

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕ-СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

Факультет: Отдел магистратуры	Студент магистратуры: Атабаева Роза Тимурлановна
Кафедра: Биотехнология	Научный руководитель: к.б.н., доцент Каршиев Т.О.
Учебный год: 2014-2015	Специальность: 5А320501-биотехнология (по видам продукции)

АННОТАЦИЯ НА МАГИСТРСКУЮ ДИССЕРТАЦИЮ

**На тему: «Исследования процессы получения фермент амилаза из
бактерии *v. subtilis*»**

Актуальность темы: В последнее годы в республике в темпе развития производственных процессов, применением новых технологий, повышения спроса производства необходимых продуктов, чтобы степень качества получаемых продуктов был высоким, определенно применение биологических способов стали играть очень важную и перспективную роль. Ферменты обладают уникальными свойствами (эффективность и специфичность действия, нетоксичность, способность работать в мягких условиях, перерабатывать различное сырье растительного и животного происхождения, в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической (фермент амилаза из бактерии *v. subtilis*) занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объём продукции которых постоянно растёт, а сфера применения неуклонно расширяется. Такое быстрое развитие связано с тем, что ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможны осуществление многих биохимических процессов и жизнь в целом.

Ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, а достижения современной энзимологии еще значительно расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине и пищевой промышленности. Рынок ферментов растет из года в год, причем он очень четко ориентирован на тенденции того рынка, где применяются ферменты. Его развитие зависит от двух взаимосвязанных факторов: экономической целесообразности их применения и возможности их промышленного производства.

Цель и задачи работы: Целью настоящей работы явилась **Исследования получения процессы фермент амилаза из бактерии *v. subtilis*** полученные из коллекции культур Института Микробиологии АНРУз. Для достижения указанной цели решались следующие задачи: Культивирования продуцентов амилотических ферментов и выявления

активных культур. Изучение состава питательной среды для оптимизации условий максимального ферментообразования, отбор рациональных питательных сред для максимального биосинтеза ферментов при глубинном и поверхностном культивировании продуцентов. Разработка оптимальных режимов культивирования отобранных продуцентов. Выбор эффективных способов выделения и концентрирования ферментов с высокой амилолитической активностью. Разработка рекомендаций для испытания полученных препаратов на практике.

Изучаемый объект и предмет: Бактериальная α -амилаза, образующая при гидролизе полисахариды с различной степенью полимеризации. Источниками бактериальной α -амилазы являются ферментные препараты: фермент амилаза - синтезируемые *Bacillus subtilis*.

Способы и исследуемый метод: биологическая характеристика и определение *bacillus subtilis*, поверхностный способ культивирования продуцентов амилаз на твердых питательных средах, методы определения активности протеолитических ферментов, определение протеолитических ферментов по Муру и Штейну, микрометод определения активности протеиназ, Определение некоторых каталитических и физико-химических свойств ферментов.

Степень новшества с научной точки зрения результатов исследования: Для получения бактериальной амилазы в производстве используют *Bac. subtilis* и *Bac. diasfaticus*. Выращивают их поверхностным методом на жидкой питательной среде определенного состава или на отрубях, а также глубинным методом. Амилаза, выделяемая бактериями в среду, обладает главным образом, разжижающим и декстринирующим действием на крахмал и малой осахаривающей способностью. Этим она отличается от амилаз плесневых грибов, солода и поджелудочной железы.

При сравнительно низкой температуре бактериальная амилаза проявляет свою активность в широком диапазоне pH, т. е. от 5 до 9 при оптимуме pH 6,5-7. Оптимальной температурой ее является 55°C. Бактериальной амилазой можно вызвать быстрое разжижение крахмала при температуре 75° С и даже при 100° С. В последнем случае необходимо нейтральное значение pH. При температуре 100°C действие фермента амилазы кратковременное, но эффективное, крахмал полностью разжижается. Фермент α -амилаза способен беспорядочно гидролизовать полисахаридную цепь крахмала и других длинноцепочечных углеводов по α -(1→4)-связям с образованием преимущественно α -мальтозы, т.е. остатки мономеров при таком расщеплении имеют α -конфигурацию. Продуктами расщепления оказываются, помимо мальтозы, также олигомеры, содержащие от 3 до 7 остатков глюкозы. Так, амилоза крахмала под действием α -амилазы превращается в глюкозу и мальтозу. Амилопектин, содержащий в молекуле α -(1→6)-связи, полностью не гидролизуются, поэтому остается

разветвленный полисахарид (с более низкой степенью разветвленности по сравнению с крахмалом), так называемый «остаточный декстрин».

Все α -амилазы являются кальцийзависимыми ферментами. Полное удаление кальция приводит к инактивации фермента. Повторное введение кальция в среду может частично восстановить его активность.

α -Амилазы богаты тирозином и триптофаном, а также глутаминовой и аспарагиновой кислотами (25% от массы белка). Наличие этих кислот связывают с осахаривающей способностью, которую проявляют эти энзимы. Серосодержащие аминокислоты входят в состав α -амилаз в сравнительно малых количествах, либо вообще отсутствуют. Кроме того, некоторые α -амилазы, выделенные из грибов, имеют углеводный фрагмент, в состав которого могут входить манноза, ксилоза.

α -амилаза обладает слабокислыми свойствами, при этом оптимальный диапазон рН для проявления ее максимальной активности составляет 6,7-7,0, т.е для действия фермента наиболее благоприятна нейтральная среда.

Исследования синтезирующихся внеклеточных белков и спектра амилаз в составе КЖ показали, что при росте и развитии в глубинной культуре бактериальной культурой синтезируются различные ферменты. Исследуемая культура *B.subtilis-15*, в питательной среде с крахмалсодержащими субстратами синтезировало в преобладающем количестве амилолитические, затем протеолитические ферменты. Исследуемые штаммы культур *Bacillus subtilis* обладали различной степенью амилолитической активности. Из 15 изученных штаммов только 7 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 15,11,9,7,5,3,2. Исходя из этого, для дальнейших исследований нами была отобрана бактериальная культура, а именно, *Bacillus subtilis - 15*. *Bacillus subtilis* на оптимальных питательных средах легко споролирует. Споры эллипсоидного или цилиндрические, размерами 0,6-0,9 x 1,0-1,5 мкм.

Таким образом, отобранный нами штамм 15 бактерии *Bacillus subtilis* выбран объектом дальнейших наших исследований и был использован как активный продуцент амилолитических ферментов, а именно α -амилазы.

Практическое значение изучаемого исследования и внедрение: α -амилазы, применяемой в различных областях промышленности и сельского хозяйства для осахаривания (гидролиза) крахмалосодержащего сырья, а именно в хлебопечении, спиртовой, пивоваренной, кондитерской и крахмалопаточной промышленности (выработка патоки, сиропов, глюкозы), при производстве крупяных изделий, овощных продуктов, изделий из фруктов (соков, сиропов, экстрактов, варений, пектина), детского питания, в

текстильной, бумажной промышленности при производстве моющих средств, а также в медицине.

Принцип работы и его содержание: Введение, литературный обзор, используемые материалы и методы, полученные результаты и их анализ, выводы, предложения, а также список использованной литературы.

Основные результаты выполненной работы: В результате активность испытуемых штаммов бактерий к росту и образованию зоны гидролиза вокруг колоний распределялись следующим образом: 15>11>9>7>5>3>2>8>6 в экспериментально подобранных оптимальных условиях в КЖ активность α -амилазы составляла 192 ед/мл, тогда как в идентичных условиях роста и развития данной культуры активности сопутствующих ферментов, в частности глюкоамилазы составляла -5,3 ед/мл, нейтральной протеазы-4,8 ед/мл, кислой протеазы-2,6 ед/мл, щелочной протеазы-6,9 ед/мл.

Краткое обобщенное значение предложений и выводы: В результате альфа - амилазы различного происхождения значительно отличаются друг от друга по скорости гидролиза крахмала и гликогена, составу конечных продуктов ферментативного гидролиза и скорости осахаривания декстринов, по стабильности оптимальной температуры и величины рН. На основе полученных научных исследований получение фермента амилаза из бактерии *v. subtilis* на уровне производства имеет высокий экономический эффект и большую рентабельность.

Научный руководитель:

Студент магистратуры:

**МИНСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

На правах рукописи

УДК 664.2.557.15

**АТАБАЕВА (КУДРАТУЛЛАЕВА) РОЗА ТИМИРЛАНОВНА
ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТА
АМИЛАЗЫ ИЗ БАКТЕРИЙ *V. SUBTILIS***

Специальность: 5А320501 – Биотехнология (производство пищевых, кормовых, химических продуктов и биопрепаратов для сельского хозяйства).

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание академической степени магистра

**Научный руководитель
к.б.н., доц. Т.О. Каршиев**

**Научный консультант
к.б.н., с.н.с. Х.Х. Муминова,
директор Института
микробиологии АН РУз**

Ташкент 2015

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Протеолитические ферменты и суперпродуценты нейтральной протеазы <i>bacillus</i> и их свойства.....	10
1.2. Характеристика отдельных ферментных препаратов, используемых в различных отраслях промышленности.....	17
1.3. Физико-химические свойства и механизм действия амилаз.....	30
1.4. Выделение и очистка препаратов протеиназы.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	40
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	33
2.1. Биологическая характеристика и определение <i>bacillus subtilis</i>	40
2.2. Поверхностный способ культивирования продуцентов амилаз на твердых питательных средах.....	43
2.3. Методы определения активности протеолитических ферментов.....	45
2.4. Определение протеолитических ферментов по Муру и Штейну.....	48
2.5. Микрометод определения активности протеиназ.....	50
2.6. Определение активности протеиназ по белковому субстрату.....	51
2.7. Определение некоторых каталитических и физико-химических свойств ферментов.....	55
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ....	56
3.1. Исследование: отбор активных штаммов микроорганизмов - продуцентов амилолитических ферментов.....	56
3.2. Получение препаратов амилаз из поверхностных и глубинных культур.....	61
3.3. Динамика роста, развития и накопления α -амилазы бактерией <i>Bacillus subtilis</i> -15 и <i>Bacillus subtilis</i> -11.....	63
3.4. Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности...	65
3.4.1. Выбор ферментов для пищевых целей.....	68
3.4.2. Правовые аспекты применения ферментов в пищевых продуктах.....	69
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	74
5. ВЫВОДЫ.....	76
6. Список литературы.....	77
7. Список опубликованных работ.....	83
8. Приложения.....	84

ВВЕДЕНИЕ

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объём продукции которых постоянно растёт, а сфера применения неуклонно расширяется. Такое быстрое развитие связано с тем, что ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможны осуществление многих биохимических процессов и жизнь в целом [1,3].

Изучение ферментов имеет большое значение для любой области химической, пищевой и фармацевтической промышленности, занятых производством биологически активных веществ для медицины и народного хозяйства[3].

Фермент амилаза широко используются в пищевой промышленности. Так амилазы используются в хлебопечении и технологиях брожения. Также амилаза играет значительную роль в расщеплении крахмала в организме человека. Поэтому понимание действия амилазы важно для оптимизации промышленного производства и изучения обмена веществ в организме человека [4,17].

Одним из самых значительных практических результатов биотехнологии является применение различных ферментов и ферментных препаратов. Ферменты, выделяемые микроорганизмами, использовались человеком достаточно давно, но сущность ферментативных процессов не была известна. С развитием биотехнологии и, в частности, инженерной энзимологии стало возможным выделять ферменты из живых организмов и использовать их непосредственно в различных областях промышленности.

Как известно, биотехнологии базируются на применении ферментов, которые представляют собой катализаторы белковой природы (биокатализаторы), обладающие способностью многократно ускорять химические реакции и отличающиеся избирательностью воздействия[18,22].

Некоторые ферменты, содержащиеся в природных растительных материалах, издавна использовались человеком для получения пива, спиртных напитков, хлеба и кисломолочных продуктов. Практика, основанная на коллективном опыте людей, намного опередила получение знаний и разработку научных основ для создания данных технологических процессов [48,45]. Промышленная отрасль получения ферментных препаратов из природного растительного сырья стала зарождаться только в конце XIX столетия, а эра современной инженерной энзимологии насчитывает около 30 лет. Тем не менее, ферменты настолько прочно вошли в нашу жизнь и настолько широко применяются в различных промышленных отраслях, что представить без них наше существование сегодня не представляется возможным. Промышленное получение и применение ферментов в различных технологических процессах составляет сегодня один из важнейших разделов новейшей биотехнологии [8,12,37].

В настоящей работе представлена обзорная информация о гликозидазах и отдельных группах ферментов данного класса - амилаза. Рассмотрены механизмы действия этих ферментов, микроорганизмы-продуценты этих ферментов, способы получения ферментных препаратов и возможные области их применения.

Амилазы (от лат. *amylum*, что в переводе означает «крахмал») — ферменты класса гликозил-гидролаз, катализирующие гидролиз крахмала, гликогена и других родственных полисахаридов главным образом по α -(1→4)-гликозидной связи с образованием олиго- и моносахаридов [12,19,62]. Амилазы также называют ферментами пищеварения.

Фермент α -амилаза способен беспорядочно гидролизовать полисахаридную цепь крахмала и других длинноцепочечных углеводов по α -(1→4)-связям с образованием преимущественно α -мальтозы, т.е. остатки мономеров при таком расщеплении имеют α -конфигурацию. Продуктами расщепления оказываются, помимо мальтозы, также олигомеры, содержащие от 3 до 7 остатков глюкозы [26,16]. Так, амилоза крахмала под действием α -

амилазы превращается в глюкозу и мальтозу. Амилопектин, содержащий в молекуле α -(1 \rightarrow 6)-связи, полностью не гидролизуется, поэтому остается разветвленный полисахарид (с более низкой степенью разветвленности по сравнению с крахмалом), так называемый «остаточный декстрин».

Фермент α -амилаза присутствует во всех тканях животных и растений (например, в овсе), обнаружена также в грибах (в аскомицетах, базидиомицетах) и бактериях (*b.bacillus*) [13,25]. Причем ферменты, выделенные из разных источников, значительно отличаются друг от друга по каталитической активности.

Актуальность темы: В последнее годы в республике в темпе развития производственных процессов, применением новых технологий, повышения спроса производства необходимых продуктов, чтобы степень качества получаемых продуктов был высоким, определенно применение биологических способов стали играть очень важную и перспективную роль.

Ферменты обладают уникальными свойствами (эффективность и специфичность действия, нетоксичность, способность работать в мягких условиях, перерабатывать различное сырье растительного и животного происхождения, в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической (фермент амилаза из бактерии *v. subtilis*) занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объём продукции которых постоянно растёт, а сфера применения неуклонно расширяется.

Такое быстрое развитие связано с тем, что ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможны осуществление многих биохимических процессов и жизнь в целом. Ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, а достижения современной энзимологии еще значительно расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине и пищевой промышленности. Рынок ферментов растет из года в

год, причем он очень четко ориентирован на тенденции того рынка, где применяются ферменты. Его развитие зависит от двух взаимосвязанных факторов: экономической целесообразности их применения и возможности их промышленного производства.

Цель и задачи работы: Целью настоящей работы явилась Исследования получения процессы фермент амилаза из бактерии *v. subtilis* полученные из коллекции культур Института Микробиологии АНРУз.

Для достижения указанной цели решались следующие задачи: - культивирования продуцентов амилитических ферментов и выявления активных культур. -Изучение состава питательной среды для оптимизации условий максимального ферментобразования, отбор рациональных питательных сред для максимального биосинтеза ферментов при глубинном и поверхностном культивировании продуцентов. -Разработка оптимальных режимов культивирования отобранных продуцентов. -Выбор эффективных способов выделения и концентрирования ферментов с высокой амилитической активностью. -Разработка рекомендаций для испытания полученных препаратов на практике.

Исследуемый объект и предмет: Бактериальная α -амилаза, образующая при гидролизе полисахариды с различной степенью полимеризации. Источниками бактериальной α -амилазы являются ферментные препараты: фермент амилаза - синтезируемые *Bacillus subtilis*.

Способы и исследуемый метод: биологическая характеристика и определение *Bacillus subtilis*, поверхностный способ культивирования продуцентов амилаз на твердых питательных средах, методы определения активности протеолитических ферментов, определение протеолитических ферментов по Муру и Штейну, микрометод определения активности протеиназ, Определение некоторых каталитических и физико-химических свойств ферментов.

Степень новшества с научной точки зрения результатов исследования: При сравнительно низкой температуре бактериальная

амилаза проявляет свою активность в широком диапазоне рН, т. е. от 5 до 9 при оптимуме рН 6,5-7. Оптимальной температурой ее является 55°С. Бактериальной амилазой можно вызвать быстрое разжижение крахмала при температуре 75° С и даже при 100° С. В последнем случае необходимо нейтральное значение рН. При температуре 100°С действие фермента амилазы кратковременное, но эффективное, крахмал полностью разжижается. Фермент α -амилаза способен беспорядочно гидролизовать полисахаридную цепь крахмала и других длинноцепочечных углеводов по α -(1→4)-связям с образованием преимущественно α -мальтозы, т.е. остатки мономеров при таком расщеплении имеют α -конфигурацию. Продуктами расщепления оказываются, помимо мальтозы, также олигомеры, содержащие от 3 до 7 остатков глюкозы. Так, амилоза крахмала под действием α -амилазы превращается в глюкозу и мальтозу. Амилопектин, содержащий в молекуле α -(1→6)-связи, полностью не гидролизуется, поэтому остается разветвленный полисахарид (с более низкой степенью разветвленности по сравнению с крахмалом), так называемый «остаточный декстрин».

Все α -амилазы являются кальцийзависимыми ферментами. Полное удаление кальция приводит к инактивации фермента. Повторное введение кальция в среду может частично восстановить его активность.

α -Амилазы богаты тирозином и триптофаном, а также глутаминовой и аспарагиновой кислотами (25% от массы белка). Наличие этих кислот связывают с осахаривающей способностью, которую проявляют эти энзимы. Серосодержащие аминокислоты входят в состав α -амилаз в сравнительно малых количествах, либо вообще отсутствуют. Кроме того, некоторые α -амилазы, выделенные из грибов, имеют углеводный фрагмент, в состав которого могут входить манноза, ксилоза.

α -амилаза обладает слабокислыми свойствами, при этом оптимальный диапазон рН для проявления ее максимальной активности составляет 6,7-7,0, т.е. для действия фермента наиболее благоприятна нейтральная среда.

Исследования синтезирующихся внеклеточных белков и спектра амилаз в составе КЖ показали, что при росте и развитии в глубинной культуре бактериальной культурой синтезируются различные ферменты. Исследуемая культура *B.subtilis-15*, в питательной среде с крахмалсодержащими субстратами синтезировало в превалирующем количестве амилолитические, затем протеолитические ферменты. Исследуемые штаммы культур *Bacillus subtilis* обладали различной степенью амилолитической активности. Из 15 изученных штаммов только 7 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 15,11,9,7,5,3,2. Исходя из этого, для дальнейших исследований нами была отобрана бактериальная культура, а именно, *Bacillus subtilis* - 15. *Bacillus subtilis* на оптимальных питательных средах легко споролирует. Споры эллипсоидного или цилиндрические, размерами 0,6-0,9 x 1,0-1,5 мкм.

Таким образом, отобранный нами штамм 15 бактерии *Bacillus subtilis* выбран объектом дальнейших наших исследований и был использован как активный продуцент амилолитических ферментов, а именно α -амилазы.

Практическое значение изучаемого исследования: α -амилазы, применяемой в различных областях промышленности и сельского хозяйства для осахаривания (гидролиза) крахмалосодержащего сырья, а именно в хлебопечении, спиртовой, пивоваренной, кондитерской и крахмалопаточной промышленности (выработка паток, сиропов, глюкозы), при производстве крупяных изделий, овощных продуктов, изделий из фруктов (соков, сиропов, экстрактов, варений, пектина), детского питания, в текстильной, бумажной промышленности при производстве моющих средств, а также в медицине.

Изучаемый объект и предмет: Бактериальная α -амилаза, образующая при гидролизе полисахариды с различной степенью полимеризации.

Источниками бактериальной α -амилазы являются ферментные препараты: фермент амилаза - синтезируемые *Bacillus subtilis*.

Краткое обобщенное значение предложений и выводы: В результате альфа - амилазы различного происхождения значительно отличаются друг от друга по скорости гидролиза крахмала и гликогена, составу конечных продуктов ферментативного гидролиза и скорости осахаривания декстринов, по стабильности оптимальной температуры и величины рН. На основе полученных научных исследований получение фермент амилаза из бактерии *B. subtilis* на уровне производства имеет высокий экономический эффект и большую рентабельность.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены в научных конференциях.

1. Кудратуллаева Р.Т., Овлакулов С.Т., Каршиев Т.О., Тиллашайхова Р.М. Определение амилазной активности местных штаммов *Bac. Subtilis* (ТХТИ) Труды XXIV – научно – технической конференции молодых ученых, магистрантов и студентов бакалавриата. Тошкент 2015. 325-326 С

2. Каршиев Т.О., Кобулжонова М.А., Кудратуллаева Р. Технология получения крахмальной патоки путем ферментативного гидролиза (ТХТИ) Актуальные вопросы в области технических и социально-экономических наук. Республиканский межвузовский сборник. Часть I. Тошкент 2014. 101-102 С

3. Каршиев Т.О., Якубов Р.Р., Мухамеджанова Б.А., Кудратуллаева Р.Т. Изучение некоторых свойств кормовых дрожжевых белков (ТХТИ) Актуальные вопросы в области технических и социально-экономических наук. Республиканский межвузовский сборник. Часть I. Тошкент 2014. 99-100.

Объем работы. Магистерская диссертация изложена в 84 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования и их обсуждение, выводов, заключение, список литературы, приложения. Работа иллюстрирована 11 таблицами.

ГЛАВА I. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И СУПЕРПРОДУЦЕНТЫ НЕЙТРАЛЬНОЙ ПРОТЕАЗЫ *VACILLUS* И ИХ СВОЙСТВА

В органическом Мире и в природе особо роль отводится микробному миру и их сообществу, поселяющие повсеместно на нашей Планете, распространенные как на суши, так и на воздухе [1,7,14]. Микроорганизмы, среди которых бактерии занимают первое положение по распространенности, разнообразии и активно участвуют в круговороте любых веществ. Следовательно, любые биологические изменения протекающие в природе не защищены от действия бактериальных прикосновений. Бактерии встречаются в глубинах почвы, достигающие иногда 30-40 м, атмосферных слоях, достигающие иногда высоты до 1000 м, в вулканических извержениях, где температура лавы достигают даже до 120°C, а также в резкоконтинентальных регионах Антарктиды, Северной Море, где покоятся живой под низкой температурой, достигающие иногда до -160-180°C[32]. От указанных явлениях видно, что насколько уживчивы и разнообразны бактериальные организмы, что без потери жизнеспособности функционируют при таких критических, т.е. экстремальных условиях природы. Помимо вышеуказанных факторов, существуют бактерии, живущие при сильно щелочных и кислотных, солевых условиях, к которым можно отнести алкилофилов, галлофилов, психрофилов, термофилов[2,36].

Среди огромного класса бактериальных культур главное значение имеют гнилостные бактерии, распространенные в почвах, гидролизующие как органические, так и неорганические соединения прежде всего, почвы, затем воды, поверхностей любых помещений, растений и т.д.

Однако, природное сырьё может включать в себя инфекционные агенты, проонкогены, нуклеиновые кислоты, прионы. Протеолитические ферменты микробного происхождения лишены этих недостатков. Короткий цикл развития бактерий, длительное хранение фермента без потери его

активности и отсутствие затруднений при очистке, всё это делает микроорганизмы перспективными продуцентами ферментов.

Растущий спрос к протеолитическим ферментам микробного происхождения в народном хозяйстве и медицине выдвигает важную задачу поиска удобных и экономичных продуцентов протеаз. Помимо уровня продукции у штаммов продуцентов немаловажное значение придаётся исследованиям, направленным на изучение токсигенности и токсичности этих штаммов с целью исключения вредного воздействия метаболитов, продуцируемых наряду с протеолитическими ферментами[5,41,43]. Одним из важнейших объектов современной биотехнологии, как продуцентов ферментов, благодаря их многим положительным факторам, в том числе ферментативной активности, а также производственной технологичности и безопасности для человека являются бактерии *Bacillus subtilis*. В научной литературе имеются сообщения о природных штаммах рода *Bacillus* - продуцентах протеолитических ферментов, но они или недостаточно активны для производственного применения, или требуют длительного периода культивирования. Проведены опыты по получению производственного штамма на основе бактерий рода *Bacillus* - суперпродуцента нейтральной протеазы методом селекции антибиотикоустойчивого мутанта и разработка способа его культивирования. культивирования[6,8,40,10].

Протеазы, широко применяются в белковой инженерии и белковом синтезе, в биотехнологии и медицине. Сотни ферментов, относящихся к различным классам, выделяют из культур плесневых грибов, бактерий, дрожжей, однако во многих случаях предпочтительнее использовать для этих целей бактерии, т.к. они имеют короткий цикл развития и продукции ферментов. Среди них наиболее используемым является род *Bacillus*, благодаря низкой патогенности, за исключением *B. cereus* var. *anthracis*, и способности синтезировать ферменты непосредственно в культуральную жидкость, где они могут накапливаться, что значительно облегчает

последующее их выделение и очистку. Чаще всего в каталитических центрах ферментов встречаются аминокислотные остатки[37,39]. Радикалы аминокислот выполняют здесь ту же функцию, что и кофермент. В зависимости от вида остатка различают 4 группы таких ферментов: сериновые протеазы, металлопротеазы, цистеиновые протеазы и аспартатные протеазы [6]. Протеазы, относящиеся к этим группам, можно разделить по чувствительности к различным ингибиторам. Сериновые протеазы ингибируются фенилметилсульфонилфлуоридом (PMSF) и диизопропил флуорофосфатом (DIFP). Металлопротеазы ингибируются хелатирующими агентами. Цистеиновые ферменты ингибируются йодацетамидом и тяжелыми металлами, аспартатные протеазы-10 пепстатином. В смеси протеаз эти ингибиторы дают возможность измерять активность ферментов каждого класса без предварительной очистки[28].

Многие штаммы рода *Bacillus* выделяют в культуральную среду протеазы двух типов-сериновые (щелочные) с оптимумом действия в интервале рН 8,0-10,0 и металлопротеазы (нейтральные) с оптимумом действия около рН 7,0. Кислые протеазы, в основном, встречаются у грибов и высших эукариот [31,15,11].

Особое значение для медицины имеет получение нейтральной протеазы из *B. subtilis*, так как применение щелочной протеазы ограничено ввиду некоторых её специфических свойств. Щелочная протеаза является поверхностноактивным веществом и обладает гемолитическими свойствами.

А также одним из факторов патогенности, обуславливающие персистирующие свойства грамотрицательных бактерий, направленных на инактивацию защитных механизмов макроорганизма. Как правило, щелочные протеазы участвуют в повреждении клеток и тканей организма . Показано, что щелочные протеазы способствуют колонизации и распространению грамотрицательных бактерий на слизистой и коже. Активность нейтральной протеазы по отношению к казеину в пять раз выше, чем у щелочной. Гидролизует она и другие белки - желатину, яичный

альбумин,колаген. Общим свойством нейтральных протеаз *B. subtilis* и бактерий родственных видов является их инактивация при обработке ЭДТА. Активность фермента восстанавливается в присутствии ионов двухвалентных металлов: Zn^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} и других. Внеклеточные металлопротеазы выделены из клеток *B.thuringiensis* и *B. subtilis* [15,16]. Эти ферменты имеют оптимумы активности при нейтральных или несколько более высоких значениях рН, их молекулярные массы составляют 35-40 кДа, они нуждаются в ионах цинка для активности и кальция для стабильности.

Все они термолабильны: через 15 мин инкубации при 59°C активность теряется на половину, за исключением фермента, выделенного из клеток *B. thermoproteolyticus*. Получена нейтральная протеаза из *B. subtilis* в высокоочищенном состоянии [9]. Фермент устойчив на всех стадиях роста культуры и поэтому культуральная среда выращивания микроорганизма является очень удобным источником для получения нейтральной протеазы. Молекулярная масса нейтральной протеазы - 33,8кДа. Во ВНИИБТ получена высокоочищенная гомогенная нейтральная протеаза из *B. subtilis*. Протеаза катализирует гидролиз белков и пептидов, преимущественно разрушая связи, образованные аминокислотами гидрофобных аминокислот, с М.м. 32кДа. Термостабильная Zn-содержащая металлопротеаза - термолизин, секретируемая клетками *B. thermoproteolyticus*, является самым изученным представителем металлопротеаз. В состав семейства термолизинподобных протеаз входят бактериальные протеазы, секретируемые *B. cereus*, *B. subtilis*. Кроме каталитического иона Zn^{2+} представители семейства термолизинподобных нейтральных протеаз связывают различное число (2-4) ионов Ca^{2+} , что обеспечивает стабилизацию протеаз в отношении химической и термической денатурации [20,11,21].

Разработана технология одновременного получения препарата - пробиотика и нейтральной протеазы при культивировании штамма *B. subtilis* ЗН. Определена зависимость протеолитической активности культуральной жидкости от посевной дозы и уровня аэрации. Установлены их оптимальные

значения, посевная доза - (3-5)-10⁹ кл/мл и насыщение среды кислородом -70 - 90 %. В этих условиях за 16 ч выращивания получали биомассу с концентрацией (20±5)-10⁹ кл/мл и культуральную жидкость с протеолитической активностью (2,0±0,5) пе/мл. Выделены штаммы *B. subtilis*, образующие протеазу со свойствами нейтральных протеаз. Этот фермент был способен к расщеплению белков в отходах ракообразных и мог быть использован с этой целью при получении хитина. Максимальное накопление фермента (20,2 пе/мл) наблюдалась при выращивании *B. subtilis* Y-108 при температуре 30°C и перемешивании в течение 3 суток. Очищенный фермент имел мол. массу 44 кДа, оптимум действия при температуре 50°C и pH 8,0, активировался ионами Mn²⁺, Co²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺, Zn²⁺, ингибировался Hg²⁺, ЭДТА, Р-меркаптоэтанолом, гидрохлоридом цистеина, гистидином, глицерином. [11,19]

Все нейтральные протеазы имеют сходную субстратную специфичность. Они расщепляют в синтетических субстратах и белках пептидные связи, образованные аминными группами аминокислот с гидрофобными боковыми цепями - валина, изолейцина, норлейцина, лейцина или фенилаланина. Обычно *B. subtilis* синтезирует одновременно несколько протеаз, в том числе металлопротеазы и сериновые протеазы. Так из клеток культуры штамма *B. subtilis* основы препарата пробиотика споробактерина, выделено не менее двух протеолитических ферментов, один из которых активизируется группами цистеина и глутатиона восстановленного [12,27,33]. Часто в препаратах протеаз присутствует целый комплекс ферментов с различными свойствами и одновременно комплексы ферментов с близкими физико-химическими и каталитическими свойствами (изоферменты). Изоферменты идентичны по своему каталитическому действию, но различаются биофизическими константами. Биосинтез ферментов микроорганизмами тесным образом связан с основными условиями, влияющими на рост и развитие культур, и в первую очередь с составом питательной среды. Источники азота и углерода в питательной

среде оказывают влияние как на конструктивный обмен культур, так и на синтез ферментов. Относительно влияния различных источников азотистого питания в среде на рост микроорганизмов и образование протеолитических ферментов имеются различные мнения [18,13,23].

Одни авторы считают, что белки являются единственным благоприятным источником азота для лучшего роста микроорганизмов и синтеза ферментов. Другие же утверждают, что в качестве лучшего источника азота необходимо использовать сочетание минерального и белкового субстратов и наконец, ряд авторов полагают, что только минеральные соли могут быть единственным источником азота [24,47,18]. При изучении питательных потребностей штамма *B. subtilis* ЗН произведён подбор оптимального источника углерода - мальтозы, позволившего разработать технологию получения протеолитического комплекса из культуральной жидкости сходного по ферментативным свойствам с террилитином [15,24,42]. Изучена динамика потребления основных источников углерода и азота и биосинтеза гидролитических ферментов при выращивании *B. mezentericus* на полу синтетических средах. Подобраны условия, обеспечивающие получение культуральной жидкости преимущественно с протеолитической или амилолитической активностью. При замене мальтозы в составе среды нативным крахмалом происходит более интенсивное накопление биомассы и гидролитических ферментов; переход от логарифмической фазы к стационарной фазе роста наступает на 3-5 ч раньше.

Было отмечено, что незначительные изменения состава среды меняют не только уровни накопления гидролитических ферментов, но и соотношение протеаз и амилаз на разных стадиях развития культуры [16,22,23].

Исследована зависимость продукции протеазы от источника азота в питательной среде у str-устойчивого штамма *B. subtilis*. Для *B. intermedius* подобраны концентрации основных компонентов питательной среды - пептона и неорганического фосфата, обеспечивающие максимальную

продукцию ферментов. Показано, что ионы аммония ингибируют продукцию протеаз по типу азотметаболической репрессии [17,50,35].

Поскольку синтез некоторых ферментов, в частности протеазы, а также многих вторичных метаболитов подвержен азотной репрессии, продукция этих соединений может быть увеличена не только в результате замены аммония в питательной среде на менее эффективные источники азота, но и с помощью специфических мутаций, снимающих репрессию аммиаком [28,29,34].

Известно, что на синтез и секрецию протеаз существенно влияет наличие в питательной среде дополнительного источника азота в виде неорганической или органической соли. Так, при исследовании влияния ионов аммония на биосинтез глутамилэндопептидазы и тирозинзависимой протеазы *B. intermedius*, секретируемых в начале стационарной фазы роста, было показано, что ионы хлористого аммония оказывают стимулирующий эффект на продукцию ферментов (15 и 7 % соответственно) [21,35,58]. При недостатке питательных веществ клетки бацилл индуцируют серию ответов, позволяющих им выжить в неблагоприятных условиях. Среди этих ответов - подвижность и компетентность клеток, синтез и секреция гидролитических ферментов, продукция антибиотиков и, наконец, образование спор. В этот период бациллы секретируют большие количества гидролитических ферментов, в том числе и протеаз, которые выделяются клетками в среду как до, так и после инициации процессов спорообразования [30,49,51]. На поздних стадиях спорообразования клетки *B. intermedius* 3-19 секретируют в среду две протеазы: глутамилэндопептидазу с максимальной активностью на 40-й ч роста и субтилизин с максимальной активностью на 44-й ч роста. С помощью биохимического маркера целостности цитоплазматической мембраны - Р-галактозидазной активности - установлено, что эти ферменты выделяются в среду, а не накапливаются в результате лизиса клеточной оболочки [21,40,59].

1.2.ХАРАКТЕРИСТИКА ОТДЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РАЗЛИЧНЫХ ОТРАСЛЯХ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.

