – флобафены. Конденсированные дубильные вещества могут быть полимерами лейкоантоцианов или катехинов, а также сополимерами этих флавоноидов.

Дубильные вещества обуславливают многие качества и технологические особенности плодов и овощей.

С солями трехвалентного железа дубильные вещества дают черно-синее (гидролизуемые) или черно-зеленое (конденсированные) окрашивание. Поэтому не следует допускать контакта мякоти и сока плодов с железом, оловом, цинком, медью и некоторыми другими металлами.

Дубильные вещества (и другие полифенолы) легко окисляются с участием ферментов полифенолоксидаз. Образуются хиноны, а затем сложные продукты взаимодействия их между собой и другими веществами – флобафены, имеющие темную окраску. Вот почему разрезанные плоды темнеют на воздухе.

Мякоть плодов может темнеть и в том случае, когда покровные ткани их не нарушены (при нажимах, ушибах). Это объясняется тем, что клетки паренхимной ткани частично нарушаются и воздух межклеточного пространства получает доступ к дубильным веществам (и другим соединениям фенольной природы) и окисляет их с участием полифенолоксидаз. Некоторые сорта яблок восстанавливают окисленные вещества (темное окрашивание исчезает).

Важное значение имеют дубильные вещества в производстве соков и вин. Они способны осаждать белковые и другие вещества коллоидной природы и в результате осветлять продукт. Своеобразные оттенки вкуса и аромата появляются при аэрировании некоторых вин, что объясняется окислением дубильных веществ до хинонов.

**Минеральные вещества.** Из макроэлементов, встречающихся в плодах и овощах, наиболее важны кальций, калий, натрий, фосфор, а также железо.

В настоящее время выяснена важная роль в процессах обмена веществ и жизнедеятельности организмов многих микроэлементов, в первую очередь марганца, магния, молибдена, бора, цинка, меди и др.

Они способствуют образованию соединений с белками и нуклеиновыми кислотами, влияющих на различные биологические функции. Например, в состав хлорофилла входит магний. Многие микроэлементы активируют ферментативные реакции и в результате влияют на все процессы обмена веществ.

Внекорневые подкормки этими микроэлементами увеличивают продуктивность фотосинтеза, повышают урожайность, сахаристость плодов и содержание в них витаминов.

Молибден способствует усвоению растениями азотистых соединений, бор усиливает устойчивость ряда плодов и овощей к функциональным расстройствам обмена веществ, а также снижает поражение их болезнями, например, капусты – точечным некрозом, свеклы – почернением сердцевины.

Содержание микроэлементов в плодах и овощах невелико и еще недостаточно исследовано. Установлено, что подкормки растений микроэлементами (а также макроэлементами) обуславливают значительное обогащение ими органов растений, особенно листьев.

**Витамины и витаминоподобные вещества.** Витамины – органические вещества разнообразной химической природы. Они не являются источником энергии или пластического материала, а регулируют обмен веществ в организме. Отсутствие (авитаминоз), недостаток (гиповитаминоз), а также избыток (гипервитаминоз) витаминов ведет к всевозможным расстройствам.

Многие витамины синтезируются только в растениях, причем по отношению к некоторым из них (С, Р, фолиевая кислота) плоды и овощи являются монопольными поставщиками.

Витамины подразделяют на водорастворимые и жирорастворимые. Водорастворимые витамины, как правило, участвуют в окислительно-восстановительных реакциях распада органических веществ, т. е. способствуют их превращениям и усвоению. Действие витаминов, растворимых в жирах, проявляется медленнее и сказывается на процессах роста, формирования тканей и устойчивости организма.

**Водорастворимые витамины.** *Витамин В<sub>1</sub>* содержится (в значительном количестве) в цветной и брюссельской капусте, пастернаке, шпинате, бобах, горохе.

*Витамин В<sub>2</sub>* (рис. 10). Способен легко окисляться и восстанавливаться, на чем и основано его биологическое действие. Содержится в зеленых овощах и капусте (особенно в цветной), луке (зелень), зеленом горошке, грушах, лесной землянике.

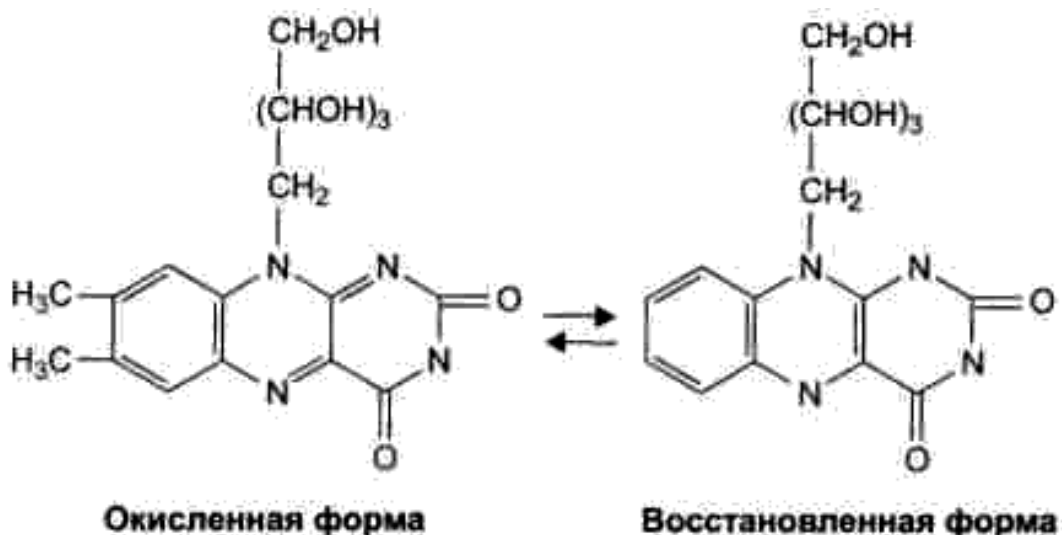


Рис. 10. Окислительно-восстановительные превращения рибофлавина

*Витамин B<sub>3</sub>* (рис. 11). Наиболее богаты этим витамином зеленые овощи.

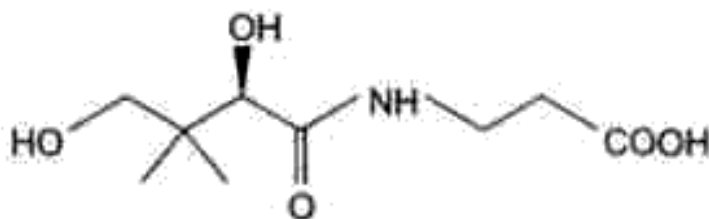


Рис. 11. Структура пантотеновой кислоты

*Витамин B<sub>5</sub> (PP)* (рис. 12). Содержится в значительном количестве в картофеле.

*Витамин B<sub>6</sub>* (рис. 13). В значительном количестве содержится в зеленых овощах, зеленом и овощном горохе.



Рис. 12. Структура витаминов группы PP

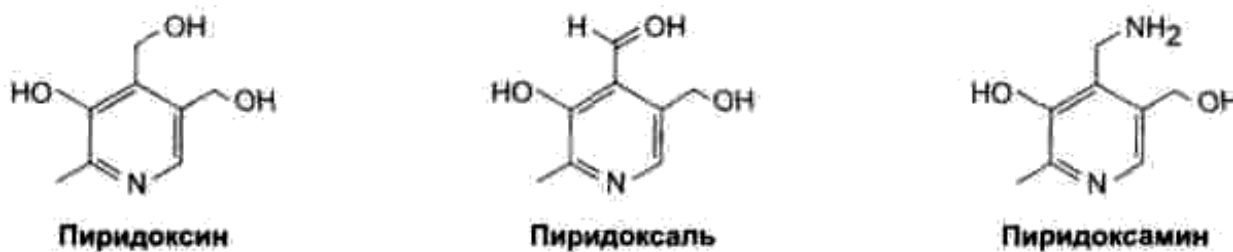


Рис. 13. Структура витаминов группы В<sub>6</sub>

Витамин В<sub>12</sub> (рис. 14). Содержится в зеленых овощах и ягодах.

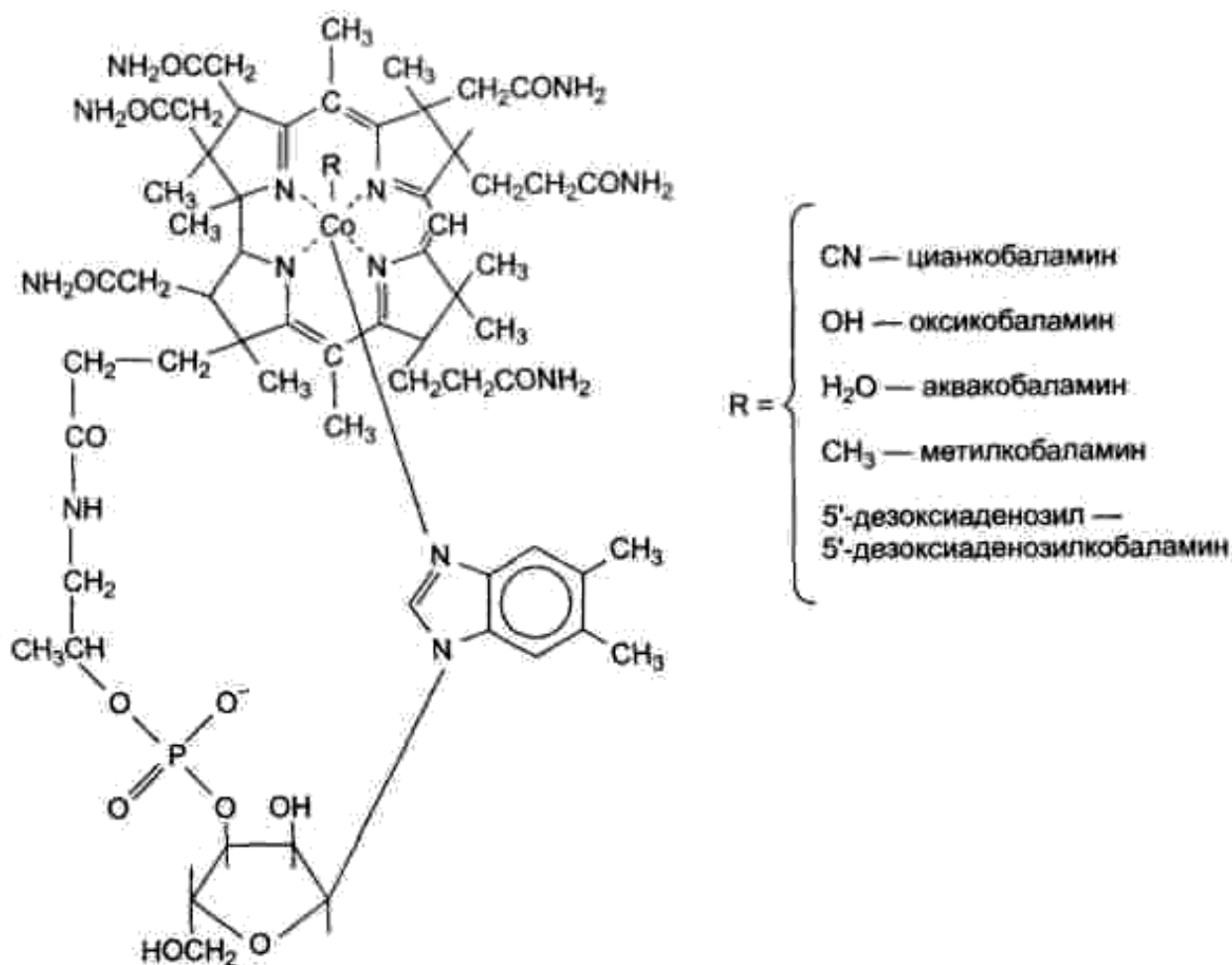


Рис. 14. Структура витамина В<sub>12</sub>

Витамин В<sub>с</sub> (рис. 15). Фолиевая кислота оказывает влияние на развитие молочнокислых бактерий, что имеет важное значение при производстве солено-квашеных продуктов. Таким же действием обладают некоторые другие близкие по строению молекул химические соединения. Основное из них – птероилглутаминовая кислота.

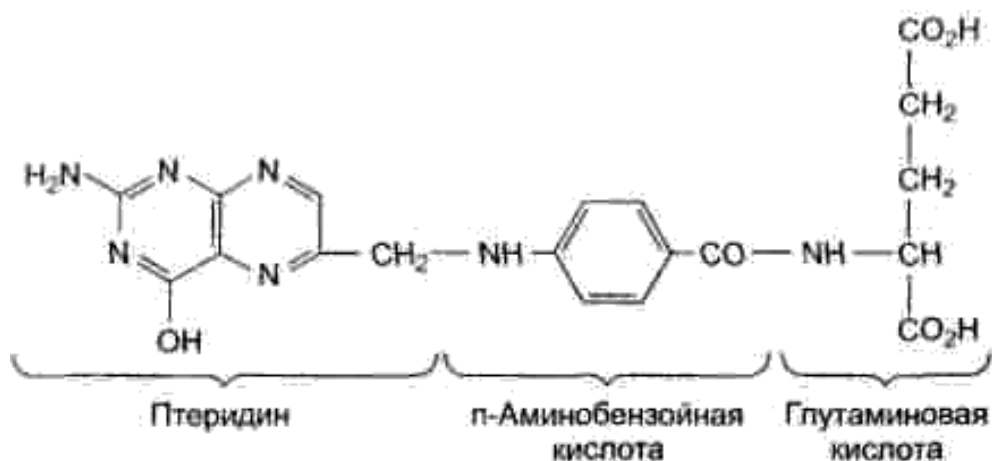


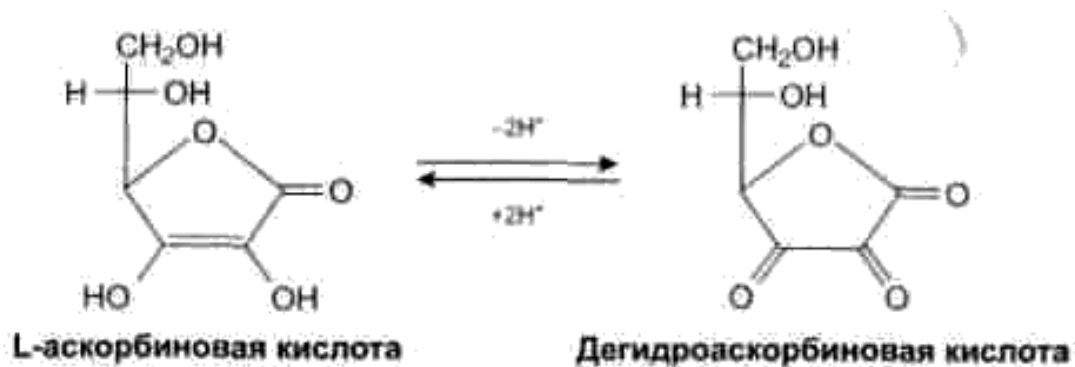
Рис. 15. Структура фолиевой кислоты

В большей части плодов и овощей витамин В<sub>с</sub> содержится в небольшом количестве (0,1–0,2 мг%), но в зеленых овощах, в частности в шпинате, а также в цветной и других видах капусты, в землянике количество его значительно выше.

**Витамин С.** Наиболее распространен в плодах и овощах. Аскорбиновая кислота представляет шестичленную углеродную цепочку. Она содержит легкоокисляемую и восстанавливаемую диэнольную группировку, поэтому играет важную роль в дыхательном обмене, являясь одним из переносчиков водорода.

Восстановленная и окисленная формы аскорбиновой кислоты легко взаимопревращаются (рис. 16). Обе формы физиологически активны. Окислительно-восстановительные превращения аскорбиновой кислоты тесно связаны с превращениями цистеин – цистин и глутатион восстановленный – глутатион окисленный. Восстановленная форма аскорбиновой кислоты защищает от окисления белки, содержащие сульфгидрильные группы. При этом образуется дегидроаскорбиновая кислота, т. е. окисленная форма аскорбиновой кислоты. При дальнейшем окислении дегидроаскорбиновая кислота разрушается и физиологическая активность ее утрачивается.

Во многих овощах обнаружена связанная форма аскорбиновой кислоты – аскорбиген (индольное производное аскорбиновой кислоты). Предшественником аскорбигена считается серосодержащий гликозид горчичного масла глюкобрассицин. Наибольшее количество аскорбигена находится в молодых растениях и в растущих частях (в точках роста и листьях содержание аскорбигена значительно выше, чем в клубнях, стеблях, корнях).



*Рис. 16. Окислительно-восстановительные превращения витамина С*

Высоким содержанием аскорбигена отличаются растения из семейства капустные: в капусте его в среднем 100–200 мг% сухой массы, а в зоне верхушечной почки – более 500–600 мг%. Аскорбиген растворим в воде, действует как витамин С, но не дает реакций на аскорбиновую кислоту. При осторожном гидролизе от аскорбигена отщепляется аскорбиновая кислота. Вот почему содержание ее в вареной капусте, несмотря на потери от окисления, часто оказывается не меньше, чем в свежей.

Таким образом, аскорбиген регулирует процессы роста – покоя и взаимопревращения форм аскорбиновой кислоты, является резервом индольных группировок, из которых могут образовываться ростстимулирующие вещества, например, индолилуксусная кислота (ИУК). Кроме того, аскорбиген является резервом аскорбиновой кислоты, которая может быть либо связана, либо освобождена в соответствии с физиологическим состоянием растений и его органов, а также в зависимости от условий консервирования и кулинарной обработки овощей.

Витамин С неравномерно распределен в плодах и овощах. Так, в плодах наибольшее его количество сосредоточено в кожуре и прилегающих слоях паренхимы, здесь его может быть в 3–5 раз больше, чем в средней пробе. В кожуре содержание фенольных соединений, пектина и некоторых других полезных веществ также значительно выше, чем в мякоти. Поэтому покровные ткани не следует счищать, так как при этом теряется много полезных компонентов. Если в саду применялись многочисленные обработки деревьев ядохимикатами

против болезней и вредителей, то в наружном слое кожуры может накопиться вредное для здоровья человека количество их остатков. Такие плоды необходимо тщательно промывать горячей водой или счищать с них кожуру. В различных частях овощей содержание витамина С также неодинаково. Так, если в лежких сортах белокочанной капусты в среднем содержится 40–50 мг% витамина С, то в кочерыжке оно возрастает до 80–100 мг% (поэтому при квашении кочерыжку лучше не удалять, а тщательно ее измельчать).

В процессе хранения содержание витамина С в плодах и овощах не остается постоянным, а уменьшается. У лежких сортов потери его незначительны, а первоначальное содержание витамина С удерживается длительное время. У нележких сортов оно быстро и значительно снижается. По динамике содержания витамина С можно в известной мере судить о лежкости сортов плодов и овощей. В зеленых овощах, нележких по своей природе, – салате, шпинате, луке (перо) и др. – при повышенной температуре, обычной во время уборки, за несколько суток теряется большая часть витамина С, особенно на солнечном свете. У капусты лежкого сорта Амагер при хранении до марта потеря витамина С составляет 7–12% первоначального содержания, у менее лежкого сорта Белорусская – 15–20%, у слаболежкого сорта Слава – до 40% и больше. В яблоках южных сортов (более лежких) потери витамина С меньше, чем в яблоках сортов средней полосы.

Так как аскорбиновая кислота легко окисляется, потери ее при различных способах термического консервирования плодов и овощей обычно значительны, особенно в присутствии воздуха (кислорода) и на свету. Поэтому стремятся удалить воздух (и инактивировать ферменты) бланшированием, вести обработку под вакуумом.

Аппаратуру для переработки плодов и овощей необходимо изготавливать из нержавеющей стали, так как ионы меди, железа и других металлов способствуют окислению аскорбиновой кислоты. Медленное нагревание усиливает разрушение витамина С по сравнению с кратковременным тепловым воздействием. Поэтому при варке овощи желательнее опускать в кипящую воду или варить их на пару. Высокая концентрация сахара способствует сохранению витамина С в продуктах переработки.



Сравнительно хорошо сохраняется витамин С при квашении капусты, так как процесс ведется в анаэробных условиях. В правильно заквашенной капусте потери витамина не превышают 15–20%. В квашеной капусте без рассола аскорбиновая кислота быстро разрушается в результате окислительных процессов.

Наиболее полно (до 90% первоначального содержания) сохраняется витамин С при быстром замораживании плодов и овощей и последующем хранении их при низкой температуре.

*Витамин Р.* К веществам, обладающим Р-витаминной активностью, относится ряд гликозидов из группы флавоноидов.

Действие витаминов С и Р сильнее проявляется при совместном введении. Отсутствие или недостаток одного из них ослабляет действие другого. Подобный эффект усиления одного фактора в присутствии другого называется синергизмом (в отличие от антагонизма, когда действие одного фактора в присутствии другого ослабляется). Витамины С и Р представляют собой взаимосвязанную пару в цепи окислительно-восстановительных превращений. Обычно оба витамина встречаются в плодах и овощах совместно, и, как правило, чем больше содержится одного из них, тем больше и другого. Имеются данные о взаимосвязи витаминов С и Р в окислительно-восстановительных превращениях и накоплении при развитии плодов, ягод, а также при переработке. Так, высокое содержание флавоноидов, и в частности антоцианов (например, в черной смородине), предохраняет аскорбиновую кислоту от окисления, и содержание витамина С в продукте переработки остается высоким и сохраняется длительный срок.

*Ж и р о р а с т в о р и м ы е в и т а м и н ы.* *Витамин А.* В растениях содержится провитамин – пигмент каротин. Изомеров каротина несколько, основное значение имеет β-каротин. Недостаток витамина А вызывает торможение роста организма и его общее истощение. Каротин благоприятно влияет на половое размножение растений, так как он стимулирует прорастание пыльцы.

Каротин находится во всех зеленых растениях (он всегда сопутствует хлорофиллу). Содержится в шпинате, салате, савойской капусте, зеленом горошке, овощной фасоле (лопатки) от 0,2–0,4 до 1–2,5 мг%. Богаты каротином морковь (до 8–12 мг%), томаты (1,5

–2 мг%), желтомясые (каротинные) тыквы (6–8 мг%), абрикосы и желтомясые персики (1–2 мг%), рябина и шиповник (6–8 мг%).

*Витамин D* – производное стеролов (рис. 17). Содержится в зеленных овощах.

*Витамин E* (рис. 18). Наиболее важные источники витамина E – облепиха, салат и другие зеленные овощи, капуста.

*Витамин K* (рис. 19). Наиболее важные источники этого витамина – зеленные растения и в первую очередь шпинат, салат, капустные овощи, томаты.

*Витамин F*. Под этим названием объединяют жирные ненасыщенные кислоты (линолевую, линоленовую, арахидоновую). Они содержатся в орехах.

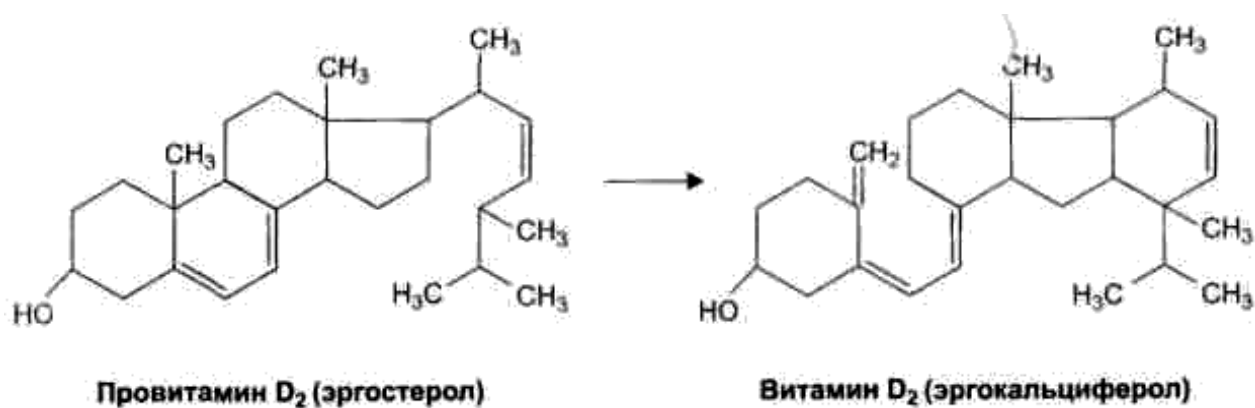


Рис. 17. Образование витамина D<sub>2</sub> из эргостерола

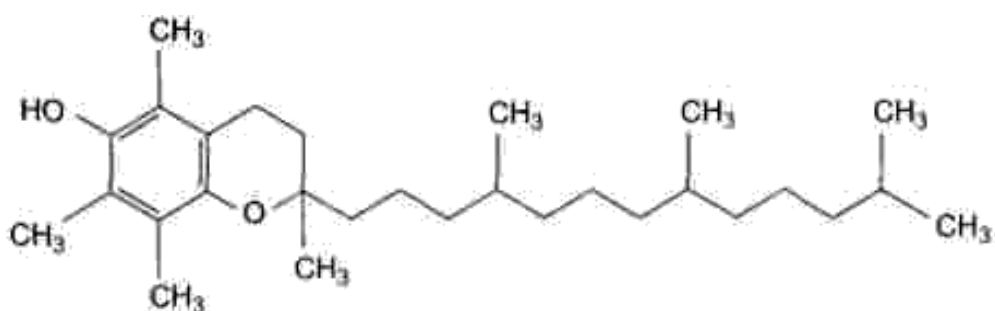
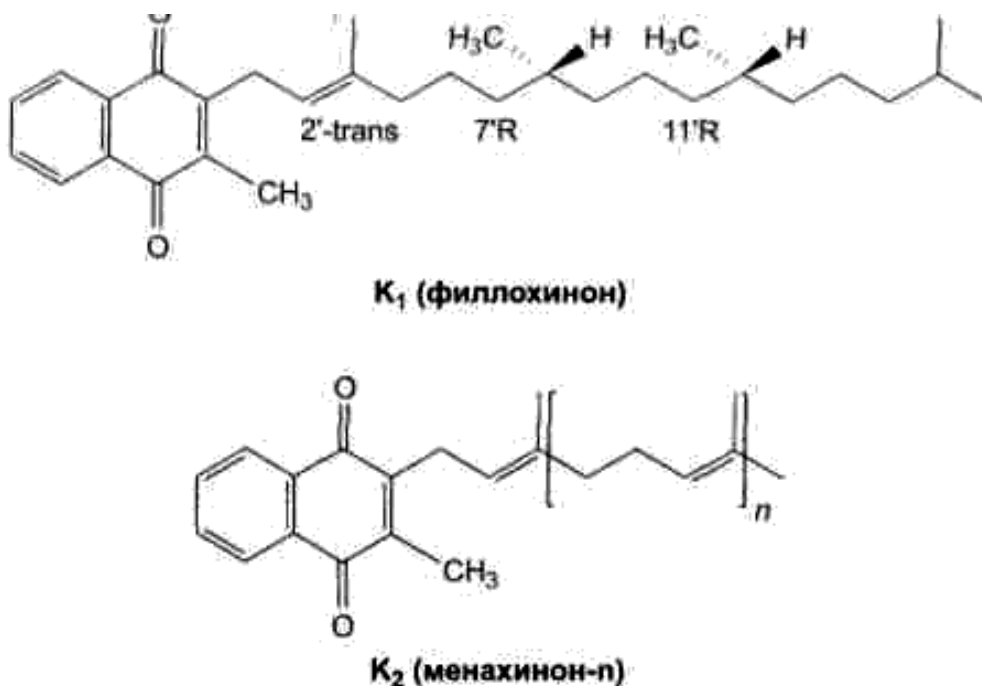


Рис.18. Строение α-токоферола (5, 7, 8-триметилтокол)



*Рис. 19. Структура витаминов группы К*

### **1.2.2. Структура растительных клеток**

Для правильного ведения технологических процессов и максимального сохранения ценных питательных веществ плодов и овощей необходимо знать строение растительной ткани, ее клеток.

Все органы растений состоят из клеток. Различают паренхимные клетки (по форме округлые или многогранные) и прозенхимные (удлиненные). Ткань плодов и овощей состоит в основном из паренхимных клеток. Прозенхимные клетки образуют преимущественно механические и проводящие ткани, которые свойственны стеблям растений.

Растительная клетка зрелых плодов и овощей имеет очень сложное строение. Состоит клетка из тонкой эластичной оболочки, внутреннего содержимого – протопласта, вакуолей, ядра и ряда субмикроскопических элементов.

*Оболочка* защищает клетку от воздействия внешней среды и придает ей форму. Состоит она из целлюлозы (клетчатки), сцементированной протопектином. Оболочка клеток обладает свойством полупроницаемости, благодаря чему в клетку проникают жидкости с меньшей концентрацией растворимых веществ по сравнению с веществами клетки. При достаточном доступе воды внутрь клетка становится упругой, внутреннее содержимое клетки плотно прижимается к

оболочке. Такое напряженное состояние клетки носит название тургора. При недостатке воды тургор исчезает, оболочка сморщивается, протопласт отстает от оболочки. Это явление называется плазмолизом.

*Протопласт* – прозрачная студенистая масса сложного химического состава, содержащая до 75-90% воды. В нем расположены цитоплазма, вакуоли, пластиды и другие субмикроскопические включения (лизосомы, рибосомы, митохондрии), выполняющие определенные функции в клетке.

По своей структуре цитоплазма имеет зернистое строение и разделяется на три слоя: плазмолему, мезоплазму и тонопласт. Плазмолемма – наружный слой цитоплазмы, примыкающий к оболочке клеток. Мезоплазма составляет основной центральный слой протопласта, а тонопласт – внутренний.

*Ядро* находится в центре клетки. Оно овальной или нитевидной формы, отделяется от цитоплазмы ядерной оболочкой и имеет одно или несколько ядрышек округлой формы. Ядра размножаются делением, что приводит и к делению клетки. Этот процесс длится примерно 22–24 часа. С ядром связано образование ферментов, играющих большую роль в жизнедеятельности тканей.

В зрелых клетках имеются *вакуоли*, представляющие собой полости, заполненные соком, являющимся водным раствором различных органических веществ – сахаров, белков, кислот и их солей, витаминов и других водорастворимых веществ. Клеточный сок плодов и овощей обладает большой пищевой ценностью. В зрелом растительном сырье клеточного сока содержится больше, чем в недозрелом.

В цитоплазме находятся *пластиды*, богатые ферментами, играющими важную роль в жизнедеятельности клетки. Различают три вида пластид: хлоропласты, хромопласты и лейкопласты. В хлоропластах неравномерно расположены хлорофилловые зерна округлой или многогранной формы, которые придают зеленую окраску растениям. Хлоропласты играют важную роль в процессах фотосинтеза. Хлорофилл является фотосенсибилизатором, т.е. веществом, которое поглощает световые лучи и использует поглощенную энергию для проведения фотосинтеза. В этом процессе вода, находящаяся в растениях, расщепляется на водород и кислород. Водород затем восстанавливает поглощенный хлоропластом диоксид углерода, образуя сахар гексозу, а кислород выделяется в атмосферу, обеспечивая жизнедеятельность всех живых существ земли. Полученный сахар в пластидах образует первичный крахмал и другие первичные продукты фотосин-

теза, которые с участием ферментов растений подвергаются дальнейшим превращениям.

Хромопласты равномерно расположены в протопласте клеток. Окрашены они в оранжевый цвет. Наличие хромопластов обуславливает оранжевую окраску таких плодов и овощей, как абрикосы и персики.

Лейкопласты – очень мелкие бесцветные пластиды шаровидной или продолговатой формы. Содержатся в клубнях, корнях, семенах растений. В них отлагается крахмал, являющийся запасным питательным веществом растений. В процессе созревания плодов и овощей возможен переход одних пластид в другие. Так, лейкопласты незрелых плодов могут превратиться в хлоропласты, которые в свою очередь переходят в хромопласты.

Клетки растительной ткани прочно соединены между собой, представляя единую живую систему, и подразделяются на покровные, механические, проводящие, ассимиляционные, запасные.

Все составные части клетки взаимосвязаны. Все вместе они обеспечивают жизнедеятельность клетки и протекание таких процессов, как питание, рост и размножение. В живой протоплазме непрерывно происходят процессы новообразования и разрушения химических веществ, в связи с чем живая растительная ткань отличается изменчивостью.

### **Контрольные вопросы к разделу 1**

1. По каким признакам разделяют традиционное растительное сырье?
2. Химический состав растительной клетки.
3. Какие органические вещества входят в состав растительной клетки?
4. Какие органеллы участвуют в синтезе липидов и углеводов?
5. Органеллы общего значения.
6. Какие органеллы клетки мембранного типа, какие – немембранного?
7. Продукты гидролиза полисахаридов.
8. Перечислите функции в клетке углеводов, белков, липидов.

## **2. ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ**

### **2.1. Создание и применение генетически модифицированного сырья**

Растения являются самой распространенной частью живого мира нашей планеты. Они играют колоссальную роль в решении жизненно важной проблемы удовлетворения человека пищей.

С незапамятных времен человек старался повысить урожайность и устойчивость растений против различных заболеваний и критических условий (соленые, кислые, неплодородные земли, засуха, мороз и т.д.), а также улучшить качество сельскохозяйственных продуктов. Для достижения этих целей в первую очередь использовали доступные средства, в основном селекцию. Несмотря на то, что видовое улучшение организмов путем селекции – длительный и трудоемкий процесс, требующий большой интуиции, наши предки все же сумели вывести разные виды зерновых (пшеница, овес, рожь, кукуруза, рис, соя), бахчевых и многие виды однолетних и многолетних растений, существенно отличающиеся от своих предшественников. Традиционная селекция, в частности методы, основанные на половом скрещивании и отборе, и сегодня не утратила своего значения и до сих пор с успехом используется, хотя в последнее время в селекции высших растений наметились принципиально новые методологические подходы, которые дают возможность улучшения и усовершенствования существующих сельскохозяйственных культур.

Новые агрономические методы основаны на (бессеменном) размножении растений микроклонированием, выведении новых сортов путем слияния протопластов и обогащения генома новыми нехарактерными для этого вида генами или дублирования существующих.

Основные цели применения методов генной инженерии высших растений – преодоление полового барьера, существующего между видами при выведении новых сортов и получении межвидовых гибридов; получение растений, имеющих запрограммированные свойства.

Сегодня с помощью генной инженерии полностью или частично разрешены следующие проблемы: увеличена устойчивость некоторых растений к гербицидам; повышена устойчивость растений к микробным заболеваниям; улучшены товарные качества.

Уничтожение сорняков гербицидами способствует повышению урожайности растений и более эффективному использованию потенциала почвы. Однако выяснилось, что остатки пестицидов (и в ряде случаев промежуточные продукты их окислительной деградации в растительной клетке) могут представлять опасность для здоровья людей и являются экологическими загрязнителями окружающей среды. В связи с этим выведены растения, резистентные к некоторым гербицидам. Технологии получения таких растений признаны эффективными, дешевыми и экологически оправданными средствами в борьбе с сорняками.

Количество потерь урожая во время хранения достаточно велико от заболеваний, вызванных насекомыми. С помощью генно-инженерных манипуляций внутренний потенциал резистентности продуктов сельскохозяйственных растений можно увеличивать. Например, гены спорообразующей бактерии *Bacillus thuringiensis* клонированы в различные растения, в итоге были получены впечатляющие результаты в борьбе против заболеваний, вызываемых насекомыми.

Особенно большой ущерб урожаю наносят грибковые и вирусные заболевания. В настоящее время путем трансформации генов достигнут значительный рост числа растений, устойчивых к вирусным заболеваниям. Для зерновых культур (особенно риса) эти проблемы практически решены.

Большая часть потерь урожая – результат заражения продукции микроорганизмами. Особенно быстро поддаются порче мягкие продукты, что выражается в их преждевременном созревании, гниении, потере вкуса, аромата и внешнего (товарного) вида. Повреждения и трещины плодов (кроме механического) в основном вызваны микрофлорой, существующей в самом плоде, под действием окислительных и гидролитических ферментов. Повреждения плодов происходят в результате действия экзогенных ферментов микроорганизмов, развивающихся в продуктах, хотя в процессе гниения возможно активное участие и эндогенных ферментов самого продукта. Можно приостановить или значительно понизить действие этих ферментов (пектиназ, целлюлаз, ксиланаз, амилаз, полифенолоксидазы, пероксидазы и др.) путем использования генетических манипуляций. Примером может служить действие полигалактуроназы, находящейся в мякоти помидора, – фермента, который при хранении плода путем разруше-

ния составных частей клеточной стенки вызывает преждевременное созревание, и, если при хранении действие фермента продолжается, гниение неизбежно. Этот процесс начинается с момента появления окраски. Например, если плод оставлен на растении для приобретения более интенсивной окраски, то с помощью ингибирования гена полигалактуроназы можно сохранить плотность плода до полного его созревания. Такой сорт помидоров, у которого улучшен вкус и продлен срок хранения, выведен американской фирмой «Calgen». Интересно, что только в США годовой оборот трансгенного помидора превысил 3,5 млрд долларов; поэтому расходы, затраченные на улучшение его качества, полностью оправданы. С помощью методов генной инженерии достигнуты определенные успехи в продлении срока хранения большого количества фруктов и овощей.

В настоящее время развитие генной инженерии растений дает возможность манипулирования одним геном, что означает приобретение растением одного нового свойства или признака. Промышленные сорта растений, обогащенные одним геном: зерновые (кукуруза, пшеница, рис, ячмень); бобовые (соя, подсолнух, рапс); овощи и ягоды (помидор, картофель, цветная капуста, морковь, огурец, свекла сахарная, клубника, сельдерей); многолетние растения (яблоня, орех, ель, тополь, пальма).

Таким образом, суть генной инженерии заключается в конструировании организмов с заданными свойствами путем целенаправленных операций над молекулами или структурами, несущими генетическую информацию. При этом видовая принадлежность организмов не меняется, но появляются не свойственные им признаки. Достижения современной науки позволяют осуществить перенос генов любого организма в клетку реципиента для получения растений с рекомбинантными генами и, соответственно, новыми свойствами.

**Г е н е т и ч е с к и м о д и ф и ц и р о в а н н ы е о р г а н и з м ы (ГМО)** – организм или несколько организмов, любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинацию генов.

**Г е н е т и ч е с к и м о д и ф и ц и р о в а н н ы е и с т о ч н и к и п и щ и (т р а н с г е н н ы е п и щ е в ы е п р о д у к т ы) (ГМИ)** – ис-



пользуемые человеком в пищу в натуральном или переработанном виде пищевые продукты (компоненты), полученные из генетически модифицированных организмов.

### Классификация ГМИ

Генетически модифицированные растения, используемые в качестве сырья для пищевой промышленности, распределяются на две группы:

I. Устойчивые к вредным факторам окружающей среды (к гербицидам, насекомым, вирусам, к неблагоприятным погодным условиям).

II. С улучшенными потребительскими свойствами:

- 1) с измененной окраской и формой;
- 2) устойчивые при хранении;
- 3) с повышенной пищевой ценностью:
  - а) с измененным аминокислотным составом;
  - б) с повышенным содержанием  $\beta$ -каротина.

### Методы трансформации растительной клетки

На первом этапе создания ГМО из большого числа генов, входящих в геном организма, выделяют один конкретный ген, контролирующий развитие того или иного признака (свойства) или кодирующий вполне определенный белок. Перенос генов в клетки других организмов осуществляется с помощью векторов, в качестве которых могут выступать ДНК плазмиды, ДНК вируса или ДНК фага.

К методам, трансформирующим растительные клетки, относятся следующие:

1) микроинъекции – введение в ядро растительной клетки векторной ДНК с включенным в нее трансгеном с помощью тонких стеклянных микроигл;

2) электропорация – воздействие на растительные протопласты и находящуюся в окружающей среде ДНК высоковольтным импульсом (200–350 В) в течение 54 мс с целью обратимого увеличения проницаемости биомембран. ДНК проникает в клетку через образующиеся на короткое время поры;

3) трансфекция – встраивание чужеродной ДНК в культивируемые эукариотические клетки в результате обработки их изолированной ДНК (например, при добавлении ионов кальция);

4) упаковка трансформирующей ДНК в липосомы с целью защиты генетического материала от разрушительного действия нуклеаз, находящихся вне клеток. Липосомы, оболочка которых состоит из фосфолипидов, захватываются клетками, и ДНК попадает внутрь;

5) бомбардирование суспензионной культуры, каллусной ткани или 4–5-дневных культивируемых незрелых зародышей однодольных микрочастицами (частицами золота или вольфрама размером 0,6–3 мкм), на которые наносится ДНК вектора, содержащая необходимый трансген. Частицы, вылетевшие из «генной пушки», проникают в клетки и ядра.

## **2.2. Обеспечение безопасности пищевой продукции из генетически модифицированных источников**

Продукты, полученные из ГМИ, могут содержать неизвестные компоненты. Поэтому для их оценки на первом этапе проводится анализ композиционной эквивалентности, то есть сравниваются молекулярные и фенотипические характеристики ГМИ и их традиционных аналогов, определяется содержание ключевых нутриентов, антиалиментарных, токсических веществ и аллергенов (характерных для данного вида продовольствия или определяемых свойствами переносимых генов).

Если при изучении композиционной эквивалентности не обнаруживают отличий ГМИ от традиционных продуктов, то ГМИ причисляют к первому классу безопасности, то есть считают его полностью безвредным для здоровья потребителей. При обнаружении каких-либо отличий (второй класс безопасности) или полного несоответствия (третий класс) сравниваемых продуктов (компонентов) переходят к следующим этапам оценки, предусматривающим изучение пищевых и токсикологических характеристик ГМИ.

В настоящее время большинство ГМИ пищи относят ко второму классу безопасности, учитывая присутствие в их составе 1–2 белков, отвечающих за проявление желаемого признака, что отличает трансгенный продукт от традиционного.

С целью идентификации ГМИ среди новых продуктов используют методы генной биотехнологии, ориентированные на определение содержания в продукте рекомбинантной ДНК и детерминированного ею белка. Именно новые белки могут индуцировать аллергенные свойства и токсичность ГМИ.

Комплексная оценка пищевой продукции, полученной из ГМИ, включает три направления: медико-биологическое, медико-генетическое и технологическое.

Медико-биологическая экспертиза пищевой продукции, полученной из ГМИ, оценивает ее химический состав, показатели качества и безопасности; биологическую ценность и усвояемость (в экспериментах на лабораторных животных); токсикологические характеристики (в экспериментах на лабораторных животных – срок – не менее 5–6 месяцев); аллергенные свойства; мутагенное действие; иммуномоделирующие свойства.

В результате медико-генетической оценки трансгенной продукции дается характеристика вносимой последовательности генов, регуляторных последовательностей генов, оцениваются эффекты выражения других генов, стабильность ГМИ, влияние ГМИ на окружающую среду.

Технологическая экспертиза оценивает потребительские свойства и функционально-технологические параметры продукции из ГМИ.

В России и странах ЕС введена обязательная маркировка пищевой продукции, содержащей более 0,9 % компонентов из ГМИ, включая произведенную из ГМИ, но не содержащую ДНК и белок. Согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 «Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» для пищевых продуктов из ГМИ обязательна следующая информация: «генетически модифицированная продукция», или «продукция, полученная из генетически модифицированных источников», или «продукция содержит компоненты из генетически модифицированных источников» (для пищевых продуктов, содержащих более 0,9 % компонентов ГМИ), а также информация о государственной регистрации.

Пищевые продукты, полученные из ГМИ, но не содержащие ДНК и белок, в дополнительном этикетировании не нуждаются в случае полной эквивалентности пищевой ценности продукта традиционному аналогу.

В настоящее время в мире уже создано и разрешено для реализации более 100 сортов генетически модифицированных сельскохозяйственных культур. Производимые с их использованием пищевые продукты широко представлены на мировом продовольственном рынке. По результатам комплексной экспертизы допущены к использованию в качестве продовольственного сырья следующие генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры: соя линии 40-3-2, устойчивая к гербициду «глифосат» (торговое название «Roundup»), производства фирмы «Monsanto Co» (США); картофель сортов «Рассет Бурбанк Ньюлив» и «Супериор Ньюлив», устойчивые к колорадскому жуку, производство фирмы «Monsanto Co»; кукуруза линии GA 21, устойчивая к гербициду «глифосат», производство фирмы «Monsanto Co»; линии MON 810, устойчивая к стеблевому мотыльку, производство фирмы «Monsanto Co» и др.

## **Контрольные вопросы к разделу 2**

1. Как классифицируют генетически модифицированные растения, используемые в качестве сырья для пищевой промышленности?
2. Назовите методы трансформации растительной клетки.
3. На чем основана электропорация?
4. Для чего осуществляют упаковку генетического материала в липосомы?
5. Какой металл используется для бомбардирования микрочастицами?
6. Приведите примеры генетически модифицированных растений.
7. Контроль за пищевой продукцией из ГМИ.
8. Медико-генетическая экспертиза трансгенной пищевой продукции.
9. Какие генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры допущены к использованию в качестве продовольственного сырья?
10. Как осуществляется маркировка пищевой продукции, содержащей более 0,9 % компонентов из ГМИ?

## 3. БИОКОНВЕРСИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТОВ

### 3.1. Общая характеристика и классификация ферментов

#### 3.1.1. Сходства и отличия ферментов от неорганических катализаторов

Одной из важнейших функций белков является катализ химических реакций. Подавляющее число химических превращений в организме носит каталитический характер.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы (от греч. *enzyme* – в дрожжах или от лат. *fermentatio* – брожение).

Ферменты ускоряют реакции в миллионы раз. Многие реакции не могут протекать в организме в отсутствие ферментов. Например, гидратация углекислоты, катализируемая карбоангидразой, является одной из наиболее быстрых реакций.

Сходства между ферментами и химическими катализаторами:

1. Не расходуются и не образуются в процессе реакции.
2. Катализируют только энергетически возможные реакции.
3. Не изменяют свободную энергию субстратов и продуктов реакции.
4. Не смещают равновесия реакции, а ускоряют его наступление.

Различия между ферментами и химическими катализаторами:

1. Ферменты являются белками и поэтому катализируют реакции в «мягких» условиях (давление 1 атм, температура 37 °С и нейтральное значение рН).

2. Ферменты обладают физико-химическими свойствами, характерными для белков: высокой молекулярной массой, амфотерностью, не способны к диализу, подвергаются высаливанию и денатурации.

3. Для ферментов характерна более высокая эффективность. Например, энергия активации разложения перекиси водорода равна 75,2 кДж/моль. При добавлении неорганического катализатора платины энергия активации снижается до 50,2 кДж/моль. Фермент каталаза снижает энергию активации до 8,3 кДж/моль.

4. Активность фермента регулируется и контролируется на генетическом уровне (на этапе синтеза белка-фермента и его фолдинга) и посредством низкомолекулярных соединений (субстратов, продуктов реакции и других низкомолекулярных эффекторов).

5. Ферменты обладают специфичностью, т.е. катализируют определенные реакции. При абсолютной специфичности действуют на один субстрат (S) или группу родственных субстратов, а при относительной специфичности действуют на определенный тип связи. Специфичность фермента обусловлена его конформацией.

Различают 4 вида специфичности ферментов:

1. Абсолютная специфичность – фермент катализирует превращение только одного субстрата (например, аргиназа расщепляет аргинин).

2. Относительная специфичность – фермент расщепляет определенный тип связи. Например, липаза гидролизует жиры по месту сложноэфирной связи на глицерол и жирные кислоты.

3. Относительная групповая специфичность – фермент расщепляет определенный тип связи, но в ее образовании участвуют определенные функциональные группы.

4. Стереохимическая специфичность – фермент катализирует превращение определенного стереоизомера. Например, оксидаза L-аминокислот превращает только L-аминокислоты.

Участок фермента, в котором происходит специфическое связывание субстрата и его превращение в продукт, называется активным центром. У простых ферментов активный центр состоит из аминокислот, у сложных, кроме аминокислот, в состав активного центра входит кофактор.

В организме действуют, как правило, полиферментные системы, в результате чего происходит многоэтапное превращение вещества с допустимыми для организма перепадами энергии.

Полиферментные системы (комплексы) представляют собой несколько ферментов, катализирующих ряд согласованных реакций, причем конечные продукты одной ферментативной реакции являются субстратами для следующей. Различают три типа полиферментных комплексов:

а) ферменты растворены в цитоплазме и контакт субстратов с ними осуществляется посредством диффузии;

б) ферменты соединены друг с другом за счет белковых взаимодействий;

в) ферменты соединены друг с другом и иммобилизованы на внутриклеточных или цитоплазматических мембранах.

Изоферменты – это разновидности ферментов, катализирующие одну реакцию, но отличающиеся по своему составу и физико-химическим свойствам.

Изоферменты встречаются у ферментов, имеющих четвертичную структуру. Они различаются по кинетическим параметрам, чувствительности к регуляторам и т.д.

### ***3.1.2. Классификация и номенклатура ферментов***

Ферменты называются добавлением суффикса -аза к названию субстрата, на который данный фермент действует. Например, ферменты, гидролизующие крахмал (амилон), были названы амилазами, гидролизующие жиры (липос) – липазами, ферменты, гидролизующие белки (протеины) – протеиназами.

Используются названия для групп ферментов, катализирующих сходные по механизму реакции. Их название строится по принципу «субстрат – тип реакции». Например, ферменты, которые переносят остаток фосфорной кислоты от АТФ на другую молекулу, называются киназами (глюкокиназа катализирует перенос фосфорильного остатка от АТФ на глюкозу).

Тривиальные названия не показывают механизма действия, но они широко используются.

Международный совет биохимиков предложил систематическое название и классификацию ферментов по типу и механизму катализируемой реакции.

Реакции и ферменты, их катализирующие, делят на 6 классов, каждый из которых состоит из 4–13 подклассов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы (синтетазы).

***Оксидоредуктазы.*** К классу оксидоредуктаз относятся ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции с участием двух субстратов А и В. Систематические названия их составляют по форме «донор: акцептор-оксидоредуктаза». Различают следующие основные оксидоредуктазы: оксидазы, которые катализируют перенос протонов (электронов) на кислород; дегидрогеназы, катализирующие реакции дегидрирования (отщепление водорода); цитохромы, обеспечивающие перенос только электронов: включение кислорода в другой субстрат (включение атома кислорода – образование ОН-группы, монооксигеназы; включение молекулы кислорода – диоксигеназы); каталаза и пероксидаза, катализирующие реакции с

участием перекиси водорода (перенос протонов и электронов на молекулу кислорода).

**Трансферазы.** К классу трансфераз относятся ферменты, катализирующие реакции межмолекулярного переноса групп X (отличной от атома водорода) с субстрата А на субстрат В. Катализируют перенос одноуглеродных остатков, ацильных, гликозильных, альдегидных или кетонных, нуклеотидных остатков, азотистых групп, остатков фосфорной и серной кислот и др. Наименование этих ферментов составляется по форме: «донор: транспортируемая группа – трансфераза». Используется ряд специальных терминов для названия ферментов этого класса: киназы – перенос фосфатного (фосфорильного) остатка от нуклеозидтрифосфата (например, АТФ) на другую молекулу или, наоборот, с образованием нуклеозидтрифосфата: фосфомутазы – внутримолекулярный перенос фосфатного остатка.

**Гидролазы** катализируют гидролиз эфирных, сложноэфирных, пептидных и гликозидных связей, кислородных ангидридов, связей С–С, С–галоген и Р–N, т. е. расщепление внутримолекулярных связей с участием воды. Наименование их составляется по форме: «субстрат – гидролаза».

**Лиазы** (синтазы) – это ферменты, отщепляющие группы от субстратов по негидролитическому (без участия воды) механизму, с образованием двойных связей. Ферменты действуют на связи С–С, С–О, С–N, С–S и С–галоген. Название ферментов: «субстрат – лиаза». В рекомендуемых названиях используются термины «альдолаза», «декарбоксилаза».

**Изомеразы** катализируют различные типы оптических, геометрических и позиционных изомеров. К классу изомераз относят также рацемазы и эпимеразы.

**Лигазы** (синтетазы) катализируют соединение двух молекул, сопряженное с разрывом пирофосфатной связи АТФ или другого макроэргического соединения. Систематическое название этих ферментов составляют по форме «А:В лигазы», где через А и В обозначают исходные вещества. В этот класс включены ферменты, катализирующие реакции образования связей С–О, С–S, С–N, С–С.

Каждый фермент имеет специальный шифр, состоящий из четырех кодовых чисел, разделенных точками; первая цифра характеризует класс реакции, вторая – подкласс, третья – подподкласс, четвертая указывает порядковый номер фермента в его подподклассе.

Название класса указывает на тип химической реакции, катализируемой ферментами. Классы делятся на подклассы, а те в свою



очередь на подподклассы. Подкласс уточняет действие фермента, так как указывает на природу химической группы субстрата, атакуемой ферментом. Подподкласс уточняет природу атакуемой связи субстрата или природу акцептора, который участвует в реакции. Дополнительная информация, если она необходима для уточнения, заключается в скобки.

### ***3.1.3. Структурная и функциональная организация ферментов***

#### **Структурная организация ферментов**

По строению ферменты делятся на простые (однокомпонентные) и сложные (двухкомпонентные) белки. Простые белки-ферменты состоят из аминокислот. Сложные белки-ферменты состоят из белковой части – апофермента и небелковой части – кофактора. Кофактор, прочно связанный с апоферментом, называется простетической группой. Комплекс апофермента и прочно связанного кофактора называется холоферментом; кофактор, который связан с апоферментом нековалентными связями и легко отделяется при диализе, называется коферментом. Кофермент присоединяется во время реакции к молекуле фермента подобно субстрату, химически изменяется и затем снова освобождается.

Роль коферментов выполняют две группы веществ: витамины и их производные и вещества невитаминной природы. Ко второй группе веществ относятся нуклеотиды (УДФ-глюкоза), фосфаты моносахаридов (2,3-бисфосфоглицерат), металлопорфирины (хлорофилл) и пептиды (глутатион). Кофактором могут быть неорганические ионы, например,  $Mg^{2+}$ . Роль металлов: 1) обеспечивают образование фермент-субстратного комплекса; 2) металлы с переменной валентностью участвуют в транспорте электронов; 3) способствуют формированию нативной структуры фермента; 4) облегчают образование связи между апоферментом и коферментом.

#### **Функциональная организация ферментов**

Вещества, вступающие в ферментативную реакцию, называются субстратами. В результате ферментативных превращений получают продукты реакции.

В трехмерной структуре фермента выделяют несколько участков, несущих определенную функцию. В молекуле фермента выде-

ляют активный центр, т. е. участок, с которым связывается субстрат и где протекает каталитическая реакция.

Активный центр фермента формируется при образовании третичной структуры белка за счет пространственного сближения радикалов аминокислот. Потеря конформации фермента в результате денатурации приводит к разрушению активного центра. Активный центр образуется боковыми радикалами аминокислот, которые могут располагаться на значительном расстоянии в первичной структуре. Он представляет собой полость, щель или карман, который занимает малую область фермента. Активный центр не является жесткой структурой. Его конформация изменяется при связывании субстрата

У сложных ферментов в состав активного центра входят кофакторы. В активном центре выделяют контактный (якорный) участок, связывающий субстрат и каталитический участок, где происходит превращение субстрата. Субстрат связывается с активным центром фермента нековалентными связями. Взаимодействие между ферментом и активным центром является необходимым для формирования переходного состояния. Взаимодействие субстратов и активного центра ферментов требует их сближения (для реализации слабых взаимодействий) и наличия комплементарных функциональных групп. Субстраты связываются с активным центром с образованием фермент-субстратного комплекса. Продукт высвобождается, и фермент снова используется для реакции.

По теории Фишера субстрат подходит к ферменту, как ключ к замку, т.е. между конформацией активного центра и конформацией субстрата существует абсолютное пространственное соответствие.

Согласно теории Кошланда, активный центр фермента формируется окончательно при взаимодействии его с субстратом, т.е. субстрат меняет активный центр соответственно своей форме в момент контакта с ферментом.

Кроме активного центра, у ряда ферментов имеется регуляторный, или аллостерический, центр, который в молекуле фермента, как правило, пространственно отделен от активного центра. К аллостерическому центру присоединяются вещества – эффекторы, которые делятся на активаторы и ингибиторы. Присоединение эффектора к аллостерическому центру приводит к изменению третичной и/или четвертичной структуры молекулы фермента и соответственно конфигурации активного центра, вызывая снижение или повышение ферментативной активности. Ферменты, имеющие аллостерический центр, называются аллостерическими.

### *3.1.4. Механизм действия ферментов*

Реакции, катализируемые ферментами, протекают в очень мягких условиях с чрезвычайно высокой скоростью и избирательностью, причем зачастую под действием ферментов происходят такие неожиданные и сложные реакции, которые не удастся осуществить даже с применением высокой температуры, давления и активных химических реагентов.

#### Фермент-субстратные комплексы

Еще задолго до того, как стали доступны чистые ферменты и была выяснена их белковая природа, у большинства энзимологов сложилось убеждение, что решающее значение для осуществления ферментативного процесса имеет образование соединения субстрата с ферментом. В ходе ферментативной реакции образуются промежуточные соединения фермента с субстратом. В результате экспериментальных исследований по влиянию концентрации сахарозы на активность сахаразы было установлено, что при низких концентрациях субстрат заметно влияет на скорость реакции, а при высокой концентрации дальнейшее ее повышение не оказывает никакого действия. Из этого следует, что для протекания ферментативной реакции необходимо образование комплекса фермента с субстратом.

При образовании и превращениях фермент-субстратных соединений различают несколько стадий:

1. Присоединение молекулы субстрата к ферменту.
2. Преобразование первичного промежуточного соединения в один или несколько последовательных активированных комплексов.
3. Отделение конечных продуктов реакции от фермента.

При реакциях переноса, когда фермент играет роль промежуточного акцептора определенных групп, и при некоторых реакциях расщепления образуются промежуточные комплексы, в состав которых входит не вся молекула субстрата, а та или иная часть этой молекулы.

Обычно наиболее быстро протекает первая стадия (и при обратимых реакциях – заключительная фаза третьей стадии). Во многих случаях скорость присоединения молекулы субстрата лимитируется в основном диффузией ее из раствора к каталитически активному участку фермента, с последующей ориентацией на нем. Низкая энергия

активации этой стадии – показатель того, что у данного фермента первичный комплекс с субстратом образуется за счет слабых типов связи. Связывание субстратных молекул в положении, стерически благоприятном для протекания реакций, само по себе недостаточно для объяснения высокой эффективности ферментативного катализа.

Преобразование молекулы субстрата во второй стадии связано с разрывом и замыканием ковалентных связей. Оно требует активирования субстрата, т. е. включает образование одного или нескольких переходных состояний (активированных комплексов). Абсолютную скорость ферментативной реакции в целом лимитирует прохождение через состояние, имеющее наибольшую свободную энергию, т. е. переход через наиболее высокий энергетический барьер: чем выше этот барьер, тем медленнее протекает каталитический процесс.

Реакции, катализируемые ферментами, характеризуются более низкими значениями энергии активации, чем соответствующие им реакции, катализируемые  $H^+$ ,  $OH^-$  и другими ионами или органическими молекулами. Катализатор не может сдвинуть положение равновесия в такой реакции, он просто увеличивает скорость превращения за счет понижения энергии активации. Однако стадии реакции, связанные с образованием и расщеплением ковалентных связей, даже если они существенно облегчены, тем не менее, обычно остаются относительно медленными. Структура частицы субстрата в фермент-субстратном комплексе в переходном состоянии модифицирована так, что это приводит к изменению прочности связей (к снижению энергетических барьеров), в результате чего значительно повышается вероятность протекания реакции. Фермент может вызывать изменения, уменьшающие прочность связей в молекуле субстрата (повышающие ее реакционную способность в определенном направлении) путем смещения электронов (поляризация связей), а также связывая субстрат в «напряженной» конфигурации. Группы фермента, к которым присоединяется субстрат, могут быть расположены в пространстве таким образом, что после связывания две части молекулы субстрата А–В удерживаются несколько дальше друг от друга, чем в молекуле А–В, находящейся в свободном состоянии. В результате происходит растяжение и ослабление связи А–В и эта связь легче поддается, например, гидролизу. Продукты же гидролиза – АОН и ВН, присоединяясь к тем же группам фермента, удерживаются на расстоянии, более близком, чем то, на котором они обычно находятся в

растворе; фермент как бы стремится выдавить молекулу воды и образовать молекулу А–В (обратимость действия). Пространственная конфигурация частицы субстрата в фермент-субстратном комплексе – промежуточная между начальным и конечным положением остатков А и В.

Структурные аналоги субстрата, нормальная конфигурация которых соответствует напряженной конфигурации субстрата, могут оказаться очень эффективными конкурентными ингибиторами фермента.

Когда молекулы субстрата первоначально связываются ферментами в положении, при котором конфигурация их приближается к конфигурации в переходном состоянии, то для повышения реактивности не требуется существенного последующего активирующего смещения субстрата с созданием других стерических отношений. Действие липаз объясняется механизмом, согласно которому молекулы донора и акцептора фосфата располагаются на поверхности фермента таким образом, что атом кислорода акцептора находится в положении, благоприятствующем непосредственному взаимодействию с атомом фосфора фосфорильной группировки, подлежащей переносу. Подобный механизм не требует допущения каких-либо изменений в положении связанных с ферментом реагирующих соединений в процессе реакции, за исключением незначительного сдвига в положении атомов фосфорильной группировки. Действительно, на основании величин ван-дер-ваальсовых радиусов и длины связи Р–О подсчитано, что для разрыва связи с донором и установления связи с акцептором атом фосфора должен сместиться всего лишь на 0,1.

В образовании фермент-субстратных комплексов могут участвовать в различных сочетаниях как ковалентные, координационные и ионные связи, так и менее прочные формы связей между молекулой фермента и отдельными группами молекулы субстрата – водородные связи, электростатическое притяжение полярных групп, ван-дер-ваальсовы силы сцепления между неполярными участками молекул.

В образовании промежуточных комплексов играют роль менее прочные типы связей, например, заряженные группы молекулы субстрата могут присоединяться к ферменту в результате действия электростатических сил (с образованием ионных и биполярных связей). В молекуле фермента имеется анионный центр, связывающийся при образовании фермент-субстратного комплекса с катионной группой ацетилхолина (и других азотистых оснований); при этом энергия свя-

зывания за счет кулоновских сил взаимодействия составляет около 2 ккал/моль. Прочность ионной связи значительно повышается, когда взаимодействующие ионы вследствие конфигурационных соотношений в комплексе сильно сближены и формирование вокруг них ориентированных электрострикцией гидратных оболочек затруднено, т. е. при образовании «ионных пар».

Повышенную прочность имеют также кратные ионные связи, возникающие при взаимодействии полианионов и поликатионов. Например, в молекуле рибонуклеазы на небольшом участке пептидной цепи, между аминокислотными остатками № 31 и 41, находятся три остатка лизина и два – аргинина, т. е. имеется повышенная концентрация катионных групп. Поскольку субстратом этого фермента является полианион – рибонуклеиновая кислота, то предполагают, что этот поликатионный участок молекулы белка-фермента непосредственно включается в состав фермент-субстратного комплекса.

В образовании фермент-субстратных соединений принимают участие и водородные связи. Известно, что вторичная и третичная структура белка обеспечивается внутримолекулярными водородными «мостиками» между парами ионогенных групп, а с соответствующими группами в молекулах субстратов (например, пептидов, нуклеотидов и др.) белки образуют межмолекулярные водородные связи. Водородные «мостики» часто соединяют кислотные (карбоксильные, тиоловые, фенольные) группы с основными азотсодержащими группами, и при осцилляции связующего атома водорода каждая из этих групп переходит обратимо в сопряженное основание или, соответственно, кислоту. Поэтому водородные связи, локализованные в активном центре промежуточных комплексов, играют очень существенную роль не только в связывании субстратов, но в то же время и в обеспечении важных кооперативных эффектов внутримолекулярного катализа, как, например, синхронный и последовательный кислотоосновной катализ, перенос протонов.

В соединении фермента с субстратом могут участвовать и вандер-ваальсовы силы. Роль сцепления неполярных (гидрофобных) участков проявляется, например, в случае холинэстеразы, где по мере возрастания длины углеводородной цепи в ацильном остатке эфира холина от  $C_1$  до  $C_4$  увеличивается сродство к ферменту. Значительной величины достигают силы сцепления, когда на небольшом участке контакта белка с субстратом сконцентрирован ряд неполярных групп. Окруженная углеводородными группами впадина в поверхности бел-

ка, размер которой достаточен, например, для метильной группы, стремится включить эту группу (даже с некоторой деформацией белка), так как при этом из впадины вытесняются полярные молекулы водной фазы и создается единая поверхность контакта гидрофобных участков.

Первостепенное значение имеет кооперативный эффект многих индивидуально слабых взаимодействий (например, ионных, водородных, гидрофобных связей) для ориентированного присоединения субстратных молекул (в особенности крупных) к белку-ферменту. В процессе соединения обоих реагирующих компонентов первая стадия должна состоять в бимолекулярной реакции с участием, быть может, одной (любой) пары взаимодействующих групп и с очень малой величиной константы ассоциации. Процесс связывания затем завершается внутримолекулярно рядом существенно облегченных мономолекулярных актов взаимодействия. Суммарная равновесная константа ассоциации будет соответствовать произведению бимолекулярной константы первой стадии и всех мономолекулярных констант дальнейших стадий; суммарная константа может достигать значительной величины.

### Природа активных центров ферментов

Очень незначительные изменения в строении или пространственной конфигурации молекулы субстрата могут превратить его из хорошего в плохой или совсем непригодный субстрат, а нередко и в ингибитор фермента. Это возможно и в тех случаях, когда изменены функциональные группы, далеко отстоящие от того участка молекулы субстрата, на который направлено действие фермента. Так, например, инверсия или замещение у четвертого или шестого углеродного атома молекулы гликозида может воспрепятствовать ферментативному гидролизу гликозидной связи у первого углеродного атома.

При образовании промежуточных соединений не одна, а несколько функциональных групп фермента вступают во взаимодействие с соответствующими, т. е. химически и пространственно (топографически) комплементарными группами молекулы субстрата. Некоторые пары взаимодействующих групп непосредственно участвуют в катализируемой ферментом реакции. Связи между остальными группами служат в основном для ориентированного, относительно стабильного прикрепления молекулы субстрата к поверхности фер-

мента. Вместе с тем, они существенным образом влияют на эффективность каталитической реакции, специфически повышая реакционную способность промежуточного комплекса, например, путем изменения электронной структуры молекулы субстрата или деформации валентных связей между атомами этой молекулы (концепция «множественного сродства»).

Под активным центром понимают ту часть молекулы ферментного белка, которая соединяется с субстратом (и кофакторами) и от которой зависят ферментативные свойства молекулы. Он определяет специфичность и каталитическую активность фермента и, следовательно, представляет собой структуру определенной степени сложности, приспособленную для тесного сближения и взаимодействия с молекулой субстрата или, по крайней мере, с теми частями ее, которые непосредственно участвуют в реакции.

Активный центр состоит из ряда функциональных групп, определенным образом ориентированных в пространстве. Среди них нередко различают группы, входящие в состав «каталитически активного» участка фермента, и группы, образующие тот участок, который обеспечивает специфическое сродство, т. е. связывание субстрата с ферментом, так называемый контактный, или «якорный», участок. Это разделение условно, поскольку взаимодействия в контактном участке фермент-субстратных соединений оказывают весьма существенное влияние на направление и скорость превращений, протекающих в каталитическом участке.

Довольно относительный характер носит и само отграничение активного центра в целом от остальных частей молекулы фермента, так как эти части играют роль в обеспечении трехмерной конформации активного центра и влияют на реакционную способность его групп. Условно можно принять такое определение активного центра, которое включает как минимум все контактные группы фермента, участвующие в образовании активированного комплекса, т. е. отстоящие в этом комплексе от молекулы субстрата не дальше, чем на длину межатомной связи (2,3). Группы, топографически сближенные с группами активного центра и влияющие на их реакционную способность, называются «вспомогательными» (*auxiliary groups*), а более отдаленные группы, необходимые для обеспечения конформации и других физических свойств всей молекулы фермента и тем самым существенные для его активности, – «способствующими» группами (*contributory groups*).



Соединения, молекулы которых по стерической и электронной конфигурации сходны с молекулой субстрата или определенными ее частями (структурные аналоги субстрата), проявляют сродство к соответствующим контактными группам активного центра и, оттесняя адекватный субстрат, действуют в качестве конкурентных ингибиторов ферментов. Классическим примером конкурентного ингибитора служит малонат, действующий как мощный ингибитор сукцинатдегидрогеназы. В малоновой кислоте карбоксильные группы расположены примерно на таком же расстоянии, как в янтарной, но в ее молекуле отсутствует группировка ( $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ), которая должна подвергаться окислению.

В тех случаях, когда ингибитор избирательно прочно связывает или разрушает ту или иную функциональную группу активного центра фермента, существенную для каталитической активности, торможение носит неконкурентный характер и обычно является необратимым. Наиболее известным примером могут служить фосфоорганические ингибиторы эстераз и протеаз, блокирующие гидроксил серина в активном центре фермента.

Участие нескольких контактных групп в образовании фермент-субстратных комплексов позволяет понять не только избирательное действие ферментов на оптически изомерные субстраты, но и явление стереоспецифического превращения ферментами соединений, не имеющих асимметрического углеродного атома (обладающих одной плоскостью симметрии).

При помощи изотопного метода установили, что ферментативные реакции молекул, содержащих атом углерода с двумя одинаковыми и двумя разными заместителями  $\text{C}_{aa'bb'}$  (так называемый «мезоуглеродный атом») протекают асимметрически, с превращением лишь одной из двух химически идентичных частей молекулы.

Теория множественного сродства объясняет асимметрическое разложение симметрических соединений тем, что субстрат прикрепляется к ферменту, по крайней мере, в трех точках, причем только одна из двух симметрических групп связывается с каталитически активной группой фермента. Симметричная молекула  $\text{C}_{aa'bb'}$  присоединяется к активному центру фермента (к которому она имеет доступ только с одной стороны) через три группы. В промежуточном комплексе мезоуглеродный атом субстрата становится асимметрическим. Только одна из соединенных с ним химически идентичных частей молекулы субстрата ориентирована надлежащим образом по отноше-

нию к реактивному участку каталитического центра, что и определяет стереоспецифический ход реакции.

Как нативные ферменты, так и полученные из них действием некоторых протеиназ и других ферментов каталитически активные полипептидные фрагменты инактивируются в условиях денатурации белка, т. е. при развертывании трехмерной упаковки пептидных цепей, специфичной для вторичной и третичной структуры данного белка-фермента. Функциональные группы активного центра не занимают смежного положения в пептидных цепях, а находятся в разных отрезках этих цепей и лишь в нативной третичной структуре фермента совмещены пространственно в районе контактных и каталитически реактивных участков.

В молекулах глобулярных белков пептидные цепи не на всем своем протяжении жестко уложены в кристаллоподобную вторичную структуру  $\alpha$ -спиралей. В нативных белках «ригидные» упорядоченные участки  $\alpha$ -спиралей чередуются с гибкими, как бы «расплавленными», неупорядоченными отрезками пептидной цепи. Число и протяженность спирализованных и раскрученных участков у данного белка может обратимо изменяться в довольно широких пределах – самопроизвольно и под влиянием относительно небольших изменений рН, температуры и других внешних физических условий. Кроме того, поскольку многочисленные ионогенные боковые группы белка в водных растворах ионизированы частично, у каждой молекулы белка возможны флюктуации распределения электрических зарядов как спонтанные, так и под влиянием диэлектрических свойств растворителя, взаимодействий белка с внешними диполями и т. д. Флюктуации распределения зарядов сопряжены с изменениями ориентации иммобилизованных электрострикцией молекул воды вокруг ионогенных групп, изменениями электронной и пространственной конфигурации всей молекулы. Таким образом, белки и, в частности, ферменты существуют в растворе не как идентичные молекулы, а как статистический ансамбль большого числа конформационных и ионизационных изомеров, незначительно различающихся по суммарной энергетической характеристике всей молекулы (поскольку положительные и отрицательные изменения теплот и энтропии отдельных связей взаимно компенсируются).

Итак, у белковых молекул ферментов, в отличие от небиологических гетерогенных катализаторов, стерическая и электронная конфигурация третичной структуры является лишь относительно жесткой и подвержена динамическим изменениям, или флюктуациям; в

частности, такие изменения имеют место при взаимодействии фермента с молекулами субстрата (или субстратов).

Большое значение придается гибкости третичной структуры ферментов и, в особенности, динамическим изменениям пространственной и электронной конфигурации фермент-субстратного комплекса в переходном состоянии.

Согласно гипотезе «вынужденного», или «индуцированного», контакта («induced fit»), каталитически активная конфигурация в ряде случаев возникает лишь в момент присоединения к ферменту молекулы субстрата в результате деформирующего воздействия последней.

Вследствие неидеального стерического соответствия (комплементарности) между контактными группами молекулы субстрата и активного центра, а также в результате внешних индуктивных воздействий и вторичных кооперативных эффектов, обусловленных изменением конфигурации белковой молекулы, в фермент-субстратных комплексах происходит геометрическая деформация (напряжение) отдельных валентных связей как в молекуле субстрата, так и в самом активном центре белка, наряду с поляризацией связей в результате изменений распределения электронной плотности. Оба фактора – деформация и поляризация ковалентных связей – повышают термодинамический потенциал этих связей, т. е. способствуют преодолению активационного барьера переходного состояния. При этом наличие значительного числа степеней свободы, допускающих флюктуацию пространственной и электронной конфигурации молекул нативного белка, повышает статистическую вероятность образования активированного комплекса, что равнозначно увеличению абсолютной скорости реакции.

Фактор «вынужденного контакта» играет роль в механизме действия разных ферментов, например, рибонуклеазы, гексокиназы, аденозинтрифосфатазы,  $\beta$ -амилазы, пенициллиназы, оксидазы D-аминокислот и др. У липазы, способной расщеплять эфирные связи глицеридов только в гетерогенной эмульсии или суспензии, реактивный каталитический участок, по-видимому, возникает лишь в результате деформации молекулы фермента при адсорбции ее на границе водной и липоидной фазы. Этим можно объяснить то, что липаза, в отличие от других эстераз, не ингибируется диизопротилфторфосфатом и аналогичными фосфоорганическими соединениями в водном растворе, но становится к ним весьма чувствительной, когда фермент адсорбирован на капельках эмульгированной липоидной фазы, в которую внесен фосфоорганический ингибитор.

## Роль взаимодействия функциональных групп в ферментативном катализе

Поверхность любого белка представляет мозаику множества разнородных химических групп, принадлежащих боковым цепям аминокислот; любая из них может играть в молекуле фермента ту или иную роль, влияя на конформацию фермента и на его взаимодействие с субстратом в силу своих химических особенностей и даже просто своим присутствием (стерический эффект).

Значение функциональных групп белка для структуры и каталитического действия ферментов очень многообразно. В промежуточных комплексах (и в третичной структуре самого фермента) солевые связи обеспечиваются ионогенными группами, кулоновское притяжение – ими же и полярными группами аминокислот. Атомы кислорода, азота, серы участвуют в образовании водородных связей и комплексов с металлами. Кислые и основные группы в зависимости от состояния их диссоциации функционируют в активных центрах ферментов в качестве кислотных и основных, нуклео- и электрофильных катализаторов, причем они могут действовать непосредственно на субстрат или изменять своим электростатическим воздействием реакционную способность соседних групп молекулы фермента. Аминные, имидазольные, гидроксильные, тиоловые и, возможно, некоторые другие группы во многих ферментных реакциях выполняют функции промежуточных акцепторов и переносчиков протонов, ацильных, фосфорильных, гликозильных, амидиновых, альдегидных, метильных и других остатков и, кроме того, участвуют в связывании органических кофакторов. Группы SH– и –SS– принимают участие в обратимых окислительных превращениях и в реакциях тиол-дисульфидного обмена, а неполярные боковые цепи – в установлении гидрофобных связей. Ароматические и гетероциклические ядра циклических аминокислот играют роль в образовании комплексов с переносом заряда, которым уделяется большое внимание в гипотезах о механизме некоторых ферментативных реакций.

Совмещение на поверхности белковой молекулы фермента на близком расстоянии большого числа разнородных, строго ориентированных химических групп, взаимодействующих с молекулой субстрата в промежуточном комплексе, обеспечивает условия для многофункционального внутримолекулярного катализа, высокая эффективность которого хорошо известна.

Для активности фермента существенное значение имеет «реакционноспособная» сульфгидрильная группа. Например, при инактивации фермента под действием иодацетамида и иодацетата скорость алкилирования SH-группы не зависит от концентрации  $H^+$  ионов в интервале pH от 6,0–10,0; начальная скорость реакций с иодацетатом, но не с иодацетамидом, заметно зависит от ионной силы. Кроме того, защита SH-групп от действия блокирующих реагентов наблюдается только в присутствии обоих субстратов и активирующего иона металла ( $Mg^{2+}$ ).

В результате кооперативных эффектов взаимодействий множества разнородных функциональных групп в молекуле белка (фермента) и их частичной ионизации трехмерная конформация белковой молекулы и распределение зарядов на ее поверхности подвержены динамическим флюктуациям. В активном центре фермента на близком расстоянии сосредоточен ряд «контактных» функциональных групп, ориентация которых топографически и электростатически комплементарна молекуле субстрата. Благодаря этому обеспечивается:

1. Высокая степень сродства, т. е. большая статистическая вероятность образования промежуточного комплекса субстрата с катализатором, что равносильно влиянию в обычных реакциях огромного увеличения концентраций их компонентов (эффект сближения).

2. Строго ориентированное взаимное размещение нескольких участвующих в реакции молекул: одного или несколько субстратов (в том числе нередко – молекул воды), кофакторов и активного центра фермента (эффект ориентации). Этот фактор приводит к значительному уменьшению энтропии системы и повышению скорости реакции за счет контакта в оптимальной ориентации трех или более взаимодействующих молекул; при беспорядочных соударениях в неферментативных реакциях статистическая вероятность такого ориентированного контакта мала для двух и практически равна нулю для трех или большего числа молекул.

3. Осуществление в контактном участке промежуточного комплекса сопряженной атаки на молекулу субстрата нуклеофильных и электрофильных групп активного центра (эффекты синхронного внутримолекулярного кислотноосновного и нуклеофильного катализа).

4. Эти механизмы (1–3) чрезвычайно повышают абсолютную скорость превращения за счет замены маловероятных реакций высшего порядка (с числом участников  $\geq 3$ ) высокоэффективными реак-

циями первого порядка (реакциями внутримолекулярного многофункционального катализа).

5. Образование ковалентных связей между субстратом и электроактивными группами фермента, что в сочетании с эффектами кислотноосновного и нуклеофильного катализа создает условия активации субстрата путем перераспределения электронной плоскости (эффект поляризации).

6. Изменение при взаимодействии с молекулой субстрата конформации (не идеально комплементарной) контактного участка фермента (эффект вынужденного, или индуцированного, контакта). Этот фактор в сочетании со спонтанными флюктуациями молекулы фермента создает дополнительные условия активации молекулы субстрата в переходном состоянии путем стерической деформации (натяжения, изгиба) тех или иных валентных связей.

Все эти факторы тесно взаимосвязаны.

### ***3.1.5. Свойства ферментов, обусловленные белковой природой***

Белковая природа ферментов определяет уникальные свойства этих катализаторов:

1. Активность ферментов зависит от температуры. При низких температурах активность ферментов низкая из-за небольшой скорости движения молекул, при этом вероятность встречи с субстратом мала. При повышении температуры активность фермента возрастает. Однако большинство ферментов при температуре 40 °С и более денатурируют, поэтому активность снижается. Максимальная активность для многих ферментов проявляется при температуре 37–38 °С.

2. Активность ферментов зависит от рН среды. Для каждого фермента существует такая область рН (оптимум), в которой он проявляет максимальную активность. В этой зоне рН конформация фермента максимально соответствует субстрату. При снижении или увеличении рН от оптимума разрушаются связи, построенные на кислотно-основных взаимодействиях (водородные, ионные). Это приводит к изменению конформации фермента, а следовательно, и активного центра. В результате активность фермента снижается. Для большинства ферментов оптимум рН находится при рН=7,4.

3. Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата. При низких концентрациях субстрата вероятность столкновения с молекулой фермента мала и образование продукта будет

происходить очень медленно. С увеличением концентрации субстрата вероятность столкновения возрастает, скорость реакции увеличивается. Когда все активные центры молекул фермента заполняются субстратом, скорость реакции становится постоянной (максимальной). Концентрация субстрата, при которой достигается максимальная скорость, называется насыщающей. Концентрация субстрата, при которой скорость реакции равна половине максимальной, называется константой Михаэлиса ( $K_M$ ).  $K_M$  характеризует сродство фермента к субстрату, т.е. способность фермента связывать субстрат. Чем меньше  $K_M$ , тем выше сродство.

4. Зависимость скорости реакции от концентрации фермента. При насыщающих концентрациях субстрата зависимость прямая.

### **3.1.6. Механизмы изменения активности ферментов**

Активность ферментов определяют: 1) по скорости убывания субстрата; 2) по скорости образования продукта. За единицу любого фермента принимают такое его количество, которое катализирует превращение 1 мкмоль вещества в 1 мин.

$$\text{Удельная активность} = \frac{\text{МКМОЛЬ}}{\text{МИН} \times \text{МГ БЕЛКА}}$$

Регуляция активности ферментов является главным отличительным свойством. Вещества, изменяющие активность ферментов, называются эффекторами. Эффекторы, снижающие активность ферментов, называются ингибиторами, повышающие активность – активаторами.

Механизмы изменения активности ферментов:

1. *Изостерический*. Регулятор действует непосредственно на активный центр.

2. *Аллостерический*. Регулятор действует на аллостерический центр. Аллостерический центр – это участок фермента, пространственно не совпадающий с активным центром. Присоединение регулятора к аллостерическому центру приводит к изменению конформации фермента, а следовательно, и активного центра. Сродство фермента при этом изменяется. Аллостерические регуляторы вызывают активацию или ингибирование фермента. Аллостерическими регулятора-

ми являются метаболиты, макроэрги, коферменты, катионы металлов, субстраты.

3. *Химическая модификация.* Заключается в изменении химической структуры фермента путем присоединения или отщепления каких-либо химических групп в любом месте фермента. Химическое изменение фермента вызывает изменение конформации, а следовательно, активности. Химическая модификация может осуществляться путем: фосфорилирования – дефосфорилирования; метилирования – деметилирования; аденилирования – деаденилирования. Частным случаем химической модификации является ограниченный протеолиз. Ограниченный протеолиз – это процесс отщепления какой-либо части фермента в виде олиго- или полипептида. В результате формируется активный центр. Активность фермента возрастает.

4. *Взаимодействие «белок – белок».* Этот механизм регуляции не является самостоятельным и характерен только для ферментов с четвертичной структурой, т.е. состоящих из субъединиц. Диссоциация или ассоциация этих субъединиц приводит к изменению конформации активного центра. Для одних ферментов ассоциация приводит к активации фермента, а диссоциация – к ингибированию, для других – наоборот.

Ингибирование ферментов бывает обратимым и необратимым. Необратимые ингибиторы прочно связываются с ферментами, при этом связываются или разрушаются функциональные группы, необходимые для проявления каталитической активности. Обратимые ингибиторы действуют недолго. Комплекс «фермент – ингибитор» непрочен и быстро диссоциирует, активность фермента при этом восстанавливается. Обратимые ингибиторы делятся на конкурентные и неконкурентные. Конкурентный ингибитор похож на субстрат по структуре и форме, поэтому может конкурировать с ним за место в активном центре. Степень ингибирования зависит от концентрации субстрата и ингибитора. Чем больше концентрация ингибитора, тем сильнее ингибирование. Неконкурентные ингибиторы структурно не похожи на субстрат, поэтому действуют вне активного центра путем аллостерического механизма или путем химической модификации. Регуляция в ферментативных цепях направлена на ключевые ферменты. К ключевым ферментам относятся: а) фермент, стоящий в начале цепи; б) лимитирующий фермент (имеет наименьшую скорость в цепи); в) ферменты, стоящие на развилке цепи.



## 3.2. Ферментативная переработка растительного сырья

### 3.2.1. Гидролитические процессы

Гидролиз крахмала происходит под действием **амилолитических ферментов**. К группе амилолитических ферментов относятся  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилазы, глюкоамилаза, пуллуланаза, изоамилаза.

Амилазы очень широко распространены в природе. Они синтезируются многими микроорганизмами (бактерии, грибы, актиномицеты, дрожжи) и растениями. До развития ферментной промышленности главным промышленным источником получения амилаз в европейских странах было проросшее зерно (солод). В настоящее время главным источником амилаз являются микроорганизмы, особенно бактерии, грибы и реже дрожжи.

Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выраженной эндоамилазой является  $\alpha$ -амилаза, способная к разрыву внутримолекулярных связей в высокополимерных цепях субстрата.

Глюкоамилаза и  $\beta$ -амилаза являются экзоамилазами, т. е. ферментами, атакующими субстрат с нередуцирующего конца.

Субстратом для действия амилаз является крахмал. Крахмал неоднороден и имеет различные характеристики по степени полимеризации гликозидной цепи и количеству ветвлений.

Крахмал – растительный полисахарид с очень сложным строением. Это двухкомпонентное соединение, состоящее из 13–30 % амилозы и 70–85 % амилопектина. Оба компонента неоднородны, их молекулярная масса колеблется в широких пределах и зависит от природы крахмала. Амилоза – это неветвящийся полимер, в котором остатки глюкозы соединены  $\alpha$ -1,4-гликозидной связью; степень полимеризации около 2000. В «аномальных» амилозах с одной-двумя  $\alpha$ -1,6-связями полимеризация может возрасти до 6000. Амилопектин имеет бóльшую молекулярную массу, чем амилоза, и более сложное строение. Это ветвящийся полисахарид. Возможно, он ветвится дихотомически, т. е. число концевых звеньев на единицу больше звеньев, дающих ветвление. Существует также мнение, что цепи амилопектина не раздваиваются, а образуют симметричные тройные разветвления. Тогда молекула приобретает продолговато-кустистую форму, обладающую большей компактностью в пространстве. Молекула амилопектина – одна из самых крупных молекул, ее молекулярная масса  $\approx 5 \cdot 10^8$ . Ветвление гликозидной цепи осуществляется с по-

мощью  $\alpha$ -1,6-связей, количество которых составляет 4–5% суммы  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-связей в амилопектине. В состав амилопектина входит от 0,012 до 0,111 % фосфора, который, по-видимому, присоединяется к шестому углеродному атому в глюкозном остатке.

Амилоза и амилопектин в растениях формируются в крахмальные зерна-гранулы.

Реакции, катализируемые амилазами, имеют две стадии: короткую – предстационарную, и длительную – стационарную. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвленных олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться йодом; он протекает значительно медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы. Поэтому конечные продукты гидролиза  $\alpha$ -амилазами могут быть различными. Первая стадия воздействия фермента на субстрат, хотя и носит неупорядоченный характер, имеет для всех видов  $\alpha$ -амилаз схожий механизм.

Существует две гипотезы о механизме действия экзоамилаз на субстрат. Первая гипотеза предполагает, что, воздействуя на субстрат по одноцепочечному или «молниеобразному» механизму, экзоамилаза образует фермент-субстратный комплекс с захватом нередуцирующего конца цепи. Дальнейшее продвижение фермента по этой цепи происходит до полного ее гидролиза. По второй гипотезе  $\beta$ - и глюкоамилаза действуют на субстрат путем механизма множественной атаки, т. е. фермент образует комплекс с молекулой субстрата, затем через несколько этапов этот комплекс распадается, и фермент связывается с новой молекулой субстрата. Иными словами, при множественной атаке происходит нечто среднее между неупорядоченным механизмом и одноцепочечной, «молниеобразной» атакой.

**$\alpha$ -Амилаза** ( $\alpha$ -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1) является эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей внутри высокополимеризованного субстрата.  $\alpha$ -Амилаза – водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий молекулярную массу, равную 45000–60000. В зависимости от вида микроорганизма свойства  $\alpha$ -амилаз могут сильно отличаться не только по механизму воздействия на субстрат и конечным продуктам, но и по оптимальным условиям для проявления максимальной активности. Действуя на целое крахмальное зерно,  $\alpha$ -амилаза атакует его, разрушая поверхность и образуя каналы и бо-

роздки, т. е. как бы раскалывает зерно на части. Клейстеризованный крахмал гидролизуется ею с образованием не окрашиваемых йодом продуктов – в основном низкомолекулярных декстринов. Процесс гидролиза крахмала многостадийный. В результате воздействия  $\alpha$ -амилазы на первых стадиях процесса в гидролизате накапливаются декстрины, затем появляются не окрашивающиеся йодом тетра- и тримальтоза, которые очень медленно гидролизуются  $\alpha$ -амилазой до ди- и моносахаридов.

Все  $\alpha$ -амилазы проявляют наименьшее сродство к гидролизу концевых связей в субстрате. Некоторые же  $\alpha$ -амилазы, особенно грибного происхождения, на второй стадии процесса гидролизуют субстрат более глубоко с образованием небольшого количества мальтозы и глюкозы.

**$\beta$ -Амилаза** ( $\alpha$ -1,4-глюканмальтогидролаза, КФ 3.2.1.2) – активный белок, обладающий свойствами альбумина.  $\beta$ -Амилаза – экзофермент концевое действие, проявляющий сродство к предпоследней  $\alpha$ -1,4-связи с нередуцирующего конца линейного участка амилозы и амилопектина. Каталитический центр фермента содержит сульфгидрильные и карбоксильные группы и имидозольный цикл остатков гистидина. В отличие от  $\alpha$ -амилазы  $\beta$ -амилаза практически не гидролизует нативный крахмал, тогда как клейстеризованный крахмал гидролизуется ею с образованием мальтозы в  $\beta$ -конфигурации, поэтому данная амилаза по аналогии с  $\alpha$ -амилазой называется  $\beta$ -амилазой. Если гидролизу подвергается амилоза, то гидролиз идет полностью до мальтозы. Незначительное количество декстринов может образовываться при гидролизе «аномальных» амилоз, так как гидролиз  $\beta$ -амилазой идет только по линейной цепи до  $\alpha$ -1,6-связей. Если субстратом для  $\beta$ -амилазы служит амилопектин, то гидролиз идет в значительно меньшей степени.  $\beta$ -Амилаза отщепляет фрагмент с нередуцирующего конца участка от внешних линейных ветвей, имеющих по 20–26 глюкозных остатков, с образованием 10–12 молекул мальтозы. Гидролиз приостанавливается на предпоследней  $\alpha$ -1,4-связи, граничащей с  $\alpha$ -1,6-связью. В гидролизате накапливается 54–58 % мальтозы, остальное составляют высокомолекулярные декстрины, содержащие значительное количество  $\alpha$ -1,6-связей – так называемые  $\beta$ -декстрины.

$\beta$ -Амилазы проявляют большую стабильность в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Молекулярная масса  $\beta$ -амилазы растений достаточно высока, она составляет от 50 000 до 200 000. Фермент может состоять из

одной или четырех субъединиц до 50 000 каждая. Фермент содержит SH-группы и чувствителен к действию тяжелых металлов. Считается, что  $\beta$ -амилаза обладает высокой способностью к множественной атаке субстрата. Для амилозы средней молекулярной массы в одном присоединении фермента к субстрату возможно отщепление до четырех остатков мальтозы. При увеличении молекулярной массы субстрата возможно и большее количество мест атаки.

До середины 70-х годов единственным источником  $\beta$ -амилазы считались растения, особенно прорастающее зерно (солод). В настоящее время для производства мальтозы из крахмала применяют бактериальные  $\beta$ -амилазы.

**Глюкоамилаза** ( $\alpha$ -1,4-глюканглюкогидролаза, КФ 3.2.1.3) катализирует последовательное отщепление концевых остатков  $\alpha$ -D-глюкозы с нередуцирующих концов субстрата. Это фермент с экзогенным механизмом воздействия на субстрат. Многие глюкоамилазы обладают способностью так же быстро, как и  $\alpha$ -1,4-связь, гидролизовать  $\alpha$ -1,6-глюкозидные связи. Но это происходит только в том случае, когда за  $\alpha$ -1,6-связью следует  $\alpha$ -1,4-связь, поэтому декстран ими не гидролизуется. Отличительной особенностью глюкоамилаз является способность в десятки раз быстрее гидролизовать высокополимеризованный субстрат, чем олиго- и дисахариды. Она синтезируется многими микроорганизмами и в литературе известна под различными названиями: амилоглюкозидаза,  $\gamma$ -амилаза, лизосомальная  $\alpha$ -глюкозидаза, кислая мальтоза, матулаза и экзо-1,4- $\alpha$ -глюкозидаза.

Механизм атаки субстрата глюкоамилазой может быть двух типов: либо одноцепочечный, либо множественной атаки.

Глюкоамилазы являются гликопротеидами, содержащими от 5 до 35% углеводов, которые состоят из олиго-, ди- и моносахаридов. Углеводный компонент может быть целостным фрагментом или же разбитым на индивидуальные соединения, которые прикрепляются к белку через треонин и серии. Например, у глюкоамилазы *A. niger* их 20. Большинство известных глюкоамилаз имеет оптимум pH при 4,5–5,2, реже – при 5,7–6,0, в основном для дрожжевых глюкоамилаз. pH-стабильность микробных глюкоамилаз лежит в широком диапазоне – от 2,5 до 9. Термостабильность глюкоамилаз находится в интервале от 30 до 45 °C и редко повышается до 55–60 °C. Глюкоамилазы различного происхождения заметно отличаются по молекулярной массе, которая, по данным различных авторов, имеет значения от 48 000 до 210 000. При росте культуры параллельно накапливаются и

другие амилолитические ферменты, обладающие не только гидролитическим, но и трансферазным действием. Это гликозилтрансфераза и  $\alpha$ -амилаза. В случае, если система открытая и продукт гидролиза (глюкоза) постоянно удаляется из системы, процесс может дойти до полного гидролиза крахмала до глюкозы. Если же система закрытая и концентрация субстрата велика, то при достижении определенной концентрации глюкозы в реакционной среде в результате переноса гликозильных остатков на глюкозу, ди- и олигосахариды начинают накапливаться изомальтоза, паноза, нигероза, изомальтотриоза и другие сахара, которые имеют горький вкус. В результате процесс не может дойти до полного превращения крахмала в глюкозу. Глюкоамилаза может проявлять небольшую трансферазную активность, но только при концентрации глюкозы свыше 60–70 %.

**Пуллуланаза** (пуллулан-6-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.41) ранее была известна под несколькими названиями: *R*-фермент; дебранчинг-фермент, предельная декстриназа или аминопектин-6-глюканогидролаза. Как и  $\alpha$ -амилаза, пуллуланаза является эндогенным ферментом, но в отличие от последней способна неупорядоченно гидролизовать  $\alpha$ -1,6-связи в пуллулане, амилопектине и предельных декстринах, получаемых при совместном воздействии на крахмал  $\alpha$ - и  $\beta$ -амилаз. Мальтотриоза является наиболее частым отщепляемым фрагментом.

Если между двумя  $\alpha$ -1,6-связями расположено более трех остатков глюкозы, то процесс разрыва  $\alpha$ -1,6-связей идет значительно медленнее, поэтому амилопектин хуже других ветвящихся полисахаридов гидролизуется пуллулاناзой. Атакуемость несколько возрастает, если происходит нарушение вторичной структуры полимерной цепи полисахарида.

**Изоамилаза** (гликоген-6-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.68), или дебранчинг-фермент, гидролизует  $\alpha$ -1,6-связи в ветвящихся субстратах, таких как амилопектин,  $\beta$ -предельные декстрины. Отличительной особенностью изоамилазы по сравнению с пуллуланазой является то, что она не способна гидролизовать пуллулан и слабо действует на предельные  $\alpha$ -декстрины. Этот фермент образуют многие микроорганизмы, такие как *B. amyloliquefaciens*, *Cytophaga*, *Streptomyces*, *Pseudomonas amyloclavata*, *Saccharomyces cerevisiae* и др., ферменты которых обладают способностью гидролизовать субстрат при pH от 3,5 до 6,5 и температурах от 25 до 52 °С. Изоамилаза не стабилизируется кальцием, за исключением фермента из *Cytophaga*, и ингибируется *n*-

хлормеркурийбензоатом. Молекулярная масса изоамилаз различна – от 90 000 до 120 000.

Гидролиз пектиновых веществ происходит под действием **пектолитических ферментов**.

Пектиновые вещества – высокомолекулярные соединения, обладающие свойствами лиофильных коллоидов. Пектиновые вещества подразделяются на несколько групп: протопектин – не растворимое в воде соединение сложного химического строения; пектиновая кислота – полигалактуроновая кислота, в малой степени этерифицированная остатками метанола; пектин – почти полностью этерифицированная пектиновая кислота; пектовая кислота – полигалактуроновая кислота; пектинаты – соли пектиновой кислоты и пектаты – соли пектовой кислоты. Пектиновые вещества представляют собой полисахариды, состоящие из остатков D-галактуроновой кислоты, связанные  $\alpha$ -1,4-связью. Они могут быть метоксилированы по шестому углеродному атому. Предельная степень этерификации 16,2 %, обычно в пектине она не превышает 14,9–15,2 %. Все пектиновые вещества, кроме протопектина, растворимы в воде. Строение протопектина точно не установлено, это водонерастворимый «материнский» полиуронид, в состав которого входят пектиновые цепочки и молекулы целлюлозы, ионы Ca, Mg, остатки фосфорной, уксусной кислот, сахара и т. д. В присутствии сахара, кислоты и под действием поливалентных ионов металлов пектины образуют гель. Молекулярная масса пектинов, выделенных из различных объектов, изменяется в пределах от 20 000 до 200 000.

Пектиназы образуют многие микроорганизмы (микроскопические грибы, бактерии и некоторые виды дрожжей). Наибольшей продуцирующей способностью обладают микроскопические грибы, особенно различные виды рода *Aspergillus*: *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. niger*, *A. terreus* и др. Способность к биосинтезу пектиназ отмечается у представителей родов *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Trichothecium*, *Fusarium* и некоторых других. Среди бактерий найдены активные продуценты пектиназ, относящиеся к роду *Clostridium*, а также отмечается способность к образованию пектиназ у некоторых бактерий, относящихся к видам *Bacillus polymyxa*, *B. felsenbergii*, *Klebsiella aerogenes*, и некоторых других. Среди дрожжей пектолитические ферменты образует культура *Saccharomyces fragilis*.

Пектиназы содержат многие растения, но они не являются промышленными источниками получения ферментов.

Все пектиназы условно можно разделить на две группы: гидролазы и трансэлиминазы. К гидролазам относят пектинэстеразу и полигалактуроназу.

**Пектинэстераза (ПЭ).** Пектинметилэстераза (КФ 3.1.1.11) представляет собой гидролазу эфиров карбоновых кислот. В зависимости от источника получения препарата пектинэстеразы отличаются по оптимальному рН. Так, микробная пектинэстераза имеет оптимальный рН от 4,5 до 5,5, а полученная из растений – 6,0–8,0. Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  активируют пектинэстеразы. Фермент омыляет сложные эфирные связи в пектиновой кислоте и пектине и отщепляет метиловый спирт. Установлено, что пектинэстераза отщепляет  $\text{CH}_3$ -группу только в том случае, когда в непосредственной близости к омыляемой связи находится хотя бы одна  $\text{COOH}$ -группа. Отщепление  $\text{CH}_3$ -групп происходит последовательно, начиная от свободной  $\text{COOH}$ -группы. В результате действия пектинэстеразы накапливаются частично или полностью деметоксилированная полигалактуроновая кислота и метиловый спирт.

**Полигалактуроназа (ПГ).** Полигалактуронидгликоногидролаза (КФ 3.2.1.15) осуществляет гидролитическое расщепление  $\alpha$ -1,4-гликозидных связей в цепи пектиновых веществ. В растениях полигалактуроназа встречается редко и в небольших количествах. Она продуцируется микроорганизмами, особенно грибами и бактериями. Полигалактуроназа многокомпонентна и проявляет большую специфичность к субстрату. По субстратной специфичности ферментов к разрушаемым пектинам различают четыре типа полигалактуро-наз: 1) *полиметилгалактуроказы* (ПМГ) – ферменты, действующие на метоксилированную полигалактуроновою кислоту (пектин); они делятся на две подгруппы: эндополиметилгалактуро-наза I типа (эндо-ПМГ-I) и экзополиметилгалактуро-наза III типа (экзо-ПМГ-III); 2) *полигалактуроказы* (ПГ) – ферменты, действующие на пектовую или пектиновую кислоту; они также разделены на две подгруппы: эндополигалактуро-наза II типа (эндо-ПГ-II) и экзополигалактуро-наза IV типа (экзо-ПГ-IV).

Эндо-ПМГ-I является разжижающим ферментом; он гидролизует нативный высокоэтерифицированный пектин тем быстрее и эффективнее, чем выше степень его этерификации. Присутствие пектинэстеразы в растворе снижает активность эндо-ПМГ-I. Этот тип фермента широко распространен среди грибов, особенно у видов *A. niger*, *Botrytis cinerea*, *Neurospora crassa*, *A. awamori* и др.

Экзо-ПМГ-III является осаживающим ферментом концевое действие, отщепляющим по одному остатку галактуронової кислоты от пектиновой кислоты или пектина. Фермент проявляет сродство к метоксилированному остатку галактуронової кислоты, гидролизует концевую  $\alpha$ -1,4-связь между двумя остатками галактуроновых кислот, которые имеют  $\text{COOCH}_3$ -группу.

Эндо-ПГ-II – разжижающая полигалактуроназа, которая гидролизует пектиновую или пектовую кислоту. Она действует только при наличии в пектиновом веществе свободных  $\text{COOH}$ -групп. Место разрыва полигалактуронової цепи эндо-ПГ-II определяется наличием свободных  $\text{COOH}$ -групп. Воздействие эндо-ПГ-II на субстрат значительно возрастает при наличии в реакционной среде пектинэстеразы.

Фермент синтезируется грибами и бактериями.

Экзо-ПГ-IV проявляет сродство к концевой гликозидной связи в молекуле пектиновой или пектовой кислоты, вблизи которой нет  $\text{CH}_3$ -группы. Для образования фермент-субстратного комплекса необходимо наличие свободных  $\text{COOH}$ -групп вблизи разрываемой связи.

Гидролиз целлюлозы происходит под действием **целлюлолитических ферментов** (рис. 20). Целлюлоза является высокополимерным полисахаридом растений, состоящим из остатков глюкозы, соединенных между собой  $\beta$ -1,4-гликозидными связями. Целлюлоза – линейный полимер. Большинство остатков глюкозы в целлюлозе содержит три свободных гидроксильных у 2, 3 и 6-го углеродных атомов, которые являются основой для образования водородных связей и формирования прочных волокон. В среднем одна нить целлюлозы состоит из 6 000–12 000 глюкозных остатков с молекулярной массой около  $1 \cdot 10^6$ – $2 \cdot 10^6$ . Объединенные в группы нитевидные молекулы целлюлозы называются микрофибриллами.

В микрофибрилле нити целлюлозы могут быть упакованы параллельно, с множеством водородных и других связей – это «кристаллиты»; участки, где нет строгой упорядоченной структуры, называют аморфными. Аморфные участки целлюлозы легче подвергаются внешнему воздействию: с увеличением количества таких участков растут набухаемость целлюлозы, ее атакуемость ферментами, падает прочность и т. д. Целлюлоза является не растворимым в воде субстратом. Нативная целлюлоза, особенно с высокой степенью кристалличности, медленно и плохо атакуется целлюлазами. Поэтому целлюлозу для ферментативного гидролиза надо подвергать предварительной обработке. Для этого применяют измельчение с помощью



вальцевания материала в различных типах мельниц, химические способы обработки кислотами и щелочами, методы физической обработки и т. д. В связи с этим при характеристике целлюлолитических ферментов обязательно учитывают состояние субстрата – целлюлозы. Различают два вида целлюлозы: *н а т и в н а я* – ничем не обработанная целлюлоза, которая полностью сохранила исходное строение и структуру микрофибрилл (хлопок, фильтровальная бумага), и так называемая *м о д и ф и ц и р о в а н н а я*, частично обработанная целлюлоза, в которой нарушены водородные связи и фибриллярная структура волокна.

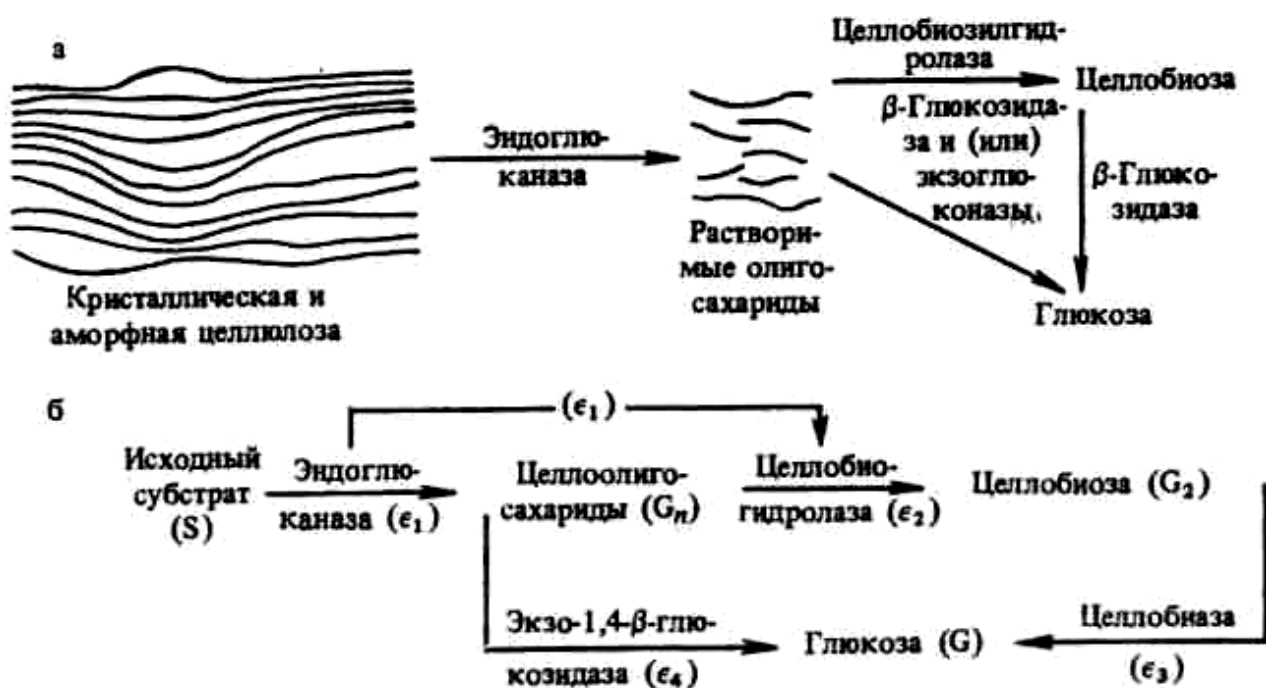


Рис. 20. Ферментативный гидролиз целлюлозы

Целлюлазы почти исключительно синтезируются только микроорганизмами, а именно анаэробными бактериями рода *Clostridium*, микроскопическими грибами и другими. Целлюлоза разрушается представителями многих родов микроорганизмов – *Alternaria tenuis*, *Aspergillus amstelodamy*, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Cellovibrio gilvus*, *Cephalosporium sacchariticus*, *Chaetomium globosum*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Jrpex lacteus*, *Myrothecium verrucaria*, *Penicillium notatum*, *P. variable*, *Rhizopus oryzae*, *Stachybotrys alternans*, *Trichoderma koningii*, *T. lignorum*, *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *Geotrichum candidum*, *Cytophaga* и др.

В соответствии с Номенклатурой ферментов к комплексу целлюлаз, участвующих в деструкции целлюлозы, относят:

1) 1,4- $\beta$ -D-глюкан-4-глюканогидролазы (КФ 3.2.1.4). Это эндоглюканаза, способная неупорядоченно гидролизовать в целлюлозе, лишенине и  $\beta$ -глюканах зерна  $\beta$ -1,4-связи, помимо целлоолигосахаридов могут образовываться в реакционной среде глюкоза и целлотриозы;

2) 1,4- $\beta$ -D-глюканглюкогидролаза (КФ 3.2.1.74). Это экзо-1,4- $\beta$ -глюкозидаза, которая гидролизует 1,4-связи в 1,4- $\beta$ -D-глюканах с последовательным отщеплением глюкозных остатков;

3) 1,4- $\beta$ -D-глюканцеллобиогидролаза (КФ 3.2.1.91). Это целлобиогидролаза, которая отщепляет целлобиозу с нередуцирующих концов целлоолигосахаридов;

4)  $\beta$ -D-глюкозидглюкогидролаза (КФ 3.2.1.21). Это  $\beta$ -глюкозидаза, или целлобиаза, которая гидролитически отщепляет концевые нередуцирующие остатки  $\beta$ -D-глюкозы с освобождением молекулы глюкозы.

Характерными особенностями целлобиогидролазы являются способность гидролизовать нерастворимую целлюлозу с образованием целлобиозы и неспособность этого фермента уменьшать вязкость растворов карбоксилметил (КМ-) целлюлозы.

Большинство целлобиогидролаз является гликопротеидами, они содержат до 9 % нейтральных углеводов, состоящих в основном из маннозы, небольшого количества глюкозы, галактозы и глюкозамина. Молекулярные массы известных экзоглюканаз достаточно близки друг к другу и составляют 45 000–48 000, но есть и более крупные молекулы – с  $M_m$  62 000–90 000.

Отличительным свойством экзо-1,4- $\beta$ -глюканазы является образование  $\alpha$ -аномерной формы глюкозы. Для многих целлюлазных комплексов этот фермент играет существенную роль в механизме образования глюкозы из целлюлозосодержащего сырья. Именно экзо-1,4- $\beta$ -глюкозидаза, а не целлобиаза играет доминирующую роль в образовании глюкозы (60–98 % общего ее количества).

Целлобиаза очень широко распространена в животном, растительном мире и у микроорганизмов. Этот фермент хорошо изучен. Ему приписываются регуляторные функции и влияние именно  $\beta$ -глюкозидаз на суммарное действие всего комплекса целлюлаз.

Отличительной особенностью целлобиаз является способность сохранять пространственную конфигурацию расщепляемой связи в

продуктах гидролиза. Среди  $\beta$ -глюкозидаз существуют ферменты, способные расщеплять  $\beta$ -1,2-,  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,6-связи в субстрате.

Молекулярная масса  $\beta$ -глюкозидаз, по различным данным, колеблется от 40 000 до 400 000. Есть мнение, что  $\beta$ -глюкозидазы относятся к олигомерным белкам, которые диссоциируют на низкомолекулярные компоненты по схеме  $(8n) \rightleftharpoons 2(4n) \rightleftharpoons 4(2n) \rightleftharpoons 8n$ . Отмечается, что с уменьшением молекулярной массы фермента возрастает его сродство к субстрату и соответственно уменьшается  $k_m$ . Октамерное строение фермента подтверждается электронной микроскопией.

Многие  $\beta$ -глюкозидазы являются гликопротеидами и кислыми белками. Максимальную активность эти ферменты проявляют в кислой зоне при рН от 4,3 до 5,0, реже – при 6,7; оптимальная температура действия лежит в диапазоне значений от 37 до 45°C.

Гидролиз гемицеллюлозы происходит под действием **гемицеллюлолитических ферментов**.

Гемицеллюлозами в отличие от целлюлоз называются те полисахариды клеточных оболочек, которые растворяются в концентрированных щелочах (17% -й раствор NaOH и 24 %-й KOH). Гемицеллюлозы наряду с пектиновыми веществами образуют основное вещество (матрикс) клеточных оболочек. Из всех гемицеллюлоз только очень немногие виды ксиланов, глюканов и маннанов имеют фибриллярное строение, например, глюкоманнаны некоторых водорослей. Остальные же гемицеллюлозы имеют ветвистое строение и поэтому не могут образовывать фибриллы. Эта группа полисахаридов, разнородная по строению, молекулярной массе и составу, при гидролизе дает довольно разнообразный набор соединений: глюкозу, фруктозу, маннозу, галактозу, ксилозу, арабинозу, глюкуроновую и галактуроновую кислоты.

Последовательность соединения отдельных остатков сахаров в гемицеллюлозах стерически близка, например, глюкоза – глюкуроновая кислота – ксилоза и галактоза – галактуроновая кислота – арабиноза. В урановых кислотах первичная спиртовая группа может быть окислена в карбоксильную, которая может декарбоксилироваться и давать начало для образования пентоз и пентозанов. Этим объясняется образование галактоарабанов, глюкуроноксианов, галактоманнанов, глюкуроноарабиноксианов и т. д.

Аморфная структура этих полисахаридов объясняется тем, что наряду с  $\beta$ -1,4-связью, лежащей в основе образования линейных по-

лимеров, в молекулах гемицеллюлоз довольно часто встречаются ответвления от основной цепи по  $\beta$ -1,3- и  $\beta$ -1,6-связям, что дает начало образованию ветвящихся и спиральных структур. Кроме того, включение в состав соединения уроновых кислот влечет за собой возрастание гидратационных свойств, что делает невозможным образование кристаллических структур в водной среде. К гемицеллюлозам многие относят только глюкозы, ксиланы и арабаны, а вещества, содержащие маннозу, фруктозу, галактозу и галактуроновую кислоту, – к слизевым веществам, гумми- и пектиновым веществам. Неустойчивость трактовки понятия «гемицеллюлозы» связана со сложностью их строения и трудностью фракционирования на индивидуальные вещества.

Главное различие гемицеллюлоз и гумми-веществ заключается в том, что истинные гемицеллюлозы растворимы только в щелочах, а гуммивещества растворяются также в теплой воде, образуя вязкие растворы.

Все гемицеллюлозные вещества делят на две группы:  $\beta$ -глюканы и пентозаны.

**$\beta$ -Глюканы.** Эти вещества являются высокомолекулярными полимерами и при полном гидролитическом расщеплении образуют одну глюкозу.  $\beta$ -Глюканы широко распространены в природе. Они входят в состав многих растений, водорослей, мхов, лишайников и микроорганизмов. По структуре  $\beta$ -глюканы могут быть линейными и разветвленными.  $\beta$ -Глюканы ячменя представляют почти линейные полисахариды, где остатки глюкозы примерно на 70 % соединены  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,3-связями (около 30 %), которые могут быть в цепи только одиночными.

В природе существуют разветвленные  $\beta$ -глюканы, имеющие  $\beta$ -1,6-глюкозидные связи. К таким  $\beta$ -глюканам относятся ламинарии и пахиман. Есть  $\beta$ -глюканы со всеми видами связей:  $\beta$ -1,3-;  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,6. Один из таких  $\beta$ -глюканов получил название курулан. Молекулярная масса  $\beta$ -глюканов варьирует в широких пределах – от 2 000 до 20 000.

**Пентозаны.** Пентозаны имеют ветвистое строение, они состоят из остатков ксилоз, арабиноз и небольшого количества остатков галактуроновой кислоты. Основной тип связей –  $\beta$ -1,4-, а в местах ветвления –  $\beta$ -1,3-связь. В концевой цепи ветвлений могут быть остатки арабинозы. Молекулярная масса пентозанов различна, она может варьировать от  $7\,900 \pm 500$  до  $58\,800 \pm 200$ .

Многие микроорганизмы образуют ферменты, гидролизующие такие гемицеллюлозы, как  $\beta$ -глюканы, ксиланы и их производные.  $\beta$ -Глюканазы образуются грибами, бактериями и дрожжами, синтезирующими целлюлазы, причем спороносные бактерии *B. subtilis* и *B. mesentericus* синтезируют из комплекса гемицеллюлаз только  $\beta$ -глюканазы, что снижает их практическую значимость. Продуцентами ксиланаз являются грибы, актиномицеты, бактерии, дрожжи. Наивысшей продуцирующей способностью обладают грибы, относящиеся к родам *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Penicillium*, *Stachybotrys* и особенно виды рода *Aspergillus*.  $\beta$ -Глюкозидазы образуют бактерии, дрожжи, грибы. Наиболее активными продуцентами  $\beta$ -глюкозидаз являются грибы, принадлежащие к родам *Trichoderma* и *Aspergillus*.

Все гемицеллюлазные ферменты делят на три группы:  $\beta$ -D-глюканазы,  $\beta$ -ксиланазы и  $\beta$ -глюкозидазы.

**$\beta$ -D-Глюканазы.** К  $\beta$ -D-глюканазам относят систему ферментов, катализирующую расщепление  $\beta$ -глюканов с  $\beta$ -1,2-,  $\beta$ -1,3-,  $\beta$ -1,4- и  $\beta$ -1,6-связями. Согласно Номенклатуре ферментов (1979) в нее входят шесть энзимов:

1,4-(1,3:1,4)- $\beta$ -D-глюкан-4-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.4). Это фермент, который имеет рабочее название целлюлаза, или эндо-1,4- $\beta$ -глюканаза. Он гидролизует  $\beta$ -1,4-глюкозидные связи в целлюлозе, лишенине,  $\beta$ -глюканах зерна. Для этого фермента наличие в субстрате  $\beta$ -1,3-связей не является препятствием. Разрыв связей происходит беспорядочно в определенном удалении от концов молекулы, т. е. этот фермент имеет эндогенный механизм воздействия на субстрат;

1,3-(1,3:1,4)- $\beta$ -D-глюкан-3(4)-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.6). Этот фермент имеет рабочие названия: эндо-1,3(4)- $\beta$ -глюканаза, ламинариназа, эндо-1,3-глюканаза. Фермент эндогенно катализирует гидролитическое расщепление внутренних  $\beta$ -1,3- или  $\beta$ -1,4-связей в  $\beta$ -глюканах, у которых глюкозный остаток, чья редуцирующая группа участвует в образовании гидролизуемой связи, сам замещен в положении C<sub>3</sub>. Субстратом для действия этого фермента являются ламинарии, лишенин и  $\beta$ -глюканы зерна;

1,3- $\beta$ -D-глюканглюканогидролаза (КФ 3.2.1.39). Этот фермент называется, как и предыдущий, эндо-1,3- $\beta$ -глюканазой, ламинариной. Но у него есть некоторые отличия от фермента КФ 3.2.1.6. Он гидролизует преимущественно 1,3- $\beta$ -глюкозидные связи в 1,3- $\beta$ -D-глюканах и очень ограниченно гидролизует эти же связи в глюка-

нах, где есть как  $\beta$ -1,3-, так и  $\beta$ -1,4-связи. Этот фермент гидролизует в основном ламинарии, парамилон и пахиман;

1,3-1,4- $\beta$ -D-глюкан-4-глюканогидролаза (КФ 3.2.1.73). Этот фермент имеет рабочее название лихеназа; он гидролизует 1,4- $\beta$ -глюкозидные связи в  $\beta$ -D-глюканах, имеющих 1,3- и 1,4-связи. Фермент гидролизует лишенин и  $\beta$ -D-глюканы зерна, но не действует на  $\beta$ -D-глюканы, содержащие только  $\beta$ -1,3- или  $\beta$ -1,4-связи;

1,6- $\beta$ -D-глюканглюканогидролаза (КФ 3.2.1.75). Этот фермент в литературе известен под названием эндо-1,6- $\beta$ -глюканаза. Он беспорядочно гидролизует  $\beta$ -1,6-связи внутри молекулы субстрата. Субстратом для действия фермента являются 1,6- $\beta$ -D-глюканы, такие как лютеан, пустулан и 1,6-олиго- $\alpha$ -D-глюкозиды;

1,2- $\beta$ -D-глюканглюканогидролаза (КФ 3.2.1.71). Рекомендуемое название этого фермента эндо-1,2- $\beta$ -глюканаза. Его отличительной особенностью является каталитическое расщепление внутримолекулярных  $\beta$ -1,2-связей в 1,2- $\beta$ -D-глюканах.

$\beta$ -D-Глюканазы – весьма разнородный комплекс ферментов, составляющие которого отличаются по многим признакам. Молекулярные массы, изоэлектрические точки, гидролитические способности этих ферментов, по данным различных исследователей, сильно различаются. Молекулярная масса эндо-1,4- $\beta$ -глюканаза находится в пределах 20 000–70 000; по другим данным, эндо-1,3- $\beta$ -глюканазы имеют молекулярные массы от 16 000 до 60 000.

Все  $\beta$ -глюканазы являются кислыми белками, содержащими большое количество дикарбоновых кислот и оксиаминокислот. Эти ферменты являются гликопротеидами, они имеют углеводный фрагмент, содержащий маннозу, галактозу, глюкозу.

$\beta$ -Глюканазы, особенно микроскопических грибов, имеют множественные формы, отличающиеся по способу гидролиза субстратов, субстратной специфичности, набору аминокислот, структуре самой молекулы, молекулярной массе, оптимальному рН, изоэлектрическим точкам и т. д.

Объединяет же всю эту группу их способность к гидролитическому расщеплению внутримолекулярных глюкозидных связей в  $\beta$ -глюканах различного происхождения.

**$\beta$ -Ксиланазы.** К  $\beta$ -ксиланазам относится система ферментов, катализирующих расщепление  $\beta$ -глюкозидных связей в  $\beta$ -ксиланах (рис. 21).

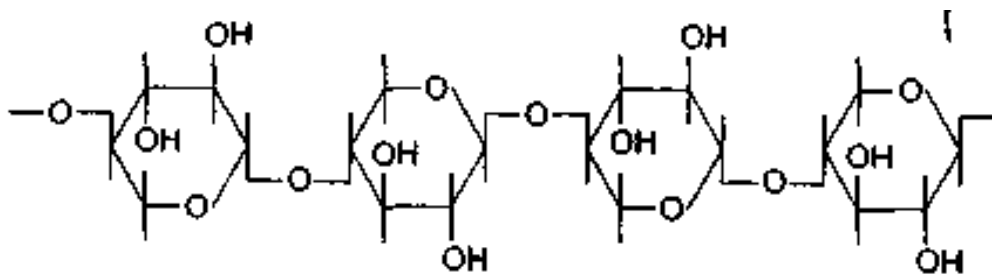


Рис. 21. Молекулярное строение ксилана

Согласно перечню ферментов, приведенному в Номенклатуре, к этой группе можно отнести несколько ферментов:

1,4-β-D-ксиланксианогидролаза (КФ 3.2.1.8). Рабочее название фермента эндо-1,4-ксилаза. Он катализирует реакцию гидролитического расщепления 1,4-β-ксилозидных связей в ксиланах;

1,3-β-D-ксиланксианогидролаза (КФ 3.2.1.32). Иначе этот фермент называется ксиланазой, эндо-1,3-β-ксиланазой. Фермент беспорядочно гидролитически расщепляет внутримолекулярные 1,3-β-D-ксилозидные связи в 1,3-β-D-ксиланах;

1,4-β-D-ксиланксилогидролаза (КФ 3.2.1.37). Фермент имеет рабочее название экзо-1,4-β-ксилозидаза, а также названия ксилобиаза и β-ксилозидаза. Он гидролизует 1,4-β-D-ксиланы путем последовательного отщепления с нередуцирующего конца молекулы полисахарида остатка D-ксилозы. Этот фермент также гидролизует ксилобиозу до D-ксилозы;

α-L-арабинофуранозидарабинофураногидролаза (КФ 3.2.1.55). Рабочее название фермента α-L-арабинофуранозидаза, а также арабинозидаза. Он катализирует гидролиз последней с нередуцирующего конца связи в молекуле α-арабинозидах, отщепляя α-L-арабинозу в фуранозной форме. Фермент действует на α-L-арабинофуранозиды, α-L-арабинаны, содержащие 1,3- и (или) 1,5-связи, на арабиноксиланы и арабиногалактаны;

1,3-β-ксиланксилогидролаза (КФ 3.2.1.72). Рабочее название фермента экзо-1,3-β-ксилазидаза. Фермент последовательно отщепляет с нередуцирующего конца молекул 1,3-β-D-ксиланов остатки ксилозы.

У большинства микроорганизмов – продуцентов ксиланаз найдено два типа ферментов, гидролизующих основную цепь ксиланов: это эндо-1,4-β-ксилазы и экзо-1,4-β-ксилозидазы. Молекулярная масса эндо-1,4-β-ксилаз лежит в пределах от 16 000 до 50 000. Мо-

лекулярная масса экзо-1,4-β-ксилозидаз варьирует достаточно сильно в зависимости от вида продуцента, примерно от 30 000 до 100 000, но она, как правило, несколько выше, чем у эндо-1,4-β-ксиланаз. Чаще всего оптимум действия ксиланаз наблюдается при рН от 4 до 7 и при температуре от 30 до 50 °С. В составе ксиланаз найдено большое количество кислых и ароматических аминокислотных остатков. В большинстве своем эти ферменты – гликопротеиды.

При изучении ксиланаз на различных субстратах было установлено, что по механизму воздействия на арабиноксиланы, арабиноглюкуроноксиланы и ксилоолигосахариды их можно подразделить на две группы: ферменты, гидролизующие α-1,3-связь, расположенную между ксилозой и арабинозой; ферменты, не отщепляющие арабинозу от арабиноксиланов, арабиноглюкуроноксиланов и олигосахаридов.

Установлено, что для многих ксиланаз ветви, содержащие арабинозу и глюкуроновую кислоту, являются стерическим препятствием для образования фермент-субстратного комплекса ксилан – ксиланазы. Образующиеся при ферментативном гидролизе ксиланов ксилоолигосахариды (ксилобиоза и ксилотриоза) часто являются препятствием для дальнейшего гидролиза субстрата до ксилозы. Эти полупродукты гидролиза полисахарида выступают в качестве факторов, тормозящих процесс дальнейшего гидролиза. Ингибирующее действие ксилоолигосахаридов устраняется в присутствии экзо-1,4-β-ксилозидазы, что связано с гидролизом ксилоолигосахаридов до ксилозы, т. е. проявляется суммарный эффект воздействия двух ферментов на субстрат.

В литературе нет единого мнения о способности экзо-1,4-β-ксилозидаз самостоятельно гидролизовать ксиланы. Большинство исследователей считают, что экзо-1,4-β-ксилозидаза – это типичная β-глюкозидаза, гидролизующая короткие цепи ксилоолигосахаридов и β-ксилозидов. Данные, которые свидетельствуют о гидролизе ксиланов под действием экзо-1,4-β-ксилозидазы, вероятнее всего, являются результатом наличия в этих препаратах примесей эндоксилиназ. Экзо-1,4-β-ксилозидазы гидролизуют ксилозиды и ксилоолигосахариды с нередуцирующего конца молекулы. При этом скорость гидролиза возрастает с уменьшением степени полимеризации олигосахаридов; продуктом гидролиза является β-ксилоза.

**β-Глюкозидазы.** В Номенклатуре ферментов β-глюкозидазы представлены в группе КФ 3.2.1.21 «β-D-Глюкозидглюкогидролаза».



В литературе эти ферменты известны под названиями: генциобиаза, амигдалаза и самое распространенное – целлобиаза.  $\beta$ -Глюкозидаза – это фермент экзогенного действия. Она гидролитически расщепляет последнюю с нередуцирующего конца  $\beta$ -1,4-связь в  $\beta$ -D-глюкозидах, высвобождая  $\beta$ -D-глюкозу.  $\beta$ -Глюкозидаза проявляет широкую субстратную специфичность. Некоторые ферменты этой группы гидролизуют не только  $\beta$ -D-глюкозиды, но и  $\beta$ -D-галактозиды,  $\alpha$ -L-арабинозиды или  $\beta$ -D-ксилозиды.

Гидролиз белков и пептидов происходит под действием **протеолитических ферментов**.

Различают простые белки, состоящие только из аминокислот, их называют **п р о т е и н а м и**, и сложные белки, в состав которых наряду с белковой частью молекулы входят соединения небелковой природы (углеводы, витамины, жиры и др.), – **п р о т е и д ы**. Все эти соединения имеют большую молекулярную массу и сложны по строению.

Пептиды имеют более низкую молекулярную массу, чем белки, и по составу подобны простым белкам. Они могут быть либо продуктами неполного гидролиза белка, либо природными соединениями.

Протеолитические ферменты синтезируются практически всеми живыми существами. Эти ферменты очень широко распространены в природе. Из растений промышленный интерес представляют плоды дынного дерева, побеги и листья инжира и отходы переработки ананасов. Активными продуцентами протеиназ являются бактерии, микроскопические грибы и актиномицеты. При промышленном получении протеиназ чаще всего используют микроорганизмы, относящиеся к родам *Bacillus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* и некоторые другие.

Протеолитические ферменты делятся на две основные группы: пептидазы КФ 3.4.11–15 и протеиназы – КФ 3.4.21–24.

В первой группе протеолитических ферментов – **пептидазах** – подразделение по подподклассам осуществляется на основе механизма расщепления пептидных связей в пептидах. Группа КФ 3.4.11 –  $\alpha$ -аминоацилпептидгидролазы – гидролитически расщепляют первую с N-конца пептидную связь. Группа КФ 3.4.12 – гидролазы пептидиламино кислот или гидролазы ациламино кислот – объединяет ферменты, действующие на первую пептидную связь с C-конца. Ферменты группы КФ 3.4.13 – дипептидгидролазы – гидролизуют дипептиды; групп КФ 3.4.14 – дипептидилпептидгидролазы – и КФ 3.4.15 –

пептидилдипептидгидролазы – гидролизуют дипептиды соответственно с N- и C-конца.

Вторая группа протеолитических ферментов – **протеиназы** – имеет четыре подподкласса, в которых все ферменты подразделяются в зависимости от особенностей механизма катализа, установленного по функционированию активного центра фермента, а также влияния pH на его активность. Специфичность к субстрату рассматривается лишь с позиции идентификации индивидуальных ферментов в пределах каждой из групп.

*Сериновые протеиназы* – протеиназы, для которых характерно наличие в каталитическом центре триады аминокислот: аспарагиновой кислоты, гистидина и серина. В этот подподкласс внесены некоторые микробные протеиназы.

*Тиоловые протеиназы* – протеиназы, имеющие в активном центре SH-группу цистеина. В подподкласс 3.4.22 вошел ряд важных протеиназ растительного происхождения, таких как папаин, фицин, бромелаин, химопапаин, и некоторые микробные протеиназы.

*Кислые протеиназы* – имеют оптимальный pH ниже 5, в каталитическом акте у этих ферментов участвуют остатки дикарбоновых аминокислот. Наиболее широко известны из этого подподкласса пепсин, катепсин и ряд кислых протеиназ грибного происхождения. Металлосодержащие протеиназы – протеиназы, содержащие ионы металлов. В основном это различные микробные нейтральные протеиназы.

Основные протеиназы растительного происхождения: папаин, фицин, бромелаин, химопапаин. Папаин не обладает субъединичной структурой и по форме близок к глобулярным белкам. Пептидная цепь уложена так, что гидрофобные остатки аминокислот погружены внутрь глобулы, а гидрофильные расположены на поверхности. Характерной чертой структуры является наличие расщелины (щель, углубление, карман), идущей от поверхности в глубь молекулы, по стенкам которой группируются гидрофобные группы. Активный центр фермента располагается внутри этой расщелины, куда проникает субстрат и где происходит реакция. Внутри щели можно выделить ряд остатков, которые играют важную роль в осуществлении катализа. В активном центре папаина имеются цистеин и гистидин, имидазол и аспарагин, что отдаленно напоминает активный центр сериновых ферментов. Считают, что существенную роль для проведения каталитического акта имеет гидрофобное окружение, в котором оказываются реагирующие вещества. Наиболее реакционноспособен

в этом кармане у папаина, фицина и бромелаина остаток цистеина. В качестве ковалентного интермедианта образуется тиацилфермент.

В полипептидной цепи папаина содержится 212 аминокислотных остатков, имеется три –S–S–группы; молекулярная масса папаина 20 700, он имеет  $\alpha$ -структуру и глобулярное строение. Папаин обладает широкой специфичностью. Он осуществляет глубокий протеолиз белков и синтетических субстратов.

Гидролиз липидов происходит под действием **липолитических ферментов**. Липазы содержатся в заметных количествах в семенах многих растений: ржи, пшеницы, овса, сои, хлопчатника и особенно клещевины. Липазы образуют очень многие микроорганизмы. Бактерии, как правило, накапливают внутриклеточную липазу, а актиномицеты, грибы и дрожжи – преимущественно внеклеточную. Среди бактерий найдены активные продуценты липаз, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*. Среди дрожжей лучшими продуцентами являются представители рода *Candida* (*C. lipolytica*, *C. paralipolytica*, *C. cylindraceae*). Для промышленного использования чаще всего рекомендуются микроскопические грибы. Высокая липазная активность отмечается у грибов родов: *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Oospora* и *Humicola*. Продуценты липаз найдены и среди актиномицетов (виды *Streptomyces flavogriseus*, *Thermoactinomyces vulgaris* и ряд других).

Липиды – это сложная смесь органических веществ, которая подразделяется на две большие группы: сложные и простые липиды. К простым липидам относятся липиды, не содержащие азота, фосфора и серы. Это воски, диольные липиды, ацилглицерины (глицериды), алкильные липиды, нейтральные плазмалогены, гликолипиды. Сложные липиды – сульфолипиды, инозитол, глицерофосфолипиды, фосфорсодержащие плазмалогены, сфинголипиды, состоящие из сфингомиелинов и гликофингомиелинов. Среди простых липидов наиболее широко распространены простые нейтральные липиды, которые часто составляют до 95–97 % общей массы липидов и, по существу, являются жирами. В состав жиров в основном входят триглицериды, но присутствуют также ди- и моноглицериды. Природные жиры содержат смешанные триглицериды, в состав которых входят различные остатки карбоновых кислот. В формировании триглицеридов может участвовать до 400 остатков кислот различного строения. Поэтому состав жира неоднороден и очень сложен.

По Номенклатуре ферментов *липаза* имеет название триацилглицеролацилгидролаза (КФ 3.1.1.3), ее рекомендуемое рабочее название триацилглицероллипаза. Этот фермент имеет еще несколько названий: стеапсин, трибутираза, липаза триглицеридов, липаза.

Липаза производит гидролитическое расщепление триацилглицерола до диацилглицерола и остатка отщепляемой жирной кислоты. Затем идет отщепление следующих остатков жирных кислот до образования глицерина. При этом скорость отщепления кислотного остатка от триацилглицерола в несколько раз больше, чем от ди- и тем более от моноацилглицерола. Фермент проявляет наибольшее сродство к эфирной связи, расположенной на внешней части молекулы триацилглицерола. Липазы быстрее отщепляют остатки высокомолекулярных жирных кислот, чем низшие карбоновые кислоты, т. е. не растворимые в воде субстраты. Ферментативный гидролиз липидов имеет существенное отличие от других ферментативных реакций. Это гетерогенный процесс, так как подавляющее большинство липаз растворимо в воде, а субстратные молекулы – нерастворимы и объединены в малоподвижные крупные ассоциаты (мицеллы, эмульгированные жировые капли). Чем выше степень диспергирования субстрата, тем быстрее идет липолиз. Это связано с явлением сорбции фермента на поверхности субстрата. Этот процесс и является первым актом ферментативного липолиза. Чтобы адсорбция фермента была продуктивной, необходимо внедрение фермента в поверхностный слой субстратной молекулы, и только после этого у фермента появляется возможность контакта активного центра с молекулой субстрата. Активный центр липаз можно расчленить на три участка, различающихся между собой функционально: 1) контактный, ответственный за узнавание поверхности субстратной фазы (мицеллы, эмульсии, монослоя и др.); 2) гидрофобный связывающий участок, осуществляющий извлечение одной молекулы субстрата из субстратной фазы в глобулу фермента; 3) участок, образованный группами, осуществляющими каталитический акт гидролиза сложноэфирной связи. Такое расчленение групп активного центра позволяет объяснить процесс катализа, осуществляемый липазами. Не исключено, что аналогичные участки имеются и у других ферментов, так как известны факты регуляции каталитической активности ферментов путем изменения физического состояния субстрата.

Липаза является гетерогенным белком, имеющим небелковый компонент липидной природы, который при удалении липидного фрагмента может потерять активность. Липидный фрагмент необходим для того, чтобы фермент мог функционировать в гетерогенной

среде. Этот фрагмент ответствен за формирование участка узнавания субстрата. Участок узнавания может конструироваться у некоторых липаз путем объединения белковой части фермента с небелковыми фрагментами или полипептидами. Специфичность же липолитических ферментов к физическому состоянию субстрата в ряде случаев связана с их надмолекулярной структурой. Липазы, полученные из различных источников, заметно отличаются друг от друга. Для многих липолитических ферментов определена субъединичная структура. Фермент имеет множественные формы, которые по своим свойствам далеко не идентичны. Ряд липаз при липолизе природных масел и жиров различного происхождения не проявляет строгой специфичности и гидролизует их с одинаковой скоростью. Так, при проведении липолиза оливкового, подсолнечного, кунжутного, хлопкового и соево-бобового масел и масла семян рапса с помощью липазы из гриба рода *Rhizopus* степень активности и глубина гидролиза были почти на одном уровне. Липолитические ферменты, выделенные из различных источников, различаются по своей термостабильности. Известны липазы, стабильные при 20 и 65 °С, но большинство наибольшую стабильность имеет в диапазоне температур от 30 до 40°С. Ряд липаз повышает активность при низких температурах – это явление необычное, но объяснимое, так как реакции могут протекать с большей скоростью благодаря различным фазовым переходам в твердое состояние участвующих в реакции компонентов. Стабильность фермента и некоторые его свойства во многом зависят от степени очистки. Так, для большинства липаз чем они чище, тем ниже их стабильность. Поэтому для каждого ферментного препарата определяются оптимальные температура, рН, стабильность и другие его свойства. В зависимости от оптимального рН для действия липаз они делятся на кислые (4–6), нейтральные (6,5–7,2) и щелочные (7,5–9). Большой промышленный интерес вызывают микроорганизмы, продуцирующие термостабильные липазы, особенно представители родов *Geotrichum*, *Aspergillus* и *Mucor*.

### 3.2.2. Негидролитические реакции

Негидролитические ферменты используются на разных технологических стадиях производства пищевых продуктов, причем на стадиях первичного преобразования исходных субстратов используются трансферазы и лиазы, а на заключительных – оксиредуктазы и изомеразы.

## Окислительно-восстановительные реакции

**Каталаза** (КФ 1.11.1.6) – геминовый фермент, содержащий тетрапиррольное кольцо и катализирующий расщепление перекиси водорода на воду и кислород, а также окисление спиртов в альдегиды, сопряженное с окислением перекиси водорода.

Фермент имеет молекулярную массу 240–300 кДа, состоит из одной субъединицы, может существовать в виде тетрамера и гексамера.

Каталаза *P. vitale* имеет широкий рН-оптимум – от 4 до 9, стабильна при температуре до 65 °С.

**Глюкозооксидаза** (КФ 1.1.3.4) катализирует окисление глюкозы в глюконовую кислоту. Промышленные препараты глюкозооксидазы выделяют из культур микроскопических грибов. Активные продуценты внеклеточной глюкозооксидазы – грибы *Penicillium* и *Talaromyces*, наиболее перспективны виды *P. vitale*, *P. amagasakiense* и *P. funiculosium*. Фермент из *P. vitale* имеет молекулярную массу 150 кДа, оптимальный рН 5,6–5,8, стабилен при рН 3–7 и температуре до 50°С. Ингибиторы – ионы ртути и меди, стабилизаторы – ионы кальция и аммония.

В пищевой промышленности глюкозооксидазу используют совместно с каталазой, потому что необходимо разлагать перекись водорода, образующуюся на первой стадии окисления глюкозы глюкозооксидазой.

Грибы пенициллы и аспергиллы обладают способностью продуцировать значительные количества обоих ферментов.

**Пероксидаза** (КФ 1.11.1.7) катализирует окисление органических соединений с помощью перекиси водорода, перенося водород от молекулы субстрата к перекиси. Субстратами фермента служат фенолы (пирокатехин, пирогаллол, гидрохинон, резорцин, гваякол), ароматические кислоты (бензойная, салициловая, галловая), аскорбиновая кислота, анилин, толуидин, нитриты и другие соединения. Фенол обладает не только пероксидазными, но и оксидазными свойствами, то есть окисляет органические соединения за счет неактивированного молекулярного кислорода. Большинство субстратов пероксидазы – фенолы. Под действием фермента они окисляются до хинонов, которые сами по себе являются сильными окислителями. Хиноны склонны к полимеризации с образованием темноокрашенных соединений.

Пероксидаза присутствует в каждой растительной клетке и представлена в растениях набором изоферментов, число которых у одного вида может составлять от 3 до 42. Наличие изоферментов расширяет границы функционирования пероксидазы, она проявляет активность в зоне рН 3–14. При изменении внешних условий и гомеостаза растения изменяется изоферментный состав пероксидазы, что является приспособительным инструментом.

Пероксидаза – двухкомпонентный фермент, состоящий из белка гликопротеина и геминового компонента, который включает протопорфирин IX и ион трехвалентного железа. Геминный компонент выполняет роль активного центра. Фермент из различных источников имеет молекулярную массу от 22 до 44 кДа, белковая часть на 43 % спирализована.

Пероксидаза активируется ионами марганца, цинка, меди, кальция и ингибируется цианидами и хелатами.

***о-Дифенолоксидаза*** (КФ 1.14.18.1) – медьсодержащий фермент, присутствующий во всех органах и тканях растения и катализирующий окисление дифенолов, полифенолов, монофенолов и дубильных веществ с помощью кислорода воздуха. Под действием дифенолоксидазы растительные фенолы окисляются в хиноны, которые, конденсируясь, превращаются в меланины. Конденсация хинонов протекает по свободнорадикальному механизму. Цвет меланинов зависит от их молекулярной массы. Чем крупнее молекула, тем темнее окраска, по мере увеличения молекулярной массы цвет меняется от розового до черного. Окисление фенолов под действием дифенолоксидазы и тирозиназы (тирозин-3-монооксигеназы) лежит в основе потемнения овощей и фруктов при чистке, измельчении, сушке. Потемнение чайного листа в процессе ферментации также связано с окислением дубильных веществ в присутствии дифенолоксидазы и кислорода воздуха. Оптимум рН 5–7. Ингибиторами фермента являются синильная кислота, азид натрия, сероводород, окись углерода, диэтилдитиокарбамат и хелаты.

***Липоксигеназа*** (КФ 1.13.11.12) – железосодержащий фермент, который за счет молекулярного кислорода катализирует окисление полиненасыщенных жирных кислот, содержащих цис-цис-1,4-пентадиеновую группу (линолевой, линоленовой, арахидоновой), и их эфиров. Ненасыщенные жирные кислоты превращаются в гидроокисикислоты, при этом изменяется положение двойной связи. У покоящихся семян бобовых, льна, в зародышах злаков активность фер-

мента высокая, а в семенах подсолнечника, рапса, конопли, ореха – невелика, но возрастает при прорастании семян. Молекулярная масса растительных липоксигеназ 67–108 кДа, оптимум рН 6,2–7,5, температура 20–40 °С. Изоформа соевой липоксигеназы активируется ионами кальция.

Фермент ингибируется антиоксидантами: токоферолами, каротиноидами, янтарной и фумаровой кислотами, флавоноидами (морин, кемпферол, мирицетин, кверцетин, дигидрокверцетин и др.), аскорбиновой кислотой.

Антиоксидантные свойства янтарной кислоты связывают с ее хорошей окисляемостью, что предотвращает перекисное окисление липидов (окислительная способность гидроперекисей реализуется в окислении янтарной кислоты, а не следующих порций липидов).

Фумаровая кислота, имеющая двойную связь, может участвовать в образовании фермент-субстратного комплекса с липоксигеназой (вместо истинного субстрата – линолевой кислоты) и является типичным конкурентным ингибитором липоксигеназы.

Характер действия токоферола зависит от его концентрации в реакционной среде. При концентрации ниже 5 мкмоль реализуется в основном механизм взаимодействия  $\alpha$ -токоферола и липоксигеназы, что приводит к необратимому ингибированию фермента. При более высокой концентрации  $\alpha$ -токоферол образует ассоциаты, структурно не способные взаимодействовать с липоксигеназой, но в них наиболее эффективно реализуется способность  $\alpha$ -токоферола нейтрализовать высокоэнергетические и радикальные частицы, то есть его стабилизирующее действие. Оно наиболее выражено при концентрации  $\alpha$ -токоферола 10–25 мкмоль, когда фермент наилучшим образом защищен от деструкции и ингибирования продуктами окисления и потому наиболее активен. При концентрации выше 25 мкмоль токоферол существует в высокоагрегированном состоянии, затрудняющем проявление им биологических свойств.

Из числа изомеров токоферолов наибольшей антиоксидантной способностью обладают  $\gamma$ - и  $\delta$ -токоферолы, но в качестве пищевой антиоксидантной добавки используют  $\alpha$ -форму с наиболее высокой витаминной активностью. Антиоксидантные свойства токоферола повышаются в присутствии аскорбиновой кислоты и ее жирорастворимой формы – аскорбилпальмитата. Для стабилизации растительных масел рекомендуют концентрацию  $\alpha$ -токоферола 50–80 мг/100 г продукта.



Флавоноиды используют как индивидуальные соединения (сильный антиоксидант – кверцетин), а также в составе растительных экстрактов, где присутствуют также токоферолы, каротиноиды и аскорбиновая кислота.

**Лакказа** (КФ 1.14.18.1) – медьсодержащий фермент, обладающий широкой специфичностью в отношении фенольных субстратов и катализирующий образование феноксильных радикалов. Грибы могут синтезировать несколько изоформ лакказы, отличающихся по специфичности действия.

Лакказы грибов рода *Coriolus* имеют молекулярную массу 60–69 кДа, оптимум действия при pH 4,4–5 и температуре 50–55 °С. Фермент из *C. versicolor* содержит 4 атома меди на молекулу. Содержание углеводного компонента в лакказе *C. zonatus* составляет около 10 %.

**Лигниназа** – гемсодержащая Mn-независимая пероксидаза. Этот фермент катализирует окислительную дегполимеризацию лигнина с участием перекиси водорода. Молекулярная масса фермента 40–63 кДа, оптимум действия при pH 2,7–3,4 и температуре 28–34 °С. Лигниназа катализирует расщепление С—С-связей в димерных моделях лигнина, окисление бензиловых спиртов и метильных заместителей в бензильных соединениях, гидрокселирование бензильных метильных групп и олефиновых связей, декарбоксилирование фенилуксусной кислоты, расщепление эфирных связей, раскрытие ароматического кольца, полимеризацию фенолов.

Грибы синтезируют до 15 гемсодержащих пероксидаз, в том числе несколько Mn-независимых.

Mn-зависимые пероксидазы, участвующие в деструкции лигнина, имеют молекулярную массу 42–49 кДа, активны в кислой среде и могут окислять субстраты и в отсутствие марганца; при этом скорость реакции зависит от природы субстрата.

## Реакции переноса

К реакциям переноса относят реакцию образования циклодекстринов из крахмала, катализируемую ферментом циклодекстринглюканотрансферазой (КФ 2.4.1.19), относящемся к классу трансфераз. Образование циклодекстринов приводит к дегполимеризации крахмала, причем отделение фрагмента  $\alpha$ -1,4-глюкана и замыкание его кон-

цов в циклодекстрин происходит со стороны нередуцирующего конца линейного участка субстрата.

Циклодекстринглюканотрансфераза предпочтительно катализирует образование циклодекстринов из высокомолекулярных субстратов, степень полимеризации 30–100 глюкозных единиц. Наибольший выход получают из кукурузного и картофельного крахмала. В присутствии амилолитических ферментов, прежде всего  $\alpha$ -амилазы, быстро понижающей среднюю молекулярную массу декстринов, степень конверсии крахмала в циклодекстрины снижается. Из глюкозы циклодекстрины не образуются.

Помимо крахмала и амилодекстринов, циклодекстринглюканотрансфераза использует в качестве субстратов образовавшиеся циклодекстрины, катализируя их взаимные превращения, а также образование глюкозы, мальтозы и мальтотриозы. С этим связано изменение соотношения форм циклодекстринов в ходе реакции. Наиболее лабильны  $\gamma$ -циклодекстрины.

Циклодекстринглюканотрансфераза катализирует перенос остатков глюкозы и мальтоолигосахаридов на акцепторы, такие как сорбоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, мальтоолигосахариды, ксилоза, галактоза, глюкуроновая кислота, инозит. Образуются линейные олигосахариды, в структуре которых акцептор расположен на редуцирующем конце. Так, при переносе остатка глюкозы на сорбозу или сахарозу образуются соответственно глюкозилсорбоза и мальтозилфруктоза. Введение акцепторов в среду с крахмалом ускоряет его деградацию.

Циклодекстринглюканотрансферазу синтезируют в качестве внеклеточного фермента различные виды бацилл, микрококков, актиномицетов, микроскопических грибов.

Соотношение  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -циклодекстринов в продуктах реакции зависит от источника фермента и может различаться у штаммов одного вида. Для циклодекстринглюканотрансфераз *B. macerans*, *B. licheniformis*, *Micrococcus varians* и *Klebsiella pneumoniae* характерно преобладание  $\alpha$ -циклодекстринов, *B. circulans*, *B. megaterium*, *M. luteus* –  $\beta$ -циклодекстринов, *B. subtilis* –  $\gamma$ -циклодекстринов. На соотношение форм циклодекстринов влияют видовые особенности крахмалов.

### 3.3. Ферментные препараты

#### 3.3.1. Источники сырья для получения ферментов

Для выделения ферментов чрезвычайно важным является выбор подходящего исходного материала, так как он часто определяет конечный результат работы. Для получения ферментов используют семена, проростки или органы растений, клеточную массу микроорганизмов.

С повышением концентрации данного фермента в биологическом сырье задача его выделения существенно облегчается. Так, в условиях индуцированного образования ферментов у микроорганизмов концентрация их в клетках повышается во много раз. Например, при индуцированном синтезе кислой фосфатазы содержание ее в клетках кишечной палочки доходит до 6 % и выше от общего сухого веса клеток. В этом и аналогичных случаях для препаративного получения чистого фермента достаточно исходить из 50–200 г клеточной массы.

При прорастании семян растений активность многих ферментов значительно повышается, поэтому при выделении растительных ферментов нередко используют 5–10-дневные проростки. У микроорганизмов активность некоторых ферментов, например триптофанпирролазы, может быть повышена путем предварительного выращивания микробов на средах с добавленным субстратом. Это явление получило название индуцированного образования ферментов.

#### Селекция и культивирование продуцентов ферментов

Получение ферментов в промышленных масштабах производится из биологических объектов всех видов. Однако признано, что лучшими источниками для получения ферментов являются микроорганизмы. Это подтверждается следующими факторами:

современные подходы к селекции микробных культур (первичная селекция, мутация, генная инженерия) и оптимизации условий культивирования дают возможность значительно увеличить биосинтез практически любого микробного фермента;

используемый в промышленных условиях штамм-продуцент должен иметь такую систему регуляции синтеза фермента, которая позволяет накапливать его в количествах, значительно превосходящих физиологическую потребность организма;

исключено влияние фактора сезонности на процесс культивирования микроорганизмов;

для культур микроорганизмов представителей разных таксономических групп характерен широкий спектр биосинтеза ферментов. Уникальное многообразие самих микроорганизмов, с учетом возможностей геной инженерии, создает уникальную возможность отбора ферментов практически для всех конкретных технологий или других целей;

возможно получение ферментов с особенными каталитическими свойствами (белковая инженерия). Это имеет большое значение при использовании ферментов в промышленных процессах.

Усиление признака биосинтеза ферментов микроорганизмами или приобретение способности синтеза ферментов с новыми, уникальными свойствами возможны с помощью клонирования соответствующих генов. С этой целью широко используются такие генетически хорошо изученные организмы, какими являются прокариоты *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и эукариоты *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Phanerochaeta chrisosporium* и др.

Использование методов геной и клеточной инженерии открывает новые возможности микроорганизмов как продуцентов ферментов. Промышленная культура микроорганизма, чтобы быть конкурентоспособной, должна характеризоваться следующими свойствами: накоплением ферментов в большом количестве (в клетке или культуральной жидкости) на дешевой питательной среде в больших емкостях; не должна проявлять токсических и патогенных свойств в промышленных условиях культивирования; образуемый фермент должен характеризоваться стабильностью или, наоборот, лабильностью, в зависимости от условий его последующего использования; культура-продуцент, которая чаще всего является мутантом, фузантом или трансформантом, должна характеризоваться конститутивным механизмом синтеза основного фермента, возможностью максимального уменьшения времени культивирования и доведения до минимума ингибирующего действия метаболитов на активность фермента.

Для каждого конкретного фермента должна осуществляться вся селекционная работа, начиная с выделения культур из природных источников. Так, например, амилазы значительно более активно образуются микроорганизмами, поселяющимися в зерновых культурах; целлюлазы и ксиланазы синтезируют микроорганизмы, встречающиеся в компостах и лесных подстилках; пектиназы наиболее интен-

сивно продуцируются микроорганизмами, участвующими в разложении плодов и овощей; хорошими продуцентами окислительных ферментов (фенолоксидазы, пероксидазы, лакказы, монооксигеназы) являются микроорганизмы, обитающие на живых растениях и овощах (например, базидиальные грибы). Иногда, вопреки всякой логике, выделяют такие продуценты ферментов, присутствие которых в тех почвенно-климатических условиях, откуда они выделены, не предполагалось.

Получение промышленных культур – продуцентов ферментов является сложным и долгим процессом. Практически любая культура должна пройти следующие стадии: 1. Выделение культуры из природного источника. 2. Получение чистой культуры. 3. Установление таксономической принадлежности, рода и вида культуры. Тщательная физиолого-биохимическая характеристика. Выявление патогенности и токсичности. Установление признака наличия синтеза интересующего фермента. 4. Получение мутанта, фузанта, трансформанта на основе селективно отобранных культур с увеличенной активностью интересующего фермента и установление генетической стабильности полученных штаммов. 5. Подбор состава питательной среды и установление специфики синтеза фермента: внутриклеточный, внеклеточный, локализованный в клеточных структурах и т.д. 6. Подбор типа (поверхностный, глубинный, погруженный, непрерывный) и условий культивирования (температура, рН среды, парциальное давление кислорода и т.д.). 7. Масштабирование процесса выращивания.

Более 50 % стоимости процесса ферментации в производственных условиях составляет стоимость питательных сред.

Наиболее важным компонентом питательной среды является углерод, составляющий не менее 50 % веса всей среды. Органическая часть питательной среды, кроме углерода, является и источником энергии.

Широко используемым источником углерода является мука различных злаков, таких как ячмень, кукуруза и рис. Например, проросший ячменный солод, в котором прорастание приостановлено воздействием высокой температуры, содержит ряд ценных питательных компонентов (частично гидролизованный крахмал, низкомолекулярные сахара, аминокислоты, белки и др.) и в ряде случаев существенно повышает качество биомассы и выход фермента. Однако в силу дороговизны этот источник используется сравнительно редко.

В качестве источника углерода используется также меласса – субстрат, содержащий легкометаболизируемые сахара (сахароза, глюкоза, фруктоза).

Азот является важнейшим составным компонентом питательных сред. В процессах метаболического синтеза азот используется в виде органических и неорганических соединений. Как правило, азот вносят в виде аммонийных солей, однако скорость роста и продуктивность можно увеличить, добавляя органические азотистые соединения. Источником роста в промышленных средах может служить мука, изготовленная из арахиса и сои. Эти источники богаты пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, витаминами и факторами роста.

Кукурузный экстракт является ценнейшим поставщиком органической формы азота. Он образуется как побочный продукт при производстве кукурузного крахмала и содержит до 25 % белка и аминокислот.

Из минеральных солей в питательные среды обычно вводятся фосфат и сульфат в довольно больших количествах (около 1 и 0,5 г л<sup>-1</sup> соответственно). Часто необходимо добавление небольших количеств ионов металлов, например, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>. Микроэлементы поступают и в составе других питательных компонентов.

Прокариоты в среднем за 1,5–2 ч удваивают количество биомассы, эукариоты тратят на этот же процесс в 1,5–2 раза больше времени. Именно этими показателями и обусловлено внесение того количества инокулята (посевной культуры), которое обеспечивает максимально быстрый рост культуры и высокий выход конечного продукта-фермента. Другим фактором, определяющим количество вносимого инокулята, является отсутствие гарантии абсолютно полной стерилизации питательной среды. Эта проблема, несмотря на разные конструкции ферментеров в промышленных условиях, все еще существует. Для того чтобы свести к минимуму вероятность заражения питательной среды в процессе выращивания продуцентов, требуется внести в ферментер довольно большое количество инокулята – культуру, находящуюся в интенсивной фазе роста. Это необходимо для того, чтобы основная культура в процессе роста могла бы конкурировать с любой формой заражения (чаще всего бактериальной) и подавлять ее в случае необходимости.

Культуру из пробирок, чашек Петри или в лиофилизированной форме высевают в колбы емкостью от 150 мл до 1 л, содержащие питательную среду, чаще всего аналогичную той, которая используется

на всех последующих этапах культивирования, в том числе и в терминальном ферментере. После достижения культурой экспоненциальной фазы роста ее пересевают в небольшие ферментеры (30–500 л); затем, после достижения стационарной фазы роста (для прокариот 8–20 ч, для эукариот 20–50 ч), культуру переносят в другие, более крупные, ферментеры (1–5 м<sup>3</sup>), а далее в терминальный производственный ферментер, обычно емкостью 25–100 м<sup>3</sup>.

Обычно в производственных условиях объем инокулята составляет 5–10 %, реже – 15 % от объема производственной ферментационной емкости.

К числу факторов, определяющих экономическую эффективность микробиологического производства ферментов, следует отнести выбор метода культивирования микроорганизмов. Существует несколько методов: поверхностный, глубинный (периодический), погруженный (очень редко) и глубинный непрерывный; каждый имеет свою специфику и особенности, в силу которых на сегодняшний день практическое использование находят все методы.

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

Наряду с глубинным применяется поверхностный способ культивирования, когда культуры продуцентов выращивают на поверхности жидких и сыпучих (твердофазное культивирование) питательных сред (отруби, свекловичный жом, измельченное целлюлозосодержащее сырье, солодовые ростки и др.). Последние увлажняют и стерилизуют.

Приоритет отдают твердофазному процессу, так как условия культивирования продуцентов максимально приближены к естественным, в которых полностью реализуется биопотенциал микроорганизмов. Клетки микроорганизмов непосредственно контактируют с питательными субстратами и не подвергаются неблагоприятным механическим воздействиям, неизбежным при глубинном культивировании. Твердофазная культура хорошо аэрируется. В конце ферментации получают культуру в форме, удобной для выделения ферментных препаратов.

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

### ***3.3.2. Методы количественного определения ферментов или их активности***

О присутствии фермента в растворе судят в большинстве случаев по действию его на определенный субстрат (или на определенный тип химической связи в молекуле субстрата) в условиях, оптимальных для активности фермента. Как правило, могут быть подобраны такие условия для определения активности, при которых начальная скорость исследуемого превращения пропорциональна количеству фермента в изучаемой пробе. Таким образом, о количестве фермента судят косвенно по его активности.

Ферменты-протеиды, простетические группы которых окрашены или обладают другими доступными измерению физическими или химическими свойствами, могут после некоторой очистки определяться прямыми методами, например, путем измерения интенсивности флюоресценции или характерных полос поглощения в растворах. Прежде чем приступить к выделению фермента, избирают и тщательно отработывают метод определения активности, под контролем которого производится выбор наиболее эффективных приемов очистки фермента, а затем и выполнение последовательных стадий его препаративного получения. Большинство ферментов отличается высокой лабильностью на последних стадиях очистки, когда удалены неактивные белки и другие стабилизирующие фермент примеси. Поэтому успех выделения часто зависит от быстроты проведения и контроля операций по очистке. При разработке способа очистки фермента наилучшим методом определения активности является тот, который не занимает много времени и достаточно прост для анализа серийных проб, хотя он может не отличаться высокой точностью. При окончательной оценке каталитических свойств чистого фермента и степени его обогащения по стадиям фракционирования должны применяться не приближенные, а наиболее точные методы определения активности. Активность фермента меняется при различных условиях реакции и зависит от температуры, рН среды, от концентраций субстратов и кофакторов. Учитывая это, при определении активности



фермента на разных стадиях очистки необходимо строго соблюдать одни и те же условия. Количество субстрата, превращаемого в условиях теста по определению активности фермента, должно быть пропорционально количеству последнего и времени инкубирования. Если в реакции такой пропорциональности нет, то активность рассчитывают по предварительно построенному калибровочному графику, отражающему зависимость скорости реакции от количества единиц фермента.

Если ход реакции нелинеен во времени (не соответствует нулевому порядку), надо определить *начальную скорость реакции* (по тангенсу угла наклона касательной к начальному отрезку кривой превращения). Это легче всего осуществимо при применении физических и физико-химических методов измерения активности, позволяющих непрерывно следить за ходом превращения во времени (спектрофотометрических, потенциометрических, полярографических методов). Как правило, точность измерения начальных скоростей реакции значительно выше, когда определяется накопление продукта превращения, а не убыль исходного субстрата. Для измерения скорости ферментативной реакции необходимо выбрать буфер, который не тормозит исследуемую активность и обеспечивает поддержание величины рН раствора, близкой к оптимуму для данного фермента. Реакцию проводят при температуре, лежащей в большинстве случаев в пределах 25–40 °С. При исследовании ферментов, требующих присутствия кофакторов, концентрация которых может снижаться по мере разбавления или очистки фермента, в реакционную смесь добавляют недостающие кофакторы, например, соли магния или других металлов, АТФ, НАДФ, флавинадениндинуклеотид, пиридоксальфосфат, глутатион и т. п. Кроме того, в состав опытных смесей для определения активности ферментов нередко вводят стабилизаторы. Во многих случаях внесение добавок предотвращает денатурацию ферментного белка. Присутствие в реакционной смеси аскорбиновой кислоты, тиолов и других восстановителей защищает фермент от окисления, а добавление цистеина, глутатиона, ЭДТА и аналогичных комплексообразователей препятствует отравлению фермента следами металлов. Стабилизирующее действие может оказать добавление специфического субстрата фермента или участвующего в его действии кофактора.

## Спектрофотометрические методы

Для определения активности ферментов широко применяются спектрофотометрические методы. Эти методы основаны на поглощении света в определенных участках спектра многими соединениями, являющимися активными группами ферментов, субстратами или продуктами реакции. Спектры этих соединений могут иметь максимумы поглощения при определенной длине волны как в ультрафиолетовой, так и в видимой области. Положение максимума поглощения определяется наличием в исследуемом материале определенных групп, например, циклических или линейных систем с сопряженными двойными связями. Для измерения спектров используют специальные приборы – фотометрические абсорбциометры, спектрофотометры. Спектрофотометрический метод имеет преимущества перед другими ввиду высокой чувствительности, быстроты определения, экономии в расходовании фермента и реактивов. В некоторых случаях растворы ферментов после измерения активности этим методом могут быть использованы для дальнейшего исследования. Располагая незначительным количеством фермента, с помощью спектрофотометрического метода можно следить за течением реакции во времени. Для этой цели реакционную смесь помещают в кювету, вставленную в термостабируемый кюветодержатель. Через короткие промежутки времени после добавления к реакционной смеси фермента (или субстрата) и быстрого перемешивания измеряют поглощение при длине волны, характерной для используемого субстрата или конечного продукта, образующегося в данной реакции. С помощью спектрофотометрического метода можно измерять непосредственно концентрацию некоторых ферментов (после достаточной очистки) по величине характерных максимумов поглощения прочно связанных коферментов (простетических групп). Флавиновые ферменты, например, имеют максимум поглощения при 450 мкм, высота которого обратимо снижается при восстановлении фермента. Изучение изменения спектра используется при количественном определении ферментов, содержащих пиридоксаль-5-фосфат. Известно, что последний, связанный с различными апоферментами, показывает при определенных значениях рН ясно выраженный максимум при 410–430 мкм. Свободный пиридоксаль-5-фосфат, отделенный от апофермента, обладает при рН 7,0 максимумом при 388 мкм, положение которого смещается в зависимости от рН.

Удельную активность фермента (число единиц активности на единицу веса) можно измерять с помощью спектрофотометрического метода по изменению спектра субстрата или продукта реакции. Фумаровая кислота, например, за счет присутствия в ее молекуле двойной связи обладает сильным поглощением при 300 мкм.

Фермент фумаратгидратаза (К.Ф 4.2.1.2) катализирует взаимопревращение фумаровой и яблочной кислот, не имеющих двойной связи и максимума при 300 мкм; измерение высоты этого максимума применяется для определения удельной активности (количества) фермента.

Спектрофотометрический метод широко используют при определении многих окислительных ферментов, например, дегидрогеназ, которые действуют с участием никотинамидных коферментов, имеющих в восстановленной форме (НАД-Н<sub>2</sub>; НАДФ-Н<sub>2</sub>) максимум поглощения при 340 мкм, а также при определении цитохромов, обладающих в восстановленной форме ясно выраженными максимумами поглощения в видимой части спектра.

В тех случаях, когда действие исследуемого фермента А не сопровождается изменениями в спектре реакционной смеси, но продукт, образующийся при его действии, может служить акцептором или донатором для НАДФ-специфической дегидрогеназы Б, внесение в реакционную смесь очищенного препарата фермента Б и соответствующего кофермента позволяет применить спектрофотометрический метод для непрямого определения фермента А с использованием эмпирического калибровочного графика. Так, например, измерение активности аспарат-глутамат-трансаминазы в реакции с аспарагиновой и кетоглутаровой кислотами с помощью спектрофотометрического метода можно проводить: 1) прямым путем, измеряя поглощение образующейся в реакции щавелевоуксусной кислоты, имеющей максимум поглощения при 280 мкм; 2) непрямым путем – либо по образующейся глутаминовой кислоте, определяемой посредством добавления препарата глутаматдегидрогеназы и НАД, либо по приросту щавелевоуксусной кислоты, добавляя НАД-Н<sub>2</sub> и малатдегидрогеназу; в первом случае измеряют количество образующегося НАД-Н<sub>2</sub> (прирост поглощения при 340 мкм), во втором – скорость окисления НАД-Н<sub>2</sub> (убыль поглощения при 340 мкм) за единицу времени. Для определения ферментов могут быть использованы не только измерение поглощения света, но также измерение флуоресценции – спектрофлуорометрический метод. Спектрофлуорометриче-

ское определение активности фермента в ряде случаев по чувствительности превосходит спектрофотометрические методы на целый порядок величины. Известно, что некоторые коферменты и субстраты обладают сильной флуоресценцией. НАД и НАДФ в восстановленном состоянии имеют сильную флуоресценцию и не флуоресцируют в окисленной форме, в то время как флавиновые ферменты флуоресцируют в окисленном состоянии. Спектрофлуорометрия широко используется как для изучения кинетики и механизма действия никотинамидных и флавиновых ферментов, так и для их гистохимического определения.

### Колориметрические (фотометрические) методы

Для определения скорости многих ферментативных реакций используются различные колориметрические методы. В основе этих методов лежит измерение при помощи визуального или фотоэлектрического колориметра окрашенного продукта, образующегося при взаимодействии субстрата или продукта действия фермента со специфическими реактивами, добавляемыми обычно в фиксированную опытную пробу, взятую после остановки ферментативной реакции. Эти методы весьма разнообразны, среди них известны такие, применение которых используется широко при различных по типу ферментативных реакциях. Так, колориметрическое определение неорганического фосфата по Фиске и Суббароу применяется при исследовании активности многих ферментов, образующих или расщепляющих органические соединения фосфорной кислоты (например, АТФ-азы). При измерении активности ферментов, действующих на углеводы с образованием редуцирующих веществ, часто применяют фотометрические методы определения закиси меди, возникающей при восстановлении реактивов, содержащих окисную медь. Наиболее ценными являются те фотометрические методы, которые позволяют следить во времени за ходом ферментативной реакции без ее прекращения по изменению окраски хромогенного субстрата или добавленного индикатора. Так, нередко используют фотометрию имеющих желтую окраску моно- и динитрофенолят-ионов для измерения скорости реакций, связанных с увеличением или снижением концентрации  $H^+$ -ионов, а также с освобождением нитрофенолята при ферментативном расщеплении бесцветных сложных эфиров или гликозидов нитрофенолов соответствующими фосфатазами, эстеразами, гликозидазами и т. п.

## Манометрические методы

Манометрические методы применяются при определении активности фермента в тех случаях, когда в исследуемых реакциях один из компонентов находится в газообразном состоянии. К таким реакциям относятся главным образом те, которые связаны с процессами окисления и декарбонирования, сопровождающимися поглощением или выделением кислорода и углекислоты, а также реакции, в которых выделение или связывание газа происходит в результате взаимодействия продуктов ферментативного превращения с добавленным в систему реактивом (например, выделение  $\text{CO}_2$  из  $\text{NaHCO}_3$  при ферментативном образовании нелетучих кислот). Наблюдение за ходом реакции во времени проводят в специальных приборах – манометрических аппаратах различных конструкций. Манометрические методы при соответствующих навыках работы успешно используют для серийных определений активности ферментов.

## Другие методы

Наблюдение за кинетикой ферментативных реакций можно вести также при помощи многих других физических и физико-химических методов, позволяющих следить за изменениями соответствующих параметров, идущими параллельно превращению субстрата. Сюда относится обширный ряд методов, включающих поляризиметрию, вискозиметрию, потенцио- и кондуктометрические измерения и т.п.

Серийные определения активности ферментов по убыли субстрата или появлению новых продуктов можно выполнять, пользуясь методами хроматографии и электрофореза на бумаге. Эти методы высокочувствительны и специфичны, что делает их во многих случаях незаменимыми; они позволяют значительно сократить расход фермента на измерение активности. Однако при наблюдении за ходом очистки ферментов эти методы не всегда применимы ввиду продолжительности разделения веществ в процессе хроматографии (и электрофореза) и их последующего количественного определения.

## Единицы ферментов

Обычно за относительную меру количества фермента принимается то количество его, выраженное в условных единицах, которому

соответствует скорость ферментативной реакции при заданных условиях определения активности. При определении степени очистки фермента необходимо рассчитать число единиц активности на единицу веса сухого препарата или содержащегося в нем белка (удельная активность фермента). Когда фермент получен в чистом состоянии и определена его молекулярная активность, измерение удельной активности менее очищенных препаратов позволяет рассчитать абсолютное содержание фермента в исследуемом материале.

За единицу (Е) любого фермента принимается то количество его, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту при оптимальных условиях. Если в молекуле субстрата – белка, полисахарида и т. п. – фермент атакует более одной связи, то вместо «микромоль субстрата» следует указать «микроэквивалент затронутых реакцией групп». Скорость реакции рекомендуется измерять при температуре 30°C; прочие условия (рН, концентрация субстратов и т. п.) должны быть по возможности оптимальными; активность фермента следует оценивать по начальной скорости реакции.

*Удельная активность* ферментного препарата выражается числом единиц на 1 мг белка; *концентрация* фермента в растворе – числом единиц на 1 мл. *Молекулярной активностью* называется число ферментных единиц в 1 мкм чистого фермента (равное числу молекул субстрата, превращаемых в 1 мин одной молекулой фермента). Когда измерению доступна абсолютная концентрация простетической группы или каталитически активного центра, то возможно рассчитать в тех же величинах *активность каталитического центра*, т. е. число молекул субстрата, превращаемых в 1 мин одним каталитическим центром.

#### Определение белка и учет результатов в опытах по выделению ферментов

Наращение удельной активности, выражающейся числом единиц фермента в 1 мг белка, свидетельствует о повышении степени чистоты фермента при его выделении. Ввиду этого при препаративном выделении фермента важно не только избрать быстрый метод определения его активности, но также подобрать подходящий метод определения белка. В настоящее время для этой цели используют несколько химических и физических методов. В основу ряда фотометрических методов положено фиолетовое окрашивание, развивающее-

ся в присутствии белка и щелочного раствора сернокислой меди (биуретовая реакция); оно обусловлено наличием пептидных связей в белках. Эта реакция свойственна всем белкам; однако чувствительность ее недостаточна; для обнаружения белка необходимо иметь раствор, содержащий 100–500 мкг белка в 1 мл. Развитие синего окрашивания в присутствии белка и реактива Фолина происходит при взаимодействии последнего с ароматическими аминокислотами, имеющимися в белке. Эта реакция использована для определения белка в методе Фолина-Чокалтеу. Поскольку содержание ароматических аминокислот в различных белках неодинаково, реакция не дает однозначной меры количества белка. По той же причине затруднительна количественная трактовка данных спектрофотометрического определения белка, основанного на свойстве ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) поглощать ультрафиолетовый свет при длине волны 280 мкм. Обычно этот метод применяют для быстрых ориентировочных определений, например, для регистрации концентраций белка во фракциях, выходящих из колонок при разделении ферментов методами ионообменной хроматографии и электрофореза. Турбидиметрические методы, основанные на определении мутности растворов, появляющейся при осаждении белков трихлоруксусной или сульфосалициловой кислотами, не являются точными, поскольку эти кислоты не осаждают полностью некоторые белки даже при прогревании, а также вследствие неравномерности флокуляции осадков. Наиболее чувствительным, специфичным и удобным для быстрого определения белка является фотометрический метод Лоури, сочетающий биуретовую реакцию с реакцией Фолина. После определения числа единиц фермента и содержания белка в препаратах на разных ступенях очистки полученные результаты для удобства представляют в общей таблице, содержащей несколько граф, в которых указываются последовательные операции обработки, количество белка в полученных фракциях, их общая активность, степень очистки или удельная активность и процент выхода активности. Данные последней графы вычисляются обычно, исходя из общей активности исходного раствора, принимаемой за 100.

Для получения максимально очищенного препарата фермента используют 8–10 различных операций. При этом удельная активность фермента может быть повышена в сотни и тысячи раз при потере общей активности, достигающей в некоторых случаях до 80–90 %. Если значительная потеря активности наблюдается уже на первых стадиях

очистки, то определяют, не происходит ли при выделении фермента потери необходимых кофакторов; в таком случае дальнейшую очистку фермента (или измерение его активности) проводят с их добавлением.

### ***3.3.3. Препаративное выделение и очистка ферментов***

В организме ферменты находятся в виде смесей и комплексов с разнообразными белками и другими веществами. Сопутствующие белки, не обладая ферментативной активностью, могут, однако, оказывать на нее косвенное влияние путем воздействия на фермент, субстрат или продукты реакции. Действие различных ферментов в биологических системах часто взаимосвязано. Выделение индивидуального белка из ткани представляет трудную задачу, поскольку данный белок, присутствуя в незначительных количествах, находится в сложной смеси белков, сходных по физико-химическому поведению. Методы выделения белков разрабатываются на основании предварительного изучения их физико-химических свойств. Отдельные свойства у некоторых белков могут быть очень близки, и это обстоятельство затрудняет выделение индивидуального белка из смеси; удачное сочетание различных подходов и приемов на пути выделения индивидуального белка часто достигается эмпирически. Как известно, ферменты принадлежат к белкам, поэтому трудности, встречающиеся при выделении белков, относятся также к ферментам. Ферменты, однако, выгодно отличаются от других белков в процессе выделения, поскольку они обладают специфической «меткой», а именно способностью катализировать определенные реакции. Это свойство дает возможность обнаружить фермент даже в том случае, когда содержание его в материале ничтожно.

Особое значение имеет надежное определение активности фермента в процессе его очистки и контроля эффективности применяемых для этой цели методов. Большие результаты достигаются при использовании таких эффективных методов, как электрофорез и ионообменная хроматография. При сочетании этих методов с методами адсорбции и дробного высаливания белков значительно возрастают возможности препаративного получения чистых ферментов.

На первых этапах выделения и очистки внутриклеточных и внеклеточных ферментов наблюдается существенная разница. Отделение биомассы микроорганизмов от внеклеточных ферментов достигает-



ся сравнительно легко центрифугированием или даже просто фильтрацией (для грибов), в результате получают фильтраты культуральных жидкостей с разными по химическому составу смесями низкомолекулярных и высокомолекулярных соединений. Фильтрат, обычно содержащий более 80 % целевой активности фермента, представляет собой раствор, готовый для дальнейших технологических манипуляций. В случае внутриклеточных ферментов культуральная жидкость точно так же отделяется центрифугированием (или фильтрацией) и промывается дистиллированной водой или слабым буфером для удаления сорбированных на биомассе компонентов. Для разрушения структуры клеток и извлечения внутриклеточных ферментов применяют разные методы: механические (перемалывание шариками, растирание в кварцевом песке), физические (ультразвук, гидравлический сдвиг, замораживание и оттаивание) и др. Экстракцию проводят в слабых буферных системах со значением рН, соответствующим оптимуму выделяемого фермента. Разрушенные части клеток удаляют центрифугированием. Нуклеиновые кислоты гидролизуют ферментами или осаждают высокомолекулярными катионами. Эта операция особенно необходима в случае экстрактов из бактерий или дрожжей, содержащих нуклеиновые кислоты в больших количествах (8–12 % от веса биомассы).

Таким образом получают фильтрат глубинной культуры в случае внеклеточных ферментов и экстракт внутриклеточных ферментов. Эти растворы отличаются между собой тем, что фильтрат внеклеточных ферментов обычно содержит до 15–20 различных белков, в то время как белковый спектр клеточного экстракта значительно шире.

В большинстве случаев прозрачный раствор фермента концентрируют выпариванием под вакуумом или ультрафильтрацией. Метод позволяет концентрировать ферментные растворы в 5–15 раз.

Концентрированный раствор фермента очищается от примесей фильтрованием через асбестовые или целлюлозные фильтры. К жидким концентратам фермента добавляют стабилизаторы (хлорид натрия, бензоаты, сорбинаты, реже ионы металлов) и при необходимости разбавляют водой до нужной концентрации.

Для получения сухих ферментных препаратов белки осаждают органическими растворителями, такими как этиловый спирт и изопропиловый спирт, ацетон (2–4 объема на объем концентрата фермента), или неорганическими солями, сернокислым аммонием или

сульфатом натрия и высушивают в условиях вакуума. Далее сухие препараты растирают в порошок, смешивают с наполнителем (крахмал, декстрины, хлорид натрия, ксилоза или какой-либо инертный наполнитель) и стандартизуют. Часто ферментные концентраты (при наличии сухих веществ более 15 %) сушат на распылительных сушилках.

В тех случаях, когда требуется получение высокоочищенных ферментов, используют разнообразные хроматографические методы, например, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Ферменты, выделяемые из растений и животных, а также из микроорганизмов, содержащихся в пище, принято считать безвредными. Для других ферментных препаратов (в основном из микроорганизмов) должна быть проведена проверка на токсичность, обусловленную возможным присутствием микотоксинов, и аллергические реакции на белки, присутствующие в препаратах.

### Солюбилизация фермента

Ферменты, как правило, относятся к типичным глобулярным белкам; многие из них имеют относительно небольшой молекулярный вес ( $< 300\,000$ ). Эти белки, подобно обычным глобулинам и альбуминам, легко растворяются в разбавленных солевых растворах при значениях pH, несколько отличающихся от их изоэлектрической точки. Наряду с ферментами, находящимися в цитоплазме в растворенном состоянии, значительные количества разных ферментов содержатся в структурных образованиях клетки (в ее оболочке, ядре, митохондриях, микросомах и других органоидах) в нерастворимой, более или менее прочно связанной форме.

В органоидах клетки трудно извлекаемые ферменты находятся частью в растворе, частью в виде комплексов с нуклеиновыми кислотами, полисахаридами, липидами, а также с другими белками. Особенно прочные нерастворимые комплексы образуются между ферментами и имеющимися в клеточных структурах белками, если на поверхности тех и других имеются большие скопления неполярных групп, между которыми возникают сильные гидрофобные взаимодействия. Такие комплексы могут быть разобщены и переведены в раствор только при помощи высокоактивных детергентов. Для выделения структурно связанных ферментов необходимо либо извлечь

из клеток комплексы фермента и затем в процессе очистки разрушить их, либо разрушить комплекс в клетке и перевести в раствор один фермент. Если разрушение клеток и извлечение свободных и связанных ферментов может быть достигнуто механическими приемами, то освобождение ферментов из их комплексов производится главным образом путем специальных химических воздействий.

Из растительных клеток большинство ферментов извлекают путем экстракции – настаивания размельченной ткани с водой, буферами или растворами нейтральных солей (NaCl и др.). Обычно используют 2–5 объемов растворителя. Экстракцию проводят либо продолжительное время (до 24 ч) при 0 °С, либо при 30–40 °С в течение 1–3 ч. В последнем случае происходит некоторый автолиз ткани; рН растворителя выбирают в зависимости от стабильности и растворимости фермента. В некоторых случаях проводят более энергичное предварительное разрушение клеток, растирая ткань в фарфоровой ступке с кварцевым песком (или толченым стеклом) или же гомогенизируя в специальных приборах – гомогенизаторах различного типа. Клетки и клеточные структуры можно разрушать также путем повторного замораживания и оттаивания. При этом внутри клеток образуются кристаллы льда, вызывающие плазмолиз и разрушение мембран. В некоторых случаях для разрушения клеток применяют действие высокочастотных звуковых и ультразвуковых колебаний, обработку органическими растворителями: бутиловым спиртом, ацетоном и др. При обработке ткани ацетоном (или спиртом) при низкой температуре происходит обезвоживание, вызывающее разрушение клеток. Полученные сухие ацетонированные препараты хранятся в течение продолжительного времени без потери активности и служат в дальнейшем хорошим источником для получения и очистки многих ферментов. Для перевода ферментов в раствор используют ферментативные методы – автолиз и лизис при помощи добавленных кристаллических или очищенных препаратов различных ферментов (протеиназ, лецитиназ, лизоцима и др.). Эти приемы используют при работе с дрожжами и бактериями, но широкого применения при выделении ферментов из растительных объектов они не получили вследствие «загрязнения» раствора фермента побочными веществами, образующимися при протеолизе, а также дополнительного внесения постороннего белка. Для экстрагирования ферментов применяют в некоторых случаях разбавленные растворы субстратов, оказывающие на активность избирательное стабилизирующее действие. Решение о вы-

боре того или иного метода освобождения и экстракции фермента из ткани основывается на данных определения его активности. Если для исследуемого фермента правильно подобрать растворитель (в отношении рН, ионной силы, солевого состава) и установить оптимальные сроки и температуру экстракции, то иногда удается получить раствор, обогащенный ферментом и содержащий относительно небольшое количество примесей.

Многие ферменты микросом и митохондрий трудно поддаются извлечению вследствие их вхождения в нерастворимые липопротеидные комплексы. Переведение таких ферментов в раствор осуществляют путем извлечения липидов бутиловым спиртом. Диссоциация липопротеидов в присутствии бутанола достигается более быстро в кислой зоне (рН 3–6) или в щелочной зоне (рН 8), чем при нейтральном значении рН. Для этой цели при тщательном охлаждении медленно добавляют бутанол (до 3–6% по объему) к раствору фермента, содержащему небольшие концентрации солей. При этом фермент остается в водном слое, липиды переходят в бутанол, а на границе водной и бутаноловой фаз выпадают денатурированные белки. Обработку нерастворимых ферментных комплексов бутанолом можно проводить не только в водных вытяжках, но и в суспензиях предварительно выделенных митохондрий и ацетонированных препаратов. При помощи этого метода некоторые ферменты, считавшиеся ранее нерастворимыми (тканевые протеиназы, эстеразы, щелочная фосфатаза и др.), были переведены в раствор и значительно очищены. Однако метод обработки бутиловым спиртом не применим для многих ферментов ввиду значительного инактивирования их в присутствии бутанола.

### Методы фракционирования

На первых стадиях выделения ферментов необходимо освободиться от большой массы неактивных белков, находящихся в растворе. Большинство применяемых для этой цели методов основано на избирательной денатурации таких белков. Часто применяют тепловую денатурацию – прогревание экстрактов при 50–70 °С в течение определенного времени. Некоторые ферменты довольно устойчивы к такой обработке. Рибонуклеаза, например, выдерживает прогревание до 90 °С без потери активности. Для отделения инертных белков используют также их кислотную денатурацию путем доведения раство-

ра фермента до  $\text{pH} = 5,0$  или ниже и выдерживания его при охлаждении в течение 10–15 мин. Выпавший осадок белков отделяют центрифугированием или фильтрованием. В некоторых случаях хорошие результаты получают при встряхивании на холоде раствора фермента с хлороформом или смесью хлороформа и спирта. После центрифугирования полученной смеси образуются три слоя: нижний хлороформный, пограничный, где находятся денатурированные белки, и верхний водный, который содержит фермент; его отбирают и используют для дальнейшей очистки. После того как фермент переведен в раствор и частично освобожден от сопутствующих белков, необходимо путем дробного осаждения, в основе которого лежит различная растворимость белков, выделить фракцию, обладающую наибольшей ферментативной активностью. Большую часть препаратов чистых и кристаллических ферментов получают путем солевого фракционирования. Обычно для этой цели используют сернокислый аммоний ввиду его хорошей растворимости, мало изменяющейся при понижении температуры. При насыщении раствора сульфатом аммония (70 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  на 100 мл раствора) практически любой белок выпадает в виде осадка. Степень насыщения раствора, при которой соль осаждает данный фермент, устанавливают опытным путем, определяя после каждой операции удельную активность фермента в растворе. При добавлении твердой соли или концентрированного раствора ее, особенно в случае применения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , поддерживают постоянную (обычно низкую) температуру и  $\text{pH}$ , во избежание возможного инактивирования фермента. После добавления соли центрифугирование раствора проводят не сразу, а через 15–20 мин, а иногда и дольше, для более четкого разделения фракций белка. Если выпавший осадок белка отстаивается быстро, то для ускорения работы верхний слой жидкости декантируют, а остальную часть центрифугируют или фильтруют; фермент, отделенный в виде осадка, растворяют в буфере. В том случае, когда в осадке активности нет, для лучшего и быстрого отделения выпавшего белка проводят фильтрование через слой бумажной мязки, кизельгура или целита. При осаждении ферментов сульфатом аммония часто выражают концентрацию последнего десятичной дробью, принимая полное насыщение за 1,00. В некоторых случаях из раствора выделяют весь белок при полном насыщении сернокислым аммонием и затем последовательно извлекают белки из осадка растворами сернокислого аммония с постепенно снижающейся концентрацией. При этом получают растворимые фракции, обога-

щенные белком-ферментом. Для дробного осаждения белков и очистки ферментов нередко используют некоторые органические растворители – ацетон, этиловый спирт, а также метиловый спирт и диоксан. Большинство ферментов при комнатной температуре и при наличии в растворе высоких концентраций солей легко денатурируется в присутствии органических растворителей. Поэтому все работы по фракционированию органическими растворителями необходимо проводить при охлаждении до температуры, близкой к точке замерзания смеси, с буферами низкой ионной силы при рН 6,5.

При осаждении фермента органическими растворителями определение активности можно проводить только после отделения выпавшего белка, его растворения и удаления остатков растворителя, поскольку присутствие спирта, ацетона и других растворителей в исследуемом растворе мешает определению активности большинства ферментов.

### Методы избирательной адсорбции

Различные методы избирательной адсорбции белков являются наиболее перспективными способами очистки ферментов. Впервые Вильштеттером для выделения многих ферментов был применен метод адсорбции на гидроокиси алюминия. Вильштеттер не ограничился эмпирическим использованием этого метода, а детально изучил его количественную сторону – установление равновесия между ферментом и адсорбирующим веществом, условия экстрагирования фермента из адсорбата, кинетику этих процессов. Таким путем удалось получить весьма значительное повышение чистоты ряда ферментов.

В препаративной энзимологии еще недавно применяли в качестве адсорбентов лишь каолин, трифосфат кальция и гидроокись алюминия. Адсорбционные свойства этих веществ определяются большой поверхностью их частиц, обладающих к тому же ионообменными свойствами. Отдельные ферменты сильно различаются по своему отношению к адсорбентам и условиям элюирования с адсорбентом. С упомянутыми адсорбентами адсорбирование ферментов проводили большей частью «в объеме», добавляя к раствору фермента определенное количество адсорбента. При дробной адсорбции адсорбент добавляют повторно маленькими порциями и каждый раз после отделения адсорбента центрифугированием определяют в растворе удельную активность фермента. Разработка методов очистки

фермента посредством адсорбции должна основываться на большом количестве ориентировочных опытов, проведенных при различных условиях.

Избирательную адсорбцию ферментов можно проводить двумя путями. Если при добавлении адсорбента к раствору фермента последний остается в растворе, а адсорбируются неактивные белки, то говорят о негативной адсорбции. При положительной адсорбции с адсорбентом связывается часть белка, включающая фермент, а неактивные белки остаются в растворе. Применяемые гели гидроокиси алюминия и трифосфата кальция обычно приготавливаются самим исследователем. Для улучшения адсорбирующих свойств гелей необходимо выдерживать их в течение нескольких месяцев. При этом меняются физические свойства адсорбентов, главным образом степень их гидратации. Без учета «возраста» и адсорбционной способности данной партии геля очень трудно воспроизвести результаты опытов по выделению ферментов, которые приводятся в литературе. Ввиду этого, условия для адсорбции исследуемого фермента должен установить сам экспериментатор, даже в том случае, если они описаны в других работах.

Для наилучшей адсорбции фермента должны соблюдаться следующие общие правила: 1) содержание белка в растворе, не превышающее 1 %; 2) отношение геля (сухой вес) к белку порядка 20 : 1; 3) низкая концентрация соли в растворе. Для негативной адсорбции используют повышенные значения рН и более высокую концентрацию солей.

Если растворы ферментов после солевого фракционирования содержат большие количества неорганических солей, то их перед адсорбцией необходимо удалить диализом. Адсорбирование ферментов лучше всего проводить при 0 °С, размешивая раствор с адсорбентом 10–15 мин для достижения равновесия. После отделения геля центрифугированием его промывают один-два раза водой или буфером (рН 5,0–6,0), затем приступают к элюированию фермента. С этой целью осадок (адсорбат) размешивают с растворами, содержащими относительно высокие концентрации поливалентных анионов при высоких значениях рН (например, фосфатными, боратными буферами). В этих условиях сродство фермента к адсорбенту снижается, и он переходит в раствор. Элюирование обычно проводится более медленно, чем адсорбция. Для этого адсорбент, связанный с ферментом, настаивают повторно по 10–15 мин с несколькими порциями элюирующего

буферного раствора с последующим центрифугированием. Объем элюирующей жидкости должен быть небольшим; лучшие результаты получаются при неоднократном элюировании маленькими объемами растворителя. Если белок прочно связан с адсорбентом, его можно элюировать фосфатным буфером, содержащим 10% сульфата аммония. В некоторых случаях фермент может быть избирательно элюирован разведенным раствором субстрата (0,001 М). При этом происходит образование фермент-субстратного комплекса, и связь фермента с адсорбентом нарушается. В процессе очистки ферментов часто применяются последовательно несколько адсорбентов.

В последние годы адсорбирование на фосфате кальция проводят в колонках. Для этой цели используют разновидность геля фосфата кальция – гидроксилпатит, имеющий микрокристаллическую структуру. Для лучшего протекания жидкости через колонку ее наполняют гелем фосфата кальция, смешанным с другими, инертными веществами, например, крупным целлюлозным порошком, целитом. Можно также наполнить колонку брушитом – гелем фосфата кальция, имеющим небольшую активность, и затем в колонке перевести его в активный гидроксилпатит. На колонке белки адсорбируются обычно при рН 7,0 из фосфатного буфера 0,005 М. Для адсорбции берут около 5 мг белка на 1 мл объема колонки. Элюирование проводят фосфатными буферами более высокой концентрации (от 0,03 до 0,15 М) при том же значении рН или более высоком. По мере повышения концентрации буфера в растворе, протекающем через колонку, сродство фермента и других белков к адсорбенту постепенно снижается. Белки переходят в раствор, который вытекает из колонки и собирается при помощи автоматического коллектора отдельными фракциями. В каждой фракции определяют содержание белка и активность фермента, величины которых изображают графически.

Фракции, содержащие фермент с наибольшей удельной активностью, объединяют и используют для дальнейшей очистки.

### Ионообменная хроматография

Методы дробного осаждения ферментов из растворов солями или органическими растворителями, а также методы избирательной адсорбции на минеральных гелях являются универсальными приемами для очистки и выделения ферментов. Применение их, однако, недостаточно эффективно на последних стадиях очистки, когда в



растворе остаются различные белки, сходные по растворимости и другим физико-химическим свойствам. Поэтому используется более эффективный прием выделения чистых ферментов – ионообменная хроматография, в основе которой лежит реакция ионного обмена между белками, растворенными в воде или разбавленных буферных растворах, и различными ионообменниками. При нанесении белка на колонку, наполненную ионообменником, происходит его адсорбция путем образования множественных электростатических связей между заряженными участками на поверхности адсорбента-полиэлектролита и группами поверхности белковых молекул, несущими противоположный заряд. Прочность адсорбции каждого белка на ионообменнике определяется величиной заряда белка, которая зависит от рН раствора и солевой концентрации (буфера). При элюировании белков с ионообменника происходит разрыв связей; это достигается изменением рН протекающего раствора, а также повышением его ионной силы (увеличением концентрации буфера или добавлением нейтральных солей, например, NaCl или KCl).

Для разделения ферментов широко применяются ионообменники на целлюлозной основе. В настоящее время синтезирован ряд таких ионообменников. Аналогично ионообменным смолам получены: катиониты (с кислыми группами) – карбоксиметилцеллюлоза, фосфоцеллюлоза, сульфоэтилцеллюлоза, сульфометилцеллюлоза; аниониты (с основными группами) – диэтиламиноэтил-, триэтиламиноэтилцеллюлоза, «Эктеола». При разделении ферментов наиболее широкое применение получили карбоксиметил- и диэтиламиноэтилцеллюлоза. Все вышеупомянутые иониты представляют собой эфиры, образованные путем этерификации гидроксильных групп целлюлозы с помощью галоидзамещенных соединений (например, монохлоруксусной кислоты, диэтил-β-хлорэтиламина).

Сила адсорбции на ионообменнике определяется физико-химическими свойствами белка, характером заряженных групп в ионообменнике и условиями адсорбирования белка. Поэтому для каждого фермента нельзя заранее рекомендовать условия, необходимые для лучшего отделения его от других белков с помощью ионообменников. Эти условия в каждом случае необходимо подбирать экспериментатору. Аниониты применяются для разделения кислых белков, имеющих избыток свободных карбоксильных групп. Адсорбцию белков на таких ионитах проводят из буферных растворов с низкой ионной силой (0,005–0,01 М) при рН 7,5–8,5. На катионитах адсорбиру-

ются основные белки, имеющие избыток аминных и других основных групп. Адсорбирование на катионитах производят из разбавленных растворов при рН 4,5–6,5. Перед нанесением раствора белка на колонку из него необходимо по возможности полнее удалить неорганические соли.

Для удаления солей из растворов фермента применяют диализ, проводимый в целлофановых мешочках или гильзах, против воды или разбавленных буферных растворов. Диализ проводится обычно в течение 10–15 ч. При этом часто наблюдается снижение ферментативной активности вследствие удаления из фермента кофакторов, а также в результате частичной потери активного белка при проникновении его через целлофан или денатурации в процессе диализа. Удаление из раствора белков неорганических и других соединений, имеющих небольшой размер молекул, можно производить с помощью геля Сефадекса. Этот гель состоит из полисахаридных цепей декстрана, соединенных поперечными связями; он представляет своеобразное «молекулярное сито», величину пор которого определяет частота поперечных связей. В зависимости от этого имеется несколько образцов геля, обозначаемых как G-25, G-50, G-75, G-100 и G-200. При пропускании через наполненную гелем колонку растворов белка, содержащих соли, происходит быстрое движение вниз по колонке макромолекул белка, которые не проникают в толщу частиц геля, в то время как малые молекулы (соли и т. п.) задерживаются в частицах сефадекса и проходят через гель гораздо медленнее. Если брать для разделения объем раствора, не превышающий 1/3 объема колонки, то можно быстро обессолить раствор белка путем однократного пропускания через колонку. Белок выходит из колонки после фильтрации через сефадекс в объеме раствора, несколько большем по сравнению с тем, в котором он был при нанесении. На колонках с сефадексом G-75, G-100 и G-200 происходит также частичное разделение белков в зависимости от величины их молекул. Поэтому колонки с сефадексом G-75–G-200 могут использоваться не только для удаления из раствора кристаллоидов, но также для частичного разделения белков.

Освобождение белков с ионообменника происходит в условиях уменьшения сродства ионообменника к адсорбируемым белкам. Это достигается либо вытеснением связанного белка другими ионами, например, повышением концентрации буфера или добавленного к нему NaCl и KCl, либо изменением рН элюирующего раствора. Изменение

в растворе концентрации буфера или рН проводят или ступенчато, или плавно (градиентное элюирование). Вытекающую из колонки жидкость собирают отдельными фракциями небольших объемов (до 5 мл), в которых определяют содержание белка и активность ферментов. После элюирования целлюлозные иониты регенерируют путем промывания колонки 1%-м раствором NaOH в случае анионитов и 0,5 М раствором HCl – в случае катионитов.

Результаты, полученные при разделении смеси белков на ионообменнике, выражают графически. По оси абсцисс наносят номера фракций элюата и отмечают рН, концентрацию буфера и содержание в нем NaCl. По оси ординат откладывают концентрацию белка и каталитическую активность последовательных фракций элюата.

Фракции элюата, содержащие фермент с наибольшей удельной активностью, объединяют, обессоливают и сгущают (или высушивают) в специальных аппаратах путем удаления влаги в вакууме при низкой температуре.

Метод ионообменной хроматографии нашел широкое применение при разделении смесей белков на отдельные компоненты и при выделении индивидуальных, максимально очищенных ферментов из частично очищенных препаратов. При помощи данного метода удаётся удалить небольшие белковые примеси из электрофоретически однородных препаратов ферментов.

## Электрофорез

Электрофорез является ценным физическим методом разделения белковых смесей, а также методом характеристики чистоты белковых препаратов. Этот метод широко применяется для препаративного выделения ферментов на конечных стадиях очистки. Принцип метода состоит в следующем. Молекулы белка содержат кислые и основные ионизированные группы. Поэтому они обладают свободным электрическим зарядом; величина и знак заряда определяются количественным соотношением кислых и основных групп в белковой молекуле, что в свою очередь зависит от состава белка и рН окружающей среды. Если молекулы белка не находятся в изоэлектрической точке, где суммарный отрицательный заряд равен положительному, то они под влиянием внешнего электрического поля перемещаются к полюсу, заряд которого противоположен их заряду. Поскольку величина свободного заряда молекул различных белков неодинакова, скорость пе-

ремещения их в электрическом поле при одних и тех же условиях (рН, ионной силе и температуре) будет различна. Вследствие этого смесь белков разделяется на несколько отдельных зон или фракций, которые выделяют порознь после окончания электрофореза.

Данный принцип разделения белковых смесей положен в основу многих вариантов метода электрофореза.

Среди различных методов электрофореза при очистке и выделении ферментов нашли применение метод движущейся границы в аппарате Тизелиуса и метод зонального электрофореза на бумаге и в блоках или колонках с различными наполнителями. Первый метод применяется главным образом в целях определения изоточки, а также для проверки чистоты и гомогенности полученных ферментных препаратов. Для препаративного выделения и очистки ферментов обычно проводят зональный электрофорез в блоках и колонках, наполненных целлюлозным порошком, крахмалом, бусинками из стекла или пластмассы (полиэтилена, полиметакрилата), которые не имеют заряда и не адсорбируют на своей поверхности белки. Хорошие результаты по разделению белков получают при электрофорезе в кашицах из агарового геля или агарозы. Проведение электрофореза в вертикальных колонках значительно упрощает собирание полученных белковых фракций и дает возможность после промывания колонки соответствующим буфером использовать ее повторно.

Условия (рН и концентрация буфера, напряжение тока и продолжительность опыта), необходимые для проведения электрофореза, подбираются эмпирически. Обычно фермент вносят в колонку или блок в небольшом объеме того буферного раствора, в котором будет проводиться электрофорез. Для этого раствор фермента концентрируют до небольшого объема и диализуют против упомянутого буфера. Выбор условий электрофореза зависит от свойств исследуемого фермента. В полученных фракциях элюата определяют активность фермента и содержание белка, которые для наглядности выражают графически.

Во всех операциях по фракционированию ферментов (электрофоретических, хроматографических и др.) как водносолевые растворы, так и неподвижные твердые фазы следует тщательно освобождать от токсических для ферментов ионов металлов, окислителей и т. п. при помощи соответствующих комплексонов, тиоловых реактивов, восстановителей (ЭДТА, меркаптоэтанол, унитиол).

## Кристаллизация

Кристаллизация ферментов проводится на последней стадии очистки обычно из растворов сернокислого аммония. Некоторые кристаллические ферменты (пепсин, пиррофосфатаза и др.) были получены из растворов спирта и других органических растворителей. Для получения кристаллов к концентрированному раствору фермента медленно по каплям добавляют насыщенный раствор сернокислого аммония или спирт до начала заметного помутнения. При добавлении высоких концентраций соли фермент обычно выпадает в виде аморфного осадка. В некоторых случаях раствор фермента диализуют против насыщенного раствора сернокислого аммония до появления мути. Затем растворы оставляют стоять без помешивания в течение нескольких дней на холоде; при этом желательно внесение затравочных кристаллов фермента. Известны, однако, случаи, когда кристаллизация лучше удается при комнатной или более высокой температуре (28–30 °С). Если перед кристаллизацией раствор фермента разбавлен, его предварительно концентрируют. Выпавшие кристаллы отделяют и подвергают неоднократной перекристаллизации, каждый раз измеряя удельную активность. Перекристаллизацию повторяют до тех пор, пока удельная активность полученных препаратов не перестанет повышаться. При получении первых кристаллических ферментов полагали, что такие препараты являются чистыми ферментами, но вскоре было установлено, что степень чистоты многих кристаллизованных ферментов не превышала 50%. Однако способность фермента к кристаллизации указывает на то, что в таком виде ферменты существуют как химически однородные вещества, отделенные от различных посторонних белков. Метод кристаллизации и перекристаллизации используется при очистке ферментов как ценный прием фракционирования белков.

### Последовательность применения различных методов при очистке

При проведении очистки ферментов не имеется каких-либо заранее заданных правил по чередованию отдельных методов. Приступая к выделению нового фермента, отрабатывают экспериментально весь процесс и путем сопоставления удельной активности и выхода фермента по отдельным стадиям решают, какие операции яв-

ляются наиболее эффективными. Выбор того или иного приема для очистки определяется не только его эффективностью, но и оборудованием. При обработке больших объемов исходного экстракта начинают с отделения значительной части балластного белка путем дробного прогревания или осаждения в слабокислой среде (в изоэлектрической зоне) неактивной (или, напротив, активной) белковой фракции. При использовании дробного высаливания сернокислым аммонием или осаждения органическими растворителями на первых стадиях очистки, когда имеются большие объемы раствора, необходимо быстро отделять выпавший белок. Для этого применяют высокоскоростные центрифуги на большие объемы или скоростные сепараторы. Если таких не имеется, то прибегают к фильтрованию на холоде на нутчах, фильтр-прессах или складчатых фильтрах. Иногда начинают с негативной или позитивной адсорбции на гидроокиси алюминия или фосфате кальция. Полученные при этом осадки легко отделяются отстаиванием или центрифугированием при небольшой скорости. Затем, когда объемы растворов будут значительно меньшими, применяют фракционированное высаливание. Для удаления из раствора солей проводят диализ; в последнее время для той же цели используют колонки, наполненные гелем сефадекса, с помощью которых можно быстро и полностью удалять соли из относительно больших объемов раствора. При пропускании через сефадекс растворов ферментов в некоторых случаях происходит снижение активности вследствие отщепления кофакторов или связывания SH-групп ферментов ионами двухвалентных металлов, присутствующих в сефадексе в виде примеси.

Аналогичное действие оказывает частичное адсорбирование белков на сефадексе за счет альдегидных групп декстранового геля. Во избежание инактивирования ферментов колонку с сефадексом предварительно обрабатывают 0,5–1,0 % раствором ЭДТА и восстанавливают альдегидные группы Na-боргидридом с последующим тщательным отмыванием колонки водой. Прогревание, применяемое после частичного фракционирования, нередко дает хороший результат при осаждении неактивных белков, однако у некоторых ферментов при этом наступает значительное инактивирование, вследствие чего удельная активность фермента повышается в небольшой степени.

Если препарат фермента значительно очищен и содержит небольшие количества неактивных белков, то хорошие результаты по обогащению фермента получают методом электрофореза. Для этого

необходимо иметь фермент в небольшом объеме. Применяющиеся для сгущения белковых растворов приемы – обдувание раствора, находящегося в целлофановых мешочках, током воздуха от вентилятора, сгущение испарением в вакууме, лиофильная сушка – часто приводят к денатурации фермента, так как параллельно с концентрированием белков происходит повышение концентрации солей. Наилучшими приемами сгущения растворов белков (ферментов) являются ультрафильтрация или равноценная ему обработка раствора белка суспензией сухого декстрана сефадекса.

Метод ионообменной хроматографии на целлюлозных ионитах может применяться для препаративного выделения ферментов из сложной белковой смеси наряду с зональным электрофорезом, а также для отделения небольших белковых примесей в электрофоретически гомогенных фракциях фермента. Поэтому этот метод с использованием различных ионообменников может применяться как перед электрофорезом, так и после него. Кристаллизацию как метод фракционирования обычно применяют в конце очистки. На любой стадии очистки фермент можно выделить в сухом виде путем осаждения сульфатом аммония, ацетоном или лиофильным высушиванием. По мере очистки от сопутствующих веществ лабильность многих ферментов, однако, повышается; их высушивание, а также хранение в очень разбавленных растворах или замораживание растворов сопровождается значительным инактивированием. Активность многих ферментных препаратов в сухом состоянии сохраняется достаточно долго при хранении их при 4 °С. В некоторых случаях необходимо хранить такие препараты при температурах от -20 до -50 °С.

### Критерии чистоты ферментов

После окончания очистки фермента устанавливают, является ли выделенный белок чистым ферментом или содержит в качестве примесей неактивные белки. Для этой цели применимы несколько методов, основанных главным образом на исследовании физических свойств белков. К ним относятся ультрацентрифугирование, электрофорез и определение растворимости белка. Каждый из этих методов, взятый в отдельности, не может дать однозначный ответ о степени чистоты фермента. О гомогенности фермента обычно судят на основании сопоставления результатов, полученных несколькими методами.

Обычно считают, что нахождение одного пика белка при седиментации (осаждении) белкового раствора в аналитическом роторе ультрацентрифуги является доказательством его гомогенности. Однако известно, что константы седиментации совпадают у различных белков с одинаковым молекулярным весом и формой частиц (или при компенсации влияний размера и формы); вследствие этого несколько белков при ультрацентрифугировании могут осаждаться с одинаковой скоростью и давать общий пик. Большой разрешающей способностью обладает электрофорез (метод движущихся границ), хотя и при нем нелегко различать белки, близкие по величинам электрофоретической подвижности. Если раствор фермента при исследовании в аппарате Тизелиуса или при зональном электрофорезе в крахмальном или агаровом геле показывает один симметричный пик, то это является указанием на его гомогенность. Однако при электрофорезе трудно обнаружить примесь других белков, если содержание их мало. Дополнительным критерием чистоты фермента при зональном электрофорезе может служить определение удельной активности, удельной оптической плотности в характерных спектральных пиках, содержания специфических простетических групп в отдельных фракциях электрофоретического пика очищенного фермента.

Наиболее чувствительным способом исследования степени гомогенности ферментов (как и других белков) является сочетание электрофоретического разделения со специфическими иммунохимическими реакциями, в частности, иммуноэлектрофорез в агаре.

Надежный, но сравнительно малочувствительный способ исследования гомогенности белка состоит в определении его растворимости. Для этого берут две пробирки с одинаковым объемом растворителя (вода, буфер, солевой или водно-спиртовой раствор). В первой из них растворяют такое количество белка, избыток которого вызывает слабое помутнение раствора, а во вторую пробирку вносят в 10 раз больше белка. После центрифугирования обоих растворов определяют в них концентрацию растворенного белка. Если содержание белка в обоих растворах одинаково, то белок можно считать практически гомогенным.

Постоянство величин удельной активности фермента, определяемых при его перекристаллизации, в некоторых случаях также может указывать на чистоту препарата. Но следует помнить, что препараты высокоочищенных ферментов в большинстве случаев являются высоколабильными и при хранении в растворах при 4 °С быстро те-



ряют активность, поэтому при повторной перекристаллизации фермента нередко наблюдается падение удельной активности вследствие загрязнения кристаллов инактивированным ферментом.

### 3.3.4. Технология получения

#### Амилолитические препараты

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

**Получение препаратов амилаз из поверхностных культур.** Продуцентами  $\alpha$ -амилазы и глюкоамилазы являются микроскопические грибы *A. oryzae*, *A. awamori*, *A. niger*, *R. delemar* и др. Средой для выращивания продуцентов служат пшеничные отруби с добавлением до 25 % солодовых ростков, увлажненные водой, подкисленной 0,1 н раствором серной или соляной кислоты. Выход готовой культуры составляет обычно от 70 до 80 % массы среды.

Выращенная культура влажностью 36–50 % может быть высушена и использована как готовый препарат с индексом Пх, а также в сухом или влажном виде может быть передана на дальнейшую переработку с целью получения очищенных препаратов. Процесс очистки начинается с водной экстракции при 20–25 °С с отбором 200–220 %, средняя концентрация сухого вещества в экстрактах 11–14%. Экстракты с целью понижения уровня обсемененности микроорганизмами могут быть обработаны слабыми растворами электролитов, например, 0,8–1,0% -м  $\text{CaCl}_2$ . Далее экстракты можно сконцентрировать методом вакуум-выпаривания или ультрафильтрации. Экстракт из поверхностной культуры может быть использован для получения очищенных амилолитических препаратов путем осаждения ферментов органическими растворителями или нейтральными солями. Амилазы выпадают в осадок почти полностью (93–96%) при концентрации этанола в растворе 69–72%, ацетона 60–62 и изопропанола 54–55%.

**Получение препаратов амилаз из глубинных культур.** Продуцентами амилаз являются микроскопические грибы рода *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. usamii*, *A. batatae*), спороносные бактерии, относящиеся к группам *B. subtilis* – *mesentericus*, дрожжеподобные организмы родов *Endomycopsis*, *Endomyces* и многие другие микроорганизмы. Вы-

бор сред для каждого продуцента проводится опытным путем с учетом физиологических потребностей продуцента и условий производства. Например, при изучении факторов, влияющих на биосинтез ферментов, было показано, что культура *B. subtilis* 103 весьма чувствительна к источнику азота в среде. Наилучшие результаты наблюдаются в присутствии двузамещенного цитрата аммония – 82,8 ед. АС/мл и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 86,4 ед. АС/мл. Органические источники азота менее эффективны, чем неорганические. Дополнительное введение азота в виде экстрактов из растительного и микробного материала к  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  позволяет на 30–40 % повысить продуцирующую способность бактерий и достичь активности 110–114 ед. АС/мл.

Главным источником углерода в среде для всех продуцентов  $\alpha$ -амилазы является картофельный или кукурузный крахмал, который вводится в среду в клейстеризованном состоянии. Вместо крахмала может применяться крахмалсодержащее сырье, например, ячменная или кукурузная мука. Все эти компоненты используются в нативном виде или в виде различных гидролизатов, причем биосинтез  $\alpha$ -амилазы протекает более интенсивно, если крахмал частично гидролизовать в процессе приготовления питательной среды, не допуская при этом накопления в среде низкомолекулярных дисахаров (мальтозы) и особенно глюкозы. Поэтому, если состав среды предусматривает высокое содержание крахмала, его вводят порциями по мере потребления культурой микроорганизма, что позволяет избежать явления катаболитной репрессии синтеза  $\alpha$ - или глюкоамилазы.

При культивировании гриба *A. oryzae* 3-9-15 – продуцента  $\alpha$ -амилазы можно использовать среду следующего состава (в %): кукурузная мука – 6;  $\text{NaNO}_3$  – 0,9;  $\text{MgSO}_4$  – 0,005 с добавлением 10 % вытяжки из солодовых ростков или среду, состоящую (в %): из кукурузной муки – 3,9, пшеничных отрубей – 1,56, рисовых отрубей – 1,56,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$  – 0,28 и  $\text{NaNO}_3$  – 0,28. Для *A. oryzae*, выращиваемого для использования в пивоварении, фильтрат пивной дробины обогащают (в %): молотым фуражным ячменем – 1,5, солодовыми ростками – 1 и солями  $\text{NaNO}_3$  – 0,9,  $\text{KCl}$  – 0,1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001, pH среды 5,6–5,7. *B. Subtilis* выращивают на водном экстракте из отрубей при их соотношении 1 : 5 или на среде, состоящей из 2 % крахмала, 0,067 М  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,02 М  $\text{KCl}$ , 0,002 М  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,001 М  $\text{CaCl}_2$  и 5 %-го щелочного экстракта из соевых бобов, pH среды 7,2.

Для увеличения секреции  $\alpha$ -амилазы бактериальными культурами направленно создают условия для интенсификации в процессе роста культуры автолитических процессов под действием некоторых компонентов среды или продуктов метаболизма культуры, например, путем введения на определенной стадии роста триптического гидролизата казеина, кукурузного экстракта. С ростом автолитических процессов под действием вводимых добавок происходит увеличение в 1,5–2 раза биосинтетической способности клеток в отношении  $\alpha$ -амилазы.

Бактериальные культуры, например, вид *B. subtilis*, подвержены естественной изменчивости. В процессе расщепления культуры появляются морфологические варианты с пониженной способностью к синтезу ферментов, что приводит к уменьшению выхода и снижению качества препаратов. Такие изменения происходят не только по годам, но и месяцам, что указывает на необходимость постоянного контроля и отбора вариантов с высокой амилолитической активностью.

В глубинных условиях биосинтез глюкоамилазы осуществляется микроскопическими грибами, относящимися к родам *Aspergillus* (*A. niger*, *A. awamori*, *A. usamii*) и *Rhizopus* (*R. delemar*), и дрожжеподобными микроорганизмами, такими как *Endomycopsis fibuligera*, *Endomyces sp.* В средах как обязательный компонент среды используется крахмал в дозировках от 0,7 до 17 % в зависимости от продуцента. Для дрожжей процесс биосинтеза можно оптимизировать, введя в состав среды олеиновую кислоту в качестве дополнительного источника азота и фактора, способствующего автолизу культуры и повышению секреции глюкоамилазы во внешнюю среду. При выращивании культуры *Endomycopsis sp.* добавление поверхностно-активных веществ в среду заметно повышает продуцирующую способность дрожжей к биосинтезу амилаз. Это связано с увеличением проницаемости клеточных мембран и интенсификацией автолитических процессов в культуре. Положительный эффект оказывает введение в состав среды солей  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$  или  $\text{KNO}_3$ . Но наилучшие результаты получаются при сочетании минерального и органического азота, например, при введении дрожжевого автолизата, кукурузного экстракта или других природных субстратов, содержащих значительные количества аспарагиновой и глютаминовой кислот. Для этого продуцента существуют не только периодические, но и непрерывные режимы культивирования. В заводских условиях биосинтеза после 30–32 ч роста *E. sp.* 20-9 в культуральной жидкости накапливается до

40–50 ед. ГлА/мл. Использование сред с высоким содержанием крахмала и штаммов, у которых синтез глюкоамилазы не контролируется катаболитной репрессией, позволяет получать культуральную жидкость с активностью по глюкоамилазе свыше 200 ед/мл.

Полученная культуральная жидкость используется без дальнейшей обработки для осахаривания крахмалистого сырья в спиртовом производстве (например, *A. awamori*) или в виде фильтрата для осахаривания высококонцентрированных крахмальных клейстеров в крахмало-паточной промышленности. Непосредственное использование культуральной жидкости в производстве требует ее немедленной реализации, так как она не может храниться из-за нестабильности растворов и инактивации ферментов.

Для получения ферментных препаратов с индексом ГЗх фильтрат глубинной культуры непосредственно не используется, так как концентрация сухого вещества в культуральной жидкости, как правило, низкая. Поэтому перед сушкой методом распыления фильтрат культуральной жидкости или культура вместе с биомассой концентрируются, затем вносятся наполнитель, стабилизатор и после этого смесь направляется на сушку. При сушке и концентрировании очень большое значение имеет правильный выбор стабилизатора фермента и температурного режима процесса. Присутствие стабилизаторов позволяет значительно снизить потери ферментативной активности в растворах. Введение этих же стабилизаторов в присутствии наполнителей – перлита и коалина – в процессе распылительной сушки позволяет практически полностью предотвратить тепловую инактивацию ферментов. Определение оптимальной концентрации сухого вещества в высушиваемом растворе и рН, при которой не происходит инактивации фермента, проводят для каждого продуцента с учетом состава среды и наполнителя.

Для получения очищенных ферментных препаратов из глубинных культур используют традиционные методы концентрирования (ультрафильтрация, вакуум-выпаривание) и методы выделения (органическими растворителями, солями, хроматографией), что позволяет освободиться от сопутствующей гликозилтрансферазы и амилазы.

Предельно простой способ позволяет выделить  $\beta$ -амилазу практически в две стадии путем осаждения этиловым спиртом и методом сорбции на крахмале с последующей десорбцией с крахмала. Сорбция проводится путем пропускания ферментного раствора через колонку с крахмалом. Для избежания слеживания крахмала его смеси-

вают с наполнителем – фильтроперлитом – в соотношении 5:1. Сорбция бактериальной  $\beta$ -амилазы проводится при 2 °С, и даже при значительном повышении ионной силы элюирующего раствора не происходит освобождение фермента. При 20 °С фермент без изменения условий элюируется с крахмала. Освобождение фермента происходит в результате взаимодействия  $\beta$ -амилазы с образующимся при этой температуре продуктом реакции – мальтозой. Чем выше температура, тем быстрее протекает процесс. Освобождение  $\beta$ -амилазы от протеазы, которая сорбируется на самом ферменте, происходит при использовании специфической сорбции – осаждении комплекса  $\beta$ -амилаза гликоген этанолом.

### Пектолитические препараты

В промышленном масштабе пектолитические препараты получают в основном из *A. foetidus* и *A. awamori* при поверхностном способе культивирования и из *A. awamori* и *A. niger* при глубинном.

#### **Получение препаратов пектиназ из поверхностных культур.**

При поверхностном способе культивирования используют свекловичный или подсолнечный пектин. В среду вводят до 66–70 % свекловичного жома, содержащего до 4–4,5 % водорастворимого пектина и 16–18 % протопектина. Остальную часть среды (35–30%) составляют пшеничные отруби. Такая среда содержит достаточно пектиновых веществ и других источников углерода, но бедна азотистыми веществами. Обогащение среды азотом производят, добавляя около 1 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  либо  $\text{NH}_4\text{Cl}$  или около 2%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Обогащение среды аммиачным азотом и установление необходимого соотношения С : N позволяет повысить активность с 1260 до 1900–2100 ед/г сухой поверхностной культуры *A. awamori* 16. Влажность среды 55–60%, температура культивирования – 30 °С в течение первых 40 ч с последующим понижением до 24 °С. Общая длительность культивирования 48–52 ч.

При засеве среды мицелиальной массой *A. awamori* 16 культура развивается медленно, поэтому лучше использовать споры в посевной материал в количестве 0,05 % к массе сухой производственной среды, внося его в виде гомогенизированной суспензии. Очищенные пектолитические препараты получают из водных экстрактов путем осаждения этанолом (73,5–75 % об.), изопропанолом (55–57 % об.) или высаливанием сульфатом аммония (в количестве 0,8 от полного

насыщения). При осаждении этанолом в препарат переходит 89–90 % ферментов, а при высаливании – всего 75–76 %. Пектиназы чувствительны к температуре, поэтому она не должна превышать 2–5 °С при максимальном контакте с растворителем. Получаемые методом осаждения пектолитические препараты обычно содержат комплекс ферментов, обладающих различными оптимальными рН и температурами. Для гриба *A. awamori* 16 максимальная активность проявляется при рН: по экзо-ПГ – 3,5, по эндо-ПМГ – 4,2, а по ПЭ – только при 5,0. Оптимальные температуры отличаются несколько меньше и лежат в интервале от 45 до 52°С.

**Получение препаратов из глубинных аэробных культур.** При глубинном культивировании чаще всего используются микроорганизмы, относящиеся к роду *Aspergillus*, особенно *A. niger*, *A. alliacens*, *A. awamori* и *A. foetidus*.

У большинства продуцентов биосинтез пектолитических ферментов носит индуцибельный характер и зависит от уровня в среде пектиновых веществ, степени их полимеризации и наличия других источников легкометаболизируемого углерода. Однако ряд микроорганизмов образует некоторые ферменты пектиназного комплекса и при отсутствии в среде индуктора. Например, *A. terreus* образует пектинэстеразу на любых средах, ряд штаммов *B. subtilis* конститутивно синтезируют полигалактуронатлиазу. Комплекс ферментов, синтезируемый микробами, различен, он зависит от вида продуцента, состава среды и условий культивирования. Например, при культивировании штаммов *A. awamori* 16 и *A. foetidus* 7 использование экстракта из солодовых ростков (10 %) и кукурузного экстракта (0,5–1,0 %) позволяет увеличить общую пектолитическую активность культуральной жидкости на 50–70 % по сравнению с полученной на среде только с минеральным источником азота. Комплексы ферментов препаратов из культур *A. awamori* 16 и *A. foetidus* 7, выращенных на близких по составу средах, отличаются друг от друга, как по составу, так и по соотношению отдельных компонентов. Очень важен также состав пектиновых веществ, вносимых в среду, и даже степень их метоксилирования. Так, при культивировании гриба *Rhizopus arrhizus* на свекловичном пектине различной степени метоксилирования биосинтез полигалактуроназ уменьшался с увеличением степени метоксилирования. Наивысший синтез отмечался на пектовой кислоте. Присутствие в среде свекловичного пектина в некоторой степени подавляет образование пектинэстеразы, но стимулирует биосинтез пектинтран-

сэлиминазы при содержании его 0,2 %, а полигалактуроназ – только при увеличении его концентрации в 5 раз (до 1–12 %).

Если концентрация свекловичного пектина мало влияет на биосинтез пектинэстеразы, то степень метоксилирования субстрата и его природа в этом случае имеют решающее значение. Яблочный пектин в концентрации 0,9–1,1 % стимулирует образование культурой пектинэстеразы. Для успешного образования пектолитических ферментов в составе среды необходимо присутствие тех или иных пектиновых веществ или продуктов их частичного гидролиза. Они могут быть введены в виде различных отваров пектинсодержащих растительных масс или же добавлены в среду непосредственно. Источниками пектиновых веществ могут быть свекловичный жом, пектин различного происхождения, яблочные выжимки, выжимки плодов, винограда, различных овощей, стебли хлопчатника и другие отходы переработки растительного сырья. Кроме пектиновых веществ, в составе среды, особенно на первой стадии роста культуры, желательно наличие в среде небольшого количества легкометаболизируемых углеводов, вносимых, например, с солодовыми ростками или гидролизатами пектиновых веществ. Они необходимы для того, чтобы начался активный рост культуры, и только после утилизации их в первые 10–20 ч начинается активный синтез пектинолитических ферментов. В то же время глюкоза вызывает почти полное подавление синтеза фермента по механизму катаболитной репрессии на фоне интенсивного роста биомассы продуцента.

В составы сред вводят соли  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  или  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в количестве 0,2 % по азоту.

Повышенное содержание в среде фосфора (от 0,2 до 0,4%) способствует возрастанию синтеза пектолитических ферментов и их секреции в культуральную жидкость в условиях глубинного выращивания. Источником фосфора обычно используют  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  или  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , иногда рекомендуется смесь этих солей, так как это способствует более интенсивному синтезу пектиназ.

Оказывает влияние на биосинтез пектолитических ферментов и минеральный состав среды. Если в составе среды есть природные источники пектина, такие как свекловичный жом, выжимки плодов и овощей, экстракты из дрожжей, солодовых ростков и т. д., то такие среды практически содержат все необходимые микроорганизму микроэлементы. Некоторый недостаток испытывают микроорганизмы в ионах марганца, магния и, особенно кобальта, внесение которых даже

в небольших количествах повышает биосинтетическую способность грибных продуцентов. Ионы цинка, железа, меди тормозят рост большинства продуцентов и образование ими пектиназ.

Для многих продуцентов необходимо наличие биотина, тиамина, никотинамида, которые способствуют повышению синтеза пектиназ на 40–50%.

В качестве посевного материала можно использовать поверхностную культуру продуцента, споровый материал или молодую глубинную культуру. Чаще всего используют заспоровавшуюся поверхностную культуру либо ту же культуру, но активированную путем подращивания спор глубинным способом. Поверхностная посевная культура выращивается в течение 7–9 суток до обильного спороношения на твердой питательной среде. Такая культура содержит от  $4,0 \cdot 10^8$  до  $7 \cdot 10^8$  спор на 1 г культуры. Готовая посевная культура в течение 12 ч активируется в солевом растворе, содержащем ионы кобальта и марганца, и используется в количестве 0,2–0,3 % для засева производственной среды. Активированный таким образом посевной материал позволяет на 10–20 % сократить время выращивания культуры и на 20–30 % повысить биосинтетическую активность продуцента по пектиназе. Большое значение имеют начальные рН среды и набор солей, который входит в состав среды, т.е. условия, определяющие изменение активной кислотности среды в процессе роста культуры. Используемые в промышленности микроорганизмы, как правило, относятся к аспергилловым грибам, которые хорошо растут при низких значениях рН. Начальная активная кислотность среды оказывают существенное влияние на биосинтез грибом *A. foetidus* пектолитических ферментов (на характер накопления ферментов, на величину максимальной активности, достигаемой на этой среде, а главное – на длительность ферментации). Наиболее высокие результаты были получены для среды с исходным значением рН 3,5–4,0. В процессе роста культуры происходит снижение рН культуральной жидкости до значений 2,5–3,0, что обычно соответствует быстрому потреблению из среды пектина и интенсивному накоплению в среде пектолитических ферментов. Основная масса продуцентов относится к мезофильным микроорганизмам, оптимум роста для которых находится при температуре 28–30 °С. Изменяя температурный режим, интенсифицируют биосинтез пектиназ. На стадии роста культуры (в первые 20–24 ч) можно повысить температуру на 2–4 °С. В этих условиях активируются все ферментативные системы, несколько убыст-



ряется рост и накапливается больше биомассы. Далее температуру понижают до оптимальной (30 °С) с тем, чтобы не вызвать преждевременного автолиза культуры, и затем для продления биосинтетических процессов температуру понижают еще на 2–3 °С. Такой дифференцированный режим многократно на самых разных культурах давал положительный эффект. Для производства очищенных ферментных препаратов первоначально от культуры отделяют всю нерастворимую часть, а фильтрат либо сразу же после охлаждения поступает на осаждение органическими растворителями, либо предварительно концентрируется методом ультрафильтрации или вакуум-выпаривания, корректируется рН ферментного раствора, производится осаждение растворителями или нейтральными солями. При концентрировании ферментных растворов методом ультрафильтрации потеря активности не превышает 6–8 %. Наилучшие результаты получаются при использовании мембран типа УАМ «Владипор» с размерами пор  $54 \cdot 10^{-10}$  м. Наибольшая скорость процесса со степенью концентрирования 10 наблюдается при избыточном давлении 0,4 МПа. При сушке ультраконцентратов, содержащих пектолитические ферменты, методом распыления отмечается, что они чувствительны к температуре, и потому наблюдается существенная потеря активности. Для снижения потерь перед сушкой распылением с наполнителем стабилизируют раствор сернокислым алюминием, что позволяет при режиме сушки с температурой воздуха 140–160 °С на входе и 70–80 °С на выходе получать препараты с потерей активности, не превышающей 5–10%. Осаждение пектолитических ферментов из культуральной жидкости или ее концентратов зависит от рН среды и природы и концентрации растворителя. Для производства пектолитических препаратов с индексом Г10х обычно используется этиловый спирт. При получении сухих ферментных препаратов пектиназ из спиртосаженных осадков путем последующей сушки сублимацией или распылением наблюдается значительная инактивация ферментов (на 20–40 %); они менее стабильны после осаждения спиртом, чем после концентрирования ультрафильтрацией. Для предотвращения инактивации осадок перед сушкой пектиназ растворяют в минимальном количестве воды (1:5), добавляют наполнитель (обычно хлористый натрий) и стабилизатор (эффективнее других проявляет себя сернокислый алюминий). Затем такой раствор высушивают методом распыления. При температурном режиме сушильного агента 140 °С на входе и 70 °С на выходе потери пектолитических ферментов не превышают 4–6%.

Пектолитические препараты получают также путем высаливания сульфатом аммония. Однако такие пектолитические препараты содержат 50–70%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Если по условиям применения препарат не должен содержать сульфата аммония, то высоланный препарат растворяют, диализуют против воды или буфера и раствор, свободный от соли, лиофильно высушивают. Методом высаливания проводят частичное фракционирование и очистку ферментов. При насыщении  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , равном 0,5, в осадок выпадает малоактивная по пектиназе фракция с выходом 0,25 % по сухой массе. Дальнейшее насыщение  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 1,0 приводит к образованию осадка с выходом 0,11 %, обладающего высокой активностью всего пектолитического комплекса (ПкА, ПЭ, ПМГ, ПГ). Особенно высока может быть активность ПкА – до 24 025 ед/г препарата. При простом высаливании, без фракционирования, с насыщением 1 получают препараты с активностью ПкА около 8000 ед/г и выходом около 0,4%. При обессоливании методом диализа против воды и гельфилтрации через сефадекс G-25 можно получать высокоочищенные препараты пектиназ с активностью до 30 000 ед. ПкА/г.

#### ***Получение препаратов из глубинных анаэробных культур.***

Основными процентами пектатлиазных ферментов, проявляющих активность в щелочной зоне рН, являются виды родов *Bacillus*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*. Многие из этих организмов являются фитопатогенными, вызывающими поражение растительной ткани, ее мацерацию. Большинство их является строгими или факультативными анаэробами. Использование анаэробных микроорганизмов в качестве продуцентов ферментов исключает энергетические затраты на аэрирование и упрощает аппаратное оформление процесса (из ферментатора удаляются устройства для подачи воздуха и перемешивания), практически устраняет инфицирование, вызываемое чаще всего недостаточной стерильностью подаваемого в ферментатор воздуха, и, наконец, позволяет проводить культивирование в больших емкостях с высоким слоем питательной среды.

Продуцентами для промышленного использования являются анаэробные виды бактерий: *Clostridium felsineum*, *Cl. pectinifermentans*, *Cl. multifermentans*, *Cl. Butyricum* и представители родов – *Bacillus polymyxa*, *B. subtilis*, *Flavobacterium pectinovorum*, *Pseudomonas marginalis*, *Ps. fluorescens*. Внеклеточные и внутриклеточные ферменты пектатлиазного комплекса образуют микроорганизмы, относящиеся к роду *Erwinia*, такие как *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*,

*E. aroideae*. Биосинтез пектатлиазных ферментов достаточно широко отмечается и у представителей микроскопических грибов, но уровень этих ферментов в общем комплексе пектиназ низок, так как грибы в основном являются продуцентами пектиназ, обладающих гидролитическим действием. *Clostridium pectinofermentans 15* обладает способностью синтезировать ферменты с высоким мацерирующим действием, способные к гидролитическому (при pH 4,0) и негидролитическому (при pH 8,0) расщеплению  $\alpha$ -1,4-связи в пектиновых веществах, т. е. образующие в процессе жизнедеятельности ферменты полигалактуроназного и пектинтрансэлиминазного комплекса. В присутствии в среде 0,2 %  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  наивысшую продуктивность культура *Clostridium pectinofermentans 15* проявляет как по полигалактуроназной, так и по пектатлиазной активности. Органические источники азота, такие как дрожжевой автолизат, кукурузный экстракт солодовых ростков, мочевины, в 1,5–2 раза менее эффективны по сравнению с  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Но они (за исключением мочевины) при совместном употреблении с  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  стимулируют рост биомассы и биосинтеза ферментов. Стимулирующий эффект на синтез пектатлиазных ферментов оказывают такие аминокислоты, как гистидин, валин и аспарагиновая кислота. В качестве источника углерода и индуктора биосинтеза пектолитических ферментов используются пектиновые вещества, вводимые со свекловичным жомом, льняной мукой или картофельной мезгой. В отличие от сред для аэробных продуцентов положительный эффект дает введение в качестве источника углерода не только пектиновых веществ, но и глюкозы. Введение сахарозы менее эффективно. Стимуляторами образования ферментов, расщепляющих пектиновые вещества, могут быть галактуроновая кислота, олигоурониды, пектиновые вещества и продукты их частичного гидролиза, а также белковый фактор, входящий в состав сырой картофельной ткани. Дифференциальная скорость синтеза фермента тем выше, чем меньше источников углерода и его метаболитов в среде. Для синтеза ферментов, обладающих пектатлиазной активностью, подавляющему количеству продуцентов необходимо присутствие в среде пектиновых веществ, а лучше их продуктов распада под действием лиазных ферментов. Если же вводятся гидролизаты пектиновых веществ, полученные кислотным или ферментативным путем с помощью гидролитических ферментов, то биосинтез пектатлиазных ферментов тормозится и стимулируется синтез полигалактуроназ. Для продуцента *Cl. pectinofermentans 15* питательная среда, обеспечи-

вающая синтез всего комплекса ферментов, вызывающих расщепление пектиновых веществ, имеет следующий состав (в %): подработанный свекловичный жом – 2;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 0,25;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,1; кукурузный экстракт – 0,5; мел для обеспечения заданного значения рН среды. *Cl. pectinofermentans 15* интенсивно синтезирует ферменты в логарифмической фазе роста, практически синхронно с накоплением биомассы. Максимальное накопление ферментов соответствует стационарной фазе роста и наступает через 55–60 ч. Исходный посевной материал готовят в виде спор продуцента и при засеве производственной среды вносят спороносящую культуру в количестве 4 % по объему. На биосинтез пектиназ оказывают существенное влияние рН питательной среды и температура культивирования. Биосинтез отдельных ферментов комплекса существенно зависит от рН среды. Подщелачивание среды свыше рН 7,2–7,5 приводит к подавлению биосинтеза ПГ и ПЭ и способствует образованию внеклеточных пектатлиазных ферментов. рН среды является действенным регуляторным фактором биосинтеза пектиназ культурой *Cl. pectinofermentans 15*. Температура культивирования мало влияет на уровень накопления пектиназ, но существенно сдвигает в ту или другую сторону максимум накопления ферментов. Температура находится в пределах от 25 до 37 °С. Из фильтрата культуральной жидкости можно получать методом распыления препарат пектоклостридин ГЗх и осаджением – пектоклостридин Г10х. Сушку распылением проводят при мягком режиме (температура теплоносителя на входе 120–125 °С и на выходе 55–60 °С). При осаджении органическими растворителями рН обрабатываемого раствора 6,5–6,8 при осаджении 2–2,5 объемами ацетона активность ферментов в осадках сохраняется на 93–95 % от исходной. При высаливании сульфатом аммония можно достичь некоторого фракционирования пектолитического комплекса: при насыщении 0,2 получается препарат, содержащий только ПЭ и ПТЭ. При дальнейшем увеличении концентрации соли в обрабатываемом растворе до 0,9 и 1,0 насыщения препараты не содержали ПЭ и обладали только ПТЭ- и экзо-ПТ-активностью. Комплексные препараты, полученные из культур *Cl. pectinofermentans*, стабильны при рН около 8,0 и температуре 20–30 °С, однако оптимальное значение рН для действия всех ферментов различно. Проявление полигалактуроназной активности в данном комплексе зависит от степени метоксилирования пектина, т. е. при совместном действии пектинэстеразы и полигалактуроназы при рН 6 наблюдается максимум для ПЭ- и минимум

для ПГ-активностей. Это полиметилгалактуроназа расщепляет с большой скоростью пектин с высокой степенью полимеризации. В этом случае присутствие пектинэстеразы препятствует проявлению гидролизующей способности полигалактуроназы. Оптимальной температурой действия ферментов является 40–45 °С. Ионы кальция при небольшой концентрации (0,005 % CaCl<sub>2</sub>) активируют экзополигалактуроназу и пектинтрансэлиминазу. Введение в реакционную смесь NaCl (0,01 %) активирует экзо-ПГ и ПЭ.

Пектолитические ферменты фракционируют из ферментного препарата пектоклостридина Г10х с помощью гельхроматографии. Препарат перед разделением подвергают очистке методом диализа, обработке гелем фосфата кальция и центрифугированию. Для разделения используют сефадекс G-200 с последующим элюированием 0,05 М трис-НСl-буфером. Полигалактуроназы и пектатлиазы, синтезируемые различными микроорганизмами, довольно лабильны в процессе концентрирования и требуют присутствия стабилизаторов. Чаще всего стабилизаторами служат соли Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> и других двухвалентных металлов. Степень очистки ферментов определяется областью их применения. В пищевой промышленности используются препараты пектинразрушающих ферментов, осажденные этиловым спиртом или другими растворителями.

### Целлюлолитические препараты

Промышленными продуцентами целлюлаз являются микроорганизмы, относящиеся к родам *Trichoderma* и *Geotrichum*. Одним из очень активных продуцентов целлюлаз является микроскопический гриб *Trichoderma reesei*, у которого есть три варианта: QM6a, QM6d и QM6c. На основе QM6a сейчас получены многочисленные мутанты с усиленной продуцирующей способностью по целлюлазам. Лучшие из этих мутантов образуют 15–20 г/л внеклеточного белка, главную часть которого (50–80%) составляет целлобиогидролаза. Продуцентами целлюлаз являются и бактерии, особенно анаэробные, относящиеся к роду *Clostridium*. Традиционный отбор продуцентов производится путем скрининга огромного количества возможных продуцентов на способность гидролизовать целлюлозу и затем оптимизации условий культивирования. Концентрация внеклеточных целлюлаз для *Trichoderma reesei* достигает 20 г/л при продуктивности биосинтеза до 200 мг/(л·ч), что в несколько раз превосходит любой другой проду-

цент. Однако молекулярная активность даже этого суперпродуцента, т. е. отношение ферментативной активности к массе целлюлаз, крайне низка, и этот показатель лимитируется природной способностью ферментов данного продуцента адсорбироваться на субстрате, что пока не поддается внешнему воздействию и изменению.

В настоящее время наиболее вероятны два пути отбора продуцентов: 1) поиск продуцентов путем биотехнологического скрининга большого количества микроорганизмов с учетом термостабильности ферментного комплекса, его адсорбционных способностей и степени ингибирования продуктами гидролиза; 2) конструирование продуцентов с заданными свойствами методами генетической инженерии.

#### ***Получение препаратов целлюлаз из поверхностных культур.***

Для поверхностного способа культивирования в нашей стране и за рубежом используют *T. viride*, *T. koningii*, *T. lignorum*, *T. reesei*, *T. longibrachiatum* и некоторые другие. Есть данные об использовании *A. fumigatus* и *A. terreus* – термофильных продуцентов целлюлаз.

Основным компонентом питательной среды являются пшеничные отруби. Наряду с отрубями в состав среды вводятся солодовые ростки, которые богаты витаминами группы В, фосфором, клетчаткой, легкоусвояемыми редуцирующими веществами и аминокислотами. В состав среды также вводят рисовую, овсяную или ячменную шелуху, свекловичный жом, кукурузный жмых и другие целлюлозосодержащие компоненты. Наивысшая активность целлюлаз наблюдалась на среде, состоящей из 55 % пшеничных отрубей, 20 % солодовых ростков и 25 % свекловичного жома. Увеличение биосинтетической способности культуры на средах с солодовыми ростками связано не только с тем, что солодовые ростки имеют рыхлую структуру, что способствует лучшему росту гриба, но и с тем, что солодовые ростки содержат значительные количества свободных аминокислот и других биологически активных веществ. Очень большое влияние имеет содержание в отрубях крахмала. Наибольший синтез целлюлаз наблюдается при содержании крахмала в среде 16–17 %. Дальнейшее увеличение крахмала приводит к снижению биосинтетической способности культуры в отношении целлюлаз, т. е. при избытке крахмала в среде в силу индуцибельного характера накопления гидролитических ферментов образование целлюлаз заметно снижается. Дополнительное введение в состав среды, состоящей из отрубей, солодовых ростков и целлюлозосодержащих отходов (шелуха), небольшого количества сахарозы приводит к возрастанию биосинтеза целлюлаз,

особенно осаживающего действия. Большое значение имеет и источник азота в среде. Для большинства продуцентов обычно бывает достаточно тех азотсодержащих веществ, которые вносятся с отрубями и солодовыми ростками. Но введение других рыхлителей среды, таких как шелуха, лузга, может вызывать обеднение среды азотом, и тогда появляется необходимость дополнительного введения неорганических или органических источников азота. Микроорганизмы часто чувствительны к форме вводимого азота и его количеству. Для большинства грибов рода *Trichoderma* наиболее благоприятное влияние оказывает азот, введенный в виде неорганических соединений — аммонийных солей. Но в то же время для гриба *T. lignorum* наивысшая биосинтетическая активность в отношении целлюлаз проявляется при введении в состав среды неорганического азота в окисленной форме. При твердофазном культивировании *T. longibrachiatum* в присутствии около 0,6 % одной из солей  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  на 20–35% биосинтез целлюлаз повышается. Введение в среду  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  вызывает во всех случаях некоторое подавление биосинтетической активности продуцента. Дополнительное введение некоторых органических источников азота почти не влияет на биосинтез целлюлаз, особенно на осаживающий комплекс целлюлаз, за исключением кукурузного экстракта, введение которого в количестве 0,6 % по азоту способствует увеличению активности на 20–40%. Это связано с тем, что кукурузный экстракт, помимо азота, является источником и других веществ. Большое значение при твердофазном культивировании имеют толщина слоя и влажность питательной среды. Для большинства продуцентов целлюлаз оптимальной является влажность 60–65%. Такая высокая влажность возможна в связи с введением в состав среды солодовых ростков и других рыхлителей, но толщина слоя даже при высокой сыпучести среды не должна превышать 25–30 мм. Для большинства мезофильных продуцентов целлюлаз на первой фазе роста культуры увеличивают температуру на 3–5 °С выше оптимальной для ускорения прорастания спор. Этот период в зависимости от продуцента имеет длительность от 14 до 20 ч. Далее температура снижается до оптимальной. Такой прием позволяет сократить длительность роста культуры на 10–12 ч и повысить уровень активности культуры на 10–15%. При твердофазном культивировании длительность выращивания продуцентов лежит в интервале от 2,5 до 3 суток и совпадает с фазой интенсивного спорообразования. Выход культуры обычно составляет 76–78 % по сухой

массе от исходной среды, так как легкодоступные источники углерода полностью утилизируются, а целлюлоза утилизируется очень медленно. Препараты получают из культур продуцентов по традиционной схеме: экстракция водой водорастворимой части культуры → стабилизация целлюлаз в растворе некоторыми солями → осаждение целлюлаз или их частичное фракционирование органическими растворителями (этанол – 74–75 % об.; изопропанол 65–70 % об.; ацетон 70–75 % об.) → высушивание влажных осадков методом сублимации – получение готового стабильного комплексного препарата целлюлаз с индексом П10х. Получение сухих очищенных препаратов проводят при сублимационной сушке методом испарительного замораживания. Это позволяет снизить до минимума потери активности и ускорить процесс высушивания на 30–60%. Из культур микроорганизмов, выращенных на твердой среде, получают препараты с индексом П10х с активностью до 3 000 ед/г по бумаге и до 11 600 ед/г по КМ-целлюлозе.

**Получение препаратов целлюлаз из глубинных культур.** Активный биосинтез целлюлаз происходит на средах с целлюлозой и целлюлозосодержащим сырьем. Наибольший синтез комплекса целлюлаз – на среде с частично гидролизованным свекловичным жомом. При глубинном способе культивирования *T. longibrachiatum* высокий синтез целлюлаз происходит в присутствии свекловичного жома, осинового опилок, бумажных отходов, хлопкового шрота и биошрота, получаемого после окончания культивирования продуцента. Большое значение имеет и источник азота. Наилучшие результаты для большинства продуцентов ферментов получаются при введении в состав среды  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , гидролизатов дрожжей, кукурузного экстракта, солодовых ростков, соевой муки и особенно хлопкового шрота и пшеничных отрубей. Введение органических источников азота особо сильно сказывается на биосинтезе целлюлаз грибом *T. longibrachiatum*. Продуценты целлюлаз весьма чувствительны к минеральному питанию. Для роста микроорганизмов необходимо наличие в среде фосфора, серы, калия, натрия, магния, а также ионов железа, марганца, кальция и ряда других металлов. Однако не все ионы оказывают положительное влияние на биосинтез целлюлаз. Ионы  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  и  $\text{Na}^+$ , как правило, снижают уровень биосинтеза целлюлаз на 25–45%. Добавление в среду поверхностно-активных веществ (ПАВ) увеличивает продуцирующую способность микроорганизмов по отношению внеклеточных целлюлаз. Например, внесе-



ние олеата натрия в среду с целлобиозой в количестве 0,1 % приводит к стократному увеличению биосинтеза целлюлаз *T. viride*. ПАВ способствует доступу целлобиозы к связанной в клеточной мембране трансферазе, которая обуславливает образование индуктора, например, софорозы. Кроме того, введение ПАВ, например, твинов, способствует повышению клеточной проницаемости. Они влияют на транспорт питательных веществ внутрь клетки и секрецию из нее, что приводит к возрастанию продуктивности клеток и повышению уровня биосинтеза внеклеточных ферментов. Стимулирующее влияние твинов, особенно твина-80, на биосинтез целлюлаз отмечается при культивировании *T. longibrachiatum*. Введение твинов в среду вызывает одновременно со стимуляцией синтеза целлюлаз некоторое торможение в накоплении биомассы, которое неодинаково в присутствии различных твинов. Влияние оказывает состав ПАВ. Полиоксипропилен-сорбитанмоноалконаты получают ангидридизацией и этерификацией сорбита соответствующей жирной кислотой с последующим каталитическим оксиэтилированием сорбитанмоноалконата. Для твина-40, -60 и -80 такими жирными кислотами являются соответственно пальмитиновая, стеариновая и олеиновая. Эффект от ПАВ и соответствующей кислоты сопровождается снижением количества биомассы, изменением морфологии культуры (появление вытянутых и вздутых форм), увеличением продолжительности культивирования с одновременным резким увеличением синтеза целлюлаз. Отличительная особенность большинства продуцентов целлюлаз – это большая длительность культивирования. Обычно максимум активности приходится на 4–8 сутки. В культуральной жидкости при оптимальных условиях выращивания может накапливаться от 2 до 22 ед. АФБ/мл и от 200 до 500 ед. КМЦ/мл. На основе глубинной культуры получают технические препараты целлюлаз и очищенные целлюлолитические препараты. Технические препараты получают путем высушивания распылением концентратов культуры без отделения твердой фазы или выпаривания ее жидкой фазы. Для снижения потерь при сушке в культуральную жидкость вводят стабилизаторы, чаще всего небольшие количества некоторых солей. Комплексные очищенные целлюлолитические препараты, например, из *T. viride*, получают осаждением органическими растворителями и высаливанием сульфатом аммония. Способ получения препарата оказывает существенное влияние на комплекс целлюлаз в данном препарате, даже если все они получены на основе одного продуцента и из одной культуральной

жидкости. Для получения очищенных препаратов целлюлаз используют комбинацию самых различных приемов: осаждение и фракционирование органическими растворителями, солями, хроматографию на молекулярных ситах и ионообменную хроматографию, электрофорез. Один из способов – аффинная хроматография целлюлаз на микрокристаллической целлюлозе или целлюлозе в виде измельченной порошкообразной фильтровальной бумаги. Использование целлюлозы позволяет разделить целлюлазный комплекс на основе различной степени сродства компонентов к субстрату. Для препаратов целлобранина Г10х и целловиридина ГЗх в качестве носителей применяются следующие формы целлюлозы: порошковая и микрокристаллическая целлюлозы, неизмельченная вата, измельченный и неизмельченный хлопковый линт. Аффинную хроматографию проводят в колонках, заполненных носителем. Адсорбция ферментов проводится при температуре 4–10 °С и рН 4,5 (оптимальный для действия целлюлаз) в 0,1 М ацетатном буфере. Десорбцию ферментов осуществляют путем изменения рН элюента до 7,0 (0,1 М фосфатным буфером) и последующего понижения ионной силы элюирующего буфера до 0,010–0,001 М и далее дистиллированной водой. В оптимальных условиях на первой стадии происходит адсорбция ферментов из раствора с одновременной очисткой их от балластных примесей и пигментов. На этой стадии сорбируется до 90–95 % эндоглюканазы. Далее колонку отмывают 0,1 М ацетатным буфером с рН 4,5 до прекращения выхода белка и пигментов. На второй стадии при промывании колонки 0,1 М фосфатным буфером с рН 7 происходит дополнительное отделение балластных белков, так как ферментативная активность практически отсутствует. Третья стадия – это элюция адсорбированных ферментов с колонки фосфатным буфером с рН 7–7,2 с понижением его ионной силы. По мере снижения ионной силы буфера происходит десорбция различных количеств эндоглюканазы с колонки, что свидетельствует о том, что система ферментов многокомпонентна и отличается различной адсорбционной способностью на целлюлозе. Целлобиогидролаза более прочно сорбируется на целлюлозе, чем эндоглюканаза. Поэтому ее элюция возможна при низких значениях ионной силы. В связи с этим последний этап элюции, несмотря на ухудшение гидродинамических свойств носителя, проводят дистиллированной водой. Все фракции, обладающие эндоглюканазной активностью, способны гидролизовать нативную упорядоченную целлюлозу. Фракции, выходящие последними при элюции дистилли-

рованной водой или при длительной отмывке 0,001 М фосфатным буфером с рН 7, обладают более высокой гидролизующей активностью. Аффинная хроматография на целлюлозе позволяет выделить комплекс целлюлаз *T. longibrachiatum*, очистив его от сопутствующих белков и пигментов, но не дает возможностей для разделения комплекса на отдельные ферменты, т. е. этот метод эффективен для групповой очистки целлюлаз. Многоступенчатую элюцию можно заменить одноступенчатой элюцией 0,001 М фосфатным буфером, при этом фракция ферментов практически не содержит низкомолекулярных веществ и солей, а элюат содержит некоторое количество глюкозы и целлобиозы, которые способствуют стабилизации ферментов при хранении. Аффинная хроматография позволяет получать высокоочищенные целлюлазные комплексные препараты с выходом активности до 50 % непосредственно из фильтрата культуральной жидкости. Однако микрокристаллическая целлюлоза является не очень хорошим носителем, у нее малая сорбционная емкость по ферменту (не более 20 ед./г по эндоглюканазе) и сравнительно низкий выход активности в элюат (около 50%). Аффинной хроматографией на целлюлозе можно селективно выделить из неочищенных препаратов и культуральной жидкости целлюлазы при незначительном количестве сопутствующих неактивных белков.

### Гемицеллюлазные препараты

Гемицеллюлазные препараты в промышленных условиях получают поверхностным и глубинным способом на основе четырех видов микроорганизмов: *Trichothecium roseum*, *A. awamori*, *A. foetidus* и *B. subtilis*. Все целлюлолитические препараты включают комплекс гемицеллюлазных ферментов, особенно с  $\beta$ -глюканазной и целлобиазной активностью.

**Получение препаратов гемицеллюлаз из поверхностных культур.** При поверхностном способе культивирования в промышленности используют в основном два продуцента: *A. foetidus* и *T. roseum*.

Питательная среда. Для *T. roseum* в качестве компонентов питательной среды используют различные отходы, содержащие гемицеллюлозы: зерновую шелуху (рисовую, ячменную, просяную, овсяную), овсяную лузгу, пшеничные отруби, кукурузные стержни, пивную дробину, солодовые ростки, автолизат пивных осадочных

дрожжей. Наилучшие результаты получают на солодовых ростках. В производстве используется среда следующего состава (в %): зерновая шелуха – 45; солодовые ростки – 45; дрожжевой автолизат влажностью 60 % – 10 (или без него); рН среды 5–5,5. Длительность культивирования 50–65 ч, температура 23–25 °С. Так как среда содержит очень мало легкоусвояемых углеводов, то тепловыделение культуры в процессе роста в 3,5–4 раза ниже, чем при выращивании на пшеничных отрубях, и есть возможность увеличить слой среды до 4–5 см. Из-за небольшого потребления из среды питательных веществ выход готовой культуры очень высокий – 83–90%. После окончания роста культуры из нее можно получить препарат с индексом Пх, а после экстракции ферментов и осаждения спиртов – препараты с индексом П10х.

Высокоактивным продуцентом всего комплекса гемицеллюлазных ферментов является гриб *A. foetidus* Д-73. Обогащение сред ферментализатами биошротов и минеральными источниками азота и фосфора повышает биосинтез гемицеллюлаз на 25–40%. Процесс выделения ферментов состоит из экстрагирования ферментов из поверхностной культуры, очистки и концентрирования экстракта методом ультрафильтрации до содержания сухого вещества в концентрате 14%, сушки концентрата со стабилизаторами методом распыления с получением препарата ПЗх. При осаждении ферментов из концентрата этиловым спиртом (концентрация в реакционной среде 80%) получают препараты с индексом П10х. Гриб *A. Foetidus* Д-73 образует богатый комплекс ферментов, которые активно расщепляют не только гемицеллюлозы, но также и целлюлозы, крахмал, белки, пектиновые вещества. Этот продуцент содержит весь комплекс ферментов, действующих на клеточный «матрикс» растений. Наличие такого комплекса открывает реальные возможности широкого применения этого препарата в биотрансформации различных растительных отходов, а именно, отходов пищевой промышленности, плодо- и овощеперерабатывающих предприятий.

**Получение препаратов гемицеллюлаз из глубинных культур.** При глубинном способе культивирования используются продуценты, которые синтезируют какую-то определенную группу ферментов гемицеллюлазного комплекса, например  $\beta$ -глюканазы – *B. subtilis*, *B. circulans* и др., ксиланазы – *T. roseum*, *A. awamori* и др.;  $\beta$ -глюкозидазы – *Geotrichum candidum*, *T. viride*. Так как для получения гемицеллюлаз используются разнообразные продуценты, компо-

ненты среды также очень различны. Существуют некоторые общие подходы к составлению сред. Для биосинтеза  $\beta$ -глюкана в состав среды должны входить поли- или олигосахариды, имеющие  $\beta$ -1,4-связи, модифицированная целлюлоза,  $\beta$ -глюкан. Стимулирующее влияние оказывают ксилоза, мальтоза, сахароза, целлобиоза, крахмал, пектиновые вещества. Введение в состав среды ячменного солода, пшеничных отрубей, солодовых ростков, соломы, свекловичного жома, а также продуктов их частичного гидролиза обеспечивает необходимый уровень углеродсодержащих соединений и способствует биосинтезу ферментов, гидролизующих гемицеллюлозы. Введение в состав среды частично разрушенных клеточных оболочек дрожжей или других микроорганизмов стимулирует синтез  $\beta$ -глюкана. Этот эффект связан с наличием в клеточной стенке микроорганизмов ламинарина, лютеана, пахимана и других соединений, стимулирующих биосинтез микроорганизмом  $\beta$ -глюкана. Для синтеза ксилана в составе среды в качестве источника углерода используются практически те же самые компоненты. Ксиланазы образуются на средах, содержащих кукурузные стержни, чингалак хлопчатника, свекловичный жом, соевую муку. При биосинтезе  $\beta$ -глюкозидазы благоприятно сказывается присутствие в составе среды субстрата для действия  $\beta$ -глюкозидазы – целлобиозы. Однако фермент также активно синтезируется на средах с крахмалом, метил- $\beta$ -глюкозидом и другими веществами и компонентами, используемыми в средах для синтеза всего комплекса гемицеллюлаз. Источник азота практически может быть любым, и выбор его зависит от продуцента, его физиологических особенностей. Азот может быть неорганическим или поставляться за счет органических соединений. Чаще всего используют соли  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , автолизаты микробных биомасс. Продуценты гемицеллюлаз весьма чувствительны к наличию в среде ионов металлов. Ионы калия, никеля, лития, магния, кальция, натрия, кобальта, марганца в концентрациях до  $1 \cdot 10^{-3}$  практически не влияют или оказывают стимулирующее воздействие на биосинтез гемицеллюлаз. Ионы свинца, меди, серебра и ртути угнетают биосинтез, а в ряде случаев полностью его ингибируют. Для получения препаратов из *T. roseum* в качестве посевного материала применяют мицелиальную массу гриба, находящегося в экспоненциальной фазе роста, в количестве 6–10% об. Для *B. subtilis* 402 посевной материал для глубинной ферментации готовят поверхностным способом на мелконарезанном картофеле до обильного спорообразования (дли-

тельность культивирования 3–4 сут.) при температуре 37 °С. Такой посевной материал подается в ферментационную среду из расчета 0,04–0,06 % по массе к объему. При использовании в качестве продуцентов *Aspergillus foetidus* и *A. awamori* посевной материал готовят в виде спороносящей пленки, выращенной на жидкой питательной среде, агаризированных средах и твердых сыпучих средах. Наилучшие результаты для *A. foetidus* получают на среде, состоящей из агаризированной смеси экстрактов (АСЭ) из пшеничных отрубей и солодовых ростков. Отличительная особенность этого посевного материала заключается в его исключительной стабильности при хранении. Доза посевного материала также оказывает существенное влияние на образование культурой ферментов. Она зависит не только от вида продуцента, но и от концентрации питательных веществ в ферментационной среде, особенно источников углерода. Физиологические особенности каждого продуцента определяют продолжительность выращивания микроорганизма и образования им гемицеллюлаз. Этот показатель определяется составом среды и ее концентрацией. Для *A. foetidus* – продуцента β-1,3:1,4-глюканазы наивысшая активность в культуральной жидкости отмечается в период 64–66 ч роста культуры. Для *B. subtilis* 402 максимум образования β-глюканазы наблюдается в культуральной жидкости на 24–30 ч роста культуры, а при дробном введении основного субстрата длительность процесса сокращается до 17–18 ч. На длительность культивирования оказывает большое воздействие не только вид продуцента, но и рН среды. Для грибных культур – продуцентов гемицеллюлаз начальный рН среды обычно слабощелочной – от 4,8 до 5,3. Затем происходит резкий сдвиг в кислую зону рН – до 2,5–3,0 и только в самом конце наблюдается небольшой подъем рН на 0,3–0,5. При культивировании бактерий исходный рН лежит в нейтральной зоне (около 7,0); в течение первых 12–20 ч он несколько понижается – до 6,2–6,4, а затем происходит подщелачивание до рН 7,0–7,3. Снижение рН на первом этапе культивирования вызывает подавление биосинтетической способности бактериальных продуцентов, поэтому рекомендуется подтитровка среды или введение подпитки с более высоким значением рН. Добавление среды проводится на 8–10 ч роста культуры, когда начальное значение рН снижается с 6,7 до 6,2. Для бактериальных продуцентов необходимо поддержание рН на уровне слабощелочных и нейтральных значений. Большое влияние на биосинтез гемицеллюлаз оказывает аэрация среды, которая обеспечивает интенсивный рост культуры. Параметры аэрации

зависят от состава среды, ее вязкости и массообменных характеристик ферментатора. Например, для культуры *B. subtilis* 402 при выращивании в ферментаторе вместимостью 1,5 м<sup>3</sup> с коэффициентом заполнения 0,5 на среде, состоящей из 4 % гидролизата БВК, 2 % ячменного солода, 0,4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, показатель скорости растворения кислорода равен 1,42. Оптимальный режим аэрации, который позволяет получать активность до 80–90 ед/мл, заключается в том, что в течение первых 8–10 ч создаются оптимальные условия для роста культуры (подача воздуха около 500 л/мин), затем аэрация усиливается до 600 л/мин и после 12 ч роста дополнительно включается устройство для перемешивания среды (около 200 мин<sup>-1</sup>). Эти мероприятия позволяют увеличить продуктивность штамма на 26–41 %. Препараты гемицеллюлаз получают путем осаждения органическими растворителями, нейтральными солями и при использовании различных видов хроматографии. На полноту осаждения гемицеллюлаз оказывают влияние рН ферментного раствора, концентрация сухого вещества, отношение ферментного раствора к органическому растворителю, наличие стабилизаторов, ингибиторов. Схема выделения гемицеллюлаз мало отличается от общепринятой процедуры очистки и разделения ферментов. Например, при осаждении гемицеллюлаз культуры *B. subtilis* 402 – продуцента эндо-β-глюканазы наиболее полно β-глюканаза переходит в осадок под действием изопропилового спирта (1:4,5) при рН 4,3, когда можно перевести в осадок до 93–94 % исходного фермента в активном состоянии. Большинство глюканаз имеет множественные формы, которые отличаются по ряду свойств и удельной активности. Например, из *G. candidum* 3с выделено три типа глюканаз (I, II и III). Они все относятся к экзо-1,3-β-глюканазам, но отличаются молекулярными массами, которые соответственно равны 88 000, 100 000 и 105 000. 1,3-β-Глюканазы отличаются и изоэлектрическими точками. Глюканазы I, II и III из *G. candidum* в кислой зоне имеют рН соответственно 3,7; 4,0 и 4,3. Эти глюканазы несколько отличаются по своей субстратной специфичности. Все три глюканазы высокоспецифичны к глюканам, в которых преобладают 1,3-β-связи, проявляя наибольшее сродство к 1,3-β-глюканламинарану. Такие полисахариды, как 1,6-β-глюканпустулан и 1,4-β-глюкан, КМ-целлюлоза глюканазами I, II и III практически не гидролизуются. По физическим свойствам эти глюканазы достаточно близки, однако, глюканаза I более термостабильна, чем другие.

## Липолитические препараты

Для осуществления интенсивного биосинтеза большое значение имеют отбор высокопродуктивного микроорганизма, состав среды и условия его культивирования. Одним из основных компонентов среды является источник азота. В зависимости от продуцента он может резко меняться и влиять очень сильно на биосинтез липаз, снижая его в десятки раз (например, нитраты) или повышая (соевая мука). В составе сред используют минеральные, органические формы азота и смешанные источники азота. Присутствие в среде аминокислот, витаминов, нуклеиновых кислот и других соединений способствует биосинтетической деятельности многих микроорганизмов. Очень важным компонентом среды является соевая мука, липидный комплекс которой оказывает стимулирующее действие на биосинтез липаз многими микроорганизмами. Усиление стимулирующего эффекта от применения сои, соевого лецитина происходит при их совместном использовании с кукурузным экстрактом. У дрожжевых организмов наилучшие результаты достигаются при использовании мочевины и аммонийного азота, а для *Oospora lactis* наивысший синтез отмечается при внесении в среду дрожжевого автолизата и сульфата аммония. В качестве источника азота в составе сред используют экстракты хлопкового и подсолнечного шротов, осадочные пивные дрожжи и т. д. Не менее важным, чем источник азота, является форма потребляемого углерода в составе среды. Источниками углерода в средах могут быть сложные органические соединения: крахмал, декстрины, олиго-, ди- и моносахариды. В состав сред очень часто добавляют компоненты липидной природы, так как липазы являются индуцибельными ферментами. Но не всякий липидный компонент вызывает стимулирование биосинтеза липаз. Эффект положительного воздействия связан с природой липида и особенностями его продуцента. Чаще всего в составе питательных сред используют оливковое и хлопковое масла, реже – подсолнечное, рапсовое, кукурузное, касторовое, трибутирин, соевое, льняное масла. Ряд продуцентов увеличивает биосинтез липаз в присутствии не только масел, но и жирных кислот. Например, *Geotrichum candidum* наивысшую биосинтетическую способность проявляет при наличии в среде оливкового или хлопкового масла, а также олеиновой и линолевой кислот. Подобный же эффект наблюдается для *Oospora lactis*, когда вносят в среду 0,5 % олеиновой и петрозелиновой кислот. Стимулирующее влияние кислот



для *O. lactis* отмечается только в отношении ненасыщенных жирных кислот; насыщенные жирные кислоты не способствуют активному биосинтезу фермента. В составе среды должен быть компонент липидной природы, способствующий синтезу микроорганизмом экзофермента, который, секретирясь во внешнюю среду, осуществляет гидролиз триглицеридов, а свободные жирные кислоты используются для энергетических нужд организма. Однако некоторые микроорганизмы в присутствии липидов снижают биосинтетическую способность. Например, при культивировании *G. candidum* введение липидов (подсолнечное, оливковое, горчичное, кукурузное и сливочное масла) подавляет синтез липазы на 24–55%. Подобные результаты получают при культивировании *A. wentii*, *P. roqueforti*, *R. arrhizus*. Но даже те микроорганизмы, которые в присутствии липидов повышают биосинтетическую способность по отношению к липазам, очень чувствительны к уровню липидов в среде. Оптимальная концентрация липидов в среде должна составлять не более 10–50 % количества присутствующего в среде источника углерода, что соответствует 5–20 г/л, так как повышение концентрации липидов в среде часто приводит к значительному снижению уровня биосинтеза фермента. Это связано с тем, что накапливающиеся продукты их расщепления начинают угнетать процесс биосинтеза липазы. Биосинтез ферментов определяется не только составом среды, но и выбранными условиями культивирования продуцента (температура, длительность культивирования, рН среды, посевной материал, аэрация). Наибольшей биосинтетической способностью культура обладала при засеве среды 20-часовым посевным материалом в количестве 2 % по объему среды и т. д. При использовании других продуцентов условия выращивания всякий раз устанавливаются экспериментально.

Получение препаратов липаз и их очистка проводятся на основе фильтратов культуральной жидкости. Биомасса продуцента и твердая взвесь среды отделяются центрифугированием или фильтрованием. Жидкая фаза культуры стабилизируется солями и концентрируется, например, путем ультрафильтрации или вакуумвыпаривания. Полученный концентрат может непосредственно высушиваться для получения технических препаратов с индексом ГЗх. Однако чаще проводят выделение фермента методом осаждения органическими растворителями или сульфатом аммония. Липазы весьма чувствительны к воздействию растворителей, так как под действием их довольно часто наблюдается частичная денатурация белка, что может привести в ря-

де случаев к нарушению организации активного центра и потере активности. Поэтому для выделения липаз высаливанием чаще применяют сульфат аммония. Для получения высокоочищенных препаратов липаз широко используются все методы хроматографии, электрофорез, гельфльтрация и изофокусирование.

### Протеолитические препараты

Протеолитические ферменты относятся к подподклассам: 3.4.11 (7 ферментов), 3.4.13 (5), 3.4.15 (1), 3.4.16 (1), 3.4.17 (5), 3.4.21 (4), 3.4.22 (3), 3.4.23 (1), 3.4.24 (4) и 3.4.99 (4). Под одним номером находится очень много ферментов, получаемых из различных источников, но имеющих сходные свойства. В подподклассе 3.4.21.14 представлена целая серия микробных протеиназ, среди продуцентов которых отмечаются *Bacillus subtilis*, *E. coli*, щелочная протеиназа из культур рода *Aspergillus*, *Tritirachium album*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Malbranchea pulchella*, *Streptomyces rectus*, *Candida lipolytica* и др. Под номером 3.4.23.6 также объединено много ферментов, источниками которых являются микроорганизмы, в основном относящиеся к грибам родов: *A. oryzae*, *A. terricola*, *A. saitoi*, *A. niger*, *P. janthinellum*, *R. chinensis*, *M. pusillus*, *M. miehei*, *Endothia parasitica*, *Candida albicans*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Rhodotorula glutinis*, *Physarum polycephalum* и др. Все микробные металлопротеиназы объединены под номером 3.4.24.4. Они выделены из культур родов: *Streptomyces*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Aspergillus*, *Mycobacter*, *Serratia*.

**Поверхностный способ культивирования.** При поверхностном культивировании в качестве продуцентов чаще всего используют микроскопические грибы видов: *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. terricola*, *A. candidus*, *R. oryzae*, *R. nigricans*, *R. cohnii*, *R. tonkiaensis*, *R. oligosporus* и др. Основным компонентом среды являются увлажненные до 56–65 % пшеничные отруби. Для обогащения пшеничных отрубей используют некоторые добавки, обычно растительного происхождения, такие как солодовые ростки, просяная мука, соевая мука. Среда при увлажнении не подкисляется, так как введение кислот несколько снижает способность микроскопических грибов к синтезу. рН среды составляет 5,6–6,2. Готовая культура либо высушивается (препарат Пх), либо поступает на последующую очистку. Водный экстракт может быть сконцентрирован (препарат П2х) либо исполь-

зован для осаждения ферментов растворителями или солями. При осаждении этанолом выход препарата от исходной культуры составляет около 5 % с переходом в осадок до 70–73 % фермента; при осаждении изопропиловым спиртом выход составляет около 2,2–2,5 % с переходом в осадок до 85–90 % протеиназ, т. е. получают препараты с меньшим содержанием балласта, но более активные.

**Глубинный способ культивирования.** В качестве продуцентов протеолитических ферментов при глубинном культивировании в промышленных условиях используют бактерии в основном рода *Bacillus*, реже – актиномицеты и микроскопические грибы. Для производства нейтральных и щелочных протеиназ используют спороносные бактерии и актиномицеты, для получения кислых – микроскопические грибы. Наиболее широко в нашей стране применяются штаммы бактерий, относящиеся к видам *Bacillus subtilis* и *B. mesentericus*. Культивирование проводится на модифицированной среде следующего состава (в %): картофельный крахмал – 2; двузамещенный цитрат аммония – 3; KCl – 0,15; MgSO<sub>4</sub> – 0,05; CaCl<sub>2</sub> – 0,01; экстракт соевых бобов – 1,0. В среду рекомендуют вводить: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,2 %), кукурузный экстракт (0,8%) и пивные дрожжи (0,4%).

На основе культуральной жидкости, содержащей внеклеточные протеиназы, получают ферментные препараты различной степени очистки, используя разнообразные методы – начиная от высушивания распылением готовой культуральной жидкости и до методов получения высокоочищенных ферментных препаратов и кристаллических протеиназ.

### Препараты, содержащие глюкозооксидазу и каталазу

Ферменты чаще используются в виноделии, пивоварении, консервной, соковой и безалкогольной промышленности для удаления кислорода, что способствует повышению стойкости продуктов к длительному хранению и сохранению цветности продукта. Ферменты применяются совместно, так как их каталитическая активность взаимосвязана. Введение ферментов в напитки в момент их укупорки позволяет полностью удалить из продукта и воздушного объема кислород, что сильно замедляет процессы окисления различных соединений и делает невозможным развитие микроорганизмов.

Источниками этих ферментов являются микроскопические грибы, относящиеся преимущественно к роду *Penicillium* и значительно реже к роду *Aspergillus*. Среди пеницилловых грибов наибольшей

способностью к синтезу внеклеточному этих ферментов обладают виды: *P. chrysogenum*, *P. casei*, *P. nigricans*, *P. notatum*, *P. adametzi*, *P. lividum*, *P. cyaneofulvum*, *P. herguei* и особенно *Penicillium vitale* *Pi-dopl. et Bilai*. Культура *A. niger* продуцирует эти ферменты внутриклеточно.

При совместном получении в среде должно содержаться 6–10 % сахара и 1,5 % азотнокислого калия. По окончании культивирования культуральная жидкость имеет каталазную активность около 50–55 ед. на 1 мг белка и глюкозооксидазную активность 40–42 ед. на 1 мг белка. Далее культуральную жидкость с рН около 3,5–4 после отделения мицелия подвергают обработке оксидом алюминия в статических условиях при интенсивном перемешивании. При этом значении рН из культуральной жидкости сорбируется до 95 % каталазы от содержания ее в культуральной жидкости, а глюкозооксидаза остается в культуральной жидкости, т. е. на этой стадии осуществляется разделение каталазы и глюкозооксидазы. Оксид алюминия с сорбированной на ней каталазой отделяют, а освобожденную от каталазы культуральную жидкость подвергают дальнейшей обработке оксидом алюминия для сорбции глюкозооксидазы. Каталаза, сорбированная на оксиде алюминия, подвергается обработке 0,1 М фосфатным буфером с рН 6,8 при перемешивании, что обеспечивает элюцию до 95 % каталазы. При осаждении каталазы из элюатов различными растворителями наилучшие результаты получаются при использовании изопропилового спирта. Осаждение каталазы в отличие от глюкозооксидазы проводится при температуре 18–24 °С и соотношении осадителя и элюента 1:1. Получаемый осадок легко отделяется центрифугированием и высушиванием при температуре 30–35 °С в вакууме. В готовом препарате каталазы содержится до 80–85 % активного фермента от исходного количества в культуральной жидкости. Из надосадочной жидкости после отделения вместе с оксидом алюминия каталазы извлекают глюкозооксидазу. При достаточно высоком биосинтезе каталазы и глюкозооксидазы возможно получение их комплексных препаратов для использования в пищевой промышленности на основе *Aspergillus niger* 8. Продуцент накапливает внутриклеточные ферменты в течение суток на среде, содержащей 3–6% раствор мелассы, 0,2% нитрата натрия и около 0,05 % сернокислого аммония. Отделенный мицелий высушивается, затем ферменты экстрагируются водой и осаждаются изопропиловым спиртом (3:1). Выход препарата составляет 3,8 % сухой массы мицелия и содержит до 70 % белка.

## Препараты глюкоизомеразы

Производство препаратов глюкоизомеразы вызвано необходимостью постоянно расширять объемы выпуска сахаристых веществ для пищевых целей. Полноценным заменителем сахарозы может служить инвертный сахар, который получают не только из сахарозы, но и из крахмала путем последовательной обработки его ферментами.

Глюкоизомеразу образуют многие микроорганизмы, в литературе приведено свыше двухсот штаммов – продуцентов глюкоизомераз, относящихся более чем к 80 видам. Наиболее часто в качестве источника глюкоизомераз используют актиномицеты. Глюкоизомеразу образуют также бактерии, относящиеся к родам *Aerobacter*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus* и др. Глюкоизомеразы обнаружены у некоторых видов дрожжей рода *Candida*, а также в прорастающем зерне ряда злаковых культур. Несмотря на достаточно большой перечень возможных продуцентов глюкоизомеразы, в промышленности преимущественно используются микроорганизмы, относящиеся прежде всего к роду *Streptomyces*, а также к родам *Aerobacter* и *Lactobacillus*.

Глюкоизомераза является индуцибельным ферментом, и потому состав среды имеет очень большое значение при выборе оптимальной технологии глюкоизомеразных препаратов. В качестве индуктора в среде обычно используется ксилоза или ксилобиоза, однако продуценты нуждаются и в других источниках углерода. Такими источниками могут быть глюкоза, сорбит, маннит, глицерин, арабиноза, крахмал, лактоза. В зависимости от продуцента соотношение индуктора (ксилозы) к другому источнику углерода меняется. Так, для бактерий оно обычно равно 10:1, а для актиномицетов – 7:3. Однако для *Streptomyces sp.* оптимальное соотношение D-ксилозы к крахмалу составляет 1:2, при культивировании *S. olivochromogenes* – 1:1, для *S. bambergiensis ATCC 13879* наивысшая продуктивность по глюкоизомеразе наблюдается на среде, содержащей D-ксилозу и D-сорбит в соотношении 1:3. В качестве источника ксилозы используют ксилозо- и ксилансодержащее сырье: солому, пшеничные и рисовые отруби, кукурузные кочерыжки, зерновую и хлопковую шелуху, причем наилучшие результаты получаются при введении в состав среды гидролизатов ксилансодержащего сырья, которые содержат значительные количества пентоз. Биосинтез глюкоизомеразы без введения индуктора возможен только для мутантных штаммов, у которых синтез фермента идет по конститутивному пути.

Продуценты глюкозоизомеразы требовательны к источнику азота, так как он должен способствовать интенсивному накоплению биомассы продуцентом. Продуценты глюкозоизомеразы достаточно хорошо растут на средах как с минеральными (аммонийные соли), так и с органическими источниками азота, в качестве которых используются соевая мука, кукурузный экстракт, экстракт из солодовых ростков. Кроме того, в среде должны содержаться ионы магния в виде соли  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  и кобальта в виде соли  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ . Концентрации этих солей определяются физиологическими особенностями продуцентов и колеблются для магния от 0,025 до 0,050 % и для кобальта от 0,005 до 0,024 %. Для бактериальных продуцентов глюкозоизомераз включают в состав среды  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  в концентрации от 0,02 до 0,05 %. В состав питательных сред для некоторых продуцентов иногда вводятся в небольших количествах соли  $NaCl$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCO_3$ ,  $K_2HPO_4$ . В состав сред при выращивании актиномицетов достаточно часто вводятся некоторые инертные вещества, такие как агар, КМ-целлюлоза, чтобы предотвратить возникновение малопродуктивных шаровидных образований микроорганизмов при глубинном культивировании. Внесение этих и подобных веществ на начальных стадиях роста культуры способствует развитию нитевидного мицелия, улучшаются условия массообмена клетка – жидкая фаза, что приводит к увеличению съема фермента с единицы объема.

На биосинтез глюкозоизомеразы оказывают существенное влияние температура, рН среды, уровень аэрирования и др. Для актиномицетов используется температура от 28 до 45 °С, для бактериальных культур диапазон температур шире – от 28 до 60 °С. Чем выше оптимальная температура роста культуры, тем термостабильнее синтезируемая глюкозоизомераза. Среда, используемые для выращивания продуцентов глюкозоизомераз, как правило, имеют начальный рН от 6 до 8.

В промышленности производство препаратов глюкозоизомеразы осуществляется двумя способами: 1) выделение фермента из биомассы продуцента путем ее полного разрушения с последующим получением высокоактивных очищенных препаратов глюкозоизомеразы; 2) фиксирование фермента внутри клетки и использование этой биомассы для изомеризации D-глюкозы в D-фруктозу. После выделения фермента из клеток его можно очистить до гомогенного состояния. Для очистки глюкозоизомераз используют обычные методы выделения: фракционирование сульфатом аммония или органическими рас-

творителями, ионообменная хроматография на ДЭАЭ-сефадексе или ДЭАЭ-целлюлозе, ультрафильтрация, электрофорез, кристаллизация и т. д. Отличительной особенностью выделения глюкозоизомераз является термическая обработка ферментного раствора, при которой термостабильная глюкозоизомераза остается без изменений, а балластные белки денатурируют и выпадают в осадок. Такой прием позволяет значительно очистить фермент от сопутствующих белков. Выделение фермента в присутствии ионов кобальта, магния и в некоторых случаях марганца значительно повышает стабильность глюкозоизомеразы, что способствует получению активных препаратов с минимальными потерями.

### Препараты $\beta$ -фруктофуранозидазы

Препараты  $\beta$ -фруктофуранозидазы применяются в технологических процессах, где необходима инверсия сахарозы. Наиболее широко фермент используется в кондитерской промышленности при производстве помадных изделий. Эти изделия быстро черствеют при хранении, так как с потерей влаги наблюдается явление кристаллизации сахарозы. Если в рецептуру добавлять  $\beta$ -фруктофуранозидазу, то будет происходить медленный гидролиз сахарозы уже в готовой конфете. Поэтому помадка и другие кондитерские изделия с помадными массами будут иметь длительное время оптимальную консистенцию и черствение замедлится. Есть данные по применению фермента в хлебопечении. Использование препарата улучшает аромат, пористость и внешний вид хлеба. Препараты фермента используются при приготовлении инвертных сиропов в ликеро-водочной и особенно в безалкогольной промышленности с концентрацией сахара до 72–73 %. Сиропы такой концентрации можно приготовить, не инвертируя сахарозу, но они очень быстро кристаллизуются, что затрудняет работу с ними. Фермент может использоваться как антикристаллизатор при изготовлении искусственного меда, плодово-ягодных морсов, соков, экстрактов и варенья.

$\beta$ -Фруктофуранозидазу образуют различные микроорганизмы (дрожжи, грибы, бактерии и актиномицеты) и растения. В качестве промышленного источника используются преимущественно дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* и некоторые другие виды дрожжей, грибы рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Среди базидиальных грибов  $\beta$ -фруктофуранозидаза обнаружена у *Cercospora beticola*. Фермент

обнаружен в *Neurospora crassa* и у некоторых представителей низших грибов. Продуцентами фермента является ряд штаммов *B. subtilis*, *E. coli*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* и некоторые другие.

**Получение препаратов инвертазы из культур микроскопических грибов.** Препараты  $\beta$ -фруктофуранозидазы получают на основе глубинного культивирования *Aspergillus awamori* 16, продуцирующего внеклеточный фермент. В состав сред вводятся углеродсодержащие соединения: глюкоза, фруктоза, галактоза, арабиноза, рамноза, сахароза, лактоза, мальтоза, раффиноза, инулин, декстрины, крахмал, инозит, маннит. Наивысший синтез внеклеточной  $\beta$ -фруктофуранозидазы наблюдается только в присутствии инулина, декстринов и особенно крахмала. В качестве источника азота используют нитрат натрия, сульфат аммония, аммонийные соли фосфорной кислоты и некоторые органические источники азота, такие как соевая мука. Наивысшие результаты по биосинтезу фермента и росту биомассы получаются на среде, состоящей из мелассы (6 %) и  $\text{NaNO}_3$  (0,9%). В качестве источников фосфора применяют соли калия, аммония, натрия фосфорной кислоты. Наилучшим источником фосфора является  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ . Посевной материал должен вноситься в среду в количестве 0,5 % на 36 ч роста культуры, рН среды в начале роста культуры должен быть 6,0, температура – 28–33°C, аэрация –  $1,4 \text{ г O}_2/(\text{л} \cdot \text{ч})^{-1}$ , длительность культивирования составляет 120 ч. На основе фильтрата культуральной жидкости традиционными способами получают очищенные препараты  $\beta$ -фруктофуранозидазы. рН ферментного раствора должен быть 5,8–6,8. Фермент достаточно хорошо осаждается органическими растворителями. Под действием этанола (1:4) осаждается до 90 % фермента в активном состоянии, изопропанола (1: 2) – 88 % и ацетона (1: 2) – 91 %. При высаливании сульфатом аммония при насыщении 0,8 фермент переходит в осадок почти полностью (99,3 %).

### **3.3.5. Характеристика отечественных ферментных препаратов**

Название препаратов состоит из двух частей: первая соответствует виду основной активности, вторая – видовому названию продуцента.

Препараты, выделенные из глубинной культуры, имеют в индексе букву «Г» (глубинный), из поверхностной – «П» (поверхностный). Далее следует цифровой индекс, который характеризует сте-



пень концентрирования фермента в препарате по отношению к культуральной жидкости или твердофазной культуре. Так, препараты с индексом «ГЗ» должны иметь активность в ед/г в 3 раза выше, чем средняя активность культуральной жидкости в ед/мл. Устанавливается стандартная активность препарата, соответствующая этому соотношению.

Препараты, содержащие комплекс ферментов, где важно соотношение компонентов комплекса, характеризуются по двум и более видам активности. При этом цена устанавливается в соответствии с основной активностью, обычно являющейся интегральной.

Индексом «Гх» обозначается неочищенная культуральная жидкость продуцента фермента.

Препараты с индексом «ГЗх» получают путем распылительной сушки концентрированной культуральной жидкости.

Препараты с индексом «ГЗх» являются неочищенными. Они имеют высокую степень микробной обсемененности, порядка  $10^{10}$  спор или клеток в 1 г. Это ограничивает сферу применения. В пищевой промышленности препараты «ГЗх» используются в тех же технологиях, что и «Гх».

Индекс «ГЗх-Ф» присвоен препаратам, которые получают путем распылительной сушки концентрированного фильтрата культуральной жидкости. Препараты «ГЗх-Ф» являются частично очищенными, так как при фильтрации из культуральной жидкости удаляется биомасса и часть балластных веществ. В пищевой промышленности препараты «ГЗх-Ф» используют наряду с более чистыми – «Г10х».

Индекс «Г10х» имеют препараты, полученные путем осаждения органическими растворителями из концентрированных фильтратов культуральной жидкости.

Препараты «Г10х» имеют значительно более высокую чистоту, чем «Гх», «ГЗх», «ГЗх-Ф». Это выражается как в активности ферментов на 1 г препарата, так и в удельной активности на 1 г белка. Микробная обсемененность препаратов «Г10х» регламентируется на уровне  $10^4$ – $10^5$  спор или клеток в 1 г. Этот показатель зависит в основном от качества фильтрации и выдерживается далеко не всегда.

Препараты с индексом «Г20х» получают с применением ультрафильтрации – способа концентрирования, основанного на разделении веществ различной молекулярной массы с помощью полупроницаемых мембран с определенным размером пор. Ультрафильтрации подвергают предварительно очищенные ферментные растворы, сво-

бодные от клеток микроорганизмов и взвешенных частиц. Культуральную жидкость очищают и фильтруют так же, как при получении препаратов «Г10х»

Препараты с индексом «Г20х» применяют при производстве пищевых продуктов и напитков.

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

### Амилолитические препараты

Амилолитические препараты широко выпускаются в нашей стране и за рубежом. В основном это крупнотоннажное производство. Амилазы находят применение почти во всех областях, где перерабатывается крахмалсодержащее сырье. Амилазы используют для осахаривания зернового и картофельного крахмала. Самым большим потребителем амилолитических ферментов являются спиртовая и пивоваренная промышленность, где в настоящее время солод (пророщенное зерно) успешно заменяется амилолитическими ферментными препаратами. Эти препараты используются в хлебопечении, а также в крахмало-паточном производстве для получения различных видов паток, глюкозы и глюкозо-фруктозных сиропов. Амилазы используются для улучшения качества концентратов и быстрорастворимых блюд.

### Пектолитические препараты

Пектолитические ферменты широко используются в различных отраслях народного хозяйства. Процесс гидролиза пектиновых веществ имеет большое значение для переработки плодов, ягод и овощей. Использование пектолитических ферментов позволяет резко повысить сокоотделение при производстве осветленных соков из плодов и ягод, особенно из тех, которые не имеют собственных пектолитических ферментов и содержат повышенные количества пектина. К таким плодам можно отнести сливу, алычу, абрикосы, персики, груши и др. Использование пектолитических ферментов позволяет на 5–25 % повысить выход сока с единицы перерабатываемого сырья, что дает очень высокий экономический эффект. При изготовлении

фруктово-ягодных напитков с мякотью с помощью пектолитических ферментов можно снять нежелательный желирующий эффект, который не позволяет получать концентрированные жидкие соки из-за высокого содержания пектина. Пектолитические ферменты используются в виноделии для увеличения выхода сока из сырья и интенсивности окраски. Есть данные об использовании пектиназ, обладающих мацерирующим действием, в пищевой технологии для размягчения тканей плодов и овощей, что резко повышает их усвояемость. Пектиназы можно использовать для снятия слизистого покрытия кофейных бобов и т. д.

Препараты пектинрасщепляющего действия: «Пектаваморин П10х» и «Пектаваморин Г10х», «Пектофоетидин П10х», «Пектофоетидин Г20х», «Мацербациллин Г3х», «Мацерин Г10х», «Эндополигалактуроназа Г10х».

### Целлюлолитические препараты

Ферментные препараты, способные разрушать целлюлозу, в ближайшее время найдут широчайшее применение в самых разных отраслях производства. В связи с ростом народонаселения Земли и активным поиском источников пищевых ресурсов на основе растительного сырья возрос интерес к целлюлозосодержащему сырью, возобновляемые запасы которого почти безграничны. Гидролиз целлюлозы дает глюкозу, которую можно использовать для производства пищевых белковых препаратов, а также она может стать исходным продуктом для производства глюкозо-фруктозных сиропов. Известны промышленные способы гидролиза древесины до глюкозы, но они приводят к частичной деградации глюкозы и образованию нежелательных примесей, от которых необходимо освободиться. Для проведения кислотного гидролиза требуется дорогое, стойкое к коррозии оборудование. Поэтому наиболее перспективным является использование целлюлаз для гидролиза целлюлозосодержащего сырья. Целлюлолитические ферменты с успехом применяют в самых различных производствах (спиртовая, пивоваренная, пищевконцентратная промышленность, хлебопечение и др.), где сырьем являются растительные материалы или отходы переработки растений. Использование целлюлаз повышает выходы целевого продукта и позволяет подойти к созданию безотходных технологий. Целлюлолитическим ферментам принадлежит большое будущее. Однако целлюлоза – очень сложный субстрат для действия ферментов, и в мире нет пока проду-

центов, которые бы в полной мере удовлетворяли потребности отраслей, применяющих целлюлазы.

Препараты цитолитического действия: «Целловиридин Г20х», «Целловиридин Г3х», «Целлоконингин П10х», «Целлолигнорин П10х», «Целлобранин Г3х», «Целлюлаза-100».

### Гемицеллюлазные препараты

Гемицеллюлазные ферментные препараты с успехом применяются в спиртовом, пивоваренном производствах, а также в других отраслях, использующих отходы сельского хозяйства и растительное сырье. Эффект от применения этих препаратов заключается в том, что они позволяют повысить выход ряда традиционных продуктов без дополнительных затрат на сырье за счет появления дополнительных резервов сахаров в обрабатываемом сырье в результате гидролитического расщепления гемицеллюлоз.

Производство этих препаратов следует отнести к перспективным и многотоннажным. Значимость их почти такая же, как амилолитических и целлюлолитических ферментных препаратов.

Препараты гемицеллюлазного действия: «Ксилаком» («Ксилоглюканофоеитин П10х»), «β-Глюканаза Г10х», «β-Маннаназа Г10х», «Вильзим АК Г20х» («Ксиланаза Г20х»), «Поликанесцин Г20х».

### Липолитические препараты

Липазы представляют большой интерес для многих отраслей народного хозяйства, где необходим частичный или полный гидролиз жиров и масел. Однако широкого применения микробные липазы не имеют.

Есть работы, указывающие на положительный эффект при приготовлении безалкогольных напитков. Завоевывает права гражданства новая технология при производстве глицерина, жирных кислот, моно- и диглицеридов с использованием растворимых и иммобилизованных микробных липаз. Большие надежды возлагают специалисты на использование липаз в пищевой промышленности. Широкое применение липаз в настоящее время сдерживается в основном в связи с отсутствием стабильных и высокопродуктивных микроорганизмов, которые можно было бы эффективно внедрять в производство.

Ферментные препараты липолитического и литического действия: «Липоризин Г3х», «Липоэрузин Г3х», «Липоэрузин Г20х», «Лизоцим Г3х», «Лизосубтилин Г10х», «Фермосор».

Мультиэнзимные композиции и премиксы: «МЭК ПП-1 для пивоварения», «Амилотротосубтилин», «МЭК-1 для виноделия».

### Протеолитические препараты

Протеолитические ферменты выпускаются промышленностью в большом количестве, это крупнотоннажное производство. Протеиназы применяются в пищевой технологии, где идет процесс с использованием микроорганизмов (дрожжи, молочнокислые бактерии и др.). Введение в процесс протеиназ позволяет в результате гидролиза белков обрабатываемого сырья обеспечить дрожжам нормальные условия жизнедеятельности, что улучшает весь технологический процесс, особенно в пивоварении, спиртовой промышленности, виноделии. В ряде исследований показано, что протеолитические ферменты могут использоваться в хлебопечении для уменьшения длительности замесов при производстве заварных сортов хлеба и специальных изделий, изготавливаемых из муки с сильной клейковиной. Внесение в тесто небольших количеств амилаз и протеиназ увеличивает газообразование, улучшает аромат, цвет корочки и мякиша, позволяет сократить процесс тестоведения. Широко применяются протеиназы для снятия различного рода белковых помутнений в пивоварении и виноделии и для ускорения фильтрационных процессов. В кулинарии используются не только микробные протеиназы, но и протеиназы, получаемые из растительного сырья. Высокоочищенные протеолитические ферменты могут с успехом использоваться в крахмало-паточной промышленности для выделения особенно чистого крахмала без сопутствующих белков.

Комплексные ферментные препараты, содержащие протеиназы, используются в пищевых концентратной и консервной промышленности при приготовлении концентратов из трудноразвариваемых круп, гороха, фасоли и др.

Амилотротосубтилитические ферментные препараты: «Амилосубтилин Г3х», «Амилосубтилин Г10х», «Амилотротосубтилин Г18х», «Амилоризин П10х», «Амилотротосубтилин Г10х» и «П10х», «Глюкаваморин Г20х», «Глюкоамилаза очищенная», «Протосубтилин Г3х», «Протосубтилин Г10х», «Кислая протеаза Г10х».

Препараты гидролаз олигосахаридов: «Лактоканесцин Г20х», «Галактосил».

Препараты изомераз сахаров: «Имфрузим».

### 3.4. Продукты ферментативной биоконверсии

#### Натуральные пищевые красители

*Пищевые красители* – основная группа веществ, применяемых для окрашивания пищевых продуктов практически всеми пищевыми предприятиями. Натуральные пищевые красители выделяют из различных частей дикорастущих и культурных растений, отходов переработки растительного сырья на винодельческих, сокопроизводящих и консервных заводах, а также получают путем химического или микробиологического синтеза. Технологии выделения натуральных пищевых красителей различны и зависят от вида сырья, свойств извлекаемых красителей, вида сопутствующих веществ. Их экстрагируют из природного сырья соответствующими растворителями, полученные экстракты очищают, концентрируют.

Способ выделения пищевых красителей из растительного сырья выбирают в зависимости от вида и состава сырья, свойств пигмента. Обычно красящие вещества извлекаются из сырья путем экстракции водой или водными растворами этанола. Липофильные красители – хлорофиллы и каротиноиды – выделяются неполярными растворителями и растительными маслами. Главным источником каротиноидов являются различные виды растительного сырья, где эти соединения находятся в виде комплексов. Природные комплексы каротиноидов обладают высокими стабильностью, биологической активностью и усвояемостью.

Существующие способы выделения препаратов каротиноидов из растительного сырья немногочисленны и в большинстве своем основаны на прямой экстракции целевого компонента маслами или органическими растворителями. Сложность выделения каротиноидов заключается в том, что представители этого класса соединений находятся в растительном сырье в ассоциации с различными биополимерами.

Применение в пищевой промышленности препаратов каротиноидов ограничено гидрофобностью этих пигментов. Повышения гидрофильности возможно достигнуть путем сорбции каротиноидов на гидрофильный агент (пектин, белок и т.д.). Введение каротиноидов в пищевые продукты в сорбированном на биополимерах виде позволяет повысить пищевую ценность изделий, обогатить их цветовую гамму и значительно расширить сферу применения гидрофобных пигментов.

Основными нелипидными компонентами томатного сырья, с которыми связаны каротиноиды, являются целлюлоза, гемицеллюлоза, пектин, белок, в соответствии с этим в качестве гидролизующих агентов используют ферментные препараты с пектолитической, целлюлолитической и протеолитической активностями. При использовании в качестве гидролизующих агентов препаратов «Целлюлаза 100» и «Пектофоетидин П10х» выход каротиноидов в масло возрастает в 1,6–2,3 раза по сравнению с выходом при прямой экстракции и составляет в зависимости от вида сырья 79–88 % их содержания в исходном продукте. «Целлюлазу 100» рекомендуют использовать для ферментативного гидролиза томатной пасты, свежих томатных выжимок, томатной кожуры, а «Пектофоетидин П10х» – для ферментативной обработки свежих томатов и томатной мякоти.

Масляные экстракты каротиноидов достаточно устойчивы при хранении. Экстракты из сырья, подвергнутого ферментативной обработке, более устойчивы по сравнению с их аналогами из не обработанного ферментами сырья.

Возможна интенсификация процессов выделения и других пищевых красителей из природного сырья с помощью ферментных препаратов. Например, существует способ получения красного пищевого красителя из сока, выжимок и непосредственно из измельченной краснокочанной капусты среднепоздних сортов. Сырье стерилизуют и подвергают воздействию гемицеллюлазных ферментов гриба *A.niger*. После окончания гидролиза выжимки отделяют, а гидролизат фильтруют и упаривают.

Используется способ получения натуральных пищевых красителей путем обработки отходов переработки свеклы, апельсинов и крапивы ферментными препаратами: «Поликанесцином», «Лизофунгином», «Целловиридином».

### Продукты гидролиза крахмала

При гидролизе (осахаривании) крахмала происходит его деструкция и образование продуктов с различной молекулярной массой (декстрины, мальтоза, глюкоза). Гидролизаты крахмала – продукты частичного гидролиза кукурузного, пшеничного или картофельного крахмала разбавленными кислотами, ферментами или теми и другими.

Технология сахаристых продуктов из крахмала имеет единую принципиальную схему, включающую три последовательные стадии: клейстеризация-разжижение крахмала, осахаривание, изомеризация

глюкозы. Отдельные продукты получают, используя только первую, или первую и вторую, или все три стадии.

При кислотной конверсии не достигается полное осахаривание крахмала, выход глюкозы не превышает 70 %, в гидролизатах образуются продукты реверсии и термического разложения углеводов, снижающие качество и выход сахаристых продуктов. Кислотный гидролиз иногда используется в биоконверсии крахмала на стадии разжижения.

Ферментативный способ переработки крахмала (рис. 22), основанный на последовательном применении  $\alpha$ -амилазы *B. subtilis* («Амилосубтилин») и амилоглюкозидазы *Asp. oryzae* («Амилоризин») или *Asp. niger* («Амилонигерин»), имеет преимущества перед кислотным: увеличение скорости процесса; уменьшение уровня загрязнения продуктами реверсии; получение продукта с высоким декстрозным эквивалентом (ДЭ). Технология ферментативного разжижения крахмала в различных модификациях используется для получения мальтодекстринов с содержанием редуцирующих веществ (РВ) 5–27 %.

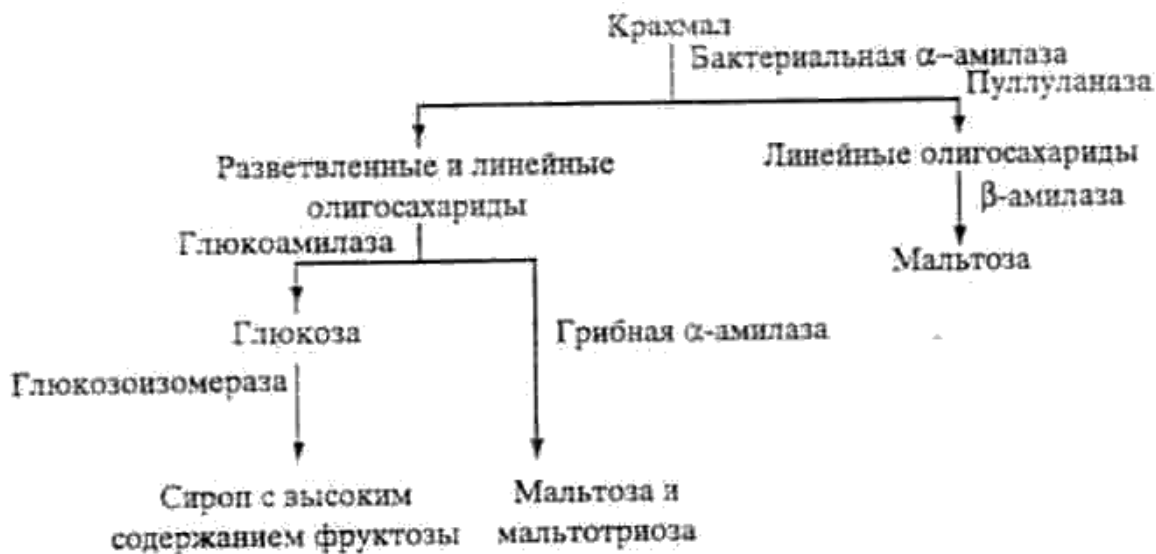


Рис. 22. Схема ферментативной переработки крахмала в промышленных условиях

Мальтин – продукт с РВ 5–8 %, получаемый путем декстринизации картофельного или кукурузного крахмала в одну стадию с использованием «Амилосубтилина Г10х». Мальтин обладает свойством образовывать прочные гели, которые обратимо разрушаются при повышении температуры, что позволяет применять его взамен жиров в



составе майонезов, кремов или тортов, как замутнитель при производстве безалкогольных напитков.

Мальтодекстрины – продукты с РВ до 25 %, получают по двухстадийной схеме разжижения крахмала, с промежуточной термообработкой, используя препарат «Амилосубтилин Г10х». Мальтодекстрины применяют в составе майонезов, маргаринов, кремов для тортов, суповых концентратов, кондитерских изделий.

Продуктами неполного осахаривания крахмала глюкоамилазой являются различные виды патоки. Основные операции при получении крахмальной патоки: подготовка крахмала, ферментативный гидролиз крахмала, инактивация ферментов, очистка полученных сиропов и их уваривание.

Низкоосахаренная патока с РВ 28–32 % содержит около 10 % глюкозы, 40 % олигосахаридов со степенью полимеризации 4–6, по 20 % мальтозы и мальтотриозы, а также олигосахариды со степенью полимеризации 7 и более. Применяется при производстве карамели, а так же, как углеводный компонент лечебных чаев.

Карамельная патока с РВ 38–44 % содержит 19–23 % глюкозы, около 24 % мальтозы, 20 % мальтотриозы, не более 20 % олигосахаридов со степенью полимеризации 4–6. Применяется при производстве леденцовой карамели.

Высокоосахаренная патока может содержать от 44 до 70 % РВ. При РВ 55–60 % в ней содержится 34–40 % глюкозы, 24 % мальтозы, не более 13 % мальтотриозы, незначительные количества олигосахаридов с более высокой степенью полимеризации. Используется при производстве хлебобулочных, кондитерских изделий, фруктовых консервов, столовых сиропов, пива.

Высокомальтозная патока – продукт  $\beta$ -амилолиза разжиженного 30–35 %-го крахмала с использованием бактериальной  $\beta$ -амилазы, например, из *B. polymyxa*. Содержание РВ 48–49 %, общее содержание сбраживаемых сахаров 70–75 %. Высокомальтозная патока используется взамен сахарозы при производстве леденцовой карамели и мороженого.

Глюкозно-мальтозная патока характеризуется примерно равным содержанием глюкозы и мальтозы при РВ 66,8–70 %. Повышение содержания мальтозы, по сравнению с высокоосахаренной патокой, достигается за счет действия грибной  $\alpha$ -амилазы «Амилоризина». Фермент расщепляет крахмал с образованием мальтозы в качестве основного продукта реакции. Патока характеризуется высокой сбра-

живаемостью, некристаллизуемостью и стабильностью к микробиологической порче. Она может применяться в составе различных пищевых продуктов.

Глюкозный сироп, очищенный фильтрацией через кизельгур, активированный уголь и ионообменные смолы, концентрируют упариванием при 60 °С до содержания сухих веществ (СВ) 45 %. Концентрированный продукт является субстратом для изомеризации. Процесс изомеризации проводят при рН 7,8 и температуре 58–60 °С с использованием препарата «Имфрузим». В продукте конверсии содержится 42–43 % фруктозы, 51–52 % глюкозы. После очистки на ионообменниках и активированном угле продукт уваривают до концентрации сухих веществ 71 %.

### Концентраты пищевых волокон

Получение препаратов пищевых волокон основано на их выделении из растительного сырья и последующей очистке. Известные методы выделения пищевых волокон включают удаление из измельченной растительной ткани низкомолекулярных веществ (моносахаридов, гликозидов, алкалоидов, минеральных соединений) либо гидролиз и экстракцию сопутствующего крахмала. Выбор метода выделения пищевых волокон из растительного сырья определяется их содержанием и плотностью упаковки биополимеров клеточных стенок. В зависимости от вида перерабатываемого сырья экстракция низкомолекулярных веществ и крахмала ведется водой при нагревании (выжимки и вытерки ряда овощей, фруктов, винограда), разбавленными растворами минеральных кислот (серной, хлоридной, фосфорной), щелочами (отруби, мучки, отходы переработки овощей), солями сернистой кислоты, пероксидами, детергентами (стебли злаков, пленки, оболочки зерна, травы), либо крахмал разрушают амилолитическими ферментами. Нагревание сырья при температурах около 100 °С с разбавленными растворами кислот приводит к деструкции крахмала, частичному гидролизу полисахаридов гемицеллюлоз. Последующая отмывка водой позволяет удалить низкомолекулярные вещества. Выделенные пищевые волокна отличаются от исходного сырья увеличенной внутренней поверхностью, повышенной способностью к сорбции и достаточной чистотой. Одновременно идет полная инактивация микрофлоры, в том числе патогенной, что повышает качество получаемых пищевых добавок.

Выделение пищевых волокон возможно при нагревании сырья с детергентами – поверхностно-активными веществами, используемыми в малых концентрациях при небольших температурах. В более жестких условиях идет распад макромолекул пищевых волокон. С помощью ферментативной обработки сырья (рис. 23) получают наименее деструктурированные пищевые волокна. В этом случае его последовательно обрабатывают амилолитическими (для удаления крахмала), а затем протеолитическими (для удаления белков) ферментами ( $\alpha$ -амилаза, глюкоамилаза, протеаза и др., в количествах от 0,4 до 1 мг/дм<sup>3</sup>).

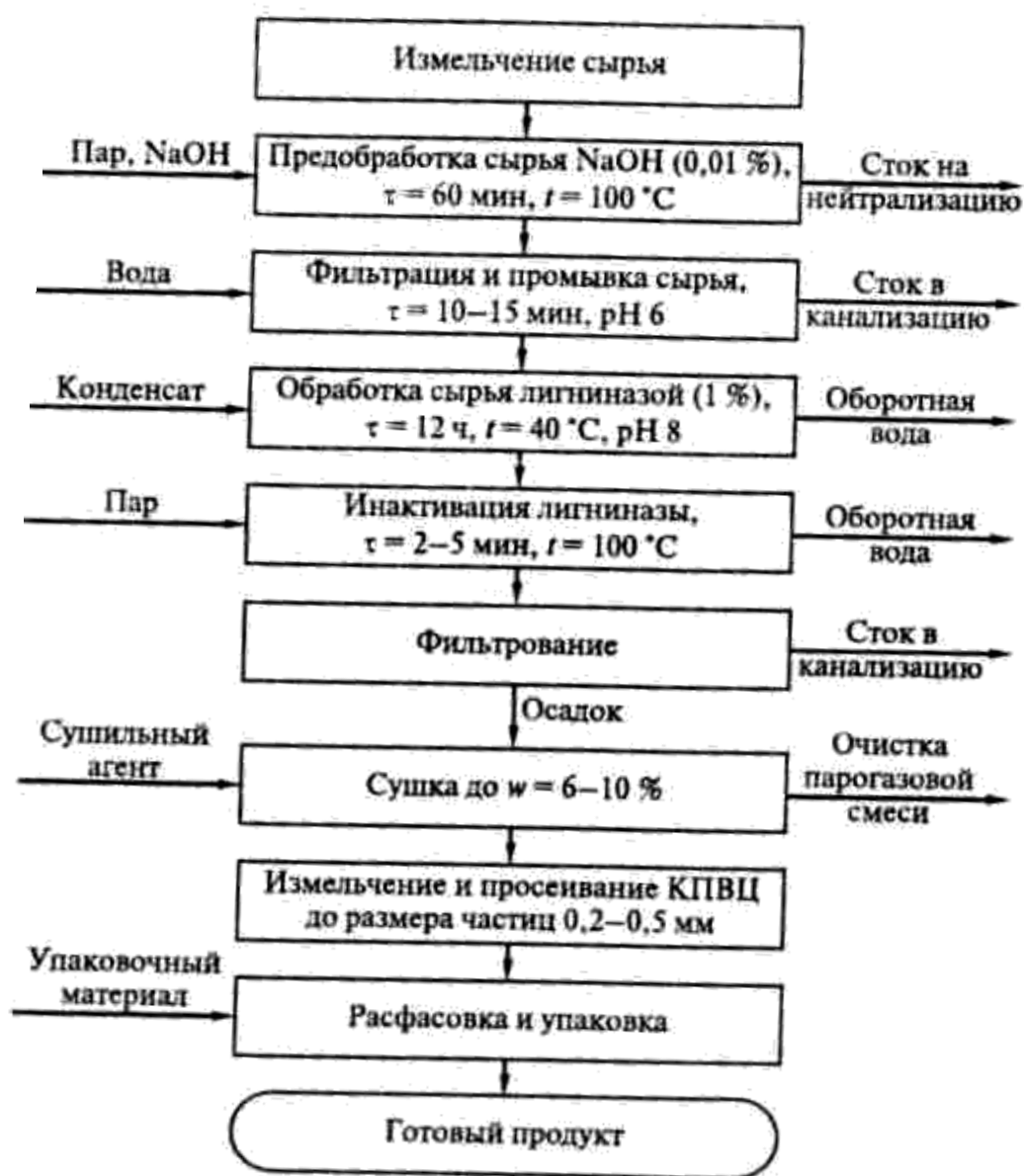


Рис. 23. Принципиальная технологическая схема процесса получения концентрата пищевых волокон из растительного сырья

С использованием ферментативных методов выделены концентраты пищевых волокон из вторичных ресурсов переработки зерна, овощей, фруктов и отходов их переработки, вторичных ресурсов переработки винограда.

Пищевые волокна можно непосредственно давать человеку в рассыпном виде либо в виде таблеток или вводить их в количестве 5–10 % в хлеб, булочки, печенье, овощные консервы, различного вида пищевые концентраты.

### Полуфабрикаты для алкогольных и безалкогольных напитков

При производстве полуфабрикатов безалкогольных (сиропов, экстрактов, концентрированных основ), а также алкогольных напитков применяется ферментация растительного материала. Мезгу плодов и овощей обрабатывают ферментными препаратами пектолитического и целлюлолитического действия, предварительно подогрев ее до 80–85 °С для инактивации окислительных ферментов. При получении экстрактов для каждого вида сырья подбирают оптимальные условия: соотношение жидкой и твердой фазы, температурный режим, РН среды, комплексы ферментных препаратов. Для корневищ это цитопекто-протоамиллитический комплекс, для трав – цитопектопротеолитический. Так, для приготовления морса из чернослива в дробленое сырье вносят водный раствор мультиэнзимной композиции, состоящий из 0,5 % «Пектофоептидина П10х» (активность 9 ед/г) и 0,005 % «Целловиридина Г10х». Ферменты также используются и на других стадиях производства полуфабрикатов для напитков. Существует технология получения виноградного сиропа как основы безалкогольных напитков и мороженого с использованием фермента сырья –  $\beta$ -фруктофуранозидазы. С помощью фермента гидролизуется сахароза, которую вносят в виноградное сусло при приготовлении сиропа.

### Пектин

Традиционная технология получения пектина основана на кислотнo-термическом гидролизе и последующем спиртовом осаждении из гидролизата. Использование ферментных препаратов существенно упрощает технологический процесс получения пектина и его аппаратное оформление, сокращает расход этанола на стадии вы-

деления пектина. С этой целью используют целлюлазы и гемицеллюлазы или пектолитические ферменты. Гидролиз пектолитическими ферментами приводит к удалению с помощью эндополигалактуроноаз фрагментов полигалактуроновой кислоты из состава протопектина. При этом структура комплекса целлюлозы и гемицеллюлозы не затрагивается, что физически затрудняет процесс экстракции пектина и позволяет получать его препараты с более высоким относительным содержанием полигалактуроновой кислоты. Большинство полигалактуроноаз эндотипа синтезируются в сочетании с пектинэстеразой, которая необходима для проявления их активности. В препаратах пектолитических ферментов соответственно присутствуют оба вида фермента. При гидролизе растительного сырья пектолитическими препаратами происходит не только вырезание фрагментов полигалактуроновой кислоты, но и частичная деэтерификация последней. Это оценивается положительно в тех случаях, когда получают пектин лечебно-профилактического назначения с высокой комплексообразующей способностью. При получении пектинов-структурообразователей важно сохранить высокую степень этерификации, поэтому целесообразно использовать первый путь ферментативного гидролиза сырья.

При гидролизе целлюлозы облегчается выход комплекса полигалактуроновой кислоты и гемицеллюлоз из клеточных стенок. Гидролиз гемицеллюлоз приводит к повышению содержания полигалактуроновой кислоты в выделяемом пектине. При отсутствии в используемых ферментных препаратах пектолитических ферментов полигалактуроновая кислота пектина не расщепляется, а степень ее этерификации не изменяется. Получаемый пектин содержит частично метоксилированную полигалактуроновую кислоту, ковалентно связанную с фрагментами гемицеллюлозы, поскольку полное отщепление нейтральных полисахаридов обычно не достигается. Одновременно с этим из сырья выделяются растворимые формы пектина, если они не извлечены на предшествующих стадиях переработки сырья.

Существует способ получения пектина из выжимок (яблок, груш, айвы и др.), основанный на гидролизе сырья «Целловиридином ГЗх». В препарате практически отсутствует пектолитическая активность. Гидролиз свежего сырья проводят в течение 2–3 ч при температуре 45–50 °С, гидромодуле 1 : 3 и дозе препарата 0,1–0,3 % массы сырья. При гидролизе в экстракт переходит 85–90 % пектина, который представлен в виде как пектиновой кислоты, так и протопектина. При

гидролизе этого же сырья «Целловиридином Г20х» в дозе 5,7–6,5 ед. целлюлазы на 1 г СВ сырья в течение 2–3 ч получают пектин со степенью этерификации 88 %. Из экстракта получают концентрированные жидкие или спиртоосажденные препараты пектина. Способ применим и к другим видам сырья (выжимки смородины и рябины).

Пектинрасщепляющие ферментные препараты («Пектомацерин Г10х» и «Пекталлиацин Г10х») используют для выделения пектина из цитрусовых выжимок.

Способ получения пектина из тыквенного жома, который является отходом производства тыквенного сока, применяют с использованием ферментного препарата «Пектаваморин». Ферментный препарат обладает целлюлазной,  $\beta$ -глюкозидазной, эндополигалактуроназной и пектинэстеразной активностями. Полученный тыквенный био-пектин эффективно образует комплексы с тяжелыми металлами и может быть использован при производстве функциональных продуктов питания.

### **Контрольные вопросы к разделу 3**

1. Что такое специфичность фермента?
2. Зависимость активности фермента от температуры.
3. Назовите факторы, влияющие на снижение энергии активации ферментативной реакции.
4. Какие ферменты катализируют гидролитические реакции?
5. Цель применения в технологии пищевых продуктов негидролитических ферментов.
6. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.
7. Какие изомеры токоферола обладают наибольшей оксидантной способностью?
8. Ферменты, катализирующие расщепление лигнина.
9. Какой фермент используется при получении циклодекстринов из крахмала?

## 4. МИКРОБНАЯ БИОКОНВЕРСИЯ

### 4.1. Сырье для микробной биоконверсии

В качестве основных источников сырья для микробной биоконверсии используют отходы пищевой промышленности и сельскохозяйственного производства. Растительные отходы сельского хозяйства: кукурузная кочерыжка, подсолнечная лузга, рисовая и хлопковая шелуха.

Хлопковая шелуха представляет собой твердую оболочку семян хлопчатника, покрытую короткими волокнами хлопка. Состав хлопковой шелухи зависит от сорта хлопчатника. Она содержит 36–48 % целлюлозы, 20–31 – лигнина и 21–28 % пентозанов. Средний выход шелухи при шелушении хлопковых семян 31,4 % их массы.

Кукурузная кочерыжка – это стержень, остающийся после отделения кукурузных зерен от початков. Выход кочерыжки – 25–35 % массы початков. Состав стержней в среднем следующий (в % к массе стержней): вода – 8, сырой протеин – 2,8, сырой жир – 0,7, безазотистые экстрактивные вещества – 54,7, сырая клетчатка – 32,8, зола – 1.

Подсолнечная лузга – отход при производстве масла из семян подсолнечника. Выход ее составляет 30–40 % массы семян. Подсолнечная лузга содержит 1,4 % богатого углеродом пигмента фитомелана, 23,6–28 пентозанов, 52–66 – клетчатки, 24,8–29,6 лигнина, 31–42,4 % целлюлозы.

Рисовая шелуха содержит 18 % легко- и 29 % трудногидролизуемых полисахаридов. Общий выход РВ 50–58 %.

Морские водоросли в Японии предложено использовать комплексно. При кислотном гидролизе водорослей образуются альгиновая кислота, витамины, пигменты и белки, на гидролизатах возможно культивирование микроорганизмов – продуцентов белка. При обработке щелочью и  $Al_2(SO_4)_3$  получают маннит, йод, калий и фукоидин. Сами водоросли после промывки и сушки могут служить для пищевых целей или основой питательной среды для микроорганизмов – продуцентов белка.

Хорошим, но очень небольшим источником углеводов являются отходы пивоварения: пивная дробина, солодовые ростки, отходы подработки несоложенного ячменя. К отходам картофелекрахмального производства, используемым в качестве сырья для выращивания

микроорганизмов, относятся клеточный сок картофеля и соковые воды, промывные воды после гидросмыва крахмала и мезга.

Клеточный сок картофеля содержит до 6 % сухих веществ, его объем доходит до 50 % к массе перерабатываемого картофеля. Клеточный сок картофеля содержит аминокислоты, оксид калия, фосфорную кислоту, соединения кальция и магния. Уровень использования клеточного сока картофеля в настоящее время составляет около 33 %.

Соковые воды содержат 0,6–1,0 % сухих веществ следующего состава (в %): белки – 28, азотистые небелковые вещества – 22, углеводы – 38, минеральные вещества – 12. Этих вод накапливается до 600 % к массе перерабатываемого картофеля.

Промывные воды после гидросмыва крахмала содержат до 0,16 % крахмала; количество их составляет 170–270 % к массе перерабатываемого крахмала.

Картофельная мезга содержит (в % к массе сухих веществ): крахмал – 50, клетчатку – 25, растворимые углеводы – 2,5, минеральные вещества – 6,2, сырой протеин – 6 и прочие вещества – 10,3. Влаг в мезге – 86–87 %, что делает ее малотранспортабельной. Концентрация клетчатки и крахмала в этом виде сырья низка, гидролиз его экономически неоправдан. На этом сырье культивируют микроорганизмы, обладающие гидролитическим комплексом ферментов и использующие при росте биополимеры.

Свекловичная меласса – отход производства сахара из свеклы (выход 3,5–5 % к массе свеклы), богата органическими и минеральными веществами, необходимыми для развития микроорганизмов. Она содержит 45–50 % сахарозы, 0,25–2,0 – инвертного сахара, 0,2–3,0 % рафинозы. Из азотистых веществ в мелассе содержатся бетаин, пирролидонкарбонная, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, изолейцин, аланин, валин, из органических кислот – молочная, муравьиная, уксусная, масляная, лимонная. В малых количествах в ней содержатся кобальт, железо, свинец, бор, цинк, кремний, серебро, йод, марганец, молибден. Свекловичная меласса представляет собой дорогое и дефицитное сырье.

Мелассная барда является отходом производства этанола на мелассе и содержит 6–12 % сухих веществ. Это полноценное сырье. В настоящее время используется более 70 % первичной послеспиртовой мелассной барды.



Зерновая и картофельная барда – отход спиртового производства. Состав зерновой и картофельной барды различен. Первая содержит 3,2–4,1 % сухих веществ, вторая – 6,7–8 %. В сухих веществах картофельной барды меньше протеина, чем в зерновой (18,7–19,5 % против 26,8–27,5), меньше жиров (3,1 % против 5,9–7,5). Картофельная барда богаче зерновой по содержанию углеводов (56,2–58,5 % против 40–41,8). Больше в ней и минеральных веществ. Отходы консервной промышленности разнообразны. В нашей стране ежегодно в консервы перерабатывается 4 млн т овощей и плодов, при этом образуется 700–800 тыс. т отходов и вторичных продуктов. Отходы разнородны, нестандартны, отличаются по химическому составу не только в зависимости от вида сырья, но и от степени зрелости, условий хранения, вида изготавливаемой продукции.

В основном томаты идут на производство концентрированных томатопродуктов и томатного сока. В первом случае общее количество отходов составляет 4–5 % к массе сырья. Количество пульпы в отходах – 51–78 %, семян – 6–14, кожицы – 6–13, сосудистых волокон – 1–3, связанной воды – 8–16 %.

При производстве томатного сока отжимают около 65 % сока и мякоти к массе сырья. Остальные 35 %, идущие в отходы, состоят на 88 % из мякоти и сока и на 12 % из кожицы и семян. На растворимую часть в отходах приходится 2,5–5 %. Рациональным способом хранения и использования отходов томатного производства является их высушивание и получение из них муки.

Отходы переработки зеленого горошка – это ботва и створки. Выход зерен горошка составляет 15–20 % скошенной массы. Отходы содержат до 40 % безазотистых экстрактивных веществ, до 11 % минеральных веществ и другие соединения. Отходы могут использоваться для получения микробных белковых препаратов.

Отходы переработки капусты, моркови, свеклы и других овощей – это ботва, очистки, испорченные овощи и т.п. Ежегодно этих отходов получают около 100 тыс. т. Отходы составляют от массы перерабатываемых овощей (в %): капуста – 22,5, морковь – 17–20, свекла 24–29 и т.д. Эти отходы используются для получения микробных белковых препаратов.

Отходы овощесушильного производства подразделяют на твердые и жидкие. К твердым относят мелкие некондиционные клубни картофеля, снятую при чистке кожицу, глазки, мелкие частицы, получаемые при сушке, инспекции и фасовке, к жидким – промывные

воды, получаемые при бланшировании, варке и других операциях, а также мезгу. Отходы при переработке картофеля составляют 25–45 % всех отходов овощесушильного производства. Это прекрасное сырье для производства белковых препаратов и крахмала.

Отходы переработки плодов состоят из выжимок, получаемых при прессовании, вытерок, остающихся при приготовлении соков с мякотью, очисток, остающихся при варке компотов, варенья, джемов и т.д. Эти отходы являются полноценной средой для выращивания микроорганизмов. При переработке яблок отходы составляют около 30–34 %. При приготовлении сока из винограда образуется до 18 % виноградных выжимок, состоящих на 43–45 % из кожицы с остатками мякоти, на 22–32 % из семян и на 24–26 % из гребней. Выжимки содержат примерно 5 % сахара.

При выработке соков и компотов из citrusовых образуется около 60 % отходов к общей массе плодов. В них содержится ряд ценных веществ: эфирное масло (1,2 %), пектиновые вещества (1,5–2 %) и гесперидин (1,2–1,5 %).

В США из отходов производства соков из citrusовых получают эфирные масла. Оставшиеся выжимки измельчают, обрабатывают известью до pH 6, затем аммиаком и прессуют. Фильтрат используют в качестве питательной среды для дрожжей.

Отходы винодельческой промышленности – это гребни, виноградные выжимки, семена, дрожжевые осадки. Смоченные сушлом гребни содержат 1–1,5 % сахара, до 2,4 % минеральных веществ, азотистые вещества.

Виноградные выжимки содержат 4–10 % сахара, азотистые, пектиновые, дубильные вещества, жиры, клетчатку, до 1,2–3,6 % минеральных веществ и могут использоваться в составе сред для выращивания дрожжей. Ежегодный объем виноградных выжимок в стране около 0,6 млн т.

Дрожжевой осадок составляет 3–8 % объема вина и содержит (в % на сухое вещество): минеральные вещества – 5–10, углеводы – 25–50, азот 5–12, белковые вещества 30–75 и жиры 2–5. Из дрожжевого осадка получают этанол, высшие спирты, альдегиды.

## 4.2. Технология микробной биоконверсии

### Предварительная обработка сырья

**Ферментативный гидролиз.** Разложение целлюлозы микроорганизмами происходит под действием комплекса микробных внеклеточных целлюлолитических ферментов. Это сложный и медленно текущий процесс, осуществлению которого мешают многие факторы, например, присутствие в реакционной среде лигнина и продуктов его частичного гидролиза.

**Химический гидролиз.** Наиболее активными химическими катализаторами реакции гидролиза полисахаридов растительной ткани являются минеральные кислоты и щелочи. При обработке растительного сырья кислотой лигнин остается нерастворимым, а целлюлоза и гемицеллюлозы гидролизуются. Щелочь, частично растворяя лигнин, не расщепляет целлюлозу и гемицеллюлозы полностью, однако делает их более доступными для последующего воздействия ферментов микроорганизмов, которые способны расти на этом субстрате. Поэтому щелочная обработка целлюлозы может быть перспективна в комбинации с ферментативным гидролизом.

**Гидролиз концентрированными кислотами.** Концентрированная соляная кислота обычной (37–38 %) концентрации очень медленно гидролизует целлюлозу. Для ускорения гидролиза необходима кислота концентрацией 41–42 %, что затрудняет работу.

Гидролиз концентрированной серной кислотой наиболее приемлем по способу механохимической деструкции полисахаридов целлолигнина с модулем отбора 30. По этому методу некоторое время работала экспериментальная установка, но промышленного выхода способ не получил.

Гидролиз концентрированными кислотами характеризуется большим расходом кислоты. Даже при гидролизе с малым модулем ее расход в 4 раза выше, чем при гидролизе разбавленными кислотами. При малом модуле велик удельный расход электроэнергии на тонкое измельчение сырья. Требуется оборудование с прочными кислотоупорными покрытиями. Все это, а также большие удельные капиталовложения определяют себестоимость гидролизатов.

**Гидролиз разбавленными кислотами.** В нашей стране в производстве применяют разбавленную серную кислоту концентрацией 0,4–0,5 %. Гидролиз проводят при 175–190 °С и соответствующем

давлении. Этот способ предусматривает большой расход пара. Выход РВ достигает 46–50 % от массы сухого сырья. Существуют периодические и непрерывные способы гидролиза, различающиеся положением гидролизуемого материала. При периодических способах он неподвижен, при непрерывных – находится в движении. Применение непрерывных способов гидролиза может привести к увеличению выхода РВ до 53–56 %, улучшению качества гидролизатов и снижению себестоимости на 20–30 %, однако эти способы пока дорабатываются.

В промышленности в настоящее время используется перколяционный способ гидролиза. По этому способу жидкая фаза проходит через слой неподвижной твердой фазы, причем твердая фаза должна быть полностью погружена в жидкость. Перколяционный способ гидролиза имеет модификации, позволяющие изменять удельную производительность гидролизных аппаратов, повышать температуру гидролиза и уменьшать расход кислоты.

### Культивирование микроорганизмов

Общими для всех производств являются следующие стадии:

**Получение посевного материала.** Для получения посевного материала используют исходную культуру микроорганизма (рис. 24), которая поступает из научно-исследовательских институтов и посевных станций. Перед введением в производственный процесс культура проходит несколько стадий выращивания на жидкой среде и в посевных аппаратах, что обеспечивает необходимый объем и качество посевного материала (рис. 25, 26).

**Подготовка питательной среды.** Потребность в тех или иных веществах определяется физиологическими особенностями данного вида микроорганизмов, но во всех случаях среда должна представлять собой водный раствор этих веществ и обеспечивать приток их в клетку в определенном количестве.

**Принципы составления питательных сред.** В самом приближенном виде физиологические потребности микроорганизма в питательных веществах можно выявить, определив химический состав микробной клетки, однако в этом случае не учитываются количество и состав метаболитов, выделенных клеткой во внешнюю среду, и то обстоятельство, что состав клеточного вещества микроорганизма зависит от состава среды обитания и варьирует в достаточно широких пределах.

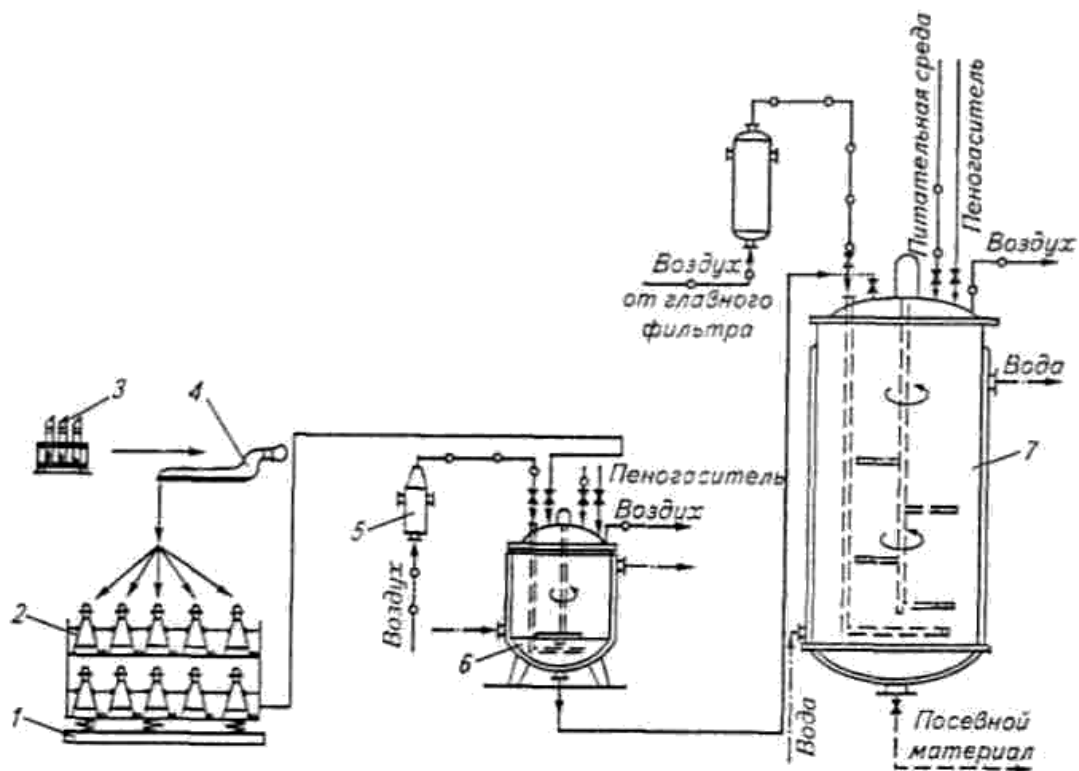


Рис. 24. Аппаратурно-технологическая схема получения глубинного посевного материала: 1 – качалка; 2 – колбы Эрленмейера; 3 – пробирки с исходной культурой; 4 – материалы для исходного продуцента; 5 – фильтр; 6 – малый инокулятор; 7 – большой инокулятор

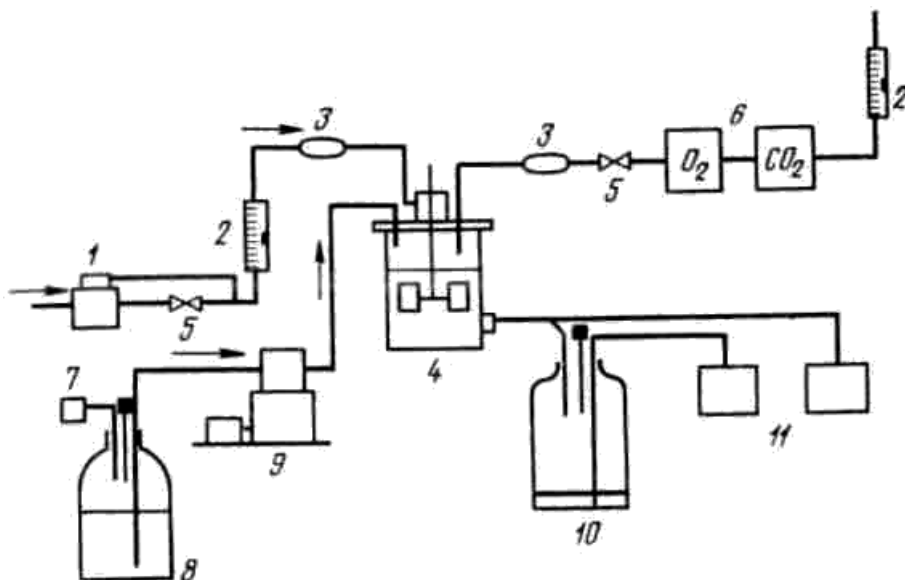


Рис. 25. Лабораторный аппарат для непрерывного процесса культивирования: 1 – регулятор подачи воздуха; 2 – ротаметр; 3 – фильтр для воздуха; 4 – биореактор; 5 – вентиль; 6 – анализатор выходящего воздуха; 7 – фильтр для питательной среды; 8 и 10 – сборники питательной среды и готового продукта; 9 – насос; 11 – закрытые пробоотборники

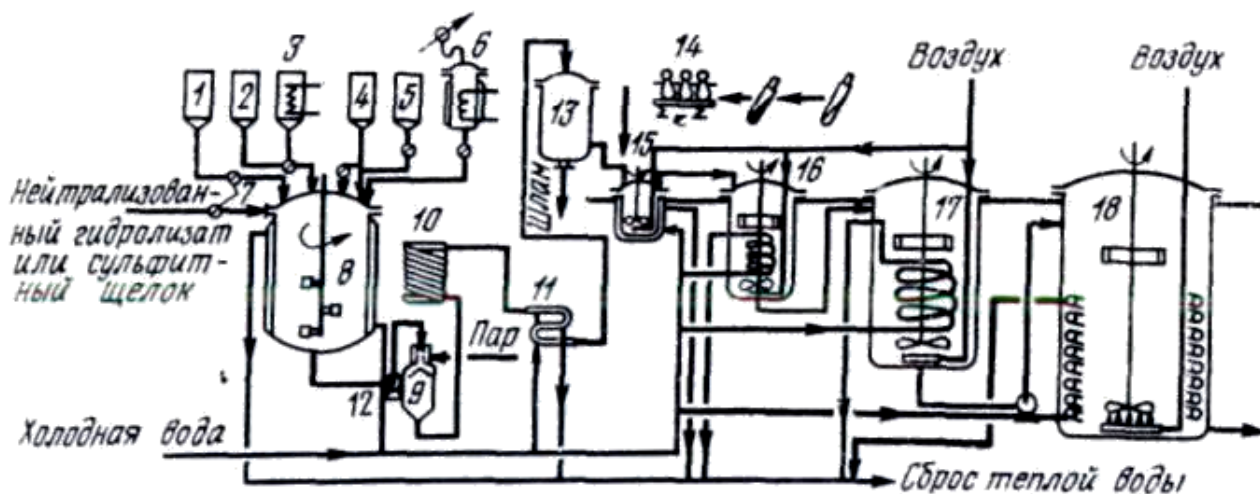


Рис. 26. Схема получения чистой культуры посевного материала: 1–5 – сборники компонентов среды (1 – сульфата аммония; 2 – суперфосфата; 3 – горячей воды; 4 – известкового молока; 5 – хлорида калия); 6 – дрожжевой автолизатор; 7 – дозирующие устройства; 8 – реактор для приготовления среды; 9 – греющая колонка; 10 – выдерживатель; 11 – теплообменник; 12 – центробежный насос; 13 – отстойник; 14 – стадия приготовления чистой культуры посевных дрожжей в лаборатории; 15, 16 – малый и большой посевные аппараты; 17 – малый ферментатор; 18 – промышленный ферментатор

Среди элементов наибольшее биогенное (жизненно важное) значение имеет углерод. Он входит в состав почти всех органических соединений, образующихся в микробной клетке. Углерод прежде всего вступает во взаимодействие с кислородом, водородом, азотом, образуя в сочетании с другими элементами основу жизненно важных соединений клетки: аминокислот, белков, углеводов, нуклеиновых кислот, жиров и т.д. Важны для питания микроорганизмов и остальные элементы: фосфор, сера, кислород, железо, калий и др.

Микроорганизмы используют питательные вещества среды не только на построение клеточного вещества, но и на обеспечение энергией всех биохимических превращений в клетке.

Микроорганизмы чувствительны к составу питательных сред. Одни соединения ими интенсивно потребляются, другие остаются нетронутыми или потребляются во вторую очередь. В процессе роста культуры состав среды меняется, что оказывает влияние на ее развитие и биосинтетическую способность.

В то же время микроорганизмы весьма неприхотливы и легко адаптируются к условиям обитания. Например, дрожжи прекрасно растут на глюкозе, сахарозе, мальтозе, но могут быть адаптированы к выращиванию на пентозах, парафинах нефти, этаноле, метаноле и т.д.

Часто сырьем для выращивания микроорганизмов служит материал, который они не в состоянии использовать без предварительной подготовки (например, целлюлоза, гемицеллюлоза, крахмал, пектин, пентозаны и т.д.). В подобных случаях при приготовлении питательной среды биополимеры предварительно гидролизуют ферментативным или химическим способом до получения усвояемой формы.

Таким образом, питательная среда должна иметь определенное значение рН, содержать водный раствор или суспензию усвояемых форм углерода, азота, необходимый набор микроэлементов и питательных солей.

Для нормальной жизнедеятельности микроорганизмов часто оказывается необходимым присутствие в питательной среде факторов роста, главным образом витаминов, источником которых могут быть автолизаты и гидролизаты дрожжей и других микроорганизмов, кукурузный экстракт, отвары растительных отходов.

*Источники углерода.* Большинство продуцентов белковых веществ и аминокислот в качестве источника углерода ассимилируют органические вещества. Исключение составляют синезеленые водоросли, которые используют диоксид углерода. Непосредственным источником углерода могут быть различные углеводы несложного строения: гексозы, пентозы, низкомолекулярные олигосахариды. Полисахариды, такие как целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества, крахмал, маннаны, пентозаны и т.д., могут быть источниками углерода лишь после их гидролиза или при условии, что микроорганизм обладает способностью синтезировать ферменты, гидролизующие эти вещества. Микроорганизмы могут использовать органические кислоты, спирты, жирные кислоты, легкие и тяжелые углеводороды и другие углеродосодержащие соединения.

Разнообразие усвояемых форм углерода предопределяет различные пути ассимиляции и превращения этих соединений в строительные блоки клетки. Наиболее универсальными строительными блоками в клетке являются ацетальдегид, ацетат, ацетил-КоА, пировиноградная кислота. И чем короче и проще путь получения этих соединений из используемого сырья, тем выше его ценность как источника углерода.

*Источники азота.* Известные продуценты белков и аминокислот не усваивают газообразный азот атмосферы. Азот должен находиться в среде в химически связанном состоянии: в виде неорганических солей, кислот, органических соединений и т.д. Потребность в

тех или иных азотсодержащих соединениях определяется физиологическими возможностями микроорганизмов. На основе экспериментального изучения потребности микроорганизма в той или иной форме азота определяют необходимое содержание этих веществ в питательной среде.

Как правило, продуценты биологически активных веществ нуждаются в отдельных аминокислотах, реже – во всех 20 протеиногенных.

Органические азотсодержащие соединения и аммонийный азот обычно легко усваиваются микроорганизмами, нитраты – медленнее, так как азот нитратов должен быть сначала восстановлен и лишь затем реализован клеткой в процессе обмена веществ. Нитриты практически не используются как источник азота в среде. Следует помнить, что при потреблении аниона или катиона, в которые входит азот, будет происходить подкисление или подщелачивание питательной среды.

Даже незначительный недостаток азота в среде приводит к «ожирению» клеток, т.е. повышению содержания в них липидов за счет уменьшения белковой и аминокислотной фракций, поэтому в производственных условиях при получении обогащенных белком дрожжей следят за тем, чтобы в среде не было недостатка азота.

*Источники фосфора.* Фосфор вносят в среду в виде солей фосфорной кислоты, как правило, с различными естественными субстратами (отварами растительных тканей, мукой, кукурузным экстрактом и т.д.) или реже с синтезированными соединениями (например, фитином).

Фосфор – важный элемент питательной среды. В клетке он входит в состав АТФ, АДФ, АМФ, обеспечивая энергетический и конструктивный обмены, участвуя в синтезе белков, нуклеиновых кислот, гликолизе и других процессах. Скорость роста культуры зависит от содержания фосфора. При недостатке его в среде, особенно в начале роста микроорганизмов, наблюдаются пониженный уровень накопления биомассы, незначительный прирост липидов, обеднение клеток белком и витамином В<sub>2</sub>, резкое снижение интенсивности дыхания и повышение бродильной способности дрожжей. При этом в несколько раз уменьшается содержание фосфора во всех клеточных фракциях микроорганизма.

*Источники витаминов, макро- и микроэлементов.* Без витаминов и ионов металлов невозможно представить обмен веществ микробной клетки. Но потребность у микроорганизмов в этих соединениях различна. По этому признаку все микроорганизмы делятся на два типа: а у к с о а в т о т р о ф ы, не требующие введения в среду



витаминов и синтезирующие их из строительных блоков самостоятельно, и ауксогетеротрофы, не способные синтезировать ряд витаминов. Если продуцент – ауксогетеротроф, то введение хотя бы небольших количеств витаминов необходимо: оно ускоряет его рост и развитие. К сожалению, многие продуценты являются ауксогетеротрофными организмами. Для дрожжей необходим водорастворимый комплекс витаминов группы В, в который входят тиамин, никотиновая и пантотеновая кислоты, пиридоксин, инозит, биотин.

Обычно потребность микроорганизмов в витаминах устанавливают экспериментально, конкретно для каждого штамма. Как правило, недостатка в витаминах в средах нет, так как они вводятся вместе с растительными субстратами, которые являются одновременно основным источником углерода в среде. В различных видах растительного сырья, используемого в производстве белковых веществ, аминокислот и липидов, содержатся следующие количества витаминов (в мг/100 г): биотин – 0,0034–0,0061, пантотеновая кислота 0,06–0,22, инозит 89–120, тиамин 0,18–0,28, пиридоксин 0,29–0,46, никотинамид 5,0–5,15. Этого количества витаминов достаточно для большинства микроорганизмов, и лишь в редких случаях приходится прибегать к введению в среды автолизатов микробных масс, кукурузного экстракта и т.п.

Многие ионы металлов, являясь составной частью активного центра ферментов или участвуя в поддержании их пространственной структуры, обеспечивают обмен веществ микроорганизмов. Ферменты, содержащие металлы, активируют процессы дыхания, окислительно-восстановительные реакции, синтез аминокислот, жирных кислот, сахаров, нуклеотидов, пиримидиновых оснований, регулируют образование сложнейших молекул белков, гликогена, нуклеиновых кислот, их трансформацию и распад.

Наибольшее влияние на рост и развитие микроорганизмов оказывают ионы железа, меди, марганца, цинка, бора, молибдена, кобальта и ряда других металлов. Микроорганизмы нуждаются в микродозах этих элементов, о чем свидетельствует количественный состав золы продуцента. Если же эти вещества присутствуют в средах в больших количествах, чем это необходимо для развития микроорганизма, то они оказывают ингибирующее действие, что объясняется законами конкурентного и неконкурентного торможения. Например, для нормального роста дрожжей необходимо присутствие в среде

железа, цинка и меди в миллионных долях, соответственно 0,2, 0,1 и 0,2. Повышение содержания меди в растворе глюкозы до 0,5 миллионной доли резко снижает сбраживание сахара, а увеличение в 10 раз по сравнению с оптимальным вызывает полное прекращение брожения.

Добавленные к синтетическим средам белки и экстракты растительных тканей ослабляют токсическое действие меди, по-видимому, за счет образования с нею комплексных соединений. Исследование тормозящего действия 50 наиболее распространенных элементов на процесс размножения дрожжей в синтетической среде показало, что только 10 элементов (С, Н, О, N, Mg, K, Na, Ca, S, P) не оказывают отрицательного влияния на рост и развитие микроорганизмов. Токсическое действие на многие микроорганизмы, в том числе и на дрожжи, оказывают галогены, формальдегиды, фенол, толуол, бензол и ряд других веществ. Установлено, что для подавления роста дрожжей достаточно присутствия в питательной среде одного из следующих элементов или соединений (в миллионных долях): ртуть – 40–50, хлор – 125–200, формальдегид – 225–250, кадмий – 350–500, медь – 400–500, диоксид серы – 1250–1500, фенол 2000–2500. Таким образом, питательная среда должна содержать определенное количество углерода, азота, фосфора, витаминов, макро- и микроэлементов.

**Выращивание производственной культуры** (производственное культивирование) составляет основную и самую длительную стадию технологического процесса.

Процесс осуществляется в ферментерах (рис. 27). Ферментер представляет собой цилиндрическую емкость из нержавеющей стали со сферической крышкой. Аппарат снабжен термостатирующим, перемешивающим, аэрирующим и регуливающим pH среды устройствами, оборудован системой подачи среды, воды, пара и т.д. Основное требование, предъявляемое к ферментеру, – сохранение стерильности при интенсивной аэрации питательной среды.

Производственное культивирование проводят в стерильных условиях. В ферментер со стерильной питательной средой вводят посевной материал. Стадия производственного культивирования для большинства микроорганизмов составляет 40–72 ч. Некоторые актиномицеты и микроскопические грибы культивируют до 12 суток.

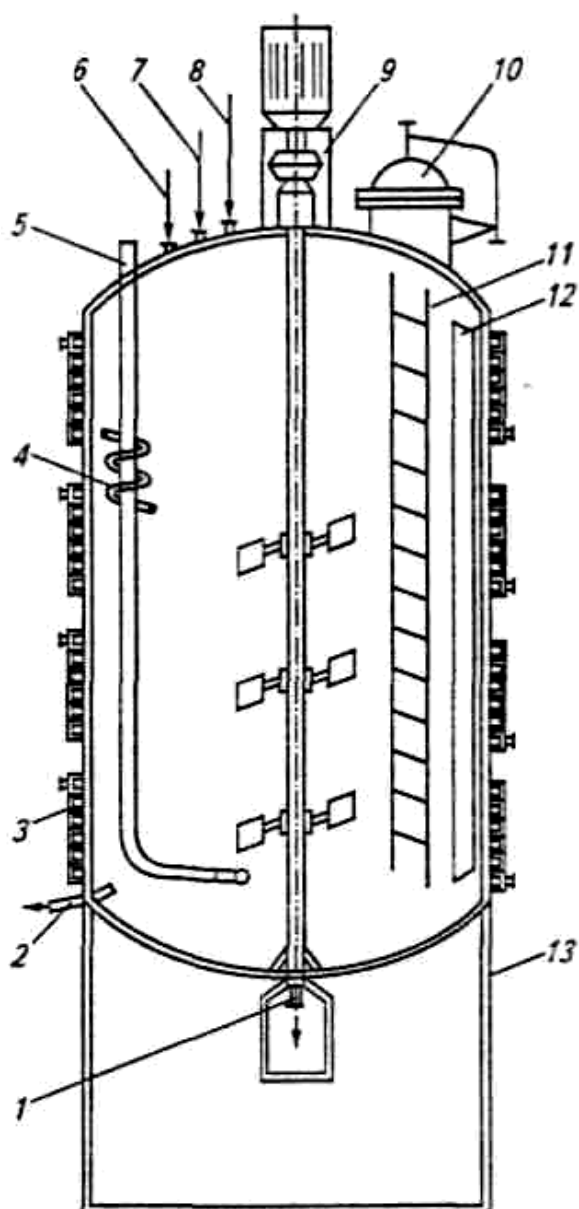


Рис. 27. Схема ферментера:

- 1 – штуцер для слива;
- 2 – штуцер для отбора проб;
- 3 – рубашка;
- 4 – змеевик;
- 5 – барботер;
- 6 – линия подачи титрующего раствора;
- 7 – линия подачи пеногасителя;
- 8 – линия загрузки;
- 9 – мешалка с приводом;
- 10 – люк-лаз;
- 11 – лестница;
- 12 – отбойник;
- 13 – опорная царга («юбка»)

В процессе культивирования ведется постоянный контроль за состоянием культуры и накоплением продуктов синтеза, контроль состава среды, pH.

**Методы культивирования.** В микробиологической промышленности для выращивания микроорганизмов применяют поверхностный и глубинный методы. Поверхностный метод применим только для аэробных культур, причем их можно выращивать как на твердых и сыпучих питательных средах, так и на поверхности тонкого слоя жидкой среды. Глубинный метод выращивания микроорганизмов может быть периодическим и непрерывным (проточным).

При периодическом процессе изменяется скорость роста, физиолого-биохимические и морфологические показатели культуры. Микробные клетки при этом претерпевают значительные изменения в

течение всего периода роста, обусловленные непрерывным изменением окружающей среды.

Непрерывный процесс поддерживает культуру микроорганизмов в динамическом равновесии. Непрерывный процесс может быть гомогенным и гетерогенным. При гомогенном непрерывном процессе в ферментере все параметры (концентрации сухих веществ, скорость роста микроорганизмов) постоянны во времени. При гомогенном непрерывном процессе можно создать условия, соответствующие определенной точке кривой роста культуры, выращиваемой периодическим способом. При гетерогенном непрерывном процессе несколько аппаратов соединяются в батареи. При этом в каждом ферментере поддерживаются постоянные условия культивирования, отличные от условий в другом ферментере.

Метод проточного культивирования может быть организован как процесс полного вытеснения и как процесс полного смешения. В первом случае сосуд для выращивания микроорганизмов представляет собой трубку, в которую подаются питательная среда и посевной материал и из которой вытекает культура. Перемешивание не производится. Этот процесс применим для культивирования анаэробных микроорганизмов. Когда среда и посевной материал поступают в ферментер, клетки находятся в начале своего развития. По ходу трубки происходит развитие культуры и на выходе клетки находятся в стационарной фазе развития (кривая роста реализуется не во времени, а в пространстве). При быстром протоке среды условия близки к условиям экспоненциальной фазы роста, при медленном – стационарной. В установившемся равновесии удельная скорость роста культуры равна удельной скорости протока среды. Аналогичная ситуация складывается в батарее проточных ферментеров.

В процессе полного смешения рост культуры происходит в емкости ферментера при интенсивном перемешивании и аэрации.

**Контроль за производством** осуществляется путем отбора проб и проведения соответствующих анализов, также при помощи контрольно-измерительных приборов. Основные этапы контроля:

1. Анализ сырья и вспомогательных материалов, поступающих на завод, для определения их соответствия требованиям стандартов и сопроводительной документации.

2. Проверка исправности, надежности, герметичности и других показателей оборудования перед началом технологического процесса и в течение всего процесса.

3. В течение всего процесса ведут постоянное наблюдение за поддержанием оптимальных параметров – рН, O<sub>2</sub>, пенообразования и т.п.

В значительной степени эффективность микробиологического производства зависит от постановки микробиологического контроля. Контролируется музейная культура микроорганизма-продуцента, посевной материал, питательные среды, воздух, культуральная жидкость, а также готовая продукция.

Одна из главных задач службы микробиологического контроля – поддержание в активном состоянии производственного штамма. В процессе неоднократных пересевов микроорганизмов, а также длительного воздействия условий культивирования с течением времени могут возникнуть спонтанные мутации, которые приводят к снижению продуктивности культуры. В связи с этим периодически (не менее 2 раз в год) проводят рассев производственного штамма микроорганизмов и отбор наиболее продуктивных для дальнейшей работы.

**Выделение конечного продукта.** После стадии культивирования микроорганизма-продуцента следующим технологическим этапом является выделение и очистка конечного продукта из культуральной жидкости. Для большинства микробиологических процессов эта стадия начинается с разделения двух фаз, так как конечный продукт может находиться либо в самом растворе, либо в микробной массе.

*Выделение конечного продукта из культуральной жидкости.* Синтезируемые микроорганизмами продукты накапливаются в среде, которую называют культуральной жидкостью. Это сложная многофазная система, содержащая микробные клетки (или мицелий), продукты биосинтеза и остатки питательной среды.

Для выделения метаболитов из среды применяют экстракционные и ионообменные методы, включающие большое количество стадий: фильтрация, концентрирование полученных растворов, экстрагирование целевого продукта, кристаллизация и т.д. Набор стадий и выбор конкретного способа зависят от природы выделяемого продукта, его стабильности и требуемой чистоты.

*Выделение конечного продукта из биомассы.* Для отделения микробной массы применяют фильтры-прессы, сепараторы, вакуум-фильтры, центрифуги различной производительности. Для извлечения внутриклеточных биополимеров – белков, нуклеиновых кислот, ферментов, липидов – широко используется метод дезинтеграции. Дезинтеграция (разрушение) клеточных оболочек микроорганизмов осуществляется несколькими способами:

1. Химический способ – основан на разрушении клеточной стенки микроорганизмов, в результате чего увеличивается ее проницаемость и биополимеры с большой молекулярной массой выходят из клетки. Наиболее широко применяют методы обработки клеточной суспензии щелочью, мочевиной, глицерином, аммиаком, перекисью водорода. Химические методы предназначены в основном для выделения суммарных белков пищевого назначения.

2. Биологический способ – это наиболее мягкий способ разрушения клеточной оболочки и выделения внутриклеточных метаболитов. Например, разрушение клеток под действием внутриклеточных гидролитических ферментов (автолиз). В результате получают смесь продуктов гидролиза – аминокислоты, пептиды, полипептиды и др. Автолиз в промышленных условиях осуществляют при получении пищевого белкового экстракта.

Другой биологический прием – использование литических ферментов. Например, литические ферменты (содержащие  $\beta$ -глюконазу) разрушают клеточные стенки дрожжей, микроскопических грибов, грамотрицательных и грамположительных бактерий.

3. Физический способ. К наиболее известным способам физической дезинтеграции биологического материала относятся: замораживание – оттаивание, ультразвуковое воздействие, растирание клеток и др.

***Контроль качества продукции.*** Это завершающая стадия любого производства. Контроль производства продуктов микробиологического синтеза включает весь комплекс химических, биохимических и микробиологических анализов и измерений по учету качественных и количественных показателей технологического режима на всех этапах производства, начиная с определения качества сырья и заканчивая оценкой качества готовой продукции.

## Контрольные вопросы к разделу 4

1. Какое растительное сырье используется для прямой биоконверсии?
2. Отходы пищевой промышленности, используемые в качестве сырья для микробной биоконверсии.
3. Почему отруби и зерновые отходы можно рассматривать как субстраты для биоконверсии?
4. Какие отходы консервной промышленности имеют наибольшее значение как сырье для биоконверсии?
5. Назовите отходы крахмало-паточной промышленности, используемые для микробной биоконверсии.
6. Способы предобработки растительного сырья.
7. Цель предварительной обработки сырья.
8. Назовите способы культивирования микроорганизмов.
9. Какие стадии включает технология культивирования?
10. Как осуществляют выбор микроорганизма?

## 5. ПРИМЕНЕНИЕ БИОКОНВЕРСИИ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ

### 5.1. Хлебопекарное производство

Хлеб – один из основных продуктов питания, употребляемый в пищу без дополнительной кулинарной обработки (рис. 28), поэтому санитарные требования на всех стадиях производства, при хранении и транспортировании должны быть особенно высокими.



*Рис. 28. Хлебобулочные изделия*

В процессе изготовления хлеба важную роль играют полезные микроорганизмы: дрожжи рода Сахаромицес и молочнокислые бактерии. В результате жизнедеятельности дрожжей из сахаров теста образуется углекислый газ, разрыхляющий тесто, и небольшое количество спирта. Молочнокислые бактерии образуют молочную кислоту и в небольшом количестве другие органические кислоты. Это повышает кислотность теста, создает благоприятные условия для развития дрожжей и улучшает вкус хлеба.

Технологический процесс производства хлеба всех сортов включает следующие основные стадии: подготовка сырья, замес, брожение, разделка (деление и формовка), расстойка теста и выпечка тестовых заготовок. Хлеб вырабатывают из пшеничной и ржаной муки и из их смеси. Поскольку пшеничная и ржаная мука отличаются по химическому составу и некоторым биохимическим свойствам, име-



ются различия и в технологии изготовления теста, а также в комплексе микроорганизмов, участвующих в этом процессе.

Жизнедеятельность используемых в хлебопекарном производстве микроорганизмов начинается на стадии замеса теста и достигает наибольшей активности на стадии брожения и созревания теста. На следующих стадиях их активность несколько ослабевает, а при выпечке совсем прекращается: они погибают под воздействием высокой температуры.

Главными разрыхлителями теста являются хлебопекарные дрожжи, которые вносят в определенном количестве при замесе теста. Применяют прессованные, сушеные и жидкие дрожжи или смесь прессованных и жидких дрожжей.

**П р е с с о в а н н ы е д р о ж ж и** представляют собой бруски светло-серого или желтоватого цвета, содержащие около 75% влаги. По качеству прессованные дрожжи должны удовлетворять требованиям действующего ГОСТа. Особенно важны для хлебопечения следующие их свойства: стойкость при хранении, устойчивость к высоким концентрациям соли, сахара и жира в тесте и высокая бродильная активность, т.е. способность хорошо разрыхлять тесто.

**С у ш е н ы е д р о ж ж и** представляют собой вермишель или обкатанные гранулы светло-желтого или светло-коричневого цвета влажностью 7,5–8%. Получают их из прессованных дрожжей в специальных цехах на дрожжевых заводах. Сушеные дрожжи должны удовлетворять требованиям действующих ТУ. Перед использованием их размачивают в воде и активируют, т.е. приводят дрожжевые клетки в жизнеспособное состояние: чем больше оживших клеток, тем выше качество сушеных дрожжей.

**Ж и д к и е д р о ж ж и** изготавливаются на хлебозаводе по разработанным схемам, которые постоянно совершенствуются. Для изготовления жидких дрожжей используют муку, солод или ферментные препараты. Для подкисления и улучшения состава питательной среды применяют специально отобранные расы молочнокислых бактерий, размножающихся при высокой ( $\approx 50^{\circ}\text{C}$ ) температуре. Размножаясь, эти бактерии быстро повышают кислотность среды и создают благоприятные условия для дрожжей и неблагоприятные для посторонней микрофлоры. Применяются специально выделенные активные расы дрожжей, относящиеся к тому же виду, что и хлебопекарные, и мало отличающиеся от них по морфологическим и биохимическим признакам. Наиболее важными свойствами при отборе рас являются: высокая

бродильная активность при сбраживании мальтозы (основной сахар теста) и солеустойчивость, т.е. способность сохранять высокую бродильную активность при повышенных (до 1%) концентрациях солей.

Кроме перечисленных микроорганизмов, в тесте активизируются микроорганизмы муки, и прежде всего различные молочнокислые бактерии из группы гетероферментативных. Развиваясь в процессе брожения теста, они образуют кроме молочной кислоты уксусную, муравьиную, иногда янтарную, небольшое количество спирта и углекислого газа. При этом повышается кислотность теста и появляется свойственный ему аромат. При несоблюдении требований санитарии и гигиены, а также при использовании недоброкачественной воды в тесте могут развиваться некоторые непатогенные разновидности кишечной палочки.

В ржаное тесто микроорганизмы вносятся при замесе вместе с головкой (тестом предыдущего цикла приготовления) или закваской, иногда используются прессованные дрожжи.

Микрофлора ржаных заквасок состоит из дрожжей и молочнокислых бактерий в соотношении 1:80. Часть этих микроорганизмов вносится искусственно (прессованные дрожжи и специально приготовленные разводки молочнокислых бактерий), часть попадает из муки.

Микрофлора головки по составу близка к микрофлоре заквасок, однако не так постоянна. Головка – это естественная накопительная культура, состоящая из нескольких микроорганизмов, отбор которых происходит благодаря специфичности условий – высокой кислотности среды, большой концентрации сухих веществ и т.д.

Главный источник микрофлоры – сырье, поэтому состав сырья, степень его загрязненности микроорганизмами могут сильно изменить состав микрофлоры и иногда испортить качество головки как возбудителя брожения теста. Это может произойти, например, если из муки в закваску или головку попадут дрожжи, не относящиеся к роду *Saccharomyces* (бродящие, хорошие разрыхлители), а представители других родов. В частности, дрожжи рода *Candida* тесто не поднимают, быстро размножаются и окисляют спирт в уксусную кислоту, используют молочную кислоту, снижая тем самым кислотность закваски или головки. Кроме того, они выделяют неприятно пахнущие вещества.

Группа молочнокислых бактерий включает представителей гомоферментативных и гетероферментативных бактерий. Первые образуют преимущественно молочную кислоту. Среди них есть бактерии,

размножающиеся при температуре 48–52°C, и другие, предпочитающие температуру 30–35°C; представители гетероферментативных бактерий, кроме молочной кислоты, образуют уксусную, муравьиную и довольно значительное количество диоксида углерода (углекислого газа) и этилового спирта. Таким образом, бактерии этой группы являются одновременно и разрыхлителями теста.

**Пшеничные закваски на основе микроорганизмов для хлебобулочных изделий.** В ГосНИИХП в результате длительных исследований созданы закваски: пропионовокислая, комплексная, ацидофильная, витаминная, эргостериновая, дрожжевая.

Основу пропионовокислой закваски составляет штамм пропионовых бактерий *Propionibacterium freundenreichii ssp. shermanii* ВКМ-103. Данная закваска разработана с целью получения наиболее эффективного биологического средства предотвращения картофельной болезни и плесневения хлеба. Смесь пропионовой, муравьиной и уксусной кислот, а также антибиотический полипептид – пропионин, синтезируемый этим штаммом, оказывает максимальное ингибирующее действие на развитие споровых бактерий и плесеней, подавляя комплекс флавиновых ферментов дыхательного цикла микроорганизмов. Кроме того, в процессе метаболизма эта культура синтезирует значительные количества витамина В<sub>12</sub>, который, как известно, в организме человека участвует в кроветворении. Поэтому применение пропионовокислой закваски в процессе приготовления теста и выпечки хлеба преследует две цели: предохранение хлеба от микробиологической инфекции и обогащение его витамином В<sub>12</sub>, что повышает его пищевую ценность.

Основу комплексной закваски составляют штаммы молочнокислых бактерий, дрожжей и пропионовокислых бактерий следующих видов: *Lactobacillus casei*-С1, *L. brevis*-В-78, *L. fermenti*-34, *Saccharomyces cerevisiae*-69, *Propionibacterium shermanii* ВКМ-103, которые находятся в следующем соотношении: 0,5 : 0,25 : 0,25 : 1 : 0,02. В качестве питательного субстрата для приготовления закваски используют мучную осахаренную заварку, которую готовят из пшеничной муки первого сорта в соотношении мука : вода – 1 : 3.

В процессе длительной эксплуатации закваска отличается стабильностью.

Ацидофильная закваска состоит из культуры *L. acidophilus*-146 и штамма дрожжей *S. cerevisiae* «Рязанские-17», адаптированного к

высоким температурам (40–45°C). Ацидофильная закваска характеризуется устойчивостью к повышенным температурам.

Витаминная закваска была создана в результате использования в микробиологическом составе пшеничной закваски каротинообразующих дрожжей, адаптированных к мучным средам.

Каротиноидные дрожжи не обладают бродильной активностью, температурный оптимум роста у них сдвинут в сторону низких значений – 22–28 °С, они имеют низкую скорость роста – 0,18 ч<sup>-1</sup>. Витаминная закваска, характеризующаяся способностью к синтезу большого количества β-каротина, витамина В<sub>12</sub>, обладающая бактерицидными, радиопротекторными свойствами и высокими технологическими показателями, включает: каротиноидные дрожжи *Bullera armeniaca* штамм Сб-103, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм Фр-3, молочнокислые бактерии *L. acidophilus*-146, пропионовые бактерии *Propionibacterium shermanii* ВКМ-103 в соотношении 1 : 1 : 0,5 : 0,2. В качестве основного субстрата для получения закваски необходимо использовать мучную осахаренную заварку с влажностью 82–85%. Процесс выращивания продолжается в течение 5–6 ч при температуре 22–25 °С.

В состав эргостериновой закваски входят дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*-576, обладающие высокими биохимическими и технологическими свойствами, способные к повышенному синтезу эргостерина (предшественник витамина D<sub>2</sub>), и мезофильные молочнокислые бактерии *L. casei*-C1, *L. plantarum*-30. Возможно частично заменить эргостериновой закваской прессованные дрожжи. Процесс брожения наиболее интенсивно происходит при замене 50% прессованных дрожжей (от рецептурного количества) на 15% эргостериновой закваской (к массе муки в тесте). Использование эргостериновой закваски при приготовлении хлеба и хлебобулочных изделий способствует увеличению удельного объема на 9–20%, пористости – на 2–4, структурно-механических свойств – на 10–15%, повышению пищевой ценности за счет обогащения изделий витамином D<sub>2</sub> – на 0,2–0,3%.

Для регионов с низкими значениями среднегодовых температур для замены жидких дрожжей путем селекции молочнокислых бактерий, способных развиваться при температуре 25–28 °С, и дрожжевых культур создана дрожжевая закваска, включающая сообщество микроорганизмов: *L. casei*-C1, *L. plantarum*-А-63, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* штамм Фр-3 на мучной питательной среде. При ее использовании интенсифицируется процесс газообразования в тесте,

сокращается продолжительность брожения. В готовых хлебобулочных изделиях отмечено увеличение удельного объема на 25–30%, пористости – на 2–3, общей упругой деформации – на 35–40% по сравнению с образцами хлеба, приготовленными на традиционных жидких заквасочных дрожжах. Вариантом дрожжевой закваски является закваска, созданная на основе высокоактивного штамма дрожжей *S. cerevisiae* «Краснодарская-11», отличительной особенностью которой является возможность использования для ее выращивания водно-мучной среды, что позволяет заменить жидкие дрожжи на хлебозаводах, где отсутствуют условия для приготовления осахаренной мучной заварки.

**Применение ферментных препаратов и гидролизатов в хлебопечении.** В хлебопечении применяют препараты амилолитических ( $\alpha$ -амилазы, глюкоамилазы) и протеолитических ферментов,  $\beta$ -галактозидазы,  $\beta$ -фруктофуранозидазы, препараты целлюлаз и гемицеллюлаз, окислительно-восстановительных ферментов (липоксигеназы, глюкозооксидазы, каталазы). 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» (ТУ 59.01.003.65-83), полученный из культуры гриба *Asp. awamori*.

Сохранить свежесть хлебобулочных изделий в течение более длительного срока позволяет применение амилолитических препаратов в сочетании с ксиланазой. Используют комплекс бактериальной  $\alpha$ -амилазы (препарат «Новамил»), мальтогенной  $\alpha$ -амилазы и ксиланазы (препарат «Фунгамил»). Выпуск хлеба с повышенным содержанием структурных полисахаридов и длительным сроком хранения расширит применение препаратов целлюлаз и гемицеллюлаз в хлебопечении. В качестве источников целлюлаз используют ферментные препараты «Амилосубтилин Г10х», «Ксилоглюканофоетидин П10х», «Цитороземин П10х», «Целлоконингин П10х», «Целловиридин Г10х», «Целлокандин Г10х» и др. В качестве окислительных ферментов используют системы, включающие липоксигеназу или комплекс глюкозооксидазы и каталазы.

При наличии в системе аскорбиновой кислоты происходит образование дегидроаскорбиновой кислоты, которая выполняет роль

окислителя сульфгидрильных групп белков. Это усиливает эффект липоксигеназы.

*Ферментативные гидролизаты*, полученные из сырья различного происхождения, целесообразно применять для улучшения биотехнологических характеристик хлебопекарных дрожжей, интенсификации процессов созревания полуфабрикатов, повышения пищевой ценности, улучшения органолептических и физико-химических показателей качества хлеба.

В хлебопечении используются высокоосахаренные фруктозные гидролизаты, полученные гидролизом полифруктозанов, накапливающихся в топинамбуре, цикории, георгине и других растениях.

## 5.2. Кондитерское производство

При производстве мучных кондитерских изделий (рис. 29) с использованием дрожжей, таких как галеты, крекеры, кексы, целесообразно воздействие комплексных препаратов с преобладанием протеолитического действия, но содержащих в своем составе  $\alpha$ -амилазу.



Рис. 29. Кондитерские изделия

Совокупное действие ферментов обеспечивает дрожжи сбраживаемыми сахарами и низкомолекулярными азотистыми веществами. Часть не использованных при брожении сахаров и азотистых веществ вступает в реакцию меланоидинообразования, в результате галеты и крекеры приобретают интенсивную окраску и приятный аромат. Для выработки затяжного печенья с использованием химических разрыхлителей (когда требуется много усилий для расслабления клейкови-

ны) на протяжении длительного технологического процесса наряду с механическим воздействием на белки клейковины целесообразно применять протеолитические ферментные препараты, например, «Протосубтилин Г10х».  $\alpha$ -Амилаза, присутствующая в качестве сопутствующего фермента как в грибных, так и в бактериальных препаратах, не мешает их использованию. В случае применения протеолитических ферментных препаратов с наличием  $\alpha$ -амилазы при производстве изделий, подобных крекерам, галетам, печенью, опасности излишней декстринизации не существует, так как  $\alpha$ -амилаза быстро инактивируется (тонкие изделия за очень непродолжительное время прогреваются до высокой температуры).

Комплексные ферментные препараты, содержащие протеазы и  $\alpha$ -амилазу, используются для ускорения и облегчения обработки теста при приготовлении слоеного полуфабриката с целью улучшения его эластичных свойств и предупреждения усадки при выпечке. Кроме того, при производстве вафель такие ферментные препараты позволяют оптимально снизить вязкость вафельного теста, способствуют получению тонких хрустящих вафельных листов.

В производстве сахаристых кондитерских изделий широкое применение имеют препараты инвертазы и липазы. Препараты инвертазы получают из дрожжей *S. cerevisiae* или *S. carlsbergensis*.

Инвертазу применяют в кондитерской промышленности для производства отливных помадных корпусов конфет, круглых помадных корпусов и жидких фруктовых начинок, таких как вишневый ликер.

В производстве шоколада, карамели, риса, сливочного крема применяют липазы. Под действием липаз образуются свободные жирные кислоты, которые усиливают аромат полученных сахаристых изделий. Липолитические ферменты продуцируют микромицеты из родов *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus japonicas* 1403 (970 ед/см<sup>3</sup>). Максимальная активность большинства липаз лежит в слабокислой или нейтральной зоне, диапазон рациональных температур действия составляет 35–40 °С. Использование липолитических ферментов в пищевой промышленности сдерживается из-за отсутствия их промышленного выпуска и недостатка активных микромицетов, обладающих специфичностью действия.

### 5.3. Спиртовое производство

Этиловый спирт, используемый для пищевых целей, получают биохимическим путем с помощью дрожжей, способных в процессе жизнедеятельности возбуждать спиртовое брожение в сахаристых растворах. Накопившийся в среде спирт выделяют отгонкой и получают спирт-сырец с содержанием спирта не менее 83% об. и содержанием примесей 0,4–0,5%. Из такого спирта затем получают спирт-ректификат разной степени очистки.

Биохимическим путем (путем брожения) этиловый спирт получают как из пищевого, так и из непищевого сырья. Спирт из непищевого сырья используется для технических нужд.

Наиболее употребительными видами пищевого сырья являются: крахмалосодержащие материалы – картофель, зерно. Эти материалы предварительно разваривают и осахаривают в подготовительном отделении заводов;

сахаросодержащие материалы – свекловичная меласса (черная патока), реже – сахарная свекла.

От того, к какой группе относится сырье, зависят особенности технологического процесса, но общие принципы получения спирта и основные стадии сохраняются. Технология производства спирта включает несколько стадий: подготовка сырья для сбраживания; подготовка засевных дрожжей – возбудителей брожения; брожение – основная стадия технологического процесса; отгонка спирта из перебродившей бражки, получение спирта-сырца; очистка – ректификация спирта-сырца.

Производственная аппаратура и технологические схемы постоянно совершенствуются и рационализируются с целью получения наивысшего, теоретически возможного выхода спирта высокого качества и с низкой себестоимостью. Немаловажную роль при этом играют и микроорганизмы, как полезные, используемые в производстве, так и вредные, нарушающие нормальное течение технологического процесса, вызывающие потери сырья и снижающие выход спирта. Очень большое значение имеет подбор активных рас дрожжей и молочнокислых бактерий, используемых в производстве, а также строгий санитарный режим, преграждающий путь вредным микроорганизмам в производственный процесс.

Дрожжи – возбудители брожения в спиртовом производстве относятся к тому же семейству, роду и виду, что и хлебопекарные дрож-



жи. Однако производственные расы собственно спиртовых дрожжей значительно отличаются от производственных рас хлебопекарных дрожжей, а также и между собой. Например, при переработке зерно-картофельного сырья используются одни расы, а при использовании мелассы – другие. Это зависит в основном от биохимических свойств дрожжей, так как морфологические признаки их очень близки.

Производственные требования к спиртовым дрожжам следующие: дрожжи должны обладать активным комплексом бродильных ферментов и быть устойчивыми к спирту, накапливающемуся в среде; хорошо переносить высокую кислотность среды и обработку серной кислотой в процессе очистки их от посторонних микроорганизмов; хорошо переносить высокие концентрации сухих веществ в среде (быть осмоустойчивыми). В специальной производственной аппаратуре в дрожжевом цехе их размножают и получают так называемые производственные дрожжи.

Молочнокислые бактерии относятся к семейству Лактобациллацеае. Их используют для подкисления питательной среды (затора) и улучшения ее качества (при переработке зерно-картофельного сырья). Они относятся к тому же виду бактерий, которые используются в хлебопечении при изготовлении жидких дрожжей и для подкисления питательной среды.

Плесневые грибы различных видов рода *Аспергиллус* обладают богатым комплексом ферментов, главным образом амилолитических. Эти грибы используют для получения осахаривающих препаратов, более дешевых и активных, чем солод. Эти препараты применяют на заводах, перерабатывающих крахмалсодержащее сырье.

#### **5.4. Винодельческое производство**

Вино – это продукт спиртового брожения виноградного или плодового-ягодного сока (сусла). Сущностью технологического процесса являются биохимические превращения сусла дрожжами, определяемые составом среды и ферментативной деятельностью дрожжей. Важнейшие составные части сусла: вода, углеводы, пектиновые вещества, органические кислоты, дубильные, красящие и азотистые вещества, витамины, ферменты, эфирные масла и минеральные вещества. Количество отдельных веществ зависит от сорта винограда (плодов, ягод), климатических, метеорологических условий, почвы и др.

В производстве вин различают первичное и вторичное виноделие. Заводы первичного виноделия располагаются в районах выращивания сырья: винограда, плодов и ягод. Подготовительные операции включают дробление сырья, отделение гребней, косточек и семечек, прессование (отделение сока), отстаивание и охлаждение сока.

Брожение сока является важнейшей операцией в первичном виноделии. В процессе брожения сахар, содержащийся в соке, сбраживается дрожжами с образованием спирта и углекислого газа. Дрожжи задают в количестве 1,5–2% к суслу. Процесс брожения ведут периодическим методом в больших емкостях (бочках, бутах) или непрерывным способом в бродильных резервуарах. Оптимальными условиями брожения являются температуры 20–25°C, содержание сахара 10–20% и кислотность сусла 8–10 г/л. При пониженной температуре процесс брожения удлиняется, но улучшается аромат получаемого вина. По окончании брожения вино снимают с осадка и фильтруют.

Доработку виноматериалов и розлив вина осуществляют на заводах вторичного виноделия, которые могут быть удалены от сырьевой базы. К доработке относятся следующие операции: доливка, охлаждение и фильтрование, переливка, оклейка, термическая обработка и др.

При хранении и выдержке в вине происходят сложные биохимические процессы, которые условно делят на следующие стадии: образование, формирование, созревание, старение, распад и отмирание вина.

Технологический процесс производства шампанских виноматериалов включает получение сусла, отстаивание его и сбраживание. Для получения однородных партий вино смешивают, затем виноматериалы купажируют и проводят вторичное брожение.

Шампанизацию осуществляют бутылочным и резервуарным методами. В первом случае основными технологическими операциями являются тиражирование (розлив вина в бутылки), брожение, выдержка и удаление осадка. При розливе в бутылки к вину добавляют сахар в виде тиражного ликера, разводку дрожжей из расчета 1 млн клеток на 1 мл, оклеивающие материалы для полного осветления. Закупоренные бутылки выдерживают в штабелях при температуре 12 °C в течение 2–3 лет. При медленном брожении образуемый углекислый газ растворяется, создавая в бутылке давление, в вине развивается букет, и вино приобретает гармоничный вкус и прозрачность.

Дрожжевой осадок постепенно переводят на пробку и удаляют из бутылки – сбрасывают.

При резервуарном способе не требуется длительного хранения вина в подвалах, поэтому продолжительность изготовления (выпуска) сокращается до 1–2 мес. В бродильный резервуар вводят купаж, ликер и чистую культуру дрожжей. По окончании брожения шампанизированное вино охлаждают и отстаивают.

Широко используется способ непрерывной шампанизации вина. Бродильная смесь поступает в батарею, составленную из пяти соединенных друг с другом бродильных аппаратов. Одновременно с поступлением смеси в первый резервуар в него вводят разводку чистой культуры дрожжей. В батарее происходят непрерывное перемещение бродящего вина, приток свежей смеси и дрожжей в первый бродильный аппарат и отвод сброженного вина из последнего. При изготовлении вина методом непрерывной шампанизации производительность технологического оборудования возрастает на 30 %. При этом сохраняется хорошее качество продукции.

Непрерывные методы брожения используются также в производстве виноградных и плодово-ягодных вин.

Главная роль в производстве вина принадлежит дрожжам. Применяемые в виноделии дрожжи относятся к виду Сахаромицес вини семейства Сахаромицетов. Они имеют овальную или эллиптическую форму клеток, длину 5–12 мкм и ширину 3–8 мкм. Строение клеток у них типичное для сахарных грибов. Дрожжи размножаются почкованием и образуют споры. Для размножения винных дрожжей наиболее благоприятна температура 18–25 °С; при повышении температуры до 35 °С брожение угнетается, при понижении температуры ниже 16 °С размножение и брожение замедляются.

Холодостойкие расы применяют для брожения при относительно низкой температуре (13–15 °С). Стабильная температура особенно необходима в начальном периоде брожения до накопления 10% спирта. Дрожжи вносят в сусло в количестве 1,5–2% к его объему. На жизнедеятельность дрожжей оказывают влияние состав сусла и физико-химические условия. Большое значение имеет кислотность среды: наиболее успешно брожение протекает при титруемой кислотности 8–10 г/л.

Размножение дрожжей тормозит спирт, образующийся при брожении. Устойчивость к действию спирта является ценным производственным качеством. Этим качеством в высокой степени обладают

дрожжи Сахаромицес вини: отдельные их штаммы образуют до 18 % спирта. Образование больших концентраций спирта препятствует развитию микробиальной порчи.

Дрожжи другого вида – Сахаромицес яйцевидный – накапливают около 18% спирта. На поверхности сухого вина они образуют пленку и применяются для производства хереса. Оптимальная температура развития хересных дрожжей 16–20°C. При более низкой температуре пленка не развивается, при более высокой угнетается и погибает.

Для получения вин высокого качества применяют чистые культуры дрожжей, выделенные и селекционированные для определенных типов вин. При применении чистых культур улучшается вкус и аромат вина, происходит более полное сбраживание сусла и осветление его. Количество спирта, образуемого в сусле, увеличивается на 0,5–1,0%.

Для приготовления вин применяют следующие расы дрожжей: виноградных столовых вин – Темпельгоф 29, Темпельгоф 14, Серсиаль 14, Бургуны 20, Феодосия 1-19, Туркестанский 36/5, Пино 14, Ркацители 6, Кахури 7 и др.;

вина типа херес – хересные дрожжи 20С, Херес 96 и др.;

шампанского, получаемого методом шампанизации в бутылках, – Кахури 2, Кахури 7, Шампанская 7; резервуарным методом – расы Штейнберг 21;

плодово-ягодных вин: яблочных и купажных белых вин – Яблочная 7, Сидровая 100, Вишневая 33; клюквенных вин – Москва 30 и Весьегонск 2; брусничных вин – Брусничная 7 и Брусничная 10.

Для гидролиза пектиновых веществ используются такие препараты, как Пектаваморин, Пектофоетидин, Полигалактуроназа, Ультразим, Винфлоу, Винозим, Пектинекс.

Для интенсификации сокоотделения применяют также препараты, в которых наряду с пектолитическими присутствуют ферменты, гидролизующие нейтральные полисахариды – целлюлозу и гемицеллюлозу. Это препараты Вильзим АК, Ксилонигрин, Поликанесцин, Целловиридин, Целлофоетидин. Гидролиз нейтральных полисахаридов сопровождается высвобождением связанных с ними лигниноподобных и других фенольных веществ. При доступе кислорода фермент *o*-дифенолоксидаза, присутствующий в сырье, катализирует окисление фенольных веществ. Образующиеся хиноны полимеризуются, что является причиной побурения окраски сусла. Хиноны ком-

плексуются с белками, вызывая коллоидное помутнение. Дополнительный вклад в этот процесс вносит мацерация тканей под действием комплекса цитолитических ферментов. Для удаления темноокрашенных продуктов и коллоидных частиц применяют сорбенты – бентонит, полиоксиэтилен, поливинилпирролидон.

Ферментативную обработку применяют при получении различных видов виноматериалов. Схема производства красных столовых виноматериалов включает сульфитацию мезги, внесение 0,01 % Пектофоеидина П10х, брожение мезги до остаточной сахаристости 1–3 %, отделение, дображивание и купаживание виноматериалов.

При получении белых десертных полусладких вин сульфитированную мезгу подогревают до 50 °С, вносят Ксилонигрин П10х (0,01 %) или Полигалактуроназу Г10х (0,00005 %), настаивают мезгу при произвольном остывании в течение 12–48 ч, после чего отделяют сусло, производят дображивание, спиртование, сульфитацию, обработку бентонитом и холодом.

При получении сусла из мезги смеси белых сортов винограда возможна ее обработка 0,02 % Поликанесцина Г20х или 0,02 % Вильзима АК Г20х. Для обработки мезги сорта Алиготе рекомендуют Целловиридин Г20х (0,02 %). Обработка мезги Поликанесцином Г20х положительно влияет на аромат виноматериалов, что связано с увеличением концентрации терпеновых спиртов и β-фенилэтанола за счет действия гликозидаз препарата на предшественников терпеновых спиртов.

Ферментные препараты гидролитического действия используют для стабилизации вин от коллоидных помутнений.

В процессе брожения коллоидная система вина обогащается биополимерами автолизирующихся дрожжей: глюканом и маннопротеином клеточных стенок, продуктами неполного расщепления белков. Эти компоненты наряду с биополимерами винограда участвуют в формировании коллоидных помутнений.

Для стабилизации вин различных типов используется мультиэнзимная композиция МЭК-1, в состав которой входят ферменты β-глюканаза, β-маннаназа, полигалактуроназа и кислая протеаза.

Хорошие результаты при стабилизации соков и вин дают иммобилизованные препараты кислых протеаз – пепсина, кислой грибной протеазы. При этом достигается расщепление белка на 80–95 %. Основными продуктами гидролиза являются пептиды, что положительно влияет на полноту вкуса соков и вин.

Применение гидролаз весьма эффективно при переработке винограда, пораженного серой гнилью. Для осветления сусла из винограда со степенью поражения 20–30 % используют композицию Пектофоептидина П10х и Амилоризина П20х в дозах соответственно 0,025 и 0,005 % или 0,01 и 0,0025 %.

При гидролизе биополимеров, с которыми ассоциированы токсины, последние переходят в свободное состояние, но, имея низкую растворимость в воде, ресорбируются на взвешенной фракции. Удаление этой фракции в процессе фильтрации приводит к снижению содержания токсинов в сусле.

Для гидролиза фенольных компонентов коллоидных частиц может быть использован фермент танназа, катализирующий расщепление сложноэфирной связи фенолкислот с фенолами или углеводами. Препараты танназы производят за рубежом, где и используют в виноделии и консервной промышленности.

Для удаления фенолов из виноматериалов используют флокулянты, сорбенты, фильтрующие материалы. При этом связываются полимерные формы фенольных соединений и их комплексы с белками и полисахаридами. Мономерные формы фенолов сохраняются в растворе и с течением времени подвергаются окислению и конденсации, что служит источником помутнений. Для удаления мономерных фенолов сусло обрабатывают ферментом монофенолмонооксигеназой, выделенной из культуры гриба вешенки. Окисление монофенолов происходит за счет растворенного кислорода, поэтому при обработке сусло постоянно перемешивают. Продолжительность обработки 0,5–1 ч, доза фермента – 50–150 ед/дм<sup>3</sup>. При обработке прессового сусла окисляется 60 % монофенолов. Окисление монофенолов приводит к их конденсации и образованию комплексов с другими коллоидами сусла. Эти комплексы удаляются после обработки сорбентами и сепарации.

## **5.5. Пивоваренное производство**

Продукция пивоваренных заводов (рис. 30) – пиво, оно является слабоалкогольным напитком. Приготавливается пиво в основном из ячменного солода и хмеля. На разных стадиях технологического процесса ячменное сусло подвергается биохимическим превращениям

под действием ферментов как солода, так и пивоваренных дрожжей. Необходимые для дрожжей питательные вещества – углеводы, аминокислоты и минеральные соли – содержатся в пивном сусле.



*Рис. 30. Пивоваренное производство*

Технологический процесс пивоварения включает следующие стадии: производство солода, варка сусла, сбраживание пивного сусла (главное брожение), выдержка и созревание пива (дображивание), фильтрация и розлив. Для производства солода ячмень замачивают, проращивают и сушат.

В процессе солодоращения в зерне накапливаются ферменты, которые затем превращают крахмал зерна в сбраживаемые сахара, а белки зерна в аминокислоты. При сушке солода под влиянием высокой температуры образуются ароматические вещества, придающие пиву характерные запах и вкус.

Сложной технологической стадией является варка сусла. Измельченный солод обрабатывают теплой водой, и под действием ферментов в раствор переходит 75 % сухих веществ солода. Варку производят в несколько этапов. Температуру регулируют так, чтобы создавались наилучшие условия для действия амилалитических (расщепляющих крахмал) и протеолитических (расщепляющих белки) ферментов. При кипячении сусла белки коагулируют, а вещества хмеля растворяются и придают суслу характерные горечь и аромат.

Процесс брожения пивного сусла разделяется на два периода – главное брожение и дображивание. Главное брожение протекает в бродильных чанах (открытых емкостях) или танках (закрытых емкостях). В зависимости от свойств применяемых дрожжей брожение может быть низовым (холодным – при температуре 6–10 °С) и верховым (теплым – при температуре 14–25 °С). В результате брожения в пиве накапливаются 3–8 % алкоголя, до 0,4 % углекислого газа и побочные продукты.

Главное брожение ведут до получения определенного количества алкоголя, соответствующего данному сорту.

Основная масса дрожжей оседает на дно сосуда, и лишь часть остается в молодом пиве на стадии дображивания. Эта стадия протекает в герметически закрытых емкостях, под давлением при температуре около 0 °С и состоит в медленном дображивании остатка сахаров, насыщении пива СО<sub>2</sub> и оседании дрожжей.

При созревании в пиве происходят сложные биохимические превращения веществ и изменяются органолептические показатели. После главного брожения продукт приобретает вкус и аромат (букет) готового напитка.

Пиво осветляется вследствие оседания дрожжей и различных взвесей – белковых частичек, хмелевых смол и др. Для полного осветления пиво фильтруют и разливают в бутылки и бочки под давлением.

Так производят пиво по классической технологии. Однако в последние десятилетия разработаны и применяются новые прогрессивные способы, позволяющие сократить длительность технологических стадий. Таких способов два: производство пива в непрерывном потоке и в крупных вертикальных емкостях – цилиндрикоконических танках (ЦКТ).

Технология производства пива в ЦКТ состоит в следующем. Танк заполняют на 80–85 % охлажденным суслом при температуре 8–10 °С в течение суток, для чего используют 4 варки: первую порцию аэрируют и в нее задают дрожжи. Брожение протекает при температуре 12–13 °С, после достижения конечной степени сбраживания пиво охлаждают до 0,5–1,5 °С и выдерживают еще 6–7 суток.

В настоящее время по этой прогрессивной технологии производят не только жигулевское пиво, но и сортовое: 12 % пиво за 18–20 суток вместо 38 и 13 % – в течение 22 суток вместо 50. При этом достигается значительный экономический эффект и получается про-



дукция высокого качества. Технология производства пива в ЦКТ широко применяется в нашей стране.

Производство пива является биохимическим процессом, который осуществляется в результате деятельности дрожжей. В пивоварении все микроорганизмы разделяют на полезные, культурные дрожжи и вредные (все остальные).

Жидкие дрожжи задают в количестве 0,5 % к объему сусла; за время брожения количество их возрастает благодаря размножению в 3–3,5 раза. При производстве пива в ЦКТ дрожжи задают из расчета 300 г прессованных дрожжей на 100 л сусла. Для производства пива используют чистые культуры пивоваренных дрожжей, благодаря чему брожение идет более равномерно, продукт получается однообразный по составу и вкусу, качество улучшается, уменьшается опасность инфицирования пива посторонней микрофлорой.

Среди чистых культур пивоваренных дрожжей имеется много штаммов или рас. Эти дрожжи встречаются лишь в условиях низового брожения, в других субстратах их нет. Штаммы пивоваренных дрожжей различаются физиологическими признаками.

Главными производственными показателями дрожжей в пивоварении являются бродильная активность, скорость размножения, способность к оседанию, а также придание пиву определенных вкусовых и ароматических качеств.

В отечественной промышленности применяют в основном пивоваренные дрожжи низового брожения Сахаромицес Карлбергензис (расы 11, 41, 44, 776, S-львовская, 8aM и др.). Эти дрожжи имеют общие свойства: овальную или эллиптическую форму, размеры (длина 8–10 мкм, ширина – 4–6 мкм), являются факультативными анаэробами, споры образуют редко, размножаются почкованием, по Граму окрашиваются положительно.

Разведение чистой культуры дрожжей на пивоваренном заводе включает следующие необходимые условия:

- применение стерильного сусла и стерильной посуды;
- постепенное приучение дрожжей к низкой температуре.

Собственно разведение означает увеличение массы дрожжей от пробирки до объема маточных дрожжей, задаваемого в чан. Процесс разведения состоит из лабораторной и цеховой стадий. После главного брожения дрожжи отделяют, промывают холодной водой и используют повторно для производственных целей, считая их первой генерацией. Производственные дрожжи при условии хороших бро-

дильных свойств и отсутствия в них вредных для пива микроорганизмов можно использовать от 10 до 12 генераций.

Работа по разведению чистой культуры дрожжей, сбору, очистке и хранению семенных (производственных) дрожжей имеет большое значение и отражается на качестве пива. Применение чистой культуры дрожжей с высокой ферментативной активностью обеспечивает энергичный процесс брожения и получение стойкого пива с хорошим вкусом.

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

Однако солодоращение как технический способ накопления ферментов с технико-экономической точки зрения имеет ряд существенных недостатков. Это в первую очередь неизбежная трата ценных составных частей ячменного зерна на дыхание и образование ростка (в среднем около 12 % сухого вещества зерна); большая продолжительность процесса во времени, связанная с длительностью замочки, проращивания ячменя и сушки солода (не менее 10–11 дней).

Основными ферментами, образующимися в процессе солодоращения и имеющими наиболее существенное значение в технологии пивоварения, являются амилолитические, разжижающие и осахаривающие крахмал; протеолитические, расщепляющие белки ячменя до полипептидов различной молекулярной массы и свободных аминокислот; гемицеллюлазные, гидролизующие некрахмальные полисахариды типа гуммивеществ и гемицеллюлоз, растворяющие клеточные стенки эндосперма зерна, благодаря чему облегчается доступ амилолитических и протеолитических ферментов к соответствующим субстратам.

При производстве светлых сортов пива замена 30–50 % солода несоложенным зерном наряду с применением ферментных препаратов позволяет достигнуть 3–5 % экономии ячменя за счет исключения потерь при солодоращении.

В нашей стране с солодом среднего качества без применения микробных ферментных препаратов рекомендуется использовать не более 25 % несоложенных материалов.

В качестве несоложенного сырья в основном используют пивоваренный ячмень II сорта и ячмень с пониженной способностью к про-

растанию, а также кукурузную муку (до 30 %), рисовую сечку, пшеницу и крахмал.

В пивоваренной промышленности используют Амилосубтилин Г10х (0,03 % массы сырья) и мультиэнзимную композицию МЭК-1 (0,025 % массы сырья), а также импортные препараты: Бирзим (Альфа, Альфа-бета, Пента, П-7 и др.) фирмы «Делер» (Германия), Церемикс 2XL, Термамил 120L, Ультрафло L фирмы «Новозаймс» (Дания).

При замене ячменем 40% солода для достижения в сусле высокого содержания редуцирующих сахаров, как и в сусле из 15 % ячменя и 85 % солода, необходимо ввести в затор 0,005–0,007 % Амилосубтилина Г20х. Для достижения конечной степени сбраживания сусле, соответствующей контрольной, необходимо повысить дозу Амилосубтилина Г20х до 0,01 %.

Для получения нормального белкового состава в сусле с 40 % несоложенного ячменя необходимо внести или 0,005–0,008 % Амилосубтилина Г20х, или жидкий препарат Бирзим П-7150 в дозе 200 см<sup>3</sup>/т солода либо 350–700 см<sup>3</sup>/т зернового сырья.

Необходимый уровень активности ферментов в заторе достигается при добавлении 0,025 % МЭК ПП-1, в состав которого входят Амилосубтилин, Протосубтилин и Амилоризин. Комплекс обладает активностью  $\alpha$ -амилазы, эндо- и экзопептидаз, эндо- и экзоглюканаз. Экзопептидазы Амилоризина, имеющие оптимум в слабокислой среде, обеспечивают глубокий протеолиз сырья.

Помимо МЭК ПП-1, в пивоварении используют множество композиций ферментов для гидролиза несоложенного сырья. Обязательным является наличие  $\alpha$ -амилазы,  $\beta$ -глюканазы и протеаз. В состав композиций входят ферментные препараты, проявляющие активность в слабокислой среде.

Совершенствование технологии пива из смешанного сырья идет по пути использования гемицеллюлазных ферментных препаратов. На их основе создаются МЭК с высокой активностью ферментов, расщепляющих некрахмальные полисахариды. В таких МЭК препараты с амилолитической и протеолитической активностью сочетают с гемицеллюлазами (Целловиридином, Ксилакомом, Целлокандином и др.), применение которых способствует сокращению продолжительности осахаривания заторов, снижению вязкости сусле, повышению скорости его фильтрации, выхода экстракта и конечной степени сбраживания.

Гемицеллюлазные ферментные препараты эффективны при переработке некондиционных солодов с низкой степенью растворения. Сусло из некондиционного солода имеет повышенную вязкость и трудно фильтруется.

Охмеленное сусло перед засевом дрожжей не обладает ферментативной активностью. На стадии главного брожения необходимо создать условия для активного размножения дрожжей, их высокой бродильной активности, для расщепления высокомолекулярных коллоидов (белков, глюканов), выделяющихся в среду в процессе жизнедеятельности и автолиза дрожжевых клеток. При внесении в сусло препаратов с протеолитической активностью происходит его обогащение свободными аминокислотами, что приводит к увеличению скорости роста молодых клеток и отмирания старых. Снижение концентрации высокомолекулярных коллоидов увеличивает коллоидную стойкость пива.

Интенсификация процесса, увеличение выхода и качества пива возможны при использовании ферментных препаратов Амилопроторизина Г10х и Г20х. При добавлении ферментного препарата в количестве 10 г/т исходного сырья в последние замочные воды повышается качество солода, увеличивается белковое растворение на 5 %, повышается степень растворения эндосперма зерна на 2,1 %, а длительность осахаривания снижается при этом в два раза.

Эффективно использование Амилопроторизина при получении пивного сусла.

Для повышения стойкости пива используются ферментативные способы. Большинство ферментативных способов стабилизации основано на применении протеолитических ферментов, т.е. на расщеплении белковой составляющей коллоидных частиц. Наряду с этим используются препараты амилаз, глюканаз, целлюлаз.

Для повышения стойкости светлого пива возможно применение Протосубтилина.

При действии препаратов с активностью кислых экзопротеаз в сусле образуются свободные аминокислоты, что тормозит синтез дрожжами разветвленных аминокислот – предшественников высших спиртов и диацетила. В результате обработки сусла препаратами Пектофоетидин П10х, Целлолигнорин П10х содержание высших спиртов в готовом пиве снижается на 6–7 %.

Для повышения коллоидной стойкости светлого пива возможно применение композиции из препаратов Пектофоетидин П10х и Целлолигнорин П10х.

## 5.6. Производство безалкогольных напитков

Для получения безалкогольных напитков хорошего качества необходимо строго соблюдать технологический режим производства, поддерживать высокое санитарное состояние предприятий и систематически проводить микробиологический контроль.

Некоторые слабоалкогольные напитки получают путем брожения (квас и др.). В этом случае большая роль принадлежит микроорганизмам, вызывающим процессы брожения. Безалкогольные напитки вырабатывают из составных компонентов путем купажирования, без активного участия микроорганизмов.

По физико-химическим свойствам безалкогольные напитки представляют собой хорошую питательную среду для микроорганизмов. Напитки содержат 80–90 % воды, 0,5–15 сахара, 0,0005–0,5 органического азота, 0,005–0,5 % минеральных солей, иногда следы витаминов группы В; рН напитков 2,5–4,0. Патогенные микроорганизмы в напитках в основном не выживают.

Микроорганизмы используют только для производства напитков, получаемых способом брожения, в основном кваса. Хлебный квас является продуктом незаконченного спиртового и молочнокислого брожения. Спиртовое брожение вызывают дрожжи; оно сопровождается выделением углекислого газа и накоплением до 0,5 % спирта. Для производства кваса используют пекарские дрожжи, жидкие пивоваренные или чистые культуры. В последнем случае применяют комбинированную закваску из квасных дрожжей и молочнокислых бактерий в виде живых культур или сушеных, технически чистых, что гарантирует получение продукции хорошего качества. Применяют дрожжи из семейства сахаромицетовых, которые имеют температурный оптимум 26–30°C, хорошо сбраживают глюкозу и сахарозу; размер клеток: длина – 6,3–7,5 мкм, ширина 5–7 мкм. Применяемые для производства кваса молочнокислые бактерии являются гетероферментативными короткими палочками. В квасном сусле они образуют молочную кислоту и летучие вещества, создающие специфические вкус и аромат.

В производстве других безалкогольных напитков и фруктовых вод микроорганизмы не применяют. Попадающие в них микроорганизмы являются нежелательными и при большом обсеменении вызывают порчу продукции.

Промышленностью производится широкий ассортимент квасов и напитков из хлебного сырья. По технологическим приемам, которые в значительной степени определяют состав конечного продукта, квасы можно разделить на две группы: квасы, получаемые с использованием процесса брожения, и квасы и напитки, получаемые купажированием. Наибольшим спросом пользуются квасы, получаемые путем брожения, в частности, квас хлебный.

Применяется интенсивная технология концентрата квасного сусла с использованием 70–90 % несоложенного сырья и 10–30 % ржаного ферментированного солода. В качестве осахаривающих средств предложена мультиэнзимная композиция, состоящая из Амилоризина П10х, Ксилоглюканофоептидина П10х и Амилосубтилина Г10х, в соотношении 1 : 2,5 : 5, позволяющая эффективно использовать до 90 % несоложенного сырья. При переработке этого количества несоложенных зернопродуктов в затор вносят МЭК в количестве 0,17–0,18 % массы засыпи. Время затирания при этом сокращается на 12,5 % по сравнению с затрачиваемым при использовании режима, предусматривающего внесение 50 % солода без ферментных препаратов. Целесообразно совмещение стадий осахаривания и концентрирования квасного сусла, для чего в него перед упариванием вносят Амилоризин П10х в количестве 0,01 % массы сухих веществ сусла. В этом случае при температуре 55–60 °С в течение времени, необходимого для сгущения сусла до содержания сухих веществ 70 %, гарантированно проходит его осахаривание. Данный технологический прием позволяет повысить в концентрированном сусле содержание редуцирующих сахаров на 18 %, а  $\alpha$ -аминного азота – на 22 %.

Для увеличения степени использования экстрактивных веществ зернового сырья, а также сокращения времени фильтрации затора и промывания дробины целесообразно проведение этих стадий при температуре 90–95 °С. При этом выход экстракта увеличивается в среднем на 0,7 %, а время фильтрации сокращается на 15–20 %.

Установлено, что при гидролизе слизистых веществ ржи Ксилоглюканофоептидином П10х образуется наибольшее количество сахаров – предшественников ароматобразующих соединений.

## **5.7. Консервное производство**

Существуют различные методы консервирования – физические, химические, микробиологические. К видам консервирования расти-

тельного сырья, основанным на биохимических процессах с участием микроорганизмов, относят квашение, соление и мочение плодов и овощей, которые осуществляются за счет молочнокислого и спиртового брожения, вызываемого микроорганизмами, находящимися в сырье. Процессы квашения, соления и мочения основаны на создании благоприятных условий для развития молочнокислых бактерий, находящихся на поверхности овощей и плодов.

Иногда при квашении применяют специально выращенные чистые культуры бактерий, что позволяет ускорить процесс брожения и получить продукты более высокого качества. В связи с тем, что квашение, соление, мочение основано на ферментативных процессах, овощи и плоды, полученные этим методом консервирования, называют ферментированными.

В результате развития молочнокислых бактерий и сбраживания сахаров в продуктах переработки овощей и плодов образуется 0,6–1,8 % молочной кислоты, которая подавляет развитие гнилостных, уксуснокислых, маслянокислых и других микроорганизмов, продуцирующих вещества, обладающие неприятными запахом и вкусом.

Квашение, соление и мочение – это различные названия одного и того же способа консервирования.

Квашеные овощи (капуста) отличаются более высоким содержанием молочной кислоты (до 1,8 %) и малым количеством соли (до 2 %). Такое соотношение этих компонентов дает возможность получить продукт кисловато-солончатого вкуса.

Соленые овощи (огурцы) содержат по сравнению с квашеной капустой меньше молочной кислоты (до 1,4 %) и больше соли (до 4,5 %), что придает им более выраженный солончатый вкус.

Яблоки квасят с добавлением соли, солода, сахара.

При квашении, солении и мочении одновременно с молочнокислыми бактериями развиваются дрожжи, вызывающие спиртовое брожение. Содержание спирта в квашеных овощах достигает 0,7 %, в моченых яблоках – 1,8 %. Соединяясь с молочной и другими кислотами, спирт образует сложные эфиры, которые придают квашеным овощам и плодам характерный аромат.

Помимо молочнокислого и спиртового брожений, возможно развитие других видов брожения, вызываемых различными микроорганизмами. Например, маслянокислые бактерии расщепляют сахар или молочную кислоту с образованием масляной кислоты, углекислого газа и водорода, которые ухудшают вкус и запах готового продук-

та. Уксуснокислые бактерии и многие плесени, относящиеся к строгим аэробам и развивающиеся только в присутствии кислорода, образуют уксусную, муравьиную и пропионовую кислоты, которые ухудшают качество продукции.

Поэтому для получения продукции высокого качества необходим ряд условий. Прежде всего, надо поддерживать на должном уровне санитарно-гигиеническое состояние помещений, оборудования, тары. Рекомендуется использовать сырье, содержащее достаточное количество сахара (в капусте – 4–5 %, в огурцах – 2–2,5 %), поэтому для квашения, соления, мочения используют плоды и овощи только определенных хозяйственно-ботанических сортов, содержащих достаточное количество сахара. Необходимо также поддерживать благоприятную температуру для нормального протекания молочнокислого брожения. Для молочнокислых бактерий оптимальной является температура 34–37 °С. В связи с тем, что эти же температуры благоприятны для развития маслянокислых и других нежелательных микроорганизмов, квашение необходимо проводить при температурах от 17 до 24 °С. Более низкие температуры (от 0 до 4 °С) очень подавляют активность маслянокислых бактерий и некоторых плесеней. Поэтому квашение и соление могут проводиться в два этапа. Вначале капуста ферментирует бурно при температуре 17–24 °С в течение 9–12 дней, при этом в ней накапливается 0,5–0,6 % молочной кислоты. Затем она дображивает при температуре 1–2 °С. При более высокой температуре брожения (25–30 °С) капуста перекисает и размягчается, вкус и запах ее ухудшаются. При температуре 0 °С и ниже капуста может не закваситься.

При высоких оптимальных температурах огурцы ферментируют в течение 2–3 суток, при этом накапливается 0,3–0,4 % молочной кислоты. Затем бочки помещают на склады для окончательной ферментации, которая при хранении огурцов на неохлаждаемых складах (температура 3–7 °С) длится 25–30 дней, на охлаждаемых (температура 0–1 °С) – 60 дней.

Существенное значение при квашении капусты и солении овощей и плодов имеет создание анаэробных условий.

При квашении капусты применяют соль – 2–2,5 % от массы продукции, при солении огурцов – 6–8, при мочении яблок – 0,5–1,5 %. При 2 % концентрации соли подавляется развитие маслянокислых бактерий, при 6–8 % – полностью прекращается их деятельность. Соль вызывает изменения коллоидной системы тканей и плазмолиз



клетки. Проникая внутрь клеток плодов и овощей, она вытесняет из них сок и тем самым способствует более быстрому образованию рассола и развитию молочнокислых бактерий, а также придает плотную консистенцию и формирует вкус готовых продуктов.

Продуктами массового производства являются капуста квашеная, огурцы и помидоры соленые. В меньших количествах вырабатывают арбузы соленые, яблоки моченые, свеклу и морковь квашеные.

## 5.8. Производство чая

В зависимости от исходного сырья и технологии переработки вырабатывают чай следующих разновидностей и типов:

*рассыпчатый (байховый)* – черный, зеленый и желтый;

*прессованный* – зеленый кирпичный, плиточный черный и зеленый; таблетированный черный и зеленый;

*экстрагированный (быстрорастворимый)* – концентрированные жидкие или сухие экстракты черного или зеленого чая.

Черный байховый чай изготавливают из кондиционного чайного листа, который перерабатывают по технологии, включающей следующие операции: завяливание и скручивание, чередующиеся с «зеленой» сортировкой; ферментацию; сушку в два приема; сухую сортировку.

Завяливание проводят искусственно – продуванием чайного листа кондиционированным воздухом с температурой 35–40 °С в течение 6–8 ч с целью придания ему эластичности вследствие снижения тургора клеток из-за потери 9–13 % воды и некоторого изменения его химического состава.

Скручивание листа проводится с целью разрушения его клеток для активации окислительных процессов и придания ему характерной формы трубочек, разделения флеша на составные части. Из разрушенных клеток выделяется клеточный сок, который, обволакивая поверхность листа, приходит в контакт с кислородом воздуха – начинается ферментативный процесс. Поэтому скручивание считают первой фазой ферментации. Скручивание осуществляют в 3–4 приема по 40–45 мин, после каждого из которых проводят «зеленую» сортировку – отделение скрученных чаинок от нескрученного листа. Так как нежные листья скручиваются быстрее, то такой сортировкой удастся отделить более нежные (почку, первый лист) составные части флеша (глушки) от менее нежных.

Каждую фракцию передают на ферментацию отдельно. При этом многие химические компоненты листа подвергаются ферментативному окислению, чай теряет зеленый цвет и запах зелени, приобретает специфические ароматические и вкусовые свойства, а также коричневую окраску в основном за счет окисления дубильных веществ.

Ферментативные процессы приостанавливаются сушкой чайного листа до остаточной влажности 3–4 %. Сушка фиксирует сформировавшиеся потребительские свойства черного байхового чая.

После сушки чай сортируют, отделяя листовые нежные чайники (листовой чай) от ломаных и грубых. Одновременно чай освобождают от высевок и крошки. Грубые фракции пропускают через чаерезательные машины. Резаные чаи объединяют с ломаными под общим названием «Мелкие». Отсортированный чай упаковывают.

В мировой торговле доля черных чаев составляет около 98 %, среди которых преобладает байховый. В последнее время в мировом производстве возрастает доля мелкого (брокенированного) байхового черного чая. Так, в Индии и Шри Ланке эти мелкие виды чая составляют 80–85 % общих объемов производства.

Вырабатывают мелкий (брокенированный) черный чай из слабозавяленного листа, который подвергают резке-измельчению в сочетании со скручиванием и ферментацией, что обеспечивает высокую степень разрушения клеток листа. Эта технология позволяет получить качественный продукт из относительно грубого сырья. Такой чай характеризуется легкой экстракцией, интенсивным настоем и приятным, более выраженным вяжущим вкусом, но не обладает нежным, изысканным ароматом, который образуется при переработке листа классическим методом. Поэтому от чайного листа сначала отделяют нежную фракцию, которую обрабатывают по классической технологии.

В Грузии также вырабатывают мелкий (брокенированный) черный чай СТС (горошкообразный). При этом чайный лист завяливают до влажности 64–67 %, подвергают кратковременному (20–30 мин) скручиванию в роллерах и «зеленой» сортировке. Нежную фракцию обрабатывают по традиционной технологии для получения чая высших сортов, а остаточную фракцию подвергают двукратной резке-измельчению с подкручиванием и сортировке с последующим скручиванием каждой фракции в роллерах в течение 25–30 мин. В период резки-измельчения и скручивания в чайном листе практически за-

вершаются ферментативные процессы и ферментацию как самостоятельную операцию не проводят. После скручивания чайный лист подвергают однократной сушке до остаточной влажности 4–6 % и термообработке (выдержке в течение 1,5–5 ч при 60–70 °С), а затем сухой сортировке и упаковке.

Зеленый байховый чай получают из кондиционного чайного листа, который перерабатывают по технологии, включающей следующие операции: обработку горячим увлажненным воздухом или паром; подсушку и выдержку (завяливание); скручивание, разбивку комьев и «зеленую» сортировку; сушку.

При обработке горячим воздухом или паром чайного листа его ферменты инактивируются, биохимические процессы в листе прекращаются и происходит фиксация соединений зеленой окраски чайного листа. Фиксированный чайный лист подсушивают и скручивают без пресса, а образующиеся комья разбивают на комколомателях при «зеленой» сортировке, при которой чайный лист разделяют по степени нежности и размерам на мелкую и крупную фракции. Отсортированный чай сушат до содержания в нем остаточной влаги 3–4 %, а затем подвергают сухой сортировке с разделением всей массы на чай листовую, чай мелкий, высевки и крошки. Отсортированный чай упаковывают.

Желтый байховый чай получают из сортового чайного листа путем завяливания одной части листа и фиксации другой части, смешивания завяленного и фиксированного листа с последующим скручиванием, кратковременного ферментирования скрученного листа с последующим высушиванием.

По качеству изготовленный нефасованный байховый чай делят на сорта (их принято называть фабричными):

зеленый – букет, высший, 1, 2 и 3-й; черный – букет, высший I категории (экстра) и II категории; 1-й и 2-й – I, II и III категорий, 3-й; желтый – высший II категории и 1-й.

Для розничной торговли и предприятий общественного питания выпускают чай черный, зеленый и желтый байховые фасованные, которые получают на чаеразвесочных фабриках купажированием соответственно черного, зеленого или желтого чаев и импортного чайного сырья по утвержденным рецептурам. Согласно международным правилам черный чай любого купажа должен содержать теафлавинов и теарубигинов в соотношении не ниже 1:16.

## Контрольные вопросы к разделу 5

1. Какие биохимические процессы происходят при брожении теста?
2. Окислительно-восстановительные ферменты, используемые в хлебопечении.
3. С какой целью в хлебопечении используют фермент амилазу?
4. Цель применения ферментных препаратов в кондитерской отрасли.
5. Особенности ферментных препаратов, используемых в кондитерском производстве.
6. Какие микроорганизмы осуществляют брожение в технологии получения кислой капусты, соленых огурцов, оливок?
7. Чем отличается технология овощных ферментированных напитков от технологии классического квашения овощей?
8. Особенности технологии зеленого и черного чая.
9. Ферменты, оказывающие влияние на качество готового чая.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растения являются самой распространенной составной частью живого мира нашей планеты. Они играют колоссальную роль в решении жизненно важных проблем, в частности, удовлетворения человека пищей. Одним из важнейших направлений развития пищевой отрасли является использование безотходных и малоотходных технологий, более широкое вовлечение в хозяйственный оборот вторичных растительных сырьевых ресурсов.

Общепризнано, что одним из определяющих факторов развития отрасли является наличие дешевой сырьевой базы. В первую очередь это относится к технологическим процессам, осуществляемым путем ферментации. Предполагается широкое использование субстратов, относящихся к числу отходов в области пищевой промышленности. Другим важным источником должно стать возобновляемое растительное сырье, отходы переработки плодов и овощей. Например, производство пектина и пектинопродуктов основывается на таких вторичных сырьевых ресурсах, как свекловичный жом, яблочные, виноградные и цитрусовые выжимки.

Современную биоконверсию растительного сырья, которая является не только сферой осуществления новейших технологий, но и означает новый уровень мышления, следует представить как синтез отдельных научных и практических направлений. Результат интеграции этих направлений позволит полностью выявить потенциал биотехнологических технологий.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Австриевских, А.Н.* Продукты здорового питания: новые технологии, обеспечение качества, эффективность применения / А.Н. Австриевских, А.А. Вековцев, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2005.
2. Безопасность продовольственного сырья и пищевых продуктов: учеб. пособие / И.А. Рогов, Н.И. Дунченко, В.М. Позняковский [и др.]. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
3. *Бутова, С.Н.* Биотехнологическая деградация отходов растительного сырья / С.Н. Бутова. – М.: Россельхозакадемия, 2004.
4. *Грачева, И.М.* Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова. – М.: Элевар, 2000.
5. *Кислухина, О.В.* Биотехнологические основы переработки растительного сырья / О.В. Кислухина, И. Кюдулас. – Каунас: Технология, 1997.
6. *Конова, Н.И.* Технология хлебопекарного, макаронного и кондитерского производства: учеб. пособие / Н.И. Конова, Г.И. Назимова. – Кемерово: КемТИПП, 2005.
7. *Косюра, В.Т.* Основы виноделия / В.Т. Косюра, Л.В. Донченко, В.Д. Надыкта. – М.: ДеЛи Принт, 2004.
8. *Матвеева, И.В.* Биотехнологические основы приготовления хлеба / И.В. Матвеева, И.Г. Белявская. – М.: ДеЛи Принт, 2001.
9. Микронутриенты в питании здорового и больного человека / В.А. Тутельян, Б.П. Суханов, В.Б. Спиричев [и др.]. – М.: Колос, 2002.
10. *Неверова, О.А.* Пищевая биотехнология продуктов из сырья растительного происхождения: учеб. / О.А. Неверова, Г.А. Гореликова, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
11. *Позняковский, В.М.* Гигиенические основы питания, качество и безопасность пищевых продуктов: учеб. / В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
12. *Поляков, В.А.* Научное обоснование и разработка технологии биоконверсии растительного сырья в производстве солода, пива, алкогольных и безалкогольных напитков: дис. . . . д-ра техн. наук / В.А. Поляков. – М., 2003.
13. *Помозова, В.А.* Производство кваса и безалкогольных напитков: учеб. пособие / В.А. Помозова. – СПб.: ГИОРД, 2006.

14. *Рогов, А.И.* Пищевая биотехнология: в 4 кн. Кн. 1. Основы пищевой биотехнологии / А.И. Рогов, Л.В. Антипова, Г.П. Шуваева. – М.: Колос, 2004.
15. *Рогов, И.А.* Химия пищи / И.А. Рогов, Л.В. Антипова, Н.И. Дунченко. – М.: КолосС, 2007.
16. *Саловарова, В.П.* Эколого-биотехнологические основы конверсии растительных субстратов: учеб. пособие / В.П. Саловарова, Ю.П. Козлов. – М.: Энергия, 2007.
17. Технология биоконверсии растительного сырья: учеб. пособие / П.В. Миронов, Н.А. Величко, О.Н. Еременко [и др.]. – Красноярск: СибГТУ, 2002. Ч. 1.
18. Технология биоконверсии растительного сырья: учеб. пособие / П.В. Миронов, Н.А. Величко, О.Н. Еременко [и др.]. – Красноярск: СибГТУ, 2002. Ч. 2.
19. Технология пищевых производств / Л.П. Ковальская, И.С. Шуб, Г.М. Мелькина. – М.: Колос, 1999.
20. Экспертиза напитков. Качество и безопасность: учеб.-справ. пособие / *В.М. Позняковский* [и др.]. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
21. Экспертиза пищевых концентратов. Качество и безопасность: учеб.-справ. пособие / *В.М. Позняковский* [и др.]. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.
22. Экспертиза продуктов переработки плодов и овощей. Качество и безопасность: учеб.-справ. пособие / *И.Э. Цапалова* [и др.]. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2007.

# **БИОКОНВЕРСИЯ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

**Учебное пособие**

**Машанов Александр Иннокентьевич  
Величко Надежда Александровна  
Ташлыкова Елена Евгеньевна**

*Редактор В.А. Сорокина*

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 24.49.04.953.П. 000381.09.03 от 25.09.2003 г.

Подписано в печать 26.05.2014. Формат 60x84/16. Бумага тип. № 1.

Печать – ризограф. Усл. печ. л. 14,0. Тираж 110 экз. Заказ № 268

Издательство Красноярского государственного аграрного университета  
660017, Красноярск, ул. Ленина, 117