

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАНА
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

На правах рукописи
УДК 663.15(075.8)

АХРАРОВ ДИЛШОД УБАЙДУЛЛАЕВИЧ

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ
СПИРТОВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.

Специальность 5А522904 "Биотехнология пищевых продуктов и кормов "

На соискание академической степени магистра

"Биотехнология пищевых продуктов и кормов "

ДИССЕРТАЦИЯ

Научный консультант _____ д.б.н. проф. З.Р.Ахмедова

Научный руководитель _____ к.б.н. доц. Р.М.Артикова

Ташкент-2012

О Г Л А В Л Е Н И Е

ВВЕДЕНИЕ

Обоснование и актуальность темы

Цель и задачи эксперимента

1 ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.1. Физико-химические свойства и механизм действия амилаз
- 1.2. Применение ферментных препаратов в производстве спирта
- 1.3. Сырья для получения микробных ферментов

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

- 2.1. Характеристика грибных и бактериальных культур-активных продуцентов амилаз (*Aspergillus niger* и *Bacillus subtilis*)
- 2.2. Поверхностный способ культивирования продуцентов амилаз на твердых питательных средах
- 2.3. Определение активности ферментов
- 2.4. Глубинный способ получения ферментов
- 2.5. Определение углеводов (свободных) по методу Дюбуа.
- 2.6. Подготовка культур микроорганизмов к применению для осахаривания разваренной массы

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

- 3.1. Отбор активных штаммов микроорганизмов – продуцентов амилолитических ферментов.
- 3.2. Динамика роста, развития и накопления α -амилазы бактерией *Bacillus subtilis* -9
- 3.3. Оптимизация состава питательной среды и условий культивирования для получения амилолитических ферментов.
- 3.4. Применение α -амилаз в спиртовой промышленности

ВЫВОДЫ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

ПРИЛОЖЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время применение ферментных препаратов является неотъемлемой частью большинства технологических процессов пищевой промышленности. В частности, протеолитические и амилолитические ферменты используются в пивоварении, хлебопечении, мясо-молочной и спиртовой промышленности, находят широкое применение в текстильной промышленности, в производстве детергентов, в качестве кормовых добавок в сельском хозяйстве, для переработки отходов мясной и птицеперерабатывающей промышленности.

В спиртовой промышленности, перерабатывающей крахмалистое сырье, широко применяются ферменты гидролитического расщепления крахмала. Для этой цели используется зерновой солод и ферментные препараты микробного происхождения. Применяемый в спиртовом производстве зерновой солод осуществляет гидролиз крахмала до сбраживаемых углеводов и является источником азотистого питания для дрожжей и при осахаривании крахмалистого сырья производит частичную деструкцию его клеточных стенок и белковых веществ.

Однако при применении солода из-за ограниченной возможности создания достаточно высокой концентрации ферментов скорость осахаривания и протеолиза сырья остается низкой, что затрудняет интенсификацию процесса брожения. Эффективная замена солода ферментами микробного происхождения является важной задачей. Опыт работы спиртовых заводов в последние 20 лет показано, что применение ферментных препаратов экономически оправдано: интенсифицируется процесс осахаривания крахмала, повышается степень использования сырья, стабилизируются технологические процессы.

Все ферментные препараты, предназначенные для спиртовой промышленности можно подразделить на три основные группы по

специфичности их воздействия на различные высокомолекулярные полимеры зернового сырья.

Достаточно широко представлены ферментные препараты амилолитического действия, способствующие гидролизу крахмала. К ним относятся ферменты разжижающего, декстринирующего и осахаривающего воздействия на крахмал. Эти ферменты можно условно подразделить на три класса:

Бактериальная α -амилаза, образующая при гидролизе крахмала декстрины с различной степенью полимеризации. Источниками бактериальной α -амилазы являются ферментные препараты: амилосубтилин - синтезируемые *Bacillus subtilis*. *Bacillus Licheniformis*.

Грибная α -амилаза, обладающая эндоамилазной способностью к гидролизу крахмала с образованием растворимых декстринов, олигосахаридов и мальтозы, с оптимумом действия 45 - 55 гр.С. и рН 4,8 - 5,5. Источник: *Aspergillus oryzae*.

Глюкоамилаза, предназначенная для осахаривания частично расщепленных полимеров крахмала с образованием глюкозы. Источники: *Aspergillus awamori* или *Aspergillus niger*.

Ко второй группе относятся ферменты *протеолитического действия*, гидролизующие белковые полимеры зерна, которые также подразделяются на классы.

Бактериальные протеиназы, продуцируемые *Bacillus subtilis* или *Bacillus licheniformis* Эти ферменты повышают технологичность сусла, снижают вероятность белкового осаждения, но не обеспечивают дрожжевые клетки легкоусвояемым аминным азотом.

Грибные протеазы, амилопротооризин, протооризин - содержат комплекс протеиназ и пептидаз (более 5 протеолитических ферментов), которые гидролизуют белки до коротких пептидов и свободных аминокислот, ассимилируемых дрожжевой клеткой. Применение этих ферментов позволяет не только снять коллоидно белковые образования, но и

обеспечить азотистым питанием дрожжи. В результате повышения бродильной активности дрожжей (на 20-25 %) интенсифицируется процесс спиртового брожения (на 30 - 40%), увеличивается выход спирта.

К третьей группе относятся ферменты *целюлолитического действия*, гидролизующие некрахмальные полисахариды зерна. Эти препараты снижают вязкость сусла, повышают доступность крахмала к действию амилолитических ферментов, способствуя увеличению выхода спирта. Препараты этой группы в основном предназначены для повышения эффективности сбраживания таких видов зерна, как рожь и ячмень[17].

В настоящее время многие спиртзаводы используют для ферментативной обработки крахмалсодержащего сырья ферментные препараты амилолитического действия. Нашей задачей является изучить возможности применения новых ферментных препаратов для повышения эффективности биотехнологических процессов переработки крахмалсодержащего сырья и технологий их применения.

Применение ферментных препаратов требует точного соблюдения технологий их применения, которая разрабатывается на основе биохимических и технологических характеристик препарата в каждом конкретном случае. При использовании ферментных препаратов в производственных условиях необходимо учитывать физико-химические показатели производства (рН и минеральный состав воды, рН и температура замеса и сусла, длительность стадий ферментативной обработки крахмалсодержащего сырья).

Одним из перспективных препаратов, широко применяемых в производстве спирта является препарат бактериальной термостабильной α -амилазы. Препарат гидролизует внутренние α -1,4-гидролизные связи крахмала и продуктов его последовательного расщепления, что приводит к быстрому снижению вязкости клейстеризованного крахмала, тем самым обеспечивая подготовку сусла к действию глюкоамилазы. Конечными

продуктами действия являются декстрины и олигосахариды. Максимальная эффективность их действия находится в интервале температур 80 - 95 гр Цельсия и значении рН 5.0 - 8.0. Препараты обладают высокой термостабильностью: термостатирование при температуре 95 гр Цельсия в течение 1 часа приводит к потере 40 % от исходной активности, температура полной инактивации - выше 105 - 110 гр Цельсия.

Высокая термостабильность и оптимум действия этих ферментных препаратов способствуют снижению расхода препаратов для разжижения крахмала зернового сырья в спиртовом производстве. Нормы расхода термостабильных препаратов по амилолитической активности соответствуют 0,2 - 0,3 ед. АС/г крахмала, против 1,0 - 1,5 ед АС/г для мезофильных амилаз. Уровень активности определяется по ГОСТ при 30 гр. Цельсия x [7].

ОБОСНОВАНИЕ И АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ

По современной номенклатуре технология спирта относится к биотехнологии. Основные процессы получения спирта — превращение крахмала в сахар и сахара в этиловый спирт под действием биологических катализаторов (ферментов). Так как ферменты для гидролиза крахмала до сахаров вырабатываются плесневыми грибами и бактериями, а для превращения сахаров в спирт — дрожжами, технология спирта неразрывно связана с технической микробиологией.

Технология спирта включает в себя следующие процессы: подготовку сырья к развариванию, разваривание зерна и картофеля с водой для разрушения клеточной структуры и растворения крахмала; охлаждение разваренной массы и осахаривание крахмала ферментами солода (пророщенного зерна) или культур плесневых грибов; сбраживание сахаров дрожжами в спирт; отгонку спирта из бражки и его ректификацию, а также приготовление солода путем проращивания зерна или культивирования плесневых грибов и бактерий для получения амилолитических и протеолитических ферментных препаратов, выведение и размножение засевных дрожжей. При получении спирта из мелассы перерабатывается содержащаяся в ней сахароза, поэтому процессы разваривания и осахаривания исключаются.

Одним из важнейших направлений научно-технического прогресса в отрасли является частичная и полная замена солода ферментными препаратами микробного происхождения. Создание комплексных ферментных препаратов, состоящих из α -амилаз, глюкоамилаз, протеиназ, целлюлаз, позволяет более глубоко осуществить ферментативный гидролиз углеводов (в частности, крахмала) и белков зерно-картофельного сырья и полнее сбраживать сусло до основного продукта — этилового спирта. Таким образом, дозировки каждого фермента и комплекса в целом, условия проведения ферментативного гидролиза субстрата приобретают решающее значение в эффективном применении

ферментных препаратов и сокращении производственных потерь зерно-картофельного сырья.

Большим и неоспоримым достоинством ферментов перед химическими катализаторами является то, что они действуют при нормальном давлении, при температурах от 20 до 70 °С, рН в диапазоне от 4 до 9 и имеют в большинстве случаев исключительно высокую субстратную специфичность, что позволяет в сложной смеси биополимеров направленно воздействовать только на определенные соединения. Все это свидетельствует о том, что производство ферментных препаратов является одним из перспективных направлений в биотехнологии, которое будет и далее интенсивно развиваться и расширяться.

При применении ферментных препаратов микробного происхождения можно значительно повысить концентрацию необходимых ферментов в среде и обеспечить таким образом глубокий гидролиз крахмала до сбраживаемых сахаров за сравнительно короткий период.

Основная цель применения ферментов микробного происхождения на стадии осахаривания – исключение стадии соложения зерна, что приводит к интенсификации процесса и снижению себестоимости спирта.

Использование ферментов микробного происхождения в спиртовом производстве позволяет гидролизовать не только крахмал, но и клеточные стенки растительного сырья, а также оболочки и пленки, что обеспечивает наилучший контакт крахмала с амилолитическими ферментами, повышение степени использования сухих веществ сырья и увеличение выхода спирта за счет образования сбраживаемых сахаров при гидролизе других полисахаридов.

Применение протеолитических ферментов позволяет гидролизовать белки, пептоны и полипептиды сырья до аминокислот, являющихся ценным азотным питанием для дрожжей. При непрерывном разваривании крахмалистого сырья применяется предварительный нагрев замесов до 90-95⁰ С целью смягчения режима последующего этапа водно-тепловой обработки

сырья, который проводится при повышенной температуре и избыточном давлении, и снижения потерь сбраживаемых веществ. Однако при этом в предразварнике происходит клейстеризация и возрастает вязкость замесов, что затрудняет их дальнейшую транспортировку.

Использование для разжижения замесов зернового солода или солодового молока нецелесообразно так как в них содержится целый ряд других ферментов, способствующих накоплению сахаров и аминокислот. Наличие замесе значительного количества свободных сахаров и аминокислот приводит к усилению сахароаминной реакции при последующем разваривании, что, в свою очередь увеличивает потери сбраживаемых веществ. Кроме того, при использовании солода во время разваривания инактивируются сахаривающие ферменты, в связи с чем требуется дополнительный расход солода на осахаривание. Наиболее целесообразно поэтому применять ферментативное разжижение на стадии зарваривания с использованием препарата термостабильной α амилазы, обладающего высокой разжижающей способностью и лишенного осахаривающих ферментов.

Применение бактериальной α амилазы при нагреве замесов до 85...95⁰ С позволяет полностью использовать вторичный пар для предварительного подогрева и смягчить режим разваривания, это сопровождается уменьшением расхода пара на тепловую обработку и соответствующим снижением потерь крахмала при разваривании.

Повышению эффективности применения ферментов микробного происхождения для гидролиза крахмала растительного сырья способствовало установление важной роли фермента глюкоамилазы.

Способность глюкоамилазы интенсивно расщеплять как α -1,4-, так и α -1,6- и даже α -1,3-связи, выдвинула этот фермент на первое место по эффективности гидролиза крахмала до сбраживаемых сахаров. Регулируя концентрацию глюкоамилазы в осахариваемом заторе, можно значительно

интенсифицировать процесс гидролиза и сократить таким образом продолжительность брожения в 2-3 раза.

В целях интенсификации процесса осахаривания крахмала и сбраживания осахаренного сусле дрожжами с помощью ферментов микробного происхождения должны быть решены следующие задачи.

- на первом этапе осахаривания, который начинается при перепаде температур от 105°C (в выдерживателе) до 60°C (в осахаривателе) необходимо обеспечить быстрый гидролиз крахмала до декстринов и сопутствующих сахаров для предотвращения ретроградации при дальнейшем охлаждении;

- на втором этапе осахаривания при температуре $56\dots 60^{\circ}\text{C}$ в течение 5-60 мин (в зависимости от принятого режима) и при температуре 30°C (при последующем брожении) надо обеспечить глубокий гидролиз крахмала за короткий срок.

Для дальнейшего повышения выхода спирта из единицы сырья за счет снижения потерь крахмала и сбраживаемых углеводов и использования других (не крахмальных) углеводов сырья необходим интенсивный гидролиз целлюлозы и гемицеллюлозы оболочек и клеточных стенок сырья, обуславливающий лучший контакт крахмала с амилолитическими ферментами, а также дополнительное образование сбраживаемых сахаров за счет гидролиза этих полисахаридов.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Целью настоящей работы явилась изучение ферментативно активных культур микроорганизмов и возможности получения амилолитических ферментных препаратов из грибов рода *Aspergillus* и бактерий рода *Bacillus* полученные из коллекции культур Института Микробиологии АНРУз. Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

1. Культивирования продуцентов амилолитических ферментов и выявления активных культур.

2. Изучение состава питательной среды для оптимизации условий максимального ферментообразования, отбор рациональных питательных сред для максимального биосинтеза ферментов при глубинном и поверхностном культивировании продуцентов.

3. Разработка оптимальных режимов культивирования отобранных продуцентов.

4. Выбор эффективных способов выделения и концентрирования ферментов с высокой амилолитической активностью

5. Разработка рекомендаций для испытания полученных препаратов на практике.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Физико-химические свойства и механизм действия амилаз

В последние годы расширяются возможности использования микроорганизмов как биотехнологических источников промышленно важных ферментов. Крахмальгидролизующие ферменты, в частности амилазы, привлекают внимание исследователей благодаря их технологической важности и экономической выгоды. Они характеризуются широким спектром применения в различных отраслях, таких как клиническая, медицинская и аналитическая химия, в сахарификации крахмала, текстильной, пищевой, бродильной, фармацевтической, бумажной, пивоваренной и спиртовой промышленности. Амилазы составляют около 30% мировой продукции ферментов [36].

Известно, что продуцентами амилаз являются микромицеты (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*) и бактерии (*Bacillus*). Данные относительно некоторых их физико-химических свойств приведено в табл. 2. Исследование α -амилаз *A. flavus*, *A. awamori* и *A. oryzae* [16] показало, что они характеризовались одинаковыми значениями рН-оптимумив активности 5,0–5,25; зона их рН-стабильности — 6,0–8,0; точка наибольшей стойкости — 7,0. Все три α -амилазы стабильные при комнатной температуре, впрочем фермент *A. flavus* был более стойким к нагреванию, чем *A. awamori* и *A. oryzae*, и при 55⁰С в течение 1 ч хранил 70% исходной активности. Температурный оптимум α -амилазы *A. flavus* — 50⁰С, а α -амилаз *A. awamori* и *A. oryzae* — 40⁰С. Стабильность исследуемых ферментов к тепловой денатурации повышалась в присутствии субстрата (крахмалу). Галогениды в концентрации 0,25М не стабилизировали α -амилазы, а наоборот ускоряли их инактивацию. Это влияние росло в последовательности $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{F}^- < \text{I}^-$ и присущий всем трем ферментам. Мочевина концентрацией от 1,0 до 6,0 М денатурировала белки. Инактивируя действие было более выраженное для α -амилаз *A. awamori* и *A. oryzae*, устойчивым был фермент из *A. flavus*. ЭДТА — сильный ингибитор

всех трех α -амилаз, а атомы кальция—важны для их активности и стабильности.

Поскольку микробная конверсия крахмала и до сих пор остается одним из важных направлений исследований в биотехнологии, для совершенствования биотехнологических процессов необходимым является поиск высокоэффективных амилолитических ферментов с новыми свойствами.

Таблица 1.1

Физико-химические свойства некоторых α -амилаз

Источник выделения	Молекулярная масса, кДа	Оптimum действия		Ингибитор	Активатор
		pH	t°C		
<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. awamori</i> <i>A. oryzae</i> [17]	-	5,0–5,25	50 40 40	ЭДТА	Ca ²⁺
<i>A. flavipes</i> [18] 1 2 3	50 63 50	6,0–7,5 5,5 5,5; 7,5	30–50 30–50 60–80	ЭДТА Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	Ca ²⁺
<i>A. niger</i> [19]	–	4,0	50–55	-	-
<i>Bacillus sp.</i> 86 [21]	83–90	6,0; 8,5	85–90	-	-
<i>Bacillus sp.</i> PN5 [22]	–	10,0	90	-	-
<i>B. subtilis</i> [24]	48	-	-	Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Pb ²⁺ , Hg ²⁺ , Mg ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺	-
<i>B. subtilis</i> JS-2004 [25]	-	–	7,0 -50	Cu ²⁺ , Hg ²⁺ , Co ²⁺	Ca ²⁺
<i>B. licheniformis</i> MIR-61 [26]	-	7,0	45	-	
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> HR-010 [32]	58	5,5	80	ЭГТА, ЭДТА	
<i>Thermomyces lanuginosus</i> F1 [35]	55	4,0	-	Гуанидин-НСl, мочевина, ЭДТА	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺

ЭДТА-этиленгликольтетраацетат; ЭГТА-этилендиаминтетраацетат

Так, авторы [20] из 245 штаммов морских грибов отобрали перспективный продуцент внеклеточных амилаз - *Aspergillus flavipes* и показали, что в зависимости от условий культивирования он способен

производить различные амилолитические комплексы. На питательной среде, содержащего пептон и дрожжевой экстракт (рН 7,0), *A. flavipes* синтезировал три формы амилазы, которые отличались оптимумом рН. Изменение начального значения рН среды (8,6) или удаление из питательной среды пептона сопровождалось образованием одной из форм фермента. Присутствие протеолитических ферментов снижала активность изолированных форм амилаз. В случае внесения в питательную среду ингибитора протеаз диизопропилфторфосфату синтезировалась новая форма амилазы с оптимумом рН 5,5 та 7, 5, максимальной активностью при 60-80 °С и высокой стабильностью. Амилаза 1 проявляла активность в широком диапазоне значений рН (5,5-8,0), поскольку составляла смесь двух молекулярных форм: кислой (г.г. 50 кДа, оптимальное значение рН 6,0, термооптимум 30-50 °С) и щелочной (м. м. 14,5 кДа, оптимум рН 7,5, термооптимум 30-50 °С) амилаз.

Амилаза 2 имела характерные для большинства грибных амилаз свойства: м. м. 63 кДа, оптимум рН 5,5, максимальная активность в диапазоне температур 30-50 °С и температурная стабильность до 50 °С. Однако исследуемые формы амилаз были нестабильными в процессе выделения вследствие присутствия протеолитических ферментов. Амилаза 3 (г. м. 50 кДа) заметно отличалась от вышеуказанных форм фермента. Она проявляла активность в широком диапазоне рН (5,5-8,5), два максимума активности сохраняла первоначальную активность в течение 20 дней при температуре 22 °С за обоих значений рН. Амилаза 3 была металозависимым ферментом, ее активность повышали ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} , ингибировали - ЭДТА и некоторые металлы - Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} . В отличие от амилаз морских бактерий, амилаза морского гриба *A. flavipes* проявляла устойчивость к экстремально высоким концентрациям соли (15% NaCl). *A. niger* 1119 во время глубинного выращивания производил амилазы с высокой активностью (3,9 Ед • мл⁻¹) при 50-55 °С и рН 4,0 и

сохранял стабильность при 53⁰С в течение 200 часов. Для того чтобы установить, можно ли использовать этот фермент в процессе очистки, различные детергенты исследовали с использованием экстракта амилазы *A. Niger* и установили возможность их применения для очистки хирургических и эндоскопических инструментов при 5,5 и 7,5 и температуре 60-80⁰С, имела высокую термостабильность (70⁰С) и [30].

Некоторые исследователи [37] показали способность Твин-80 и рамнолипиду стимулировать активность внеклеточной амилазы *Penicillium simplicissimum*. Амилазу обнаружили также у разных представителей бактерий, как патогенных (*Vibrio cholerae*, *B. anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*), так и непатогенных (*B. mesentericus*, *B. subtilis*, *B. macerans*) видов. Промышленное значение, безусловно, могут иметь и фактически имеют лишь непатогенные бактерии. Особого внимания заслуживают термостабильные амилазы, которые способны гидролизовать нативный крахмал и выдерживать высокие концентрации солей, а также щелочные амилазы, поскольку большинство видов грибов амилаз, которые широко применяются в промышленности, проявляют активность в кислой среде. Амилолитические ферменты термофильного штамма *Bacillus sp.* 86 проявляли активность при температуре 30-95⁰С (термооптимум 85-90⁰С) и в интервале значений рН 5,0-10,5 с двумя рН-оптимумами (6,0 и 8,5). Активность препарата при 60⁰С оставалась без изменений в течение 4 ч, а время его напивактивации при этой температуре - 9 ч, при 90⁰С активность препарата не менялась в течение 50 мин, а время напивактивации составил 2 ч [15].

Способность изучаемого фермента осуществлять гидролиз крахмала в условиях слабокислого, нейтрального и щелочного сред является существенным преимуществом перед другими α -амилазами и предопределяет возможность использования его в качестве катализатора различных промышленных реакций разрежения крахмалсодержащего сырья. Ионы кальция, которые не влияют на активность α -амилазы, значительно

повышают стабильность фермента, к тому же потребность в ионах этого металла растет с повышением температуры инкубации. Крахмала, как специфическом субстрата α -амилазы, также присущ высокий стабилизирующим эффектом. В 22,5% растворе крахмала α -амилаза *Bacillus* sp. 86 за отсутствие ионов кальция вполне стабильна в течение 100 мин при 90⁰С и 80 мин при 100⁰С. Установлено, что данный фермент является гликопротеином. Белковая глобула фермента тесно связана с углеводным компонентом, который составляет до 16% сухой массы. Молекулярная масса α -амилазы равна 83-90 кДа. Молекула α -амилазы *Bacillus* s p. 86, содержит 16 аминокислот и насчитывает в среднем 254 аминокислотных остатков, отличается высоким содержанием аспарагиновой и глутаминовой кислот, аланина, валина и триптофана. В молекуле фермента не обнаружено цистеина. Предполагают, что роль дисульфидных связей в создании структуры термостабильной α -амилазы играют ионы кальция [10].

Високотермостабильную амилазу, которая продуцируется *Bacillus* sp. PN5, были изолированы из почвы [35]. При выращивании на среде, содержащей (%) крахмал (0,6), пептон (0,5) и дрожжевой экстракт (0,3), при 60⁰С, рН 7,0, в течение 60 ч активность амилазы, составила 65,23 Ед / мл. Максимум активности был достигнут при рН 10,0 и температуре 90⁰С. Активность фермента подавлялась при 105⁰С на 65%, а при температуре от 80 до 100⁰С была стабильной в течение 1 часа. Фермент сохранял 83% активности после 1 ч инкубации с додецилсульфатом натрия. Эти свойства указывают на возможность использования данной амилазы при осахаривании крахмала и образовании детергента.

В России в настоящее время в промышленном масштабе производят препараты α -амилазы из - *B. subtilis* (амилосубтилин) и *A. oryzae* (амилоризин) Однако эти амилазы не относятся к термостабильным ферментам, поскольку оптимальная температура их действия 55-65 ⁰С. Авторы [21] методами мутагенеза и селекции получили

высокопроизводительный штамм *B. Licheniformis* 103, который способен синтезировать термостабильные α -амилазы (температурный оптимум 90-95⁰С, рН-оптимум 6,0-8,5). Оптимизацией состава ферментационной среды и условий глубинного культивирования продуцента им удалось почти в 8 раз по сравнению с исходным штаммом повысить активность амилазы, которая составляла 260 ед • мл⁻¹.

Авторы [24] изолировали штаммы *B. Subtilis* JS-2004 с максимальной активностью 72 ед • мл⁻¹ во время выращивания на жидкой среде с картофельным крахмалом течение 48 ч при рН 7,0 и 50⁰С. Добавление ионов Ca²⁺ и дрожжевого экстракта повышало выработку фермента, тогда как добавление 1% глюкозы способствовало значительному ингибированию. Оптимальной активности был достигнут при рН 8,0 и 70⁰С. Фермент был стабильным в течение 1 ч при 60 и 70⁰С, одновременно при 80 и 90⁰С исходная активность терялась на 12 и 48% соответственно. Фермент активировали ионы Ca²⁺ (117%), в значительной степени ингибировали ионы Co²⁺, Cu²⁺ и Hg²⁺ и в меньшей степени Mg²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Fe²⁺ и Mn²⁺. Штамм производил высокие уровни α -амилазы, которую можно использовать в крахмало-паточный и пищевой промышленности.

Из образцов южноамериканских почв выделено штамм *B. licheniformis* MIR- 61, который производил повышенное количество кислой α -амилазы. В периодических культурах *B. licheniformis* MIR- 61 в фазе экспоненциального роста проявляли внеклеточные α -амилазы и глюкозидазы. Максимальной активности α -амилазы была достигнута при 45⁰С и рН 7,0 в поздней экспоненциальной фазе. Оптимум активности этого фермента наблюдался при 50-67⁰С и рН от 5,5 до 6,0. α -Амилаза характеризовалась термостабильностью при 60⁰С [25]. α -Амилаза *B. licheniformis* является высокостабильным ферментом, его используют в биотехнологических процессах. Несмотря на то, что ее производит не термофильные бактерии, она сохраняет активность в течение нескольких часов при температуре выше

90⁰С, в условиях промышленного гидролиза крахмала. Она также более стабильная, чем α -амилаза *B. stearothermophilus* и *B. amyloliquefaciens*, несмотря на значительное сходство последовательностей между этими тремя белками. α -Амилаза *B. licheniformis* является интересной моделью для белковой инженерии во время исследования термостабильности и термостабилизации.

Авторы [26] осуществили мутационный и структурный анализ α -амилазы *B. licheniformis*, для того чтобы выяснить происхождение необычных термальных свойств и, если возможно, повысить термостабильность фермента. Еще до того как было установлено трехмерную структуру, исследователи идентифицировали два критических положения, в которых замещение аминокислот может либо повысить, либо снизить в значительной степени необратимую термоинактивацию. Результаты изучения X-лучевую структуру α -амилазы *B. licheniformis* было установлено, основанный на структуре мутагенез применили для определения роли остатков, которые привлекаются к образованию солевых мостиков, связывание с кальцием или потенциальных процессов деаминарования.

Результаты исследователей [13] свидетельствуют о ключевой роли домена В и его взаимодействия с доменом А в термостабильности α -амилазы *B. licheniformis*. Большинство мутаций, которые авторы вводили в эту область, так или иначе модифицировали стабильность благодаря влиянию на электростатическое взаимодействие триады металлов Ca-Na-Ca в месте контакта доменов А/В. Мутационные исследования показали важность триады металлов для поддержания правильного изгиба домена А, а также расщепление конформации активного центра. Однако подобный триадный металлозависимый центр также присутствует в менее термостабильных бактериальных гомологов, таких как *B. stearothermophilus* и *B. amyloliquefaciens*. Поэтому повышенная термостабильность α -амилазы *B.*

licheniformis не может быть обусловлена присутствием этой триады металлов.

В процессе мутационных исследований авторы сконструировали более 500 вариантов амилазы, несли от одной до многочисленных мутаций, среди которых было много как высокоактивных, так и в определенной степени полезных для стабильности. Кумулятивный эффект мутаций дал исследователям возможность модулировать стабильность фермента в диапазоне 50⁰С, включая значительное вмешательство в амилолитическую функцию. Несмотря на то, что полного понимания происхождения естественной термостабильности α -амилазы *B. licheniformis* еще не достигнута, исследования авторов показали, что она не является оптимальной и есть возможность повышать или понижать ее искусственно несколькими путями, используя как случайный, так и целенаправленный мутагенез. Интересно, что инженерно созданы гипертермостабильные варианты α -амилазы *B. licheniformis* также более стабильными низких значений pH.

Изучая взаимодействие α -амилазы *B. amyloliquefaciens* с дивалентные катионы кальция и кобальта, исследователи [34], установили 17 сайтов связывания кальция на ферменте со слабой положительной кооперативностью. Связывания кальция, так и кобальта является экзотермическим процессом. Кальций стабилизировал фермент против сурфактантов и термальной денатурации. Более того, связывание с кальцием предотвращало спонтанному уменьшению биологической активности α -амилазы. На ферменте существует 25 некооперативных сайтов для связывания ионов кобальта. Активность фермента значительно повышается с увеличением концентрации кобальта, но температура денатурации фермента снижается. Таким образом, дивалентные катионы кальция и кобальта действуют как стабилизатор и активатор, соответственно, для α -амилазы *B. amyloliquefaciens*.

Исследователи показали [31] способность продукуваты высокоактивную амилазу штаммов *Streptomyces somaliensis* GS 1242 и *Streptomyces sampsonii* GS 1322. Вырастая на среде с глюкозой, *Clostridium acetobutyricum* продуцирует внеклеточную α -амилазы. Фермент достаточно охарактеризован биохимически, однако его ген пока не идентифицированы. Ген *amyP* кодирует 80013-Да зрелый белок с N-концевым доменом, который является идентичным такому семей 13 гликозилгидролаз, таких как α -амилаза *Bacillus*. Транскрипционный анализ показал, что *amyP* транскрибируется в растворе хемостатной культуры. Приведенные данные соответствуют активности α -амилазы, а это свидетельствует о том, что экспрессия *amyP* регулируется на транскрипционного уровне. *AmyP* локализувалы на мегаплазмиди *pSOL1*, которая несет все гены, участвующие в конечной стадии образования раствора. Дегенерация *C. acetobutyricum* связана с потерей *pSOL1*. Показано, что *amyP* можно использовать как рецепторную систему для характеристики этого явления [1].

Новый термофильный спорообразующий штамм MR3Ct, что его изолированно от геотермального почвы, локализованного на горе Риттманн в Антарктике, был способен производить внеклеточную амилазу. На основе 16 S рРНК-последовательности было показано, что штамм близок к *Anoxybacillus amylolyticus* [33].

C *Geobacillus thermodenitrificans* HRO10 [29] выделены и очищены до гомогенного состояния (13,6 раза, 11,5% выход) α -амилазы. Молекулярна масса, определенная с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, составила 58 кДа. Активность была оптимальной на картофельном крахмале при pH 5,5 и 80⁰С. В присутствии ионов Ca²⁺ остаточная активность достигала 92% после 1 ч инкубации при 70⁰С. α -Амилаза не теряла активности в присутствии фитатов (селективный ингибитор α -амилазы) в концентрации 10 мМ и сохраняла 90% максимальной активности после 1 ч инкубации при 70⁰С. ЭГТА и ЭДТА были сильными ингибиторами фермента. α -Амилаза

гидролизovali растворимый крахмал при 80⁰С с Km 3,05 мг • мл⁻¹ и Vmax 7,35 Ед • мл⁻¹.

Способность к продуцированию внеклеточной α-амилазы были обнаружены и в галофильных бактерии *Halomonas meridiana* [27]. Основные продукция α-амилазы наблюдалась в конце логарифмической фазы во время роста культуры на среде с 5% солей или крахмала в отсутствие глюкозы. Фермент проявлял максимальную активность при рН 7,0, но был относительно устойчивым и в щелочных условиях. Оптимальные значения температуры и солености для активности α-амилазы составляют соответственно 37⁰С и 10% NaCl.

В биотехнологических процессах, а именно в ферментативном гидролизе крахмала в процессе получения глюкозы, используют амилалитические ферменты, которые синтезируются термофильными археями [28].

Способность к синтезу термостабильной α-амилазы обнаружена в *Thermomyces lanuginosus* F1. Молекулярная масса и изоэлектрическая точка для этого фермента составили соответственно 55 кДа и 4,0. Максимальная стабильность α-амилаза проявляла при рН 4,0 и сохраняла > 80% активности при рН 5,0-6,0 течение 24 часов. После инкубации при 90⁰С в течение 1 ч α-амилаза сохраняла лишь 6% активности. Активность фермента возрастала в присутствии Mn⁺², Co⁺², Cu⁺², Zn⁺² и Fe⁺², но ингибировался гуанидин-НСl, мочевиной и ЭДТА. Этот фермент имеет следующие параметры рН и термостабильности, которые делают его перспективным для промышленного использования [32].

Таким образом, представители различных таксономических групп микроорганизмов способны продуцировать активные α-амилазы, с различными физико-химическими свойствами, что определяет практическое использование их в различных сферах жизнедеятельности людей.

Субстратами для действия амилаз являются крахмал, состоящий из амилозы и амилопектина, продукты частичного гидролиза крахмала и гликоген.

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 (*М. м.*) колеблется в широких пределах и зависит от природы крахмала. Амилоза - это неветвящийся полимер, в котором остатки глюкозы соединены α -1, 4-гликозидной связью; степень полимеризации около 2000. В «аномальных» амилозах с одной-двумя α -1, 6-связями полимеризация может возрасти до 6000. Амилоза практически не обладает восстанавливающей способностью, так как в каждой молекуле амилозы имеется только одна свободная альдегидная группа. Молекула амилозы представляет собой растянутую спираль, шаг которой составляет 10,6 А и в каждый виток входит 3 остатка глюкозы. Максимальная длина молекулы амилозы достигает 7000 А. В растворе спираль сжимается за счет увеличения витка, в котором уже участвует 6 остатков глюкозы.

При вхождении молекулы йода в спираль амилозы возникает характерный синий цвет. Строго говорить о величине молекулы амилозы нельзя, т. е. даже из одного образца крахмала извлекается амилоза, с величиной молекулы от 500 до 2000 остатков глюкозы. Амилопектин имеет большую молекулярную массу, чем амилоза, и более сложное строение. Это ветвящийся полисахарид. Предполагается, амилопектин ветвится дихотомически, т. е. число концевых звеньев всегда на единицу больше числа звеньев, дающих ветвление, а сумма этих чисел дает общее число звеньев по всей цепи.

К группе амилотических ферментов относятся α - и β -амилазы, глюкоамилаза, пуллуланаза, изоамилаза и некоторые другие ферменты. Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выраженной

эндоамилазой является α -амилаза, способная к разрыву внутримолекулярных связей в высокополимерных цепях субстрата.

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 α -амилазами могут быть различными. Первая стадия воздействия фермента на субстрат хотя и носит неупорядоченный характер, имеет для всех видов α -амилаз схожий механизм.

Механизм воздействия амилаз на субстрат может быть рассмотрен с нескольких позиций:

- 1) вид разрываемой связи (α -1,4 или α -1,6);
- 2) тип воздействия на субстрат (эндо- или экзо-);
- 3) влияние на скорость гидролиза степени полимеризации субстрата;
- 4) возможность гидролиза олигосахаридов;
- 4) способность фермента к множественной атаке субстрата.

α -Амилаза. α -Амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1.) является эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей внутри высокополимеризованного субстрата. Фермент назван α -амилазой потому, что он высвобождает глюкозу в α -мутамерной форме.

α -Амилаза - водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий *M. m.* 45 000-60 000. Своего рода исключением является α -амилаза *V. macerans*, которая имеет *M. m.* 130 000. Есть указания, что некоторые термостабильные α -амилазы имеют *M. m.* 14 000-15 000, но в их молекулах содержится в 2-3 раза больше атомов кальция.

Все α -амилазы относятся к металлоэнзимам, содержание в них Са колеблется от 1 до 30 г атом на 1 г моль фермента. Полное удаление кальция приводит к инаktivации фермента. Повторное введение кальция в среду может частично восстановить его активность. α -Амилаза *B. subtilis* с помощью иона цинка способна образовывать димерную форму, чего лишены другие α -амилазы. Все α -амилазы устойчивы к воздействию протеаз. Они богаты тирозином и триптофаном. Глютаминовая и аспарагиновая кислоты составляют 25% массы белка. Наличие этих кислот в α -амилазе связывают с их осахаривающей способностью. Так, разжижающие α -амилазы не имеют сульфгидрильных групп, а осахаривающие содержат один остаток цистеина. Сравнительно мало или совсем отсутствуют в α -амилазах содержащие серу аминокислоты. Некоторые α -амилазы грибного происхождения имеют углеводный фрагмент, в состав которого могут входить манноза, ксилоза, гексозоамин, но функции его не установлены.

В зависимости от вида микроорганизма свойства амилаз могут сильно отличаться не только по механизму воздействия на субстрат и конечным продуктам, но и по оптимальным условиям для проявления максимальной активности [38].

Действуя на целое крахмальное зерно, α -амилаза атакует его, разрыхляя поверхность и образуя каналы и бороздки, т.е. как бы раскалывает зерно на части. Клейстеризованный крахмал гидролизуетея ею с образованием на окрашиваемые йодом продукты - в основном состоящие из низкомолекулярных декстринов. Процесс гидролиза крахмала многостадийный. В результате воздействия α -амилазы на первых стадиях процесса в гидролизате накапливаются декстрины, затем появляются неокрашивающиеся йодом тетра- и тримальтоза, которые очень медленно гидролизуются α -амилазой до ди- и моносахаридов.

Все α -амилазы проявляют наименьшее сродство к гидролизу концевых связей в субстрате. Некоторые же α -амилазы, особенно грибного происхож-

дения, на второй стадии процесса гидролизуют субстрат более глубоко с образованием небольшого количества мальтозы и глюкозы. Схему гидролиза под действием α -амилазы можно записать следующим образом:

α -Амилаза

Крахмал,-----> α -Декстрины + Мальтоза + Глюкоза
гликоген (много) (мало) (мало)

β -Амилаза. β -Амилаза (α -1,4-глюкан мальтогидролаза, КФ 3.2.1.2) - активный белок, обладающий свойствами альбумина. Каталитический центр фермента содержит сульфгидрильные и карбоксильные группы и имидазольный цикл остатков гистидина. β -Амилаза -экзофермент концевое действия, проявляющий сродство к предпоследней **β -1,4**-связи с нередуцирующего конца линейного участка амилозы и амилопектина.

В отличие от α -амилазы β -амилаза практически не гидролизует нативный крахмал, тогда как клейстеризованный крахмал гидролизуетея ею с образованием мальтозы β -конфигурации, поэтому данная амилаза по аналогии с α -амилазой называется β -амилазой. Если гидролизу подвергается амилоза, то гидролиз идет полностью до мальтозы. Незначительное количество декстринов может образовываться при гидролизе «аномальных» амилоз, так как гидролиз β -амилазой идет только по линейной цепи до α -1,6-связей. Если субстратом для β -амилазы служит амилопектин, то гидролиз идет в значительно меньшей степени. β -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 α -1,4-связи, граничащей с α -1,6-связью. В гидролизате накапливается 54-58% мальтозы, остальное составляют высокомолекулярные декстрины, содержащие значительное количество α -1,6-связей - так называемые β -декстрины. Действие β -амилазы на крахмал можно записать в виде следующей схемы:

β -Амилаза

Крахмал,-----> Мальтоза + р-Декстрин

гликоген (54-58%) (42-46%)

β -Амилазы проявляют большую стабильность в отсутствие ионов Ca^{2+} .

Молекулярная масса β -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 (β -ами-лаза 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.

Глюкоамилаза. Глюкоамилаза (α -1,4-глюкан глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3.) широко распространена в природе. Она синтезируется многими микроорганизмами и образуется в животных тканях, особенно в печени, почках, плаценте кишечника и т. д. Фермент в литературе известен под различными названиями: амилоглюкозидаза, γ -амилаза, лизосомальная α -глюкозидаза, кислая мальтаза, матулаза и экзо-1,4- α -глюкозидаза. Глюкоамилаза катализирует последовательное отщепление концевых остатков α -D-глюкозы с нередуцирующих концов субстрата. Это фермент с экзогенным механизмом воздействия на субстрат. Многие глюкоамилазы обладают способностью так же быстро, как и α -1,4-связь, гидролизовать α -1,6-глюкозидные связи. Но это происходит только в том случае, когда за α -1,6-связью следует α -1,4-связь, поэтому декстран ими не гидролизуется. Отличительной особенностью глюкоамилаз является способность в десятки раз быстрее гидролизовать высокополимеризованный субстрат, чем олиго-и дисахариды.

В литературе высказывается мнение, что механизм атаки субстрата глюкоамилазой может быть двух типов: либо одноцепочечный, либо множественной атаки, и что активный центр имеет под-центровую структуру

[5]

Почти все 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 серин. Например, у глюкоамилазы *A. niger* их 20. Большинство известных глюкоамилаз имеет оптимум рН при 4,5-5,2, реже - при 5,7-6,0, в основном для дрожжевых глюкоамилаз.

рН-стабильность микробных глюкоамилаз лежит в широком диапазоне -от 2,5 до 9. Термостабильность глюкоамилаз лежит 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. Следует заметить, что далеко не все микробные глюкоамилазы способны полностью гидролизовать крахмал до глюкозы. Еще в 1960-х годах И.Фукумото предложил все микробные глюкоамилазы разделить на два типа:

- 1) полностью гидролизующие крахмал до глюкозы и
- 2) гидролизующие крахмал до глюкозы на 80-85%.

В то время предполагалось, что степень гидролиза зависит только от свойств глюкоамилаз и их происхождения. Позже было показано, что при росте культуры параллельно накапливаются и другие амилаолитические ферменты, обладающие не только гидролитическим, но и трансферазным действием. Это гликозилтрансфераза и α -амилаза. Даже 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 глюкозильных 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 и возникает ошибочное представление, что глюкоамилаза не полностью гидролизует крахмал. Сама же глюкоамилаза может проявлять небольшую трансферазную активность, но только при концентрации глюкозы свыше 60-70% [23].

1.2. Применение ферментов в производстве спирта

В настоящее время проблеме применения микробных ферментов в перерабатывающих отраслях промышленности продолжают уделять все большее внимание ученые и производственники во многих странах мира. По прогнозам специалистов, использование ферментных препаратов (ФП) микробного происхождения в промышленности имеет устойчивую тенденцию к увеличению, при этом 2/3 текущего объема составляют ферменты для пищевой промышленности, а их основная доля приходится на спиртовую отрасль.

В спиртовой промышленности, перерабатывающей крахмалистое сырье, широко применяются ферменты гидролитического расщепления крахмала. Для этой цели используется зерновой солод и ферментные препараты микробного происхождения. Применяемый в спиртовом производстве зерновой солод осуществляет гидролиз крахмала до сбраживаемых углеводов и является источником азотистого питания для дрожжей и при осахаривании крахмалистого сырья производит частичную деструкцию его клеточных стенок и белковых веществ.

Однако при применении солода из-за ограниченной возможности создания достаточно высокой концентрации ферментов скорость осахаривания и протеолиза сырья остается низкой, что затрудняет интенсификацию процесса брожения. Эффективная замена солода ферментами микробного происхождения является важной задачей. Опыт работы спиртовых заводов в последние 20 лет показано, что применение ферментных препаратов

экономически оправдано: интенсифицируется процесс осахаривания крахмала, повышается степень использования сырья, стабилизируются технологические процессы.

Несмотря на то, что для успешного осахаривания нужен комплекс ферментов, отбор микроорганизмов-продуцентов до сих пор проводился главным образом по высокой активности амилолитических ферментов — α -амилазы и глюкоамилазы.

Активные амилазы способны синтезировать многие бактерии: *Bac. subtilis*, *Bac. diastaticus*, *Bac. mesentericus*, *Bac. macerans* и *Bac. polymycus* и др. Для промышленного получения препаратов бактериальной α -амилазы, кроме *B. subtilis*, используют также культуры *B. amyloliquefaciens* и *B. licheniformis*. α -амилазы *B. amyloliquefaciens* применяют для гидролиза крахмала при температуре 90⁰С. Однако отрасль промышленности, где есть переработка крахмала, заинтересована в повышении температуры гидролиза. Это стало возможным после получения α -амилазы с *B. licheniformis*. Эта амилаза позволяет проводить гидролиз крахмала при температуре 105-110⁰С. *B. amyloliquefaciens* в процессе культивирования образует, кроме α -амилазы, нейтральную протеазу, α -глюканаза, гемицеллюлаза. Во время гидролиза крахмала присутствие протеазы нежелательна, поскольку деградация белковых фракций крахмала приводит к потемнению сиропа. Учитывая это для получения большинства коммерческих препаратов α -амилаз используют штаммы, не продуцирующие протеазу. Исключением является α -амилазы *B. licheniformis*. Их высокая термостабильность позволяет избавиться от нежелательных примесей протеазы термической инактивацией без значительных потерь α -амилазного активности.

Бактериальные α -амилазы выпускают преимущественно в виде жидких препаратов, содержащих в качестве консерванта 20%-й раствор хлорида натрия, но бывают и твердые препараты.

Бактерию *Bac. subtilis*-82, применяемую в настоящее время на спиртовых заводах как продуцент α -амилазы в смеси с препаратами глюкоамилазы, выращивают в течение 48...60 ч при температуре 30...35 °С.

Особенность бактерий—их способность образовывать высокоактивную термостойкую α -амилазу, необходимую для разжижения и декстринизации крахмального клейстера на стадии подваривания замесов и осахаривания сусла.

На рынок кроме бактериальных поступают также α -амилазы грибного происхождения. Для их получения используют культуры *A. oryzae* и *A. niger*. Так, α -амилаза *A. oryzae* является основным компонентом ферментного препарата така-диастаза, что является одним из первых ферментных препаратов этой группы, который начали производить. Оптимальное для действия этой амилазы значение рН лежит в интервале 4,8-5,8, а термостабильность ее ниже, чем в α -амилазы *B. amyloliquefaciens*. Свойства α -амилазы *A. niger* мало чем отличаются от свойств α -амилазы *A. oryzae*. Некоторые штаммы *A. niger* производят амилазу, которая сохраняет стабильность в еще кислее среде (при рН <2) и более термостойкой. Однако препараты α -амилазы *A. niger* имеют ограниченное применение из-за низкой амилазной активности и, следовательно, их высокую стоимость.

Препаратам α -амилазы *Aspergillus* присуща большая оцукрювальная способность по сравнению с препаратами α -амилазы *Bacillus*: с их помощью можно достичь высокого выхода сахаров (50%-й выход мальтозы во время гидролиза крахмала) [12]. В производстве спирта в качестве основной ферментовной материал раньше применяли солод, который от начала возникновения спиртовой промышленности использовали для осахаривания крахмала сырья и который с успехом был заменен культуры микромицетов с активным амилолитическим комплексом ферментов [19].

Применение в процессе производства спирта грибной амилазы вместо солода позволяет: а) сэкономить десятки тысяч тонн высококачественного

зерна б) повысить выход спирта в) резко сократить во времени процесс получения ферментного препарата. Как известно, для получения активного зернового солода нужно 7-8 суток, для выращивания же культуры гриба и получения из нее препарата фермента - несколько десятков часов г) уменьшить количество производственных площадей, а также всех видов энергии. В пивоварении амилазы используют вместо зернового солода. Вкусовые качества пива при этом практически не меняются.

На спиртовых заводах стали широко применять высокоактивный по глюкоамилазе штамм *Asp. awamori* 466 и ВУД-Т2, выращиваемые на концентрированном кукурузном сусле (18 % сухих веществ). Готовая культура имеет активность до 250 ед. ГЛА на 1 мл, других ферментов образует мало[4].

Амилолитические ферменты синтезируют также некоторые дрожжи и дрожжеподобные грибы родов *Saccharomyces*, *Candida*, *Endomycopsis* и *Endomyces*.

В спиртовом производстве нашли применение *End. bispora* и *End. species* 20-9, выращиваемые глубинным способом и продуцирующие главным образом активную глюкоамилазу; ос-амилазная активность проявляется слабо. Высокоактивный *End. bispora* имеет разветвленный мицелий, образует бластоспоры; гифы — септированные, зернистые; на твердых агаризованных средах образуют колонии с воздушным серовато-белым мицелием, на жидких питательных средах — гифы и некоторое количество бластоспор.

Дрожжеподобные грибы в спиртовом производстве самостоятельно не применяют, так как они не содержат других ферментов, необходимых для нормального осахаривания сусла из крахмалсодержащего сырья. Обычно их используют в смеси с ферментными препаратами из микроскопических грибов или бактерий.

1.3. Сырьё для получения ферментов

Для получения ферментов могут быть использовано различное сырьё, в том числе отходы производства спирта – меласно-спиртовая и зернокартофельная барда, барда ацетонобутиловых заводов. Используемый как компонент среды свекловичный жом содержит безазотистые экстрактивные вещества – пектин, гемицеллюлозу, клетчатку. Белки составляют лишь до 8% сухой массы.

Дорогостоящим сырьём для получения ферментов является картофель. Основным источником углевода в нем – крахмал (до 20% массы картофеля). Азотистых веществ в картофеле не более 2,0%, клетчатки – 1,0-1,5%, минеральных веществ – до 1,0%. Значительную часть биологически активных веществ составляют витамины.

Основными компонентами сред, используемых в качестве источника углевода, являются мука и крахмал (картофельный и кукурузный). Используется непосредственно и кукурузная мука, содержащая до 70% крахмала, до 10% других углеводов, примерно столько же белков и небольшое количество (до 4,0%) жира.

Компонентом среды, т.е. сырьём для получения ферментов микробного происхождения может быть соевая мука – богатый источник азотистых веществ. В ее состав входят углеводы – до 25%, в том числе 5-10% сахарозы, остальное – мальтоза, рафиноза, декстрины, гемицеллюлозы. Крахмала и глюкозы – около 0,5-1,0%. Имеются водо- и жирорастворимые витамины. Многочисленными работами установлено, что биосинтез ферментов зависит от состава питательной среды, т.е. сырья для получения ферментов. Один и тот же микроорганизм образует различные ферменты на средах разного состава. Большое значение при этом имеет не только концентрация каждого из компонентов среды, но и их соотношение. В этом своеобразии процессов биосинтеза микробных ферментов. Различны пути регуляции активности и биосинтеза внутри и внеклеточных ферментов. В ряде случаев вещество –

«регулятор» не является субстратом фермента и его роль в образовании ферментов неясна. Многое зависит от того, является данный фермент конститутивным или индуцируемым. Например, для альфа-амилазы установлено, что независимо от условий культивирования и состава сред наилучшим индуктором амилолитических ферментов являются крахмал, декстрины и мальтоза. Сильно влияет на синтез амилолитических ферментов концентрация углеводов в среде. Глюкоамилаза в наибольшем количестве синтезируется в присутствии 3% крахмала, а для максимального накопления альфа-амилазы необходима более высокая концентрация крахмала. Производственные штаммы продуцентов амилолитических ферментов вида *Aspergillus oryzae* требуют до 6% крахмала для максимального накопления альфа-амилазы[5].

Активными стимуляторами образования альфа-амилазы являются некоторые высшие жирные кислоты. Так, олеиновая и стеариновая в три раза повышают интенсивность синтеза глюкоамилазы, тогда как миристиновая, наоборот, тормозит этот процесс.

Особенна роль источников азотистого питания, в качестве сырья для получения ферментов, в биогенезе амилолитических ферментов: они должны составлять примерно 5% количества углеводов. Влияние азотистых веществ на биосинтез ферментов зависит от природы источников углерода. У некоторых культур термофильных продуцентов ферментов синтез амилазы стимулируется добавлением казеинового гидролизата, если источниками углерода служат глицерин, глюкоза, сахароза и крахмал. Хорошими источниками азота для многих продуцентов амилолитических ферментов являются нитраты натрия и аммония в концентрации около 1%. Это значительно выше, чем концентрация минеральных солей азота, необходимая для роста многих микроорганизмов (0,1%). Таким образом, для роста продуцентов не требуется высоких концентраций азота, это необходимо для интенсификации процесса биосинтеза ферментов. Например, для роста гриба

Aspergillus awamori достаточно присутствие в среде 0,05% минеральных солей азота, а для образования активной альфа-амилазы концентрация должна быть повышена до 0,15%, максимальный синтез глюкоамилазы возможен лишь на среде с 0,40% минерального азота.

Органические источники азота, являясь сырьем для получения ферментов, как правило, стимулируют рост, но не образование ферментов, которое замедляется под влиянием желатина, казеина.

Солодовые ростки могут стимулировать биогенез амилолитических ферментов, т.е. получение ферментов. Механизм этого процесса не исследован.

Биосинтез амилолитических ферментов тесно связан с присутствием солей магния, фосфора, кальция, но роль магния особенно среди сырья для получения ферментов. Исключение сульфата магния из среды культивирования приводит к полному прекращению синтеза большинства амилолитических ферментов. Количество магния в виде сульфата – 0,05%. Фосфорных солей должно быть в среде больше – 0,1-0,2% KH_2PO_4 . Кальций является необходимым элементом в процессе образования амилаз, в состав которых он входит. Активность амилолитических ферментов связана с наличием сульфургидрильной группы, поэтому возрастает роль серы в качестве сырья для получения ферментов. Она же необходима для построения серосодержащих аминокислот.

ГЛАВА II. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика грибных и бактериальных культур-активных продуцентов амилаз (*Aspergillus niger* и *Bacillus subtilis*)

Грибы рода *Aspergillus niger* аэробные микроорганизмы, хорошо растут на различных субстратах. Образуют плоские пушистые колонии черного или коричневого цвета. Мицелий гриба очень сильный, с характерными для высших грибов перегородками. Аспергиллы распространяются спорами, образуясь бесполом путем, что характерно для всего класса вообще. Широко распространены в природе, очень устойчивы к воздействиям внешней среды. Чёрная «плесень» на стенах сырых помещений — это, преимущественно, *Aspergillus niger* в фазе плодоношения. *Aspergillus niger* используются человеком применяются для биосинтеза лимонной кислоты.

Аспергиллы уже привлекали к себе внимание как активные агенты процессов разрушения самых разнообразных материалов, как возбудители заболеваний и причина токсикозов животных и человека, как продуценты различных ферментов и других ценных продуктов обмена веществ, с успехом используемых в ряде отраслей промышленности. Кроме того, они хорошо растут в лабораторных условиях, почему и стали одним из излюбленных объектов исследований.

Виды группы *A. niger* отличаются многообразной биохимической активностью. Они вырабатывают разнообразные ферменты — амилалитические, протеиназы, пектиназу, липазу, глюкозооксидазу, ферменты, разрушающие роговое вещество, хитин и др. Широкое применение получила способность штаммов *A. niger* и других видов этой группы к образованию лимонной, щавелевой, глюконовой, фумаровой кислот.

A. niger очень чувствительны к минеральным источникам питания, возможно использовать специально отобранные штаммы для определения

дефицита некоторых элементов в почве (фосфора, калия, меди и др.) и витаминов, что оказалось значительно проще, точнее и быстрее, чем химические анализы.

Род *Bacillus* – прямые палочки $0,5-2,5 \times 1,2-10$ мкм, с закругленными или обрубленными концами, часто в парах или цепочках. Грамположительные, подвижные за счет перетрихиальных жгутиков. Эндоспоры овальные или иногда сферические либо цилиндрические, устойчивые ко многим неблагоприятным воздействиям. В клетке образуется не более одной споры. Споруляция не подавляется атмосферным воздухом. Аэробы или факультативные аэробы. Отношение к повышенной температуре, рН и солености сильно варьирует. Хемоорганотрофы: метаболизм бродильного или дыхательного типа. Обычно каталазоположительные. Обнаружены в различных местах обитания, некоторые виды патогенны для позвоночных и беспозвоночных.

2.2. Поверхностный способ культивирования продуцентов амилаз на твердых питательных средах

Для получения амилолитических и протеолитических ферментов поверхностным способом культивирования плесневого гриба *Aspergillus niger* производили на твердой питательной среде, содержащий прежде всего крахмал содержащий субстрат, а также другие полисахариды и минеральные вещества. .

Ибо, в настоящее время в мировой ферментной промышленности поверхностный способ выращивания продуцентов довольно широко распространен и хорошо изучен. Такое повсеместное распространение его связано с простотой технологии, отсутствием сложных механизмов, возможностью использования малоквалифицированного ручного труда. С развитием науки о микроорганизмах, техники, механизации и автоматизации, а главное с расширением производства метод поверхностного культивирования в последнее время стал заметно

вытесняться более современным способом культивирования микроорганизмов – глубинным.

Однако, несмотря на очевидные преимущества глубинного способа культивирования, до сих пор удельный вес предприятий с поверхностным способом выращивания продуцентов ферментов еще очень велик.

Выращивание исходной культуры обычно проводится на увлажненных пшеничных отрубях или на отрубях с небольшими добавками других компонентов. Питательная среда при поверхностном способе культивирования размещается невысоким слоем в перфорированных кюветах. Кюветы со средой устанавливаются на этажерках или стеллажах в специальных растительных камерах с кондиционированным воздухом.

Приготовление посевного материала. За 3-4 дня до эксперимента делается пересев продуцента с музейной пробирки на свежескошенный сусло-агар. Посевы на косом сусловом агаре помещали в термостат с температурой 30°C на 3-4 суток. Рост гриба заканчивается обильным спороношением. Производили пересев продуцента с пробирок на твердую питательную среду (пшеничные отруби). Для осуществления этого посева в конические колбы емкостью 250 мл раскладывали по 15 г пшеничных отрубей с влажностью 45%. Колбы со средой стерилизовали в автоклаве при давлении 1 ати в течение часа. Охлажденные до температуры 40°C отруби в стерильных условиях засеивали суспензией спор плесневого гриба. Суспензию спор получали смывом спороносящей культуры продуцента с косого сусла-агара 5 мл стерильной воды. На каждую колбу со стерильной средой вносили вся суспензия спор. После тщательного перемешивания колбы с засеянной средой ставили в термостат с температурой 30°C на 2-3 суток. После 48-72 часов роста мицелий гриба полностью пронизывает питательную среду, образуется рыхлый корж густо покрытый конидиями гриба желтозеленого цвета. Эта культура на отрубях, выращенная в колбах, является исходным посевным материалом для последующего эксперимента.

Подготовка посуды к стерилизации. Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена. Далее следует завернуть в бумагу, не нарушая ее целостности и аккуратно завязать веревочками следующие предметы: 1) кювету; 2) крышку к кювете вместе с вырезанным по размерам крышки листом непроклеенной бумаги; 3) сосуд емкостью 1,5-2 литра для увлажнения среды и ее засева; 4) мерный цилиндр на 250 мл для дозировки стерильной воды; 5) стеклянную палочку для перемешивания посевной культуры; 6) колбу (емкостью 500 мл с 250 мл водопроводной воды). Стерилизацию следует проводить в автоклаве при 1 ати в течение 30 минут. Стерильная посуда после стерилизации должна быть подсушена в сушильном шкафу при 105°С, т.к. бумага при стерилизации слегка увлажняется.

Приготовление заданного варианта среды. Среда заданного состава готовится в количестве 200 г по воздушно-сухому весу.

Предлагается следующие варианты сред:

2 вариант - 70% пшеничных отрубей+ рисовые муки + 10% пивные дробины

2 вариант - 70% пшеничных отрубей рисовые муки + 10% пивные дробины

2 вариант - 70% пшеничных отрубей рисовые муки + 10% пивные дробины

Контрольный вариант– 100% пшеничных отрубей

Определение насыпного веса. После взвешивания компонентов среды их тщательно перемешивали и определили насыпной вес, который рассчитывали по следующей формуле:

$$P_{\text{Н}} = \frac{M_1 - M_2}{V}$$

где $p_{\text{н}}$ – насыпная плотность, г/см³; M_1 – масса сосуда с материалом, г; M_2 – масса пустого сосуда, г; v – объем сосуда, см³[6].

Подготовка среды к стерилизации. Из приготовленной смеси после тщательного перемешивания отвешивали 125 г (Аср) для стерилизации и

заполнения кюветы. Среду помещали в сухую марлевую салфетку, свернутую в четыре слоя, и закрепляли четыре конца салфетки резинкой. Салфетка вместе с резинкой перед заполнением взвешивали с точностью до 0,1 г (а).

Стерилизация питательной среды. Салфетки со средами помещали в бикс и стерилизуют 1 час при 1 ати. Перфорированный пояс бикса должен быть во время стерилизации открыт. При стерилизации в результате конденсации пара при соприкосновении с холодной средой происходит ее увлажнение. После стерилизации салфетку с питательной средой вновь взвешивали (В) и определяли количество конденсированной влаги при стерилизации (п).

$$a=15,0 \text{ г}; B= 150,0;$$

$$n = (B - a - 125,0) = (150,0 - 15,0 - 125,0) = 10 \text{ г}.$$

Здесь допускается определенная неточность, т.к. марля также увлажняется при стерилизации, но в данном расчете этим увлажнением марли можно пренебречь.

Определение влажности сыпучей среды. Контроль влажности (W) осуществляли высушиванием 5 г сыпучей среды при температуре 130°C до постоянной массы и рассчитывали по следующей формуле:

$$W_{\text{исх}} = \frac{(m_1 - m_5) (m_2 - m_5)}{(m_1 - m_5)} \cdot 100$$

где m_5 – масса пустой бюксы; m_1 – масса бюксы с навеской до высушивания; m_2 – масса бюксы с навеской после высушивания.

Расчет воды, необходимой для увлажнения питательной среды. Для хорошего развития плесневого гриба и интенсивного образования ферментов необходимо, чтобы среда имела влажность 60%.

Расчет добавляемой воды проводили следующим образом:

- 1) Вес питательной среды с исходной влажностью

$$(W_{\text{исх}}) = A_{\text{ср}} = 125 \text{ г} .$$

2) Содержание абсолютно сухого вещества в исходной пробе, гр

$$B_{\text{ср}} = A_{\text{ср}} \cdot \frac{100 \cdot W_{\text{исх}}}{(100)}$$

3) Вес питательной среды с заданной влажностью, гр

$$(W_{\text{зад}}) = C_{\text{ср}} ;$$

$$B_{\text{ср}} = A_{\text{ср}} \cdot \frac{(100)}{100 \cdot W_{\text{исх}}}$$

4) Вес питательной среды после стерилизации

$$\Gamma_{\text{ср}} = (B - a),$$

где B – вес стерильной среды с салфеткой

a – вес салфетки.

5) Количество конденсированной влаги при стерилизации

$$n = (\Gamma_{\text{ср}} - A_{\text{ср}}) .$$

6) Количество воды, которое необходимо добавить для получения заданной влажности питательной среды

$$D = (C_{\text{ср}} - \Gamma_{\text{ср}}) .$$

$$1) A_{\text{ср}} = 125,0 \text{ г} ; W_{\text{исх}} = 10\% ; W_{\text{зад}} = 60\% ;$$

$$2) B_{\text{ср}} = 112,5 \cdot \frac{100 - 10}{100} = 112,50$$

$$B = 150,0 \text{ гр.}, a = 15,0$$

$$3) C_{\text{ср}} = \frac{112,5 \cdot 100}{100 - 60} = 281,25$$

$$4) \Gamma_{\text{ср}} = 150,0 - 15,0 = 135,0 \text{ г} ;$$

$$5) n = 135,0 - 125,0 = 10,0 \text{ г} ;$$

$$6) D = 281,25 - 135,0 = 146,25 \text{ г} .$$

Таким образом, в результате расчета установлено, что для увлажнения среды до $W=60\%$ в данном варианте требуется 146,25 мл стерильной воды.

Увлажнение стерильной питательной среды, ее засев и раскладка в кюветы для выращивания продуцента. Стол, на котором должен производиться засев, полностью освобождали от посторонних предметов, тщательно протирали этиловым спиртом. На руки надели перчатки, которые промываются спиртом.

Работа осуществляли в следующем порядке:

- 1) Осторожно, частично разворачивали сосуд емкостью 1,5-2 л, и в него высыпали среда из салфетки, после чего сосуд прикрывали краем стерильной бумаги.
- 2) Разворачивали цилиндр и в непосредственной близости к горелке в него наливали рассчитанное (Д) количество стерильной воды. Затем открытый край цилиндра прикрывали стерильной бумагой.
- 3) Открывали колба с посевным материалом. Туда вносили стерильную палочку и наливали приблизительно 40-50 мл стерильной воды из цилиндра. Содержимое колбы перемешивали палочкой с водой и в виде водной суспензии.
- 4) Содержимое сосуда тщательно перемешивали рукой в резиновой перчатке, Такое перемешивание необходимо для того, чтобы влага и посевной материал равномерно распределились по всей массе среды.
- 5) Засеянная среда полностью переносили в заранее взвешенную стерильную кювету (Р), равномерно распределяли и закрывали сначала листом непроклеенной бумаги, затем – крышкой.
- 6) Закрытая кювета со средой взвешивали (К). Рассчитывается точное количество засеянной среды, поставленное на выращивание (М)

$$M_{\text{вл}} = (K - P) \text{ г.}$$

Если учесть, что среда имеет влажность 60%, то на выращивание поставлено сухого вещества ($M_{\text{с.в.}}$)

$$M_{\text{с.в.}} = M_{\text{вл}} \cdot \frac{100 - W_{\text{зад}}}{100}$$

$$K = 430,0 \text{ г; } P = 160,0 \text{ г; } W_{\text{зад}} = 60\% .$$

$$1) M_{\text{вл}} = 430,0 - 160,0 = 270,0 \text{ г ;}$$

$$2). M_{\text{с.в.}} = 270,0 \cdot \frac{100-60}{100} = 108,0$$

$V_{\text{ср}} = 112,50$ г следовательно, в результате механические потери ($P_{\text{мех}}$) составляет $P_{\text{мех}} = V_{\text{ср}} - M_{\text{с.в.}} = 112,50 - 108,00 = 4,50$ г.

Засеянная плесневым грибом твердая питательная среда, помещенная в строго кондиционированные условия растительной камеры, начинает прорастать мицелием гриба по всей толще среды к 24-30 час. роста. Для плесневого гриба *Aspergillus niger* максимум в накоплении амилолитических и протеолитических ферментов наступает на 23-25 час. культивирования. К этому времени спорообразование культуры еще не наступает. Такая культура, имеющая влажность приблизительно 45-50%, называется “сырой готовой культурой” плесневого гриба. В процессе культивирования поверхностным способом различают три стадии роста плесневого гриба:

1. Стадия первая, продолжающаяся от 8 до 12 час. с момента засева – это стадия наклевывания спор и выхода ростовой трубочки. Обычно эта стадия не требует сильной аэрации, но очень чувствительна к температуре. Обмен воздуха в камере, где происходит выращивание, не превышает 2-3 объемов воздуха на объем камеры в час, температура поддерживается 29-31°C. Накопление ферментов в этот период не фиксируется.

2. Стадия вторая, продолжающаяся с 8-12 час. до 18-21 час., является стадией бурного роста микроорганизма, интенсивного образования мицелия, который «схватывает» среду и полностью ее пронизывает. В этот период проросшая среда представляет довольно плотный корж, который можно поднять с кюветы за один край почти полностью. В связи с формированием основной массы мицелия из среды интенсивно потребляются питательные вещества, необходимые для осуществления биосинтетических процессов микроорганизмом. При этом часть этих веществ, в частности, углеводы, расходуется на энергетические дыхательные процессы. Углеводы разлагаются с образованием воды и углекислого газа.

Выделившаяся энергия при разложении углеводов частично расходуется на обеспечение процесса биосинтеза в клетке, а часть выделяется в виде тепла.

Микроорганизмом выделяется значительное количество физиологического тепла, до 80-90 ккал на кг культуры в час. Это тепло необходимо отводить от культуры, иначе температура культуры резко поднимается и наступает явление с «амостерилизации», когда микроорганизм погибает от перегрева, а синтезируемые им ферменты инактивируются. Кроме того, аэрация необходима и для того, чтобы подвести культуре кислород и отвести летучие продукты метаболизма, в частности углекислый газ, который может затормозить рост продуцента. В этот период первоначальный вес среды значительно уменьшается, наблюдается заметное увеличение ферментативных активностей. Требуется очень интенсивная аэрация культуры до 60 объемов воздуха на 1 объем камеры за 1 час, температура , воздуха 28-26°C относительная влажность его 100%. От сильной аэрации культура слегка подсыхает.

3. Стадия третья, продолжающаяся с 18-21 час. до момента начала спорообразования. Этот период принято связывать с моментом наиболее

интенсивного образования в культуре ферментов, накопление которых в основном завершается и достигает максимума как правило в начале спорообразования. В этот период тепла выделяется меньше от 30 до 15 ккал/кг культуры за 1 час. Эту стадию принято называть стадией «ферментации». Аэрация культуры не превышает 20-25 объемов на 1 объем камеры за 1 час.

Определение содержания крахмала. Сущность метода заключается в способности крахмала, растворенного в разбавленной кислоте, давать оптически активные растворы, изменяющие угол вращения плоскости поляризованного луча света[33].

Таблица 2.2.1. Взвешивали 5 г питательной среды на технических весах до сотых долей грамма. Навеску пересыпают в сухую мерную колбу на 100 мл.

Реактивы	Количество, мл
Соляная кислота, 1,124% р-р ⁽⁰⁾	25
Перемешивание	
Соляная кислота, 1,124% р-р	25
Выдержка на кипящей водяной бане, 15 мин ⁽¹⁾	
Холодная дистиллированная вода	15
Охлаждение до 200С	
Фосфорно-вольфрамовая кислота, 4% раствор	10
Выдержка 20 мин	
Этиловый эфир	1-2 капли
Дистиллированная вода	До 100
Фильтрация ⁽²⁾	
Отсчет показаний сахариметра ⁽³⁾	

Примечание:(0) – 26,6 мл $\rho=1,19$ г/мл или 40 мл $\rho=1,125$ г/мл довести до 1 л дист. водой.

(1) – В течение первых трех минут, не вынимая колбы из бани, размешивали ее содержимое плавными круговыми движениями. Необходимо, чтобы вода в бане покрывала всю широкую часть колбы и непрерывно кипела.

(2) – Первые порции фильтрата возвращают в воронку.

Фильтратом наполняют поляризационную трубку и сразу же делают первый отсчет.

(3) - Отсчет показаний сахариметра должен быть сделан быстро, чтобы избежать неправильных результатов определения. По трем отсчетом вычисляют среднее арифметическое. Расхождение между крайними значениями результатов отсчета не должна превышать 0,1° шкалы.

Содержание крахмала (X,%) в каждой навеске среды в пересчете на абсолютное сухое вещество вычисляли по формуле:

$$X = \frac{K \cdot a \cdot 100}{100 - q}$$

где K – переводной коэффициент, равный (при длине трубки сахариметра 200 мм) для пшеницы – 1,898.

a – показания сахариметра в градусах шкалы

q – влажность среды, %.

Переводные коэффициенты рассчитаны на длину трубки сахариметра 1 тр= 200 мм, если 1 тр= 100 мм, то полученный результат умножается на 2.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое результатов 2-х параллельных определений. Расхождение между результатами параллельных определений не должно превышать 0,5% при длине трубки 200 мм и 1,1% - при длине трубки 100 мм.

Определение веса сырой готовой культуры. Известен вес пустой кюветы и листа непроклеенной бумаги (P). Известен вес влажной среды в объеме кюветы (Mвл) и вес сухого вещества среды в кювете (Mс.в.).

Кювета с культурой взвешивали – это будет величина K₁. Вычитаем из нее вес пустой кюветы (P), и получаем вес сырой готовой культуры (A_к) в граммах:

$$A_k = K_1 - P.$$

Определение влажности культуры и расчет ее выхода. Сырую культуру плесневого гриба вынимали из кюветы и переносили в сосуд типа кристаллизатора, где тщательно измельчали и перемешивали ее рукой,

одетой в резиновую перчатку. Затем отбирали среднюю пробу, а из нее навеску для определения влажности.

Расчет выхода культуры определяли по следующей схеме:

1. Содержание сухого вещества в готовой культуре (V_k)

$$V_k = A_k \cdot \frac{100 - W_k}{100} \text{ г}$$

2. Содержание сухого вещества в исходной среде известно из первого занятия, и оно равно ($M_{с.в.}$).

3. Убыль в весе сухого вещества за время культивирования составляет ($У_{с.в.}$):

$$У_{с.в.} = M_{с.в.} - V_k.$$

4. Выход культуры по отношению к исходной среде будет (η)

$$\eta = \frac{V_k \cdot 100}{M_{с.в.}} \%$$

$K_1 = 310,0 \text{ г}$; $P = 160,0 \text{ г}$; $W = 46\%$; $M_{с.в.} = 108,0 \text{ г}$.

1. $A_k = 310,0 - 160,0 = 150,0 \text{ г}$.

$$V_k = \frac{150,0 \cdot (100 - 46)}{100} = 81,0$$

3. $У_{с.в.} = 108,0 - 81,0 = 27,0 \text{ г}$.

$$V_k = \frac{81,0 \cdot 100}{108,0} = 75 \%$$

Таким образом, выход культуры от веса исходной среды составил 75%, тогда безвозвратные потери на жизнедеятельность микроорганизма определились величиной $(100 - \eta) = 25\%$.

2.3. Определение активности ферментов

Приготовление ферментативных вытяжек из культуры. Готовится две вытяжки – одна для определения амилолитических ферментов (АФ), вторая – для определения протеолитических ферментов (ПФ).

Таблица 2.3.1. Ход приготовления ферментативных вытяжек из культур.

Реактивы	Количество реактивов	
	АФ	ПФ
Сырая культура плесневого гриба	10,0 г	10,0 г
Вода дистил. (H ₂ O)	20 мл	20 мл
Ацетатный буфер pH=4,7	2,0 мл	-
Фосфатный буфер pH=7,3	-	20мл
Толуол	2,0мл	2,0мл
Углекислый кальций	-	500мг
Встряхивание в течение 30 мин Фильтрование через вату		

Определение амилолитической активности. Принцип метода. Амилазную активность выражают в миллилитрах 0,1%-ного раствора крахмала, гидролизуемого одним миллилитром культуральной жидкости при 40-45°C в течение 15 мин.

Брали 3 пронумерованных пробирок для пробы и 1 пробирок для контроля.

Таблица 2.3.2. Определение амилолитической активности.

Реактивы	Количество, мл	
	Проба	Контроль
Ацетатный буфер, pH=4,7	1мл	1мл
Экстракт фермента	1мл	-
Контроль (вода дист.)	-	1 мл
Перемешивание, разведение 1/2 1/4 1/8, 1/16, 1/32, 1/64		
Крахмал, 0,1%	2 мл	2мл
NaCl, насыщенный	0,4мл	0,4мл
Инкубация, 40 – 45оС, 15 мин Охлаждение		
Йод в йодистом калии	1каплю	1каплю

Для расчета принимаем во внимание последнее разведение, в котором после добавления йода не появился синий цвет. Например, это вторая пробирка, а в третьей уже синее окрашивание, тогда разведение культуральной жидкости соответствует 1/8.

Расчет: 1/8 мл культуральной жидкости расщепляет 2 мл 0,1%-го крахмала:

$$1 \text{ мл} \text{ ----- } X \text{ мл};$$

$$x = \frac{2 \cdot 1}{1/8} = 16 \text{ мл}$$

Следовательно, 1 мл неразведенной культуральной жидкости расщепляет за 15 мин 16 мл 0,1%-го раствора крахмала.[31]

Определение протеолитической активности. Принцип метода: В результате расщепления белков под действием протеолитических ферментов, образуются аминокислоты. Учет аминокислот осуществляется путем их связывания в окрашенные комплексы.

Брали 3 пронумерованных пробирок пробы и 1 пробирок контроля.

Таблица 2.3.3. Определение протеолитической активности.

Реактивы	Количество, мл	
	Проба	Контроль
Фосфатный буфер, рН=7,3	1мл	1мл
Экстракт фермента	1мл	-
Контроль (вода дист.)	-	1 мл
Перемешивание, разведение 1/2 1/4 1/8, 1/16, 1/32, 1/64		
Желатин, 0,1%	2 мл	2мл
Инкубация, 37°C, 20 мин		
Медный раствор	2мл	2мл

Сравнивали контрольные пробирки с пробирками, содержащими экстракт фермента. Для расчета принимали во внимание разведение, в котором после добавления медного раствора появился отличительный цвет.

Единицы

протеолитической активности рассчитывали аналогично амилолитической активности.

2.4. Глубинный способ получения ферментов

Глубинное культивирование позволяет устранить некоторые из недостатков характерные поверхностной ферментации. В частности, глубинная ферментация предоставляет большие возможности для управления и автоматизации, высокую асептику и более широкие возможности для масштабирования.

Микроскопические грибы и спороносные бактерии, реже – актиномицеты обладают способностью накапливать в среде амилолитические ферменты (α - и β -амилазы, глюкоамилазы комплекс ферментов, называемый в литературе декстриназой). Выход амилолитических ферментов у микроорганизмов зависит от состава среды, способа культивирования и возраста культуры.

Ферменты, обладающие амилолитической активностью, можно получить и использовать в виде культуры микроорганизмов и очищенных препаратов. Для выделения амилолитических ферментов в работе использована глубинная культура продуцента [32],[33].

Приготовление сред и стерилизация. Питательная среда для культивирования *Aspergillus oryzae* и *Bacillus Subtilis*. Среда для выращивания посевного материала содержит: 4% картофельного крахмала, 6% кукурузного экстракта, 3% кукурузной муки, 3% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,15% KCl , 0,01% CaCl_2 , 0,05% MgSO_4 - водопроводной воды до 100 мл; pH – естественный. Среду наливают в колбу на 750 мл и

Среду стерилизуют для удаления посторонней микрофлоры при температуре 121 °С в течение 1 часа. Температура культивирования: 26-32 С для грибов, а для бактерий 32-35 С. Режим аэрации: 50- 60 м³/ч м³.

Приготовление посевного материала. Культуры *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* выращивается в пробирках на агаризованной среде в термостате при 37°С в течении одних суток. Посев производится уколом в глубину питательной среды. Далее культура культивируется на качалках в колбах объемом 750 мл. При температуре 37°С 46 часов, частота движения качалки 180-200 об/мин. В качестве среды используется производственная. После культура подается на стадию инокуляции. Процесс проходит при следующих условиях: температура 37°С, избыточное давление 0,1 МПа, расход воздуха 258 м³/час, время 48 часов.

Отбор проб. Отбор проб проводится через 24, 48 часа культивирования.

Стерильными пипетками в асептических условиях отбирают по 25 мл пробы в стерильные пробирки и ставят в холодильник. Через 48 часа культивирования колбы снимают с качалки и убирают также в холодильник.

Отобранные пробы КЖ используют для определения морфологического состояния культуры, контроля рН среды и динамики накопления биомассы, ферментов в процессе глубинного культивирования

Подготовка бумажных фильтров. Бумажные фильтры высушивают до постоянной массы при $t=105^{\circ}$, взвешивают до четвертого знака, регистрируют номер, вес каждого фильтра и оставляют в эксикаторе.

Оценка морфологического состояния культуры. Готовят препараты грибной культуры (раздавленная капля).

Микроскопируют препараты и делают зарисовки для комплексной оценки морфологического состояния культуры, биомассы, рН и ферментативной активности.

Определение биомассы. Биомассу гриба и бактерий определяют по массе сухого мицелия и клетки. Для этого из глубинной культуры гриба и бактерий в жидкой среде после тщательного перемешивания пипеткой отбирают 10 мл пробы и отфильтровывают через заранее высушенный и взвешенный бумажный фильтр. Мицелий и клетки на фильтре промывают дистиллированной водой и высушивают до постоянной массы при $t=80^{\circ}$ в течение одних-двух суток. По разности массы фильтра с мицелием и без него определяют массу сухого мицелия и клетки в 10 мл жидкой культуры.

2.5.Определение углеводов (свободных) по методу Дюбуа.

Этот метод основан, для определения свободных углеводов, в основном глюкозы. В методе протекает фенольно – серная реакция.

Необходимые реактивы для определения углеводов по методу:

1. 0.5% фенол:

2. Серная кислота, отвечающая на пробу Савая:

Техника определения.

Взяв пробу в количестве 1 мл, помещают её в пробирку, также в отдельную пробирку помещают 1 мл дистиллированной воды (для контроля) добавив в эти пробирки по 1 мл 0.5% - фенола, выжидаем 10 мин. при комнатной температуре. Далее в пробирки с реакционными растворами добавляем по 2мл серной кислоты отвечающей на пробу Савая. Калориметрирование проводят на ФЭЖе после остывания реакционной смеси, на длине волны $\lambda=490$ в кюветах при ширине стен 10 мм против контрольной смеси.

Полученные значения оптической плотности находят по калибровочному графику содержания свободных углеводов в исследуемой пробе. Построение калибровочного графика по таблице 7. Где исходным раствором свободных углеводов является глюкоза.

Таблица 2.7.1. Построение калибровочного кривого

№	Кол-во стандартного раствора глюкозы	Кол-во мг стандартного раствора глюкозы в 50 мл эталона	Оптическая плотность, по ФЭЖу нм
1	2,5	10	0,3
2	5,0	20	0,55
3	7,5	30	0,78
4	10,0	40	1,12
5	12,5	50	1,25
6	15,0	60	1,49
7	17,5	70	1,73
8	20,0	80	1,92
9	22,5	90	2,2
10	25,0	100	2,43

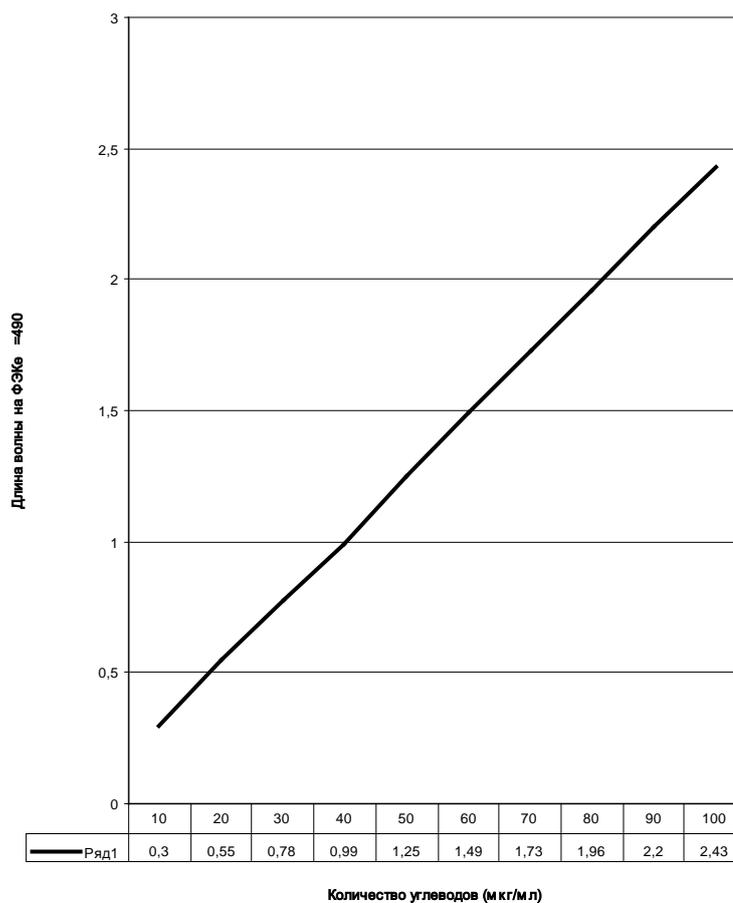


График 2 Калибровочная кривая для определения свободных углеводов

2.6. Подготовка культур микроорганизмов к применению для осахаривания разваренной массы

При замене солода глубинной культурой микроскопических грибов в ферментер по окончании ферментации при тщательном перемешивании добавляют 40%-ный раствор формалина из расчета 2 л на 1 м³ культуральной жидкости. После этого культуру перекачивают насосом в расходные баки, из которых она через дозатор непрерывно поступает в осахариватель.

При замене солода сухой поверхностной культурой микроскопических грибов или смесью культур их взвешивают, смачивают водой в соотношении 1:1 и тщательно измельчают на дробилках, применяемых для дробления солода. Измельченную массу направляют в сборники и смешивают с теплой водой (28...30 °С) из расчета 3...4 л на 1 кг исходной культуры. Для

стерилизации приливают 20...25 мл 40%-ного раствора формалина на 1 дал суспензии, тщательно перемешивают 15...20 мин, после чего выдерживают в течение 20...30 мин и передают в расходные баки.

Если применяют смесь поверхностной культуры микроскопических грибов и солода, например *Asp. awamori* или *Asp. oryzae* и ячменного или ржаного солода, то их дробят вместе и приготавливают водную суспензию так же, как солодовое молоко.

Расход поверхностной культуры, удовлетворяющей требованиям стандарта, определяемый по/массе крахмала зерна и картофеля, включая крахмал, в культуре препарата, составляет 5 %, в том числе Глюкаваморина П-4 %, Амилоризина П-1 %; при использовании смеси солода и поверхностной культуры: на крахмал картофеля и зерна-4 % солода и 2 % Глюкаваморина П или 4 % солода и 3 % Амилоризина.

Расход глубинной культуры микроорганизмов, а также концентрированных препаратов на осахаривание рассчитывают по их активности.

Так, при 72-часовом брожении расход α -амилазы должен составлять 1,5...2 ед. АС, глюкоамилазы — 6 ед. на 1 г крахмала. При 48-часовом брожении расход α -амилазы остается неизменным, а глюкоамилазы увеличивается до 15 ед. ГлА на 1 г крахмала. При этом достигаются равные показатели выбраживания.

Аналогично рассчитывают расход и других препаратов микроорганизмов-источников α -амилазы. Препарат α -амилазы рекомендуется подавать в две точки технологической схемы: 0,5 ед АС- на разжижение подвариваемой массы в предразварник и 1 ед. АС на 1 г крахмала- в осахариватель вместе с глюкоамилазой.

Если препарат α -амилазы содержит и другие амилолитические ферменты, в частности глюкоамилазу, то следует их учитывать и соответственно сокращать расход Глюкаваморина.

ГЛАВА-III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Отбор активных штаммов микроорганизмов – продуцентов амилолитических ферментов.

Особое место в современной биотехнологии занимает биотехнология микробных ферментов - область, которая охватывает круг вопросов, начинающаяся от отбора и селекции микроорганизмов - продуцентов ферментов, их биосинтеза, далее, методов выделения ферментов, включая производственного использования полученных ферментных препаратов.

Не секрет, что в последние годы для получения различных ферментов широко используют микроорганизмы, характеризующихся коротким циклом развития, активно растущие на легкодоступных и дешевых питательных средах, что очень важно для промышленного производства ферментов, особенно амилолитических. По экономическим и технологическим соображениям получать ферменты с помощью микроорганизмов более выгодно, чем из растительных и животных источников. Применение микробных ферментных препаратов в спиртовой промышленности позволяет заменить солод на не соложеное, исходное сырье в больших количествах, что является немаловажным фактом в отношении экономии зерна.

Обычно, как в мировой, так и в нашей практике для получения ферментных препаратов используют как микроскопические грибы, так и бактерии, а также в особых случаях дрожжи.

Ввиду того, что грибы рода *Aspergillus* и бактерии рода *Bacillus* очень эффективны для получения амилолитических и протеолитических ферментных препаратов, то в начальном этапе наших исследований нами были взяты несколько штаммы указанных культур, содержащиеся в коллекции музейных культур ИМБ АН РУЗ.

В качестве продуцента α -амилазы использовали *Bacillus subtilis*-аэробные, грамположительные, подвижные палочки бациллярной формы.

Для этих бактерий характерен очень богатый комплекс гидролитических ферментов. В качестве источников питания они могут использовать белки, углеводы, спирты, органические кислоты.

Bacillus subtilis культивируют как методом поверхностного культивирования на пшеничных отрубях, так и в жидких средах особого состава по методу глубинного культивирования, причем в стационарном режиме.

Хочется заметить, что данная культура, т.е. *Bacillus* очень эффективны для получения амилолитических ферментных препаратов в промышленных условиях, функционирующих в Республике Узбекистан. Имеются работы по получению активной α -амилазы данной культурой, где в качестве питательных сред для выращивания данных продуцентов можно использовать отходы спиртовой промышленности (барда), пивоваренные (солодовые ростки, пивные дрожжи, пивные дробины) и пшеничные отруби, что открывает новую возможность внедрения безотходных технологических процессов.

Известно, что активная α -амилаза в основном секретируется грибными и бактериальными культурами[11]. Отбор активного штамма является важнейшим фактором в процессе производства α -амилаза. Из-за высокой активности синтезируемых амилаз среди бактериальных культур нами предпочтение отдавалось различным штаммам *Bacillus subtilis*.

Амилолитическую активность активных крахмал разлагающих штаммов №: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 бактерий *Bacillus subtilis* определяли качественным методом, основанным на цветной реакции йода с крахмалом на твердой агаризованной среде. Способность бактерии к гидролизу крахмала определяли в течении 48, 72 и 96 часов по величине разлаженной зоны.

Исследуемые штаммы культур *Bacillus subtilis* обладали различной степенью амилолитической активности. Из 10 изученных штаммов только 4

обладали наибольшей способностью образовывать зоны вокруг колоний, появление которых обнаруживали уже на 16 часы роста, далее зоны разжижения увеличивались. В зависимости от времени культивирования размер зонн увеличивался и на четвёртые сутки роста бактерии охватывал всю поверхность среды на чашках Петри. Наиболее широкие гидролизованные зоны образовывали штаммы 9, 5, 3. Активность испытуемых штаммов бактерий к росту и образованию зоны гидролиза вокруг колоний распределялись следующим образом:

9>5>3>1>4>10>2>8>7

На следующих этапах исследований методом глубинного культивирования отобранных активных штаммов было изучено количественное содержание амилолитических ферментов в КЖ бактерий.

Наибольшей α -амилазной активностью обладали штаммы 9, 5, 3 достигающая максимума на 3 сутки культивирования, тогда как штаммы бактерии 1, 4, 10 обладали сравнительно низкой амилолитической активностью (от 40 до 50 ед/мл), у остальных штаммов α -амилаза образовывалась в незначительных количествах: от 5 до 15 ед/мл.

Отобранные штаммы бактерий, кроме разжижающей способности, обладали также осахаривающей способностью, т.е. глюкоамилазной активностью, доходивший до 28 ед/мл КЖ. (Табл.).

Табл. 3.1.1. Амилолитическая способность некоторых штаммов бактерии

Bacillus subtilis в глубинной культуре.

№	Продуценты	α -амилаза, ед/мл	Глюкоамилаза, ед/мл
1	<i>Bacillus subtilis</i> 9	93,4	28,5
2	<i>Bacillus subtilis</i> 5	87,6	25,3
3	<i>Bacillus subtilis</i> 3	86,1	21,7

Как известно, бактериальные культуры расщепляют крахмал в 2-2,5 раза быстрее, чем амилазы грибного происхождения, накапливая при этом 4-5 раз больше водорстворимых углеводов. У ферментов бактериального

происхождения активность высокая, и поэтому, дозы их применения примерно в 10 раз меньше, чем грибных амилаз. Существенным преимуществом бактериальной α -амилазы – её термостабильность [2]. Благодаря этим преимущественным характеристикам α -амилазы бактерий более предпочтительны и перспективны в различных отраслях производства. Исходя из этого, для дальнейших исследований нами была отобрана бактериальная культура, а именно, *Bacillus subtilis* – 9.

Bacillus subtilis на оптимальных питательных средах легко споролирует. Микроскопически представляется в виде одиночных клеток, спрентобацилл. Строгий аэроб, поэтому в стационарных условиях растёт в виде плёнок на жидких средах, таких как мясо-пептонный бульон, пептон, дрожжевой автолизат и различные белковые гидролизаты. Клетки подвижно, движение цепочек волнистого типа. Споры эллипсоидного или цилиндрические, размерами 0,6-0,9 x 1,0-1,5 мкм.

Таким образом, отобранный нами штамм 9 бактерии *Bacillus subtilis* выбран объектом дальнейших наших исследований и был использован как активный продуцент амилолитических ферментов, а именно α -амилазы .

3.2. Динамика роста, развития и накопления α -амилазы бактерией

***Bacillus subtilis* -9**

Анализ литературных данных касающиеся изучения кинетики синтеза внеклеточных α -амилаз в зависимости от состава питательной среды и скорости роста культур, показал, что она носит индивидуальный характер и зависит не только от состава компонентов питательной среды и физико-химических параметров культивирования, но и от экологической приуроченности культур, а также сезонного колебания их роста [23]. Исходя из этого, последующие эксперименты были посвящены изучению динамики образования α -амилазы культурой *Bacillus subtilis* штамм – 9 на подобранной ранее питательной среде.

При росте и развитии бактериальной культурой синтезируются различными метаболитами, в том числе и гидролитические ферменты.

Исследуемая культура *Bacillus subtilis* – 9, в питательной среде с крахмал-содержащими субстратами в преобладающем количестве синтезировала амилолитические (α -амилазу, глюкоамилазу) и другие сопутствующие ферменты. Так например, в КЖ активность α -амилазы составляло 90 ед/мл, глюкоамилазы 12,5 ед/мл, β -галактозидазы-3,8 ед/мл и др. глюкозидазы, нейтральной протеазы - 8,8 ед/мл, кислой протеазы – 2,0 ед/мл, щелочной протеазы 3,5 ед/мл. Полученные данные по изучению состава и активности сопутствующих ферментов представлены в таблице 3.1. .

Табл. 3.2. 1. Активность амилолитических и некоторых гидролитических ферментов, сопутствующих в в КЖ *Bacillus subtilis* –9.

№	Ферменты	Активность в КЖ, ед/мл
1	α -амилаза	90
2	Глюкоамилаза	12,5
3	Нейтральная протеаза	8,8
4	Кислая протеаза	2,0
5	Щелочная протеаза	2,4
6	β -глюкозидаза	2,5
7	α -галактозидаза	2,0
8	β -галактозидаза	3,8

Далее в лабораторных условиях нами были проведены исследования по изучению накопления α -амилазы. Было обнаружено, что появление активности обоих ферментов наблюдается к 30-35 часам роста продуцента, а максимальная амилолитическая активность до 90 ед/мл проявляется к 70-75 часам, в то время как протеолитическое достигает максимума до 10 ед/мл к 80-85 часам роста культуры. Активность обоих ферментов снижалась после 96 часов роста бактерии.

Следует отметить, что в процессе культивирования штамма наблюдалась повышение pH КЖ от 6,5 до pH 7,5, что объясняется синтезом фермента протеазы. К 96 часам роста и развития бактерии на поверхности

КЖ наблюдалась густая, вязкая биомасса, содержание которой составляет 6,5-8,5 г/100мл.

Данные выше приведённых экспериментов свидетельствуют о том, что синтез с α -амилазы протекает параллельно росту микробной популяции, однако наиболее интенсивное выделение фермента происходит в процессе лизиса клеток продуцента, которое происходит после исчерпания источников углерода и азота в питательной среде. Активность сопутствующего α -амилазе фермента – нейтральной протеазы быстро возрастает в первой половине экспоненциальной фазы роста *Bacillus subtilis* – 9. Было отмечено, к концу ферментативного процесса, сначала лизиса клеток, её активность вновь возрастает и достигает вторичного максимума, т.е. доходит до 10 ед/мл в КЖ.

3.3. Оптимизация состава питательной среды и условий культивирования для получения амилолитических ферментов.

Для проведения указанных исследований проводили посевы микроорганизмов на производственные отходы для активного биосинтеза ферментов при глубинном и поверхностном культивировании продуцентов.

Анализ исходного состава пшеничной отруби и пивной дробины проводили согласно ГОСТ 6527, где в исследуемых объектах были определены основные характеристики: органолептические свойства, массовые доли сырого протеина, жира, крахмал и др. веществ. Исходя из состава исходных компонентов питательные среды готовили в различных концентрациях и комбинациях.

Определение протеолитической активности проводилось модифицированным методом Ансона. В качестве субстрата, подвергаемого расщеплению полученным ферментным препаратом, использовался казеинат натрия (ТУ 15-188-76). Для определения активности α -амилазы использовали колориметрический метод, разработанный Рухлядовой и Горячевой.

Результаты анализов химического состава отрубей и пивных дробин приведены на рис. 3.3. 1.

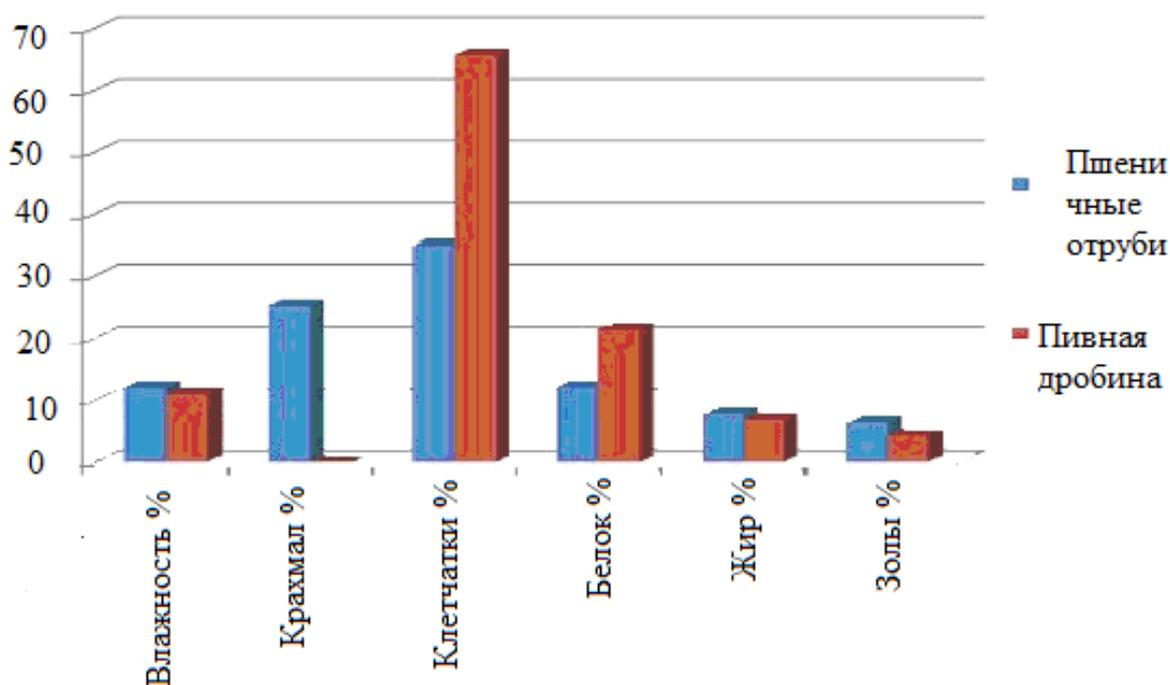


Рис.3.3.1. Диаграмма сравнения химического состава пшеничных отрубей и пивных дробин

Согласно полученным данным видно, что пивные дробины не уступают пшеничным отрубям по некоторым параметрам. Так например, по высокому содержанию клетчатки и белка отличался пивная дробина, но в них не было обнаружена крахмал-ценный полисахарид для биосинтеза амилаз. Хотя пшеничные отруби содержали меньшую концентрацию клетчатки, белка, но содержания жира и зольных веществ были высокой. Полученные данные свидетельствует о возможности использования пивных дробин в качестве добавок к питательной среде для поверхностного культивирования продуцентов амилаз, что позволяет экономить не только сырьё, но и придает нужную рыхлость среде.

Подобранный таким образом питательный компонент использовали для культивирования гриба *Aspergillus niger* и бактерии *Bacillus Subtilis*.

Так как ферменты представляют собой соединения белковой природы (активные белки), культивирование продуцентов следует вести на питательных средах, которые обеспечивают не только синтез общего белка клетки, но и направленный синтез определенного активного белка – метаболита. Для нормального развития микроорганизма и биосинтеза необходимого фермента питательная среда должна включать соединения, содержащие азотистые вещества, углеводов, водород, кислород, а также минеральные вещества (магний, кальций, фосфор, сера, железо, калий, марганец и др). Многочисленными работами установлено, что биосинтез ферментов зависит от состава питательной среды, т.е. сырья для получения ферментов. Один и тот же микроорганизм образует различные ферменты на средах разного состава. Большое значение при этом имеет не только концентрация каждого из компонентов среды, но и их соотношение. В этом своеобразии процессов биосинтеза микробных ферментов. Различны пути регуляции активности и биосинтеза внутри и внеклеточных ферментов. В ряде случаев вещество – «регулятор» не является субстратом фермента и его роль в образовании ферментов неясна. Многое зависит от того, является данный фермент конститутивным или индуцируемым. Например, для альфа-амилазы установлено, что независимо от условий культивирования и состава сред наилучшим индуктором амилолитических ферментов являются крахмал, декстрины и мальтоза. Сильно влияет на синтез амилолитических ферментов концентрация углеводов в среде. Для получения ферментов могут быть использовано различное сырье, в том числе отходы производства спирта – мелассно-спиртовая и зерно картофельная барда, барда ацетонобутиловых заводов доказано, что максимальный биосинтез ферментов наблюдается на комбинированных средах с однозамещенным фосфатом аммония и кукурузным экстрактом. Применение этого источника органического азота в

составе питательной среды позволяет также решить вопрос об утилизации отходов производства и снизить себестоимость ферментов.

Таблица 3.3.1. Состав питательной среды для глубинного культивирования продуцента *Bacillus Subtilis*

Наименование компонентов	Питательные среды	
	Контрольная	Опытная
Картофельный крахмал, %	4	4
Кукурузный экстракт, %	6	8
Кукурузная мука, %	3	5
NH ₄ H ₂ PO ₄ , %	3	4
KCl, %	0,15	0,15
CaCl ₂ , %	0,01	0,01
MgSO ₄ , %	0,05	0,05

Данные компоненты смешивают с водой и стерилизуют при 0,5 атм с продолжительностью 60 минут. Среду охлаждают до температуры 37 °С и проводят засев маточных культур (5-6млд клет/мл) в количестве 1мл/100 мл. рН питательной среды корректируют с помощью Na₂CO₃ от исходного значения 5,8 до оптимального 6,9 для *Bacillus Subtilis* и HCl до 4,7 для *Aspergillus niger*. Достижение значения рН в процессе культивирования 5,5-5,6 свидетельствует об окончании ферментации.

Культивирование *Bacillus Subtilis* и *Aspergillus niger* проводили в 4 колбах на качалках при скорости 180 об/мин, время культивирования для *Bacillus Subtilis* 56 часов, для *Aspergillus niger* 60 часов.

Культивирование данных видов продуцентов проводилось по следующему температурному режиму (таблица 3.3.1.).

Таблица 3.3.2. Температурный режим глубинного культивирования

Время, час.	<i>Bacillus Subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
2 первые часа	37 °С	32 °С
4 следующие часа	35 °С	30 °С
Остальное время	34 °С	28 °С

Влияние продолжительности культивирования на биосинтез ферментов *Bacillus Subtilis* и *Aspergillus niger* показано на рис. 3.3.1.

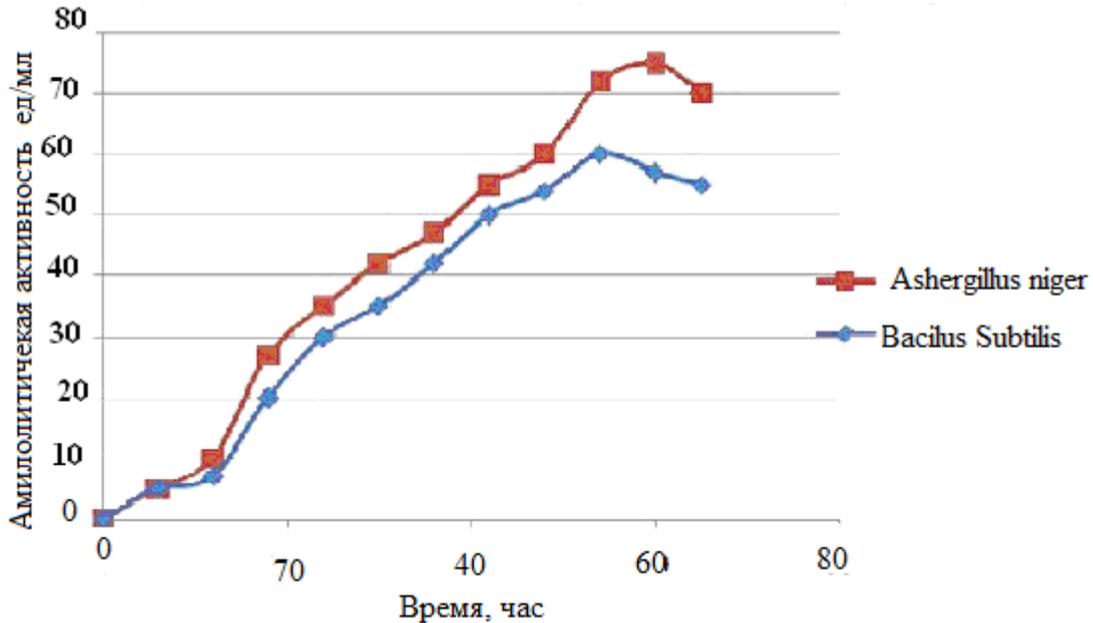


Рис. 2- Влияние продолжительности культивирования на биосинтез ферментов

Поверхностное культивирование *Aspergillus niger* проводилось по 4 вариантам. Питательные среды для поверхностного культивирования готовились по следующему составу(таблица 3.3.2.).

Таблица 3.3.3. Состав питательной среды для поверхностного культивирования

Название компонентов	1 - вариант	2 - вариант	3 - вариант	Контрольный вариант
Пшеничные отруби, %	70	70	70	100
Рисовая мука, %	10	5	10	0
Пивные дробины, %	10	15	15	0
Кукурузная мука, %	10	10	5	0

Все компоненты смешивались, увлажнялись до влажности 60%, стерилизовались в автоклаве при 0,5 атм продолжительностью 60 мин. Питательные среды с влажностью 48-58% охлаждались до температуры 32⁰С. Засев маточной культуры в питательные среды проводили с расчетом 2%, одновременно увлажняли среду до влажности 60% стерильной водой.

Культивирование проводилось в открытых банках, покрываемых марлями при температуре 32⁰С продолжительностью 60 часов.

Таблица 3.3.4. Ферментная активность полученных препаратов

Продуцент	Преобладающий фермент	Способ культивирования (поверхностный П, глубинный – Г)	Активность, ед./г сухого вещества или ед./мл культуральной жидкости	
			α -амилазы	Протеазы
Bacillus subtilis	α -амилазы и протеазы	Г	60	45
Aspergillus niger	α -амилазы и протеазы	Г	75	05
Aspergillus niger-контрольного варианта	α -амилазы и протеазы	П	60	04
Aspergillus niger 1-ого варианта	α -амилазы и протеазы	П	65	03
Aspergillus niger 2-ого варианта	α -амилазы и протеазы	П	65	03
Aspergillus niger 3-его варианта	α -амилазы и протеазы	П	62	04

Амилолитическую и протеолитическую активность полученных технических ферментных препаратов определяли колориметрическим методом, разработанным Рухлядовой и Горячевой и модифицированным методом Ансона, соответственно. Результаты представлены в таблице 4.

Из таблицы 6 видно, что добавление рисовой и кукурузной муки способствует биосинтезу α -амилазы в примерно равной степени.

Таким образом, анализ полученных данных позволяет сделать вывод о том, что Bacillus Subtilis и Aspergillus niger активно продуцируют ферменты. Полученные технические ферментные препараты имеют амилолитическую активность порядка 62-75 ед., и 04-45 ед. протеолитической активности. Для получения α -амилазы рекомендуется использовать Aspergillus niger поверхностным и глубинным способом культивирования, а для получения протеазы - Bacillus Subtilis глубинным способом культивированием.

Глубинный способ культивирования является более прогрессивным с точки зрения техники и экономики. Данные технические ферментные препараты могут применяться в спиртовом и пивоваренном производстве.

Производство и применение микробных ферментов открывают новую возможность внедрения безотходных технологий для получения пищевых продуктов и стали актуальной задачей для пищевых производств.

3.4. Применение α -амилаз в спиртовой промышленности

В условиях спиртового производства гидролиз крахмала при переработке сырья можно разбить на две стадии: первая разжижение и осахаривание крахмала разваренной массы в непрерывнодействующем осахаривателе, вторая – окончательное доосахаривание крахмала, осуществляющееся в процессе брожения. [7].

Важнейшим фактором, определяющее состояние углеводно-амилазного комплекса при брожении, является концентрация H^+ ионов. На основании полученных результатов приведённых в литературе делается вывод о том, что регулирование рН при брожении является одним из важнейших практических мероприятий, ведущих не только к стабилизации технхимических показателей брожения, но и к существенному повышению выхода спирта из перерабатываемого сырья.

α -Амилазы весьма чувствительны к повышению концентрации H^+ ионов при брожении. В связи с этим было интересно выяснить, оказывает ли какое-либо влияние их инактивация на процесс превращения крахмала и декстринов в сбраживаемые сахара. Исходя из представлений о механизме гидролиза крахмала β -амилазой или глюкоамилазой можно заранее предсказать, что роль α -амилазы будет различной в зависимости от того, с каким ферментом она будет находиться вместе – с β -амилазой или глюкоамилазой.

При гидролизе крахмала в сбраживаемый сахар действие β -амилазой прекращается на фрагментах крахмала β -амилодекстринов. Стерическим препятствием здесь будет, с одной стороны, редуцирующий конец декстрина, с другой – β -амилазой α -1,6-глюкозидная связь. Дальнейшее превращение такого аномального декстрина в сбраживаемый сахар окажется возможным лишь в том случае, когда в глубине его разветвлений будет разорвана какая-либо α -1,4-глюкозидная связь. Именно это и осуществляет α -амилаза. В данном случае для β -амилазы она выполняет роль синергетического фактора. Иное дело, когда α -амилаза действует совместно с глюкоамилазой.

Поскольку глюкоамилаза расщепляет α -1,4- и α -1,6-глюкозидные связи в крахмале, действие её может протекать совершенно независимо от действия α -амилазы. Правда скорость гидролиза крахмала в присутствии α -амилазы может быть выше, но это не окажет существенного влияния на конечные результаты гидролиза.

Таблица 3.4.1. Роль α -амилазы (АС) в превращении крахмала в сбраживаемый сахар в присутствии глюкоамилазы (ГЛС)

Брожение, ч	α -амилаза		β -амилаза+ α -амилаза		
	Активность	Сбраживаемые углеводы, г в пересчёте на глюкозу	активность ГЛС	Активность α -амилазы	Сбраживаемые углеводы, г в пересчёте на глюкозу
1) 0	10,81	13,78	10,38	150,0	13,78
24	9,15	7,85	8,91	109,0	3,45
48	7,31	5,89	6,72	65,8	1,35
72	5,24	5,81	5,00	33,3	0,68
96	4,72	5,81	4,12	21,4	0,59

Различную роль α -амилазы в сбраживаемых средах содержащих β -амилазу или глюкоамилазу, достаточно убедительно подтверждают результаты опытов, представленные в таблицах 3.3.1. и 3.3.2.

Таблица 3.4.2..Роль α -амилазы в превращении крахмала в сбраживаемый сахар в присутствии глюкоамилазы.

Броже- ние, ч	Глюкоамилаза+кислотоустойчивая α -амилаза			Глюкоамилаза+ общая α -амилаза		
	Актив- ность глюкоами- лазы	Актив- ность α - амилаз ы	Сбраживаем ые углеводы, г в пересчёте на глюкозу	Актив- ность глюко- амилазы	Актив- ность α - амилазы	Сбраживаемые углеводы, г в пере-счёте на глюкозу
0	-	0,0	13,52	-	5,3	13,52
24	-	0,0	6,12	-	5,0	4,27
48	293,1	0,0	1,66	305,6	5,1	0,91
72	289,4	0,0	1,29	300,9	5,0	0,66
96	279,7	0,0	0,98	-	5,1	0,35
144	265,6	0,0	0,76	-	-	-

Как видно из таблицы 3.3.1. успех в ходе брожения определяется совместным действием α - и β -амилаз определённая взаимосвязь между выходом спирта и активности α -амилазы отмечено и другими исследователями. При высокой концентрации ионов водорода потери несброженных углеводов в процессе брожения зависят от двух причин: а) от инактивации β -амилазы (прямое действие H^+ -ионов и образования комплекса с меланоидинами); б) от инактивации α -амилазы.

В сусле содержащем глюкоамилазу, брожение идёт в полне нормально даже в том случае, когда в них отсутствует α -амилаза. Однако α -амилаза имеет важное значение в снижении вязкости сусла, в превращении крахмала в декстрины, особенно крахмала, нерастворившегося при тепловой обработки сырья. При высокой концентрации H^+ -ионов в снижении вязкости сусла особенновелика роль кислотоустойчивой α -амилазы. Из таблицы 3.3.2. видно, что при действии одной глюкоамилазы в сусле несколько замедляется процесс превращения крахмала в сбраживаемый сахар, хотя это нельзя

сравнить с действием одной β -амилазы. Инактивация α -амилазы при сбраживании сусле, содержащего глюкоамилазу, оказывает влияние на конечные результаты брожения, но не столь существенные, как в сусле с β -амилазы.

ВЫВОДЫ

1. Были испытаны более 10 местных штаммы, активно гидролизующие 10 % крахмал с образованием большой зоны разжижения в течение 16 часов. такие как №: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 бактерий *Bacillus subtilis*
2. Наиболее активным продуцентом α -амилазы оказался *Bacillus subtilis*-9, способный образовать максимальную активность в течение 36-48 часов роста α -амилазу 120 ед/мл и др. не менее важные гидролитические ферменты. .
3. Для удешевления состава питательной среды и использования промышленных отходов с целью выращивания амилолитически активных бактерий и грибов были изучены отходы производства: пшеничные отруби (отход мукомольного производства) и пивная дробина (отход пивоваренной промышленности). Было установлено пивная дробина отличается большим содержанием крахмала, белков, жира и зольных веществ, тогда как отруби отличаются высоким содержанием клетчатки и белка. Оказалось, что оба отхода являются полноценными субстратами для поверхностного культивирования амилолитически активных штаммов микроорганизмов, как бактерий так и грибов.
4. Для культивирования продуцентов ферментов различного сырья, в том числе отходы производства спирта – меласно-спиртовая и зерно картофельная барда, барда ацетонобутиловых заводов. Доказано, что максимальный биосинтез ферментов наблюдается на комбинированных средах с однозамещенным фосфатом аммония и кукурузным экстрактом.
5. Полученные технические ферментные препараты имеют амилолитическую активность порядка 62-75 ед., и 04-45 ед. протеолитической активности. Для получения α -амилазы рекомендуется использовать *Aspergillus niger* поверхностным и глубинным способом культивирования, а для получения протеазы - *Bacillus Subtilis* глубинным способом культивированием.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1.Алиханян С.И., Селекция промышленных микроорганизмов.// Москва, Наука, 1968, 369 с.
- 2.Виестур У.Э., Кузнецов А.М., Савеньков В.В., Системы ферментации. // Рига, Зинатне, 1986, 367 с.
- 3.Галич И.П., Амилазы микроорганизмов.// Киев, Наука думка, 1987, 190с.
- 4.Глемжа А.А., Люджюс Л.Л., Петрова Л.И., Микробные ферменты в народном хозяйстве.// Вильнюс, Мокслас, 1985, 188 с.
- 5.Грачева И.М., Технология ферментных препаратов.// Москва, Агропромиздат, 1987, с. 335.
- 6.Егорова Н.С., Промышленная микробиология.// Москва, Высшая школа, 1989, 688 с.
- 7.Жеребцов Н.А., Руадзе И.Д., Яковлев А.Н., *О механизме кислотного и ферментативного гидролиза крахмала.*// Прикл. биохимия и микробиология, 1995, Т.31, № 6, стр. 599-603.
8. Избранные задачи для большого практикума по микробиологии. /Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991.
- 9.Квеситадзе Г.И., *Грибные и бактериальные амилазы*, Мецниереба, Тбилиси, 1984, 155.
10. *Кичакова Н. А.* Выделение и изучение свойств термостабильной альфа-амилазы *Bacillus* sp. 86: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. — К., 1991. — 16 с.
- 11.Ловачева Г.Н.,Мглинец А.И., Успенская Н.Р. Стандартизация и контроль качества продукции. М.: Экономика, 1990. 238 с.
12. *Люджус Л. Л., Чекменева Т. М., Куниский Д. Г.* Состояние производства и применение ферментов за рубежом. — М., 1986. — С. 6–8.]

13. Методические рекомендации к проведению лабораторных работ по технологии белковых препаратов, аминокислот и липидов. /Под ред. И.М.Грачевой. М.: МТИПП, 1984. 69 с.

14. Нурматов Ш.Х., Ахмедова З.Р., Рахимов Д.А. *Выделение, очистка и характеристика α -амилазы *Bacillus subtilis*-7A*//, Химия Природных Соединений, 2001, N4, стр. 309-312.

15. Павлова И. Н., Кичакова Н. А., Захарова И. Я. Термостабильные амилазы штамма *Bacillus sp.* // Методы получения, анализа и применения ферментов. — Рига, 1990. — С. 34.

16. *Перевозченко И. И.* Сравнительное исследование α -амилаз некоторых плесневых грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 093. — К., 1981. — 24 с.

17. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Серба Е.М., Трифонова В.В., *Сравнительная характеристика микробных протеаз по степени гидролиза белковых субстратов.*// Прикл. биохимия и микробиология, 1997, Т.33, № 1, стр. 43-48.

18. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Н.С.Егорова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983.

19. *Рухлядева А. П., Польшгалина Г. В.* Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Легпищпром, 1981. — С. 34–43.

20. *Фролова Г. М., Сильченко А. С., Пивкин М. В., Михайлов В. В.* Амилазы гриба *Aspergillus flavipes*, ассоциированного с *Fucus evanes) cens* // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 2. — С. 155–160.

21. *Цурикова Н. В., Нефедова Л. И., Костилева Е. В. и др.* Получение активного штамма *Bacillus licheniformis* — продуцента термостабильной α -амилазы // Приклад. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38, № 5. — С. 502–508.

22. Чиркин А.А. Практикум по биохимии. Минск: ООО «Новое знание», 2002. 516 с.

23. Яровенко В.Л. Технология спирта. Москва. Колос, Пресс, 2002
24. *Asgher M., Asad M. J., Rahman S. U., Legge R. L.* A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing // *J. of Food Engineering*. — 2007. — V. 79, N 3. — P. 950–955.
25. *Castro G., Baigori M., Sinerir F.* Studies on α -amylase production by *Bac. Licheniformis* MIR-61 // *Acta Biotechnol.* — 1999. — V. 19, N 3. — P. 263
26. *Decklerck N., Machius M., Joyet Ph. et al.* Engineering the thermostability of *B. licheniformis* α -amylase // *Biologia (Bratislava)*. — 2002. — V.11. — P. 203–211
27. *Coronado M., Vargas C., Hofemeister J., Nieto J.* Production and biochemical characterization of an α -amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana* // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2000. — V. 183, N1. — P. 67–71.
28. *Leveque E., Janecek S., Haye B., Belarbi A.* Thermophilic archaeal amylolytic enzymes // *Enzyme Microb. Technol.* — 2000. — V. 26, N1. — P. 3–14.]
29. *Ezeji T. C., Bahl H.* Purification, characterization, and synergistic action of phytate-resistant α -amylase and α -glucosidase from *Geobacillus thermodinitrificans* HRO10 // *J. Biotechnol.* — 2006. — V. 125, N 1. — P. 27–38
30. *Mitidieri S., Martinelli A. H. S., Schrank A., Vainstein M. H.* Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations // *Bioresource Technology*. — 2006. — V. 97, N10. — P. 1117–1224.
31. *Kumar J. P., Richa J., Jain P. C.* Production of industrially important enzymes by some actinomycetes producing antifungal components // *Hindustan Antibiot. Bull.* — 2003–2004. — V. 45–46. — C. 29–33.
32. *Odibo F., Ulbrich)Hofmann R.* Thermostable α -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1 // *Acta biotechnol.* — 2001. — V. 21, N 2. — P. 141–153.

33. Poli A., Esposito E., Lama L., Orlando P. *Anoxybacillus amylophilus* sp. nov., a thermophilic amylase producing bacterium isolated from mount Rittmann (Antarctica) // *System. App. Microbiol.* — 2006. — V. 29, N 4. — P. 300–307

34. Saboury A. A. Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca^{2+} and Co^{2+} // *Ibid.* — 2002. — V. 11. — P. 221–228.

35. Saxena R. K., Dutt K., Agarwal L., Nayyar P. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5 // *Bioresource Technology.* — 2007. — V. 98, N 2. — P. 260–265.

36. Sivaramakrishnan S., Gangadharan D., Kesavan Madhavan Nampoothiri et al. α -Amylases from microbial sources an overview on recent developments // *Food Technol. Biochem. Technol.* — 2006. — V. 44, N 2. — P. 173–184.

37. Zeng G.)M., Shi J.)G., Yuan X.)Z., Liu J. Effects of Tween 80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost // *Enzyme Microb. Technol.* — 2006. — V. 39, N 7. — P. 1451–1456.

38. Jensen B, J Olsen and K Allermann. *Effect of media composition on the production of extracellular amylase from the thermophilic fungus Thermomyces lanuginosus.* *Biotechnol Lett* (1987) 9: 313– 316.

39. Schügerl K, SR Gerlach and D Siedenberg. *Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of Aspergilli.* *Adv Biochem Eng Biotechnol* (1997) 60: 195– 267.

40. Papagianni M, Joshi N and Moo-Young M. *Comparative studies on extracellular protease secretion and glucoamylase production by free and immobilized Aspergillus niger cultures.* *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* (2002) 29, 259 – 263.