Структура и свойства ферментов. Ферменты - это биологические катализаторы белковой природы, ускоряющие реакции в живых организмах и вне клеток. Ферменты – это белки, которые в свою очередь состоят из звеньев - аминокислот. В белках встречаются двадцать типов аминокислот, чередование которых в белковой цепи определяет специфику фермента и его биологическую функцию [1-5].

Ферменты обладают уникальными свойствами, которые выделяют их на фоне обычных химических катализаторов. Прежде всего, это высокая каталитическая активность. Так, добавка незначительной концентрации фермента (10^{-9} – 10^{-7} М) ускоряет превращение субстрата в 108 - 1012 раз [1,2,46]. Другое не менее важное свойство ферментов – специфичность (избирательность) их действия в отношении структуры субстрата, типа реакции и условий ее проведения [1,32,56]. Специфичность определяется способностью фермента превращать только данный тип субстратов в определенных реакциях и условиях.

Механизм заключается в образовании комплекса фермент-субстрат. Образовавшийся комплекс вступает в реакцию, при этом энергия активации реакции снижается. Превращение субстрата происходит в активном центре фермента. Для многих ферментов, состоящих из субъединиц, характерно наличие регуляторного участка, который взаимодействует с веществами, влияющими на активность фермента (активаторами, ингибиторами)[37,48].

Для каждого фермента существует свой оптимум рН, при котором его каталитическое действие максимально. При резком изменении рН среды ферменты могут инактивироваться в результате необратимой денатурации. Поскольку ферменты – вещества белковой природы, то в смеси с другими белками определить их количественно практически невозможно. Наличие

фермента в препарате может быть установлено лишь по протеканию той реакции, которую катализирует фермент.

Промышленные ферментные препараты. Использование микробных ферментов в некоторых отраслях промышленности началось достаточно давно. Основными группами ферментных препаратов являются:

Амилолитические ферменты (α -амилаза, β -амилаза, глюкоамилаза). Их действие проявляется при гидролизе крахмала и гликогена [23,6,57].

Протеолитические ферменты относятся к гидролазам, образуя класс пептидгидролаз. Их действие заключается в ускорении гидролиза пептидных связей в белках. Важная их особенность – выборочный, селективный характер действия на пептидные связи в белковой молекуле. Например, пепсин действует только на связь с ароматическими аминокислотами, трипсин – только на связь между аргинином и лизином. Применяются в пищевой промышленности для смягчения мяса; кожевенной промышленности при мягчении шкур; в косметической промышленности при производстве паст, кремов; также применяют при создании моющих средств как добавку для удаления загрязнений белковой природы; в медицине при лечении воспалительных процессов, ожогов, тромбозов [4,6].

Целлюлолитические ферменты очень специфичны, их действие проявляется лишь в деполимеризации молекул целлюлозы, такие ферменты способствуют гидролизу целлюлозы до глюкозы. Используют в гидролизной промышленности, в медицине для выделения лекарственных веществ из растений; в сельском хозяйстве как добавка в комбикорма для жвачных животных [4,55].

Пектолитические ферменты объединены в одну группу по внешнему проявлению своего действия - уменьшению молекулярной массы и снижению вязкости пектиновых веществ. Все пектиназы делятся на 2 вида – гидролазы и трансэлиминазы. Первые отщепляют метильные остатки (пектинэстеразы) или разрывают α -1 \rightarrow 4-гликозидные связи (полигалактуроназы). Вторые ускоряют негидролитическое расщепление

пектиновых веществ с образованием двойных связей. Применяются в текстильной промышленности для вымачивания льна; в виноделии для осветления вин, уничтожения мутности; в консервировании для приготовления фруктовых соков [3,4,6,49].

Ферментная технология включает продукцию, выделение, очистку, использование в растворенной форме и, наконец, применение в иммобилизованном виде ферментов в широком круге реакторных систем.

Использование ферментов и ферментных препаратов. В настоящее время количество ферментов, используемых в различных областях промышленности, постоянно растет. Основные ферменты и их области применения показаны в таблице 1.2.1. [34,3,18].

Таблица 1.2.1.

Некоторые ферменты, использующиеся в промышленности

Фермент	Применение
а-Амилаза	Пивоварение, производство спирта
Аминоацилаза	Получение L-аминокислот
Бромелаин	Размягчение мяса, осветление соков
Каталаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Целлюлаза	Получение спирта и глюкозы
Фицин	Размягчение мяса, осветление соков
Глюкоамилаза	Пивоварение, производство спирта
Глюкозоизомеразы	Производство сиропов с высоким содержанием фруктозы
Глюкозооксидаза	Антиоксидант в готовых к употреблению пищевых продуктах
Инвертаза	Инверсия сахарозы
Лактаза	Утилизация сыворотки, гидролиз лактозы
Липаза	Сыроварение, получение ароматизаторов
Папанн	Размягчение мяса, осветление соков
Пектиназа	Осветление соков, производство спирта
Протеаза	Детергент, производство спирта
Реннин	Сыроварени

Пищевая промышленность. С давних пор в таких процессах, как пивоварение, изготовление хлеба и производство сыра, использовалась (хотя и не понимаемая) деятельность ферментов. В результате эмпирических

совершенствований эти традиционные технологии получили широкое распространение задолго до того момента, когда сформировались научные знания о механизмах этих процессов. Хотя история пищевых технологий насчитывает тысячелетия, тем не менее совершенствование их постоянно продолжается. В последнее время особенно наметились перспективы принципиального сдвига в технологии получения и улучшения качества пищевых продуктов.

Ферментные препараты, предназначенные для использования в пищевой промышленности или в медицинской практике, подлежат строгому контролю на токсичность для животных, мутагенную активность, канцерогенность, а также проверяются в различных фармакологических тестах.

Использование ферментов в хлебопечении. Применение ферментов в хлебопечении дает возможность, прежде всего, сбалансировать содержание этих природных катализирующих соединений в зерне разных урожаев, что обеспечивает стандартизацию и постоянство свойств муки. Однако ферменты способны еще и заменять различные применяемые в хлебопечении и кондитерском производстве химические агенты.

Действие ферментов в тесте [38,22,36]. Как известно, мука содержит три важнейших компонента: крахмал, белок клейковины и пентозаны. Тесто созревает в процессе поглощения воды и является основой всех хлебопродуктов. Вместе с тем компоненты муки поглощают влагу неодинаково. Крахмал, на долю которого приходится 68% массы пшеничной муки, впитывает лишь 50% влаги. Клейковина (содержание которой в муке около 12%) адсорбирует 27% воды, а пентозаны, которых в муке всего лишь 3%, поглощают 12% влаги.

Соотношение крахмала, белка клейковины и пентозанов должно быть оптимальным. Ферменты, присутствующие в самом зерне, всегда участвуют в процессе получения хлебопродуктов. Амилазы расщепляют крахмал до сахаров, которые служат питательными веществами для дрожжевой клетки; протеазы разрыхляют весьма плотную структуру белка клейковины. Однако

уровень нативных ферментов в муке подвержен колебаниям в связи с условиями выращивания зерна, что влияет на отклонение свойств хлеба от принятых стандартов[37,58,62].

Ферменты микробного происхождения полностью устраняют зависимость пекаря от непостоянства состава исходного сырья и в каждом конкретном случае позволяют выбрать наиболее подходящую пропорцию амилаз и протеаз. При этом еще можно улучшить стабильность и подъем теста благодаря гемицеллюлазам.

Амилазы расщепляют цепочку крахмала до декстринов и отдельных сахаров, усиливают созревание теста, благотворно влияют на формирование вкуса и обеспечивают субстратом дрожжи. Протеазы ослабляют белок клейковины и придают тесту эластичность. Гемицеллюлазы и пентозаназы придают тесту большую стабильность и увеличивают его подъем.

Существует несколько теорий, объясняющих действие гемицеллюлаз. Суть их сводится к тому, что ферменты этой группы разрывают полимерные молекулы нерастворимых пентозанов пшеницы до растворимых высокомолекулярных фрагментов. Последние характеризуются высокой водосвязывающей способностью и взаимодействуют с белками, образуя стабильные белковые пены с развитыми заполненными воздухом порами. В результате тесто становится устойчивым к оседанию и при выпечке хорошо поднимается.

Гемицеллюлазы, используемые в хлебопечении, получают из микробных культур рода *Aspergillus*. Причем такие ферментные добавки лучше адаптированы к рН теста и обеспечивают отличную стабильность.

Новый для хлебопечения фермент - трансглутаминаза - способствует образованию поперечных связей между молекулами клейковинного белка и таким образом улучшает реологические свойства теста в процессе выпечки. Прекрасно дополняя другие хлебопекарные ферменты, трансглутаминаза усиливает белок клейковины и способствует формированию оптимальных характеристик теста [7,31,61].

Использование ферментов в виноделии [8,47,60]. Для интенсификации технологических процессов виноделия ферментная промышленность предлагает ряд комплексных препаратов грибного происхождения, различающихся по величине активности и соотношению гидролитических ферментных систем, оказывающих многообразное действие на высокомолекулярные вещества винограда и вина. При получении вин всех типов широкое применение получили пектолитические ферментные препараты - Пектаваморин, а также Пектофоедин. Препараты стандартизуются по общей пектолитической активности; в качестве основных ферментов они содержат полигалактуроназу эндо- и экзодействия и пектинэстеразу, а в качестве сопутствующих - протеиназы, целлюлазы и гемицеллюлазы.

Оптимальные условия действия препаратов: pH 3,5-4,0, температура 35°-40°С. При получении крепленых, а также красных столовых виноматериалов ферментные препараты вносят в мезгу. При этом повышается общий выход сусла на 1-5%, а сусла-самотека на 10-20%, облегчается прессование, увеличивается содержание экстрактивных веществ и интенсивность окраски, ускоряются биохимические процессы, протекающие при созревании вин. При приготовлении белых столовых вин ферментные препараты вносят в сусло. Процесс осветления сусла ускоряется в 2-3 раза, количество осадков снижается на 4-5%. Пектолитические ферментные препараты могут быть использованы для обработки трудноосветляемых виноматериалов. При этом значительно сокращается расход оклеивающих веществ, повышается стабильность вин к помутнениям коллоидного характера.

Использование целлюлолитических и пектолитических ферментных препаратов позволяет усовершенствовать технологию переработки сладких виноградных выжимок. При этом увеличивается выход спирта-сырца и снижается процент примесей в осадке виннокислой извести. Дозировки ферментных препаратов, зависящие от его активности, устанавливаются пробной обработкой. Обычно используют суспензии ферментных препаратов

концентрацией от 1 до 10%, которые готовят непосредственно перед внесением в обрабатываемый материал. Перспективы дальнейшего совершенствования приемов использования ферментативного катализа в виноделии связаны с созданием композиций высокоочищенных ферментов строго регламентированного состава, а также с получением иммобилизованных форм различных ферментных препаратов [8,52].

Медицина. Крайне широко ферменты и ферментные препараты применяются в медицине. С помощью ферментных препаратов проводят анализ содержания глюкозы, мочевины, молочной кислоты, аминокислот, этанола, ацетальдегида, АТФ, АДФ, полиненасыщенных жирных кислот пенициллина, креатинфосфата [9,10,28].

Бактериолитические ферменты. Хорошо известно, что клетки бактерий, грибов и высших растений в отличие от клеток животных обладают мощными клеточными стенками. Вместе с тем для проведения многих экспериментов в области современной науки необходимо иметь клетки, лишенные толстых стенок. В связи с этим пристальное внимание уделяется специфическим ферментам, способным разрушать (лизировать) клеточные стенки бактерий, грибов – литических ферментов. Такие литические ферменты могут стать мощным антибактериальным средством, помогающим бороться с патогенными микроорганизмами, обладающими множественной устойчивостью к антибиотикам [4,9,11].

Основные литические ферменты по субстратной специфичности делятся на три типа. Первый тип представлен гликозидазами, разрушающими полисахаридные цепи.

Лизозим. Лизоцим, или N-ацетилмурамидаза гидролизует связь между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином. *N-глюкозаминидаза.* Гидролизует связь между N-ацетилглюкозамином и N-ацетилмурамовой кислотой. Второй тип представлен одним ферментом – *N-ацетилмурамил-L-аланиламидазой* (или *амидазой*), расщепляющей связь между мурамовой кислотой полисахарида и пептидной частью.

К третьему типу относятся *пептидазы*, гидролизующие пептидные связи пептидогликана. Лизоамидаза. Представляет собой комплекс высокомолекулярного полисахарида, заряженного отрицательно, и положительно заряженных ферментов. Лизоамидаза является эффективным средством борьбы с устойчивыми к антибиотикам патогенным микроорганизмам. При медико-биологическом и клиническом испытании препарата оказалось, что он обладает не только литическим действием на патогенные бактерии, но и хорошо очищает раны от некротических тканей, а также стимулирует заживление ран, обладая мощным иммуностимулирующим действием [1,9,12].

Иммуноферментный анализ. В последнее время все чаще применяется высокоспецифичный иммуноферментный анализ. Иммунохимические методы основаны на реакции антител с антигеном, образующие друг с другом прочные комплексы. Возможность получения высокоспецифичных антител к широкому кругу различных веществ в сочетании с чувствительными методами регистрации образовавшихся комплексов обуславливают широкое практическое использование методов иммунохимического анализа в медицине, ветеринарии, растениеводстве, области охраны окружающей среды, контроля биотехнологических процессов [3,44].

Антитело, образуя комплекс с антигеном, может обеспечить уникальное по специфичности узнавание определяемого вещества в любых сложных многокомпонентных системах.

Принципиально новый шаг был сделан при использовании в иммунохимических реакциях компонентов, помеченных маркером, который легко детектируется одним из известных физико-химических методов. В качестве таких маркеров используются различные вещества: радиоактивные изотопы, флуоресцирующие красители, а также ферменты.

Ферментные метки. К ферментам, использующимся в иммуноферментном анализе, предъявляются высокие требования. Фермент

должен быть высоко активен, а продукты его реакции детектироваться с высокой чувствительностью, он должен быть стабилен, так, чтобы его активность сохранялась долгое время. Наиболее часто в иммуноферментном анализе применяются β -галактозидаза, щелочная фосфатаза кишечника теленка, пероксидаза хрена [5,10,46].

Получение конъюгатов с ферментами. Для введения ферментативной метки разработано много химических, биохимических способов. Первым реагентом, использованным для синтеза иммуноферментных конъюгатов, был глутаровый альдегид, реагирующий с ϵ -аминогруппами лизина белковых молекул. С помощью глутарового альдегида получены конъюгаты антител и антигенов с *пероксидазой, щелочной фосфатазой, глюкозооксидазой, глюкоамилазой*. Состав полученных генов можно варьировать, изменяя концентрацию альдегида и белковых компонентов.

Широкое распространение получил метод синтеза иммунопероксидазных конъюгатов, в основе которого лежит окисление периодатом натрия углеводной части молекулы пероксидазы с образованием альдегидных групп.

Разработаны методы получения иммуноферментных конъюгатов с β -галактозидазой. Методы основаны на том, что связывание через них антигенов не отражается на каталитических свойствах фермента. Восстановленный меркаптоэтанолом иммуноглобулин или его фрагмент связывают с β -галактозидазой с помощью N–N'-о-фенилендималеимида, специфически реагирующего с SH-группами белков. Выход конъюгата по ферменту достигает 50% при высоком сохранении компонентами специфических свойств [6,8,28].

Применение. Методы иммуноферментного анализа находят широкое применение в различных областях медицины, сельского хозяйства, контроле технологических процессов и качества пищевых продуктов, научных исследованиях.

В медицинской диагностике методы иммуноферментного анализа все активнее внедряются для обнаружения микробных и вирусных возбудителей. Все шире применяется иммуноферментный анализ в диагностике неинфекционных болезней, таких, как диабет, сердечнососудистые и эндокринные заболевания.

Методы иммуноферментного анализа применяются также для контроля лекарственной терапии, особенно препаратов, влияющих на сердечнососудистую систему, психотропных препаратов, антибиотиков. Эти методы позволяют быстро выявлять отравления, наличие наркотиков в препаратах.

Очень важен иммуноферментный анализ при производстве препаратов медицинского назначения, в том числе из животного сырья и донорской крови. Примеси сопутствующих веществ или вирусных антигенов могут оказаться опасными для организма.

Лекарственные препараты на основе ферментов. Наибольшие успехи сделаны в области лечения острой сердечной недостаточности и терапии раневых процессов. *Сердечнососудистые заболевания.* Достаточно эффективен препарат на основе стрептокиназы. Он представляет собой иммобилизованную на полисахариде стрептокиназу-белок, способствующий активации плазминогена, естественного предшественника протеиназы плазмينا, предотвращающего образования тромба в кровеносной системе. Стрептокиназа иммобилизуется на окисленном периодатом декстране, при этом она не обнаруживает антигенных свойств, нетоксична и стабильна [5,6,53].

Препараты на основе стрептокиназы применяются при самых разных патологиях, связанных с тромбообразованием. Важно, что иммобилизация придает стрептокиназе безопасность в отношении иммуногенности.

Лечение ран. Хорошо известно, что протеиназы, расщепляя денатурированные белки, способствуют очищению ран, и, следовательно, их заживлению. В качестве носителей для иммобилизации протеолитических

ферментов наиболее удобны волокнистые материалы на основе целлюлозы, полиамидное и коллагеновое волокно. Имобилизованные протеолитические ферменты с большим успехом применяются в лечении гнойных заболеваний легких и плевры [6,54].

Химический анализ. Для контроля примесей в объектах пищевой, микробиологической и фармацевтической промышленности, в мониторинге окружающей среды, для решения некоторых медицинских и биохимических задач в последние годы все шире применяют ферментативные методы анализа, основанные на использовании зависимости скорости катализируемой ферментом химической реакции от концентрации реагирующих веществ и фермента. Использование биологических катализаторов, отличающихся высокой активностью и избирательностью действия, позволяет значительно повысить чувствительность и селективность методов анализа [1,2,23].

Наиболее часто применяют фотометрические методы индикации. Их используют в реакциях, катализируемых пероксидазой и другими оксидазами, а также гидролазами. Исключительно высокой чувствительностью отличаются хемилюминесцентные методы, позволяющие контролировать скорость ферментативных реакций (например, с участием люциферазы).

Различные электрохимические методы (потенциометрия, амперометрия) наиболее удобны для контроля скорости реакции, протекающих с поглощением или выделением протонов, а также окислительно-восстановительных процессов. При этом можно выделить ферменты, позволяющие определять целый класс соединений, либо часть этого класса, либо индивидуальное соединение. Так, с помощью алкогольдегидрогеназы можно определять спирты (субстраты этого фермента), алкогольоксидазы – первичные спирты, арилалкогольоксидазы – ароматические первичные спирты. Пределы обнаружения многих органических веществ – субстратов ферментов лежат в интервале $10^{-6} - 10^{-4}$ М [2,19].

Сельское хозяйство. Основное свойство ферментов, применяющихся в сельском хозяйстве, состоит в том, что ферменты улучшают питательность кормов. Все жвачные животные используют при переваривании пищи ферменты. Их вырабатывает либо само животное, либо микроорганизмы, находящиеся в пищеварительном тракте. Несмотря на это, эффективность пищеварительного процесса животных не достигает уровня 100 %. Например, свиньи не способны переварить более 15-25 % потребленного корма. По этой причине в корм для животных добавляют ферменты или их комплексы, в основном целлюлолитические для расщепления грубой растительной пищи. За счет такой добавки повышается эффективность функционирования пищеварительной системы животных [5,11]. В растительных кормах содержатся вещества антипитательного характера. Это, прежде всего, некрахмалистые полисахариды: целлюлоза, β -глюканы, пентозаны, пектиновые соединения, повышающие вязкость субстратов в желудочно-кишечном тракте. Из-за них клетчатка не переваривается и значительная часть питательных веществ не усваивается. Это негативно сказывается как на здоровье стада, так и на качестве продукции животноводства [4,5,11]. Действие трудно перевариваемых веществ устраняется применением ферментных препаратов. В пшенице содержатся ксиланы, они расщепляются ферментом ксиланазой. Для расщепления β -глюканов необходима β -глюканаза. Самый эффективный вариант – применение препаратов комплексного действия – мультиэнзимной композиции. При этом каждый мультиэнзимный препарат подбирается под конкретное животное и определенный вид корма для наилучшей усваиваемости питательных веществ. Сейчас на рынке представлены мультиэнзимные комплексы с разным сочетанием ферментов. Каждый препарат индивидуален по количеству, составу ферментов и преобладающей активности. Чаще всего комплексы содержат пять – семь ферментов, но иногда больше. Например, компания BASF выпускает мультиэнзимы для лучшего усвоения зерновых и белковых компонентов, содержащихся в

кормах для птиц и свиней. Один из таких препаратов содержит эндоксилазу, β -глюканазу и разработан для пшенично-ячменных рационов, а другой предназначен для кормов на основе пшеницы. Использование препарата приводит к росту массы бройлеров на 7,1%, по сравнению с рационом без фермента. Один из препаратов для жвачных животных предлагает фирма «Оллтек». Препарат защищен от действия рубцовой микрофлоры, способной усваивать ферменты как любой другой белок, и позволяет лучше переваривать клетчатку в рубце. За счет данного улучшения переваримости и питательности корма можно улучшить производство, основывающееся на одном и том же корме, и поддерживать производство на одном и том же уровне за счет составления более экономичной кормосмеси. Оба этих метода по использованию ферментов дают более хороший экономический результат [3,11,54].

Применение ферментов в стиральных порошках. Ферменты для стиральных порошков. В производстве стиральных порошков используются следующие ферменты: щелочная протеаза; щелочная липаза; амилаза; целлюлаза; щелочная пектиназа; кератиназы.

Амилаза выводит из белья крахмалсодержащие остатки пищи, а целлюлаза придает поверхности хлопчатобумажных изделий гладкость, а волокнам - эластичность. Также целлюлазу используют для снятия пилинга, который образуется на хлопчатобумажных и льняных тканях в виде катышков при носке. За счет того, что ворсинки удаляются с поверхности ткани, удаляется и грязь, которую держали эти ворсинки, далее, осветляется цвет ткани, ткань становится приятной на ощупь [12,22].

Производство ферментов при производстве стиральных порошков просто необходимо, чтобы повысить моющую способность. По оценкам специалистов – технологов доля ферментов в общей моющей способности порошка составляет 30-35% [7,12].

1.3. 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. [1,36]. 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 [3,33].

Известно, что продуцентами амилаз является микромицети (*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* [11,16] 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 - амилази 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, *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 Cl^- , Br^- , F^- , 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. Таб. 1.3.1 **Таблица 1.3.1. Физико-химические свойства некоторых α -амилаз**

Источник выделения	Молекулярная масса, кДа	Оптimum действия		Ингибитор	Активатор
		pH	tC °		
<i>Aspergillus flavus</i> A. <i>awamori</i> A. <i>oryzae</i> [17]	-	5,0–5,25	50 40 40	ЭДТА	Ca ²⁺
<i>A. flavipes</i> [18]	1 50 2 63 3 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</i> sp. 86 [21]	83–90	6,0; 8,5	85–90	-	-
<i>Bacillus</i> sp. PN5 [22]	–	10,0	90	-	-
<i>B. subtilis</i> [24]	48	-	-	Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Hg 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- HCl, 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 (pH 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[3,5].

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 концентраций 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 53°С 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*, *Staphy*) *lococcus*, *Pneumococcus*), 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 pH 5,0-10,5 с двумя pH-оптимумами (6,0 и 8,5). Активность препарата при 60⁰С оставалась без изменений в течение 4 ч, а время его активации при этой температуре - 9 ч, при 90⁰С активность препарата не менялась в течение 50 мин, а время активации составило 2 ч [3,15,54].

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 разложения 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. Крахмал, как специфический субстрат α -амилазы, также обладает высоким стабилизирующим эффектом. В 22,5% растворе крахмала α -амилаза *Bacillus*

sp. 86 за отсутствие ионов кальция вполне стабильна в течение 100 мин при 90°C. *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 60°C и 80 мин при 100°C. 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* sp. 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 60°C, pH 7,0, в течение 60 ч активность амилазы, составила 65,23 Ед / мл. Максимум активности был достигнут при pH 10,0 и температуре 90°C. Активность фермента подавлялась при 105°C на 65%, а при температуре от 80 до 100°C 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 сасахаривании крахмала и образовании детергента.

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 pH 7,0 и 50°C. Добавление ионов Са²⁺ и дрожжевого экстракта повышало выработку фермента, тогда как добавление 1% глюкозы способствовало значительному ингибированию. Оптимальной активности был достигнут при pH 8,0 и 70°C. Фермент был стабильным в течение 1 ч при 60 и 70°C, одновременно при 80 и 90°C исходная активность терялась на 12 и 48% соответственно.

Несмотря на то, что ее производит не термофильные бактерии, она сохраняет активность в течение нескольких часов при температуре выше 90°C, в условиях промышленного гидролиза крахмала. Она также более стабильная, чем α -амилаза *B. stearotherophilus* 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

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 гомологах, таких как *B. stearotherophilus* и *B. amyloliquefaciens*. Поэтому повышенная термостабильность α -амилазы *B. licheniformis* не может быть обусловлена присутствием этой триады металлов.

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*.

Новый термофильный спорообразующий штамм MR3St, что его изолировано от геотермальной почвы, локализованного на горе Риттманн в Антарктике, был способен производить внеклеточную амилазу. На основе 16 S рНК-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. Молекулярная масса, определенная с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза, составила 58 кДа. В биотехнологических процессах, а именно в ферментативном гидролизе крахмала в процессе получения глюкозы, используют амилолитические 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 pH 4,0 и сохраняла > 80% активности при pH 5,0-6,0 течение 24 часов. После инкубации при 90 °C 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 pH 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.

1.4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРЕПАРАТОВ ПРОТЕИНАЗЫ

Современный уровень науки и техники позволяет получить не только комплексные, но и гомогенные, кристаллические ферменты. Их, как правило, выделяют непосредственно из биомассы гриба или культуральной жидкости, а так же из экстрактов поверхностных культур.

В качестве осадителей при получении комплекса препаратов протеиназ применяют сульфат аммония [1,3,16] , этанол, ацетон, изопропанол. Отмечается, что в зависимости от применяемого осадителя выход фермента бывает различным.

Так при использовании различных органических растворителей в концентрации 80% , выход протеолитических ферментов составил 56% - для этанола, 78% - изопропанола, 65% - ацетона. Вместе с тем, сочетание различных осадителей приводит к более полному отделению от сопутствующих веществ.

И.М Грачева с соавторами для очистки препарата реннинопузилин П10х воспользовались осаждением сульфатом аммония. Полученный осадок растворяли в воде, фракционировали этиловым спиртом. При этом авторам удалось отделить значительную часть сопутствующих белков[2,22].

Таким способом получают комплексные ферментные препараты. Их можно применять в народном хозяйстве, не проводя дальнейших этапов очистки. Более полная очистка возможна с помощью таких методов разделения как гельфильтрации на сефадексе, хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе, КМ-сефадексе, КМ-целлюлозе, ДЭАЭ-целлюлозе.

Например, протеиназа *Torula thermofila* была выделена и очищена в 11 раз в результате диализа препарата, полученного осаждением сульфатом аммония, с последующей гельфильтрацией на сефадексе У-100. Наиболее изученные протеолитические ферменты, продуцируемые *Bac. Subtilis*, получены в кристаллическом состоянии.

Схема очистки этих препаратов включает высаливание сульфатом аммония 75% насыщения с последующим диализом против ацетатного

буфера. Затем двух кратное осаждение 67% ацетоном и диализ против трисбуфера с последующей хроматографией на ДЕАЕ-сефадексе А-50 {30} . При разделении нейтральной и щелочной протеиназ *Asp. Oryzae* ОИТ-5038 использовали осаждение сульфатом аммония 80% насыщения, с последующей хроматографией на ДЕАЕ-целлюлозе и сефадексе У-100. Для отделения баластных белков и пигментов от протеиназы *Asp. Terricola* Войнарским разработан метод очистки на биогеле Р-10. В результате активность протеиназы возросла в 30 раз, а содержание пигментов уменьшилось в 100 раз. В результате ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе был получен препарат нейтральной протеиназы *Streptomyces acidoresistous* 1403 с десятикратной степенью очистки.

Наиболее эффективным методом выделения и очистки ферментов является афинная хроматография. Метод основан на использовании взаимодействий, аналогичных взаимодействию фермента с субстратом. Как правило, ферменты, полученные с помощью афинной хроматографии, являются гомогенными или смесью изоферментов. Это подтверждается данными электрофокусирования, электрофореза в полиакриламидном геле, определением аминокислотной последовательности 20 . В настоящее время достаточно широко применяется для очистки метод ультрафильтрации растворов ферментов.

Преимуществом ультрафильтрации являются отсутствие тепловой инактивации и небольшие энергозатраты. Ультрафильтрация позволяет провести концентрирование раствора без фазового превращения при комнатной температуре, при одновременном освобождении от баластных веществ пигментов, низкомолекулярных соединений. Например, Рожанская с соавторами [17,19] с успехом использовали метод ультрафильтрации при очистке протеиназ из *Asp. terricola* и *Streptomyces* sp. Приведённые литературные данные, касающиеся вопросов выделения и очистки протеолитических ферментов, свидетельствуют о том, что сочетание

различных методов позволяет получить гомогенные ферментные препараты из культур микроорганизмов.

Применение того или иного из них зависит от индивидуальных свойств фермента, конечной цели при его применении, физико-химических факторов. Анализируя литературные данные, мы пришли к выводу, что молекулярная масса нейтральных протеиназ находится в интервале 20000 - 50000. Все они имеют довольно высокий температурный оптимум, лежащий в интервале 40 - 60°C, оптимальное значение рН 7,0 - 8,0, диапазон стабильности характеризуется значениями рН 5,0 - 10,0. Так нейтральная протеиназа *Bac. Subtilis* имеет оптимум рН 7,0 и температурный оптимум 52°C. Протеолитические ферменты *Bac. Subtilis*, выделенные А.А. Глемжай и сотрудниками, имеют несколько оптимумов рН от 6,5 до 10,5. Молекулярная масса нейтральной протеиназы 38000 - 45000, щелочной - 27000 - 29000. Препараты протеиназ *Pseudomonas aeruginosa* 700 75 имеют рН оптимум от 7,5 до 10,0. Протеиназы различных фракций обладали различными рН оптимумами.

Фермент с молекулярной массой 28000 имеет оптимум рН 10,5. Уменьшение молекулярной массы коррелировало со снижением оптимума рН. Так, протеиназа с молекулярным весом 20000 характеризуется рН оптимумом 7,0. Известны термостабильные препараты протеиназ. Для термостабильного фермента, выделенного из *Thermoactinomyces thalporphilus* максимальная активность обнаружена при рН 6,0 и сохранялась до 70 при изменении рН от 5,0 до 8,0. Оптимальная температура равна 70°C, но через 30 минут выдерживания при 70°C сохраняется лишь 62 активности {32}.

Другая термостабильная нейтральная протеиназа - прототерпин имеет оптимум температуры 79°C, за 60 часов инкубации при 60°C потеря активности не превышает 15. Итак, рН оптимум для нейтральных протеиназ варьирует от 6,0 до 8,0, температурный оптимум 40 - 60°C, однако термостабильность ферментов может варьировать в широком диапазоне.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ ПО ГЛАВЕ I

Биотехнология является одной из самых интенсивно развивающихся наук. Это объясняется, прежде всего, тем, что результаты биотехнологических исследований применяются во многих отраслях промышленности. В результате анализа литературных данных были показаны наиболее распространенные и некоторые новые ферменты и ферментные препараты, применяемые в промышленности.

Достаточно широко ферменты применяются в пищевой промышленности (получение глюкозо-фруктозных сиропов, безлактозного молока; использование в виноделии и хлебопечении), медицине (получение лекарств на основе ферментов). Освещены также особенности иммуноферментного анализа, как одного из самых актуальных вопросов диагностики в медицине.

Представлены основные ферменты, применяемые для промышленного синтеза различных соединений, которые трудно или невозможно получить химическим путем (антибиотики, аминокислоты).

Затронуты вопросы аналитического обеспечения промышленных процессов, поскольку в последнее время достигнуты большие успехи в разработке ферментативных методов определения ряда органических и неорганических соединений. Особенностью ферментативных методов контроля является их высокая специфичность по отношению к определяемому веществу.

Также кратко описано применение ферментов в сельском хозяйстве (получение высококачественных кормовых добавок), а также в других актуальных на сегодня областях (биodeградация целлюлозы, получение эффективных стиральных порошков).

Таким образом, в работе показаны наиболее важные достижения в области инженерной энзимологии и дана характеристика основных ферментов, применяющихся в промышленности.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ *BACILLUS SUBTILIS*

Bacillus subtilis (сенная палочка) - грамположительные крупные палочки с закругленными концами (1,0-1,3 x 4,6-5,5 мкм). Подвижные (перитрихи), образуют центральную овальную спору. Хемоорганотрофы. Факультативные анаэробы. Являются нормальными обитателями кишечника человека и животных. Широко распространены в природе.

Штамм-продуцент растет на жидких и агаризованных средах. Оптимальная температура роста 37°C, оптимальная pH 6,6-7,2, культивирование 18 - 24 часа. Для размножения используется мясопептонная агаризованная среда (МПА) с глюкозой (1 %) [1,2,5].

На мясопептонная агаризованная штамм образует небольшие округлые колонии, максимальный диаметр которых составляет 0,5 - 0,7 см. Край колоний изрезанный, с характерным белым налетом в центральной верхней части. Колонии гладкие, плоские, матовые, сухие. Не вырастают в агар и легко отделяются от него. Цвет от слабо кремового до желтоватого.

Морфологически штамм представлен подвижными мелкими палочками, образующими центрально расположенные эндоспоры, располагаются поодиночке или цепочками различной длины. Палочкиснабжены жгутиками, расположенными перитрихиально.

B. subtilis 65 строгий аэроб, сапрофит, мезофил, грамположительен. Штамм интенсивно разлагает белковые среды благодаря действию протеолитических энзимов, при этом на желатине происходит разжижение, на среде лакмус-молоко - пощелочение, пептонизация. Чувствителен к целому ряду антибиотиков, умеренно чувствителен к ампицилину [36].

Предельно допустимая концентрация (ПДК) в воздухе рабочей зоны - 40000 кл./м³, пометка А, 4 класс опасности.

Пределы измерений. Методика обеспечивает выполнение измерений количества клеток микроорганизма в воздухе рабочей зоны в диапазоне

концентраций от 50 до 500000 клеток в 1 м³ воздуха при доверительной вероятности 0,95.

Метод измерений. Прямой метод основан на аспирации из воздуха производственных помещений клеток микроорганизма на агаризованную среду МПА с глюкозой (1 %) и подсчета количества выросших колоний по типичным культурально-морфологическим признакам.

Косвенный метод основан на аспирации из воздуха клеток микроорганизма на поверхность плотной питательной среды (молочный агар Эйкмана) и подсчета прозрачных зон, образующихся вокруг выросших колоний и четко выделяющихся на общем молочно-мутном фоне среды через 18 - 24 часа.

При данном методе на одной чашке Петри после забора пробы может быть учтено не более 50 колоний, т.к. большее количество колоний на чашке образуют сливающиеся зоны пептонизации молочного белка казеина.

Средства измерений, вспомогательные устройства, реактивы и материалы. При выполнении измерений применяют следующие средства измерений, вспомогательные устройства и материалы.

Реактивы, растворы: Антибиотики: ампициллина натриевая соль, нистатин, спирт этиловый ректификат, агаризованная среда МПА с глюкозой (глюкоза - 1 %), агар - 1,5 - 1,8 %, рН 6,6 - 7,2, режим стерилизации 1,1 - 1,2 атм в течение 30 мин). Молочный агар Эйкмана (10 мл мясopептонная агаризованная среды МПА и 2,5 - 3 мл стерильного молока – содержание жира не более 2 %, белка -2,8 % - смешать ex tempore)

Выполнение анализа. При выполнении анализа воздуха прямым методом агаризованную среду мясopептонная агаризованная расплавляют, остужают до 50 - 60°С, добавляют свежеприготовленный в стерильной дистиллированной воде раствор антибиотика ампициллина из расчета 10 - 15 мкг на 1 мл среды (для подавления посторонней бактериальной микрофлоры), раствор нистатина из расчета 10 мкг на 1мл среды (для

подавления грибковой флоры), стерильный раствор глюкозы (1 %), тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

При выполнении анализа воздуха рабочей зоны косвенным методом к уже приготовленному мясопептонная агаризованная добавляют, соблюдая все правила асептики, стерильного молока из расчета 10 мл мясопептонная агаризованная и 2,5 -3,0 мл молока и разливают по 10 мл в стеклянные чашки Петри на горизонтальной поверхности.

Чашки с застывшей средой помещают в термостат на сутки при температуре 37 °С, после чего проросшие чашки бракуют, стерильные чашки используют для контроля воздуха.

После отбора проб воздуха чашки Петри помещают в термостат на 37 °С. Через 18 - 24 часов производят подсчет выросших колоний по культурально-морфологическим признакам (прямой метод) или прозрачных зон вокруг выросших колоний продуцента на общем молочно-мутном фоне среды (косвенный метод) как результат ферментативного действия нейтральной протеиназы на молочный белок - казеин.

Вычисление результатов измерения. Расчет концентрации клеток продуцента в пересчете на 1 м³ воздуха производят по формуле:

$$X = \frac{N \cdot 1000}{V}, \text{ кл./м}^3, \text{ где}$$

X - концентрация клеток продуцента в воздухе;

N - количество зон вокруг колоний продуцента, выросших на чашке;

1000 - коэффициент пересчета на 1 м³ воздуха;

V - объем воздуха, л (произведение скорости на время аспирации).

2.2. ПОВЕРХНОСТНЫЙ СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОДУЦЕНТОВ АМИЛАЗ НА ТВЕРДЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ.

Для получение амилаолитических и протеолитических ферментов поверхностным способом культивирования плесневого гриба *Bacillus subtilis* производили на твердой питательной среде, содержащий прежде всего

крахмал содержащий субстрат, а также другие полисахариды и минеральные вещества[31,26,16].

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 мало квалифицированного 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 атм 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 косо́го су́сла-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 30С 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[16].

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

Подготовка среды к стерилизации. Из приготовленной смеси после тщательного перемешивания отвешивали 125 г (Асп) 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 (n). $a=15,0$ г; $B= 150,0$; $n = (B - a - 125,0) = (150,0 - 15,0 - 125,0) = 10$ г. Здесь допускается определенная неточность, т.к. марля также увлажняется при стерилизации, но в данном расчете этим увлажнением марли можно пренебречь.

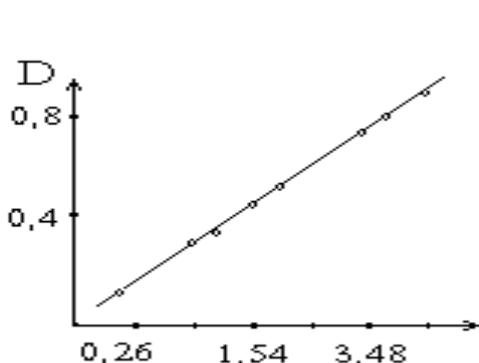
2.3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Модификационный метод с применением субстрата казеина основан на определении скорости ферментативной реакции гидролиза субстрата под действием исследуемых протеолитических ферментов, содержащихся в материале, взятом на анализ. Скорость реакции определяют по количеству образовавшихся аминокислот - тирозина (α -амино- β -оксифенил пропионовая кислота) и триптофана (α -амино- β -индолил пропионовая кислота), которые устанавливают колориметрической реакцией с реактивом Фолина. Этим методом определяют указанные аминокислоты как в свободном, так и в связанном состоянии.

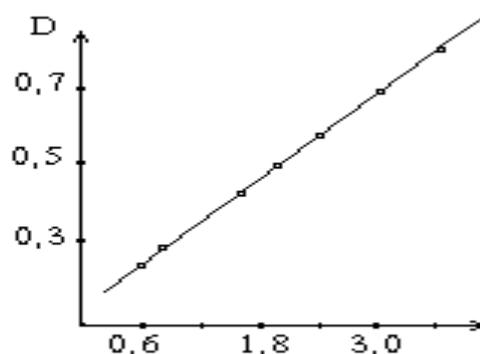
По количеству тирозина и триптофана, содержащемуся в гидролизате, определяют количество превращенного белка в процессе ферментативной реакции (из расчета содержания в белке 6% тирозина и 1.8% триптофана). В основу расчета активности протеолитических ферментов положена зависимость степени гидролиза белка от числа единиц активности фермента,

введенных в ферментативную реакцию. На основе этой зависимости составляется график.

Поскольку в данном методе количество аминокислот, характеризующих количество превращаемого белка, определяется по интенсивности окраски реакционных сред - оптической плотности после реакции с реактивом, то в графике для простоты расчета вместо количества превращенного белка ставится пропорциональная ему оптическая плотность раствора. При составлении графика по оси абсцисс откладывают число единиц фермента, введенное в ферментативную реакцию, а по оси ординат - оптическую плотность, полученную после колориметрической реакции с реактивом Фолина.



а) Содержание белка, мг



б) Единицы активности

а) Зависимость оптической плотности от количества превращенного в процессе ферментативной реакции белка.

б) Зависимость оптической плотности от числа единиц активности протеолитических ферментов.

Относя количество введенных в реакцию единиц активности фермента к действию 1 г препарата, определяют его активность. Для расчета прямой, изображенной на графике, составляет расчетное уравнение.

За единицу протеолитической активности принято такое количество фермента, которое катализирует за 30 минут гидролиз 1 г белка в принятых условиях до продуктов, не осаждающихся трихлоруксусной кислотой. 1г составляет 25% от взятого на ферментативную реакцию белка.

Протеолитическая активность характеризуется числом единиц активности фермента, содержащегося в 1 г препарата и твердых полупродуктов или в 100 мл жидких материалов. Метод предназначен для анализа очищенных ферментных препаратов грибного происхождения и всех полупродуктов, получающихся при их производстве.

Определение пепсина по Ансону и Мирскому. Данный метод основан на следующих принципах. Гемоглобин подвергают воздействию пепсина, оставшийся гемоглобин осаждают трихлоруксусной кислотой. Фенольные свойства остатка (тирозин), определяемые фотометрически, используют как меру активности фермента.

Субстратом служит 2%-ный раствор гемоглобина в 0.06 н. растворе соляной кислоты, 5 мл субстрата нагревают до 25⁰С, прибавляют 1 мл раствора фермента, оставляют в течении 10 мин., добавляют 10 мл 0.3 н. раствора трихлоруксусной кислоты, энергично взбалтывают, фильтруют и 5 мл фильтрата отливают в мерную колбу на 25 мл. Сюда же приливают 10 мл 0.5 н. раствора едкого натра и 3 мл фенольного реактива (реактив Фолина-Чиокалтеу разводят предварительно двойным объемом воды) и доводят водой до метки. По истечении нескольких минут окрашенный раствор фотометрируют относительно стандартного раствора, содержащего 0.0008 мэкв тирозина в 5 мл 0.2 н. раствора соляной кислоты (к раствору добавляют 0.5% формальдегида в качестве антисептика). Для исключения возможных ошибок ставят холостой опыт. Единицы пепсина выражают в мили эквивалентах тирозина (в пределах от $6 \cdot 10^{-4}$ до $11 \cdot 10^{-4}$): единицы пепсина = мили эквиваленты тирозина $\times 1.47$.

2.4.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ ПО МУРУ И ШТЕЙНУ.

Метод основан на том, что содержащие α -аминогруппу аминокислоты дают с нинггидридом окрашенную производную - дикетогидриндилиден дикето гидриндамин, а также альдегид-аминокислоты и углекислоту.

Окрашенный продукт обладает характерным максимумом поглощения при 570 мμ, а интенсивность окраски зависит от количества аминокислоты. С пролином и оксипирином реакция протекает в ином направлении, а максимум поглощения получаемого при этом окрашенного продукта расположен при 440 мμ.[14,16]

Инкубацию фермента удобно проводить в мерных колбочках по 5 мл, в которых смешивают и уравнивают при постоянной температуре на водяной бане все компоненты за исключением фермента. После этого добавляют фермент, раствор смешивают и берут пробы для исследования. Для кинетических измерений концентрацию фермента желательно подобрать таким образом, чтобы аликвотные части можно было бы брать каждые 5 минут.

Аликвотные части пробы, взятые сразу же после добавления фермента, а затем через соответствующие интервалы, добавляют в фотометрические пробирки, содержащие 2 мл реактива нингирида - это тотчас обрывает реакцию. После этого смесь 20 мин. нагревают на водяной бане; полученная окраска устойчива минимум 24 часа. Средняя ошибка при анализе повторных проб составляет $\pm 2\%$. После разбавления кипяченой смеси пробы и нингирида 10 мл смеси, состоящей из равных объемов воды и н.пропанола, интенсивность окраски определяют на спектрофотометре Колемана при 570 мμ.

Для калибровки пользуются постоянными количествами стандартных аминокислот, содержащих реакционные компоненты. При помощи калибровочных кривых, построенных отдельно для каждой исследуемой аминокислоты, измерения интенсивности окраски (по отношению к контрольной колбе) пересчитывают в миллимоли. При делении этих величин на миллимоли субстрата, использованного в процессе реакции, можно найти процент гидролиза.

Построение калибровочной кривой исключает ошибки, происходящие от качественных различий реакции аминокислот на цветной реактив. До оптической плотности 0.1 зависимость между величиной поглощения и количеством субстрата носит линейный характер.

Воспроизводимость составляет $\pm 3\%$. Мешающее влияние аммония, аминов и других веществ, содержащихся в биологическом материале и дающих цветную реакцию с нингидридом, исключается при помощи соответствующих холостых проб. Анализ сравнительно упрощается, когда изучают протеолитические ферменты, субстратами которых являются пептиды, не содержащие свободных аминогрупп. В этом случае вся образующаяся окраска целиком приходится на освободившуюся аминокислоту. [3,5,57]

2.5. МИКРОМЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ.

А.П.Алексеев. Предлагаемый микрометод определения активности протеолитических ферментов основан на измерении содержания аргинина в пептидах, освобождающихся при гидролизе протеиназами белковых субстратов. Содержание аргинина определяют с помощью стабилизированной и усовершенствованной реакции Сакагучи (хроматограмму погружают в 0.1% раствор 8-гидроксихинолина в ацетоне, высушивают на воздухе, опрыскивают раствором 0.2 мл Br₂ в 100 мл 0.5 М NaOH; аргинин и другие гуанидины дают оранжево-красные пятна, тауромицин и гликоциамин - лишь временную окраску), позволяющей определить содержание аргинина в растворах трихлоруксусной кислоты после осаждения и удаления нерастворимых белков. Зная содержание аргинина в белковом субстрате и определяя его количество в перешедших в раствор пептидах, можно рассчитать процент гидролиза белкового субстрата изучаемыми протеиназами. В этом состоит главное преимущество метода, поскольку метод Ансона не дает возможности рассчитать процент гидролиза белка, атакуемого протеолитическими ферментами. Из всех существующих

методов только метод Мура и Штейна позволяет определить процент гидролиза белковых субстратов, но он имеет ограниченное применение, поскольку требует предварительного проведения полного кислотного гидролиза как белка-субстрата, так и образовавшихся пептидов. В предложенной методике калибровочная кривая строится по растворам свободного аргинина. Введение в реакцию пептидов и белков в виде их биуретовых комплексов повысило чувствительность реакции Сакагучи с остатками аргинина и сделало ее такой же чувствительной, как и для свободного аргинина. В качестве белкового субстрата используют классический субстрат - гемоглобин и окисленный по Сангеру лизоцим. Этот низкомолекулярный белок, содержащий 12.7% аргинина прекрасно расщепляется пепсином (рвется около 30 связей).[3,5,16]

2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕИНАЗ ПО БЕЛКОВОМУ СУБСТРАТУ.

К 0.5 мл субстрата в соответствующем буферном растворе добавляют 0.5 мл пробы, содержащей фермент (экстракт, биологическую жидкость), инкубируют установленное опытным путем время, после чего белки в пробе осаждают 5 мл 10% трихлоруксусной кислотой. Отделяют осадок центрифугированием, а надосадочную жидкость (ТХУ-центрифугат) подвергают дальнейшей обработке. Контрольные пробы - пробы, где реактив добавлен в обратном порядке: к 3 мл 10% раствора ТХУ добавляют 0.5 мл раствора, содержащего фермент и 0.5 мл субстрата. Рекомендуется ставить пробу на автолиз субстрата: к 0.5 мл субстрата добавляют 0.5 мл прокипяченного раствора, содержащего фермент, инкубируют вместе с опытными пробами и осажденной ТХУ.

Определение содержания аргинина в ТХУ-центрифугантах по модифицированной реакции Сакагучи. К 0.5 мл ТХУ-центрифуганта добавляют 0.5 мл 2.5мМ раствора CuSO_4 , 0.5 мл 5 Н. КОН, 0.5 мл раствора ДХН (2,4-дихлор-1-нафтол). Раствор встряхивают и вносят 0.5 мл гипобромита натрия, мгновенно возникает ярко-розовая окраска. Раствор

встряхивают и через 20-30 секунд стабилизируют пробы добавлением 0.2 мл раствора 2-тиогликоля (чтобы предотвратить разрушение окрашенного продукта избытком гипобромита натрия. После добавления 2-тиодигликоля в пробы как опытные, так и контрольные, появляется желтоватое окрашивание за счет побочного продукта реакции между избыточной ТХУ и гипобромита натрия. Побочный продукт также стабилизируется 2-тиодигликолем. Оптическая плотность пробы измеряется спектрофотометром при 520 нм в кювете толщиной 1 см.

Определение концентрации белка определяли по методу Лоури (Lowry O.H et al., 1951). В качестве стандартного белка использовали бычий сывороточный альбумин. Во фракциях, полученных после хроматографии, белок определяли спектрофотометрически по оптической плотности при 280 нм, используя спектрофотометр СФ-26 «Ломо». [3,16,53]

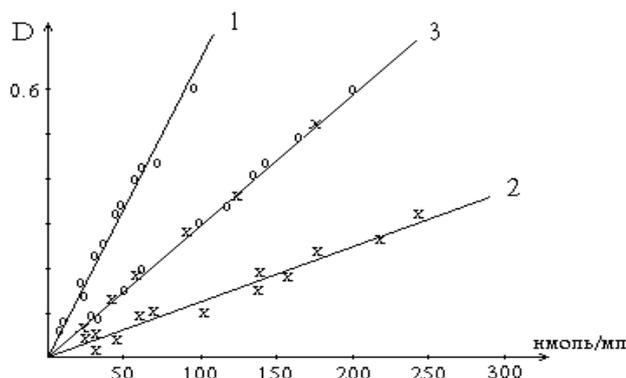
Определение активности протеиназ по реакции с реактивом Фолина.

К 0.5 мл того же ТХУ-центрифуганта добавляют 0.5 мл 2.5 мМ раствора CuSO_4 , 4 мл 0.5 н. раствора NaOH и 1.5 мл разбавленного в три раза реактива Фолина. Через 30 минут измеряют на спектрофотометре оптическую плотность при 760 нм

Калибровочные кривые по пепсиновому гидролизату окисленного лизоцима. 30 мг окисленного лизоцима растворяют в 50 мл подкисленной воды (40 мл H_2O + 10 мл 0.3 н. раствора HCl . и к полученном раствору добавляют 0.5 мг пепсина. Смесь оставляют при комнатной температуре на сутки. По истечении этого срока инкубации препарат не дает осадка с ТХУ. Этот препарат используют наряду с растворами аргинина и тирозина в качестве стандарта для построения калибровочных кривых. Приготавливают разведения с содержанием от 60 до 600 мкг/мл исходного лизоцима. В пробы вводят соответствующее опытным пробам количество ТХУ. Приготавливают также растворы свободного аргинина и тирозина с концентрациями от 0.04

до 0.25 мкмоль/мл. Из каждой пробы берут по 0.5 мл (в трех параллельных пробах) для определения содержания аргинина и тирозина по Фолину.[60]

Калибровочные кривые. Количество аминокислоты или ее остатка в гидролизате в наномолях на 1 мл.



3 получена с помощью микрометода на основе реакции Сакагучи (520 нм) по растворам аргинина (x) и по пептидному гидролизу лизоцима (o); 1 и 2 - с помощью реакции Фолина (760 нм): 2 - по растворам тирозина, 1 - по пептидному гидролизу лизоцима. Значение оптической плотности проб, измеренные при 520 нм или 760 нм, нанесены на график против концентрации аргинина или тирозина или их остатков в пепсиновом гидролизате лизоцима. Кривая 1, проходящая выше кривой 2, получена при реакции реактива Фолина с растворами тирозина эквивалентной концентрации. Кривая 3 получена в результате реакции Сакагучи как со свободным аргинином, так и с его остатками, содержащимися в пептидах пепсинового гидролизата лизоцима. Расположение опытных точек точно по прямой свидетельствует о том, что в гидролизате, осажденном ТХУ, весь аргинин полностью реагирует с реактивом Сакагучи.

Воздействие Фолина на тирозин не специфично. Кроме тирозина в пептидах с этим реактивом реагируют триптофан, цистеин. Образуемые медью с тетрапептидами и полипептидами биуретовые комплексы облегчают такое взаимодействие. Следовательно, выражение величины активности протеолитических ферментов в тирозиновых эквивалентах и по Фолину, как это иногда делают, неправильно.

Таким образом, особенности ферментов как биологических катализаторов, показаны их отличия от небелковых катализаторов, способы измерения активности предложенных ферментов – пепсина, папаина и микроорганизмов.[61]

Определение протеазной активности в КЖ микроорганизмов определяли также по модифицированному методу Ансона 1971 (ГОСТу – 20264.2-88У) . В качестве субстрата использовали 1,0 % казеина. За единицу протеолитической активности принята способность фермента превращать за 1 мин при температуре 30°C и рН-8.5, приводящий казеин в неосаждаемое трихлоруксусной кислотой состояние, количество которой вычисляли по тирозиновому эквиваленту, соответствующем 1 мкмоль тирозина.[1,362]

2.7.ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕКОТОРЫХ КАТАЛИТИЧЕСКИХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

Активности протеаз определяли по отношению к растворимому различным белковым субстратам (глиадин, казеин, казеинат натрия, желатин, гемоглобин, глютен и др.). Реакционную смесь, состоящую из 2 мл (0,1-3 %) субстрата 0.05 М фосфатном буфере рН 6,0 и 0,1-2,0 мл разбавленного раствора протеазы по шкале, указанной в ГОСТе, соответственно по их активности, инкубировали при 37°C в течение 3-30 мин. Реакцию останавливали кипячением в течение 10 мин и определяли количество непрогидролизованной части белков. Оптимум рН для проявления максимальной активности ферментов проводили с использованием 1,0 % раствора казеина в 0,05 М фосфатном, фосфатно-цитратном буфере при значениях рН реакционной смеси в интервалах 3,0-10,0 при температуре 30°C. рН стабильность исследуемого фермента определяли также как и в предыдущих значениях рН и буфере, выдерживанием ферментного раствора предварительно в указанных значениях рН буфера в течение 30-60 мин, после чего определяли активность фермента.

Для определения температурного оптимума фермента, реакционную смесь фермента с субстратом в 0,05 М фосфатном буфере с оптимальным

значением рН 6,0 инкубировали в течение 10-30 мин при различных температурах в интервале от 10-80°C, и затем определяли количество образовавшейся глюкозы или прогидролизованного количества крахмала.

Для определения устойчивости активности фермента к высоким температурам предварительно ферментный раствор без субстрата в 0,05 М фосфатном буфере рН 6,0 инкубировали в течение 30 мин при различных интервалах температуры 5-80°C, после чего определяли активность ферментов. Для изучения влияния ионов металлов определяли активность ферментов в реакционной смеси в оптимально подобранных условиях с использованием 0,05 М фосфатного буфера рН 6,0 в присутствии солей различных металлов при концентрациях 1-10 мМ.[1,5,8]

ЗАКЛЮЧЕНИЯ ПО ГЛАВЕ II.

При исследовании процессы получения фермент амилаза из бактерии *v.subtilis* используют различными активными продуцентами. Для в этом разделе использован различными методами - биологическая характеристика и определение *bacillus subtilis*, поверхностный способ культивирования продуцентов амилаз на твердых питательных средах, методы определения активности протеолитических ферментов, определение протеолитических ферментов по Муру и Штейну, микрометод определения активности протеиназ, определение активности протеиназ по белковому субстрату, определение некоторых каталитических и физико-химических свойств ферментов.

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ИССЛЕДОВАНИЕ ОТБОР АКТИВНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ АМИЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ.

К группе белковых препаратов, получаемых биотехнологическим способом, относятся ферментные препараты, аминокислоты, белковые концентраты и белковые изоляты. Из перечисленных групп белковых препаратов в пищевой промышленности в настоящее время наиболее широко используются ферментные препараты.

Ферменты обладают уникальными свойствами (эффективность и специфичность действия, нетоксичность, способность работать в мягких условиях, перерабатывать различное сырье растительного и животного происхождения, в том числе и отходы), в связи с чем их применение в промышленности выгодно с экономической и экологической точек зрения.

Производство ферментных препаратов занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объём продукции которых постоянно растёт, а сфера применения неуклонно расширяется. Такое быстрое развитие связано с тем, что ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения, которые широко распространены в природе, без них невозможны осуществление многих биохимических процессов и жизнь в целом.

Ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности, а достижения современной энзимологии еще значительно расширили возможности применения ферментов, и в первую очередь, в медицине и пищевой промышленности. Рынок ферментов растет из года в год, причем он очень четко ориентирован на тенденции того рынка, где применяются ферменты. Его развитие зависит от двух взаимосвязанных факторов: экономической целесообразности их применения и возможности их промышленного производства.

Для получения бактериальной амилазы в производстве используют *Bac. subtilis*. Выращивают их поверхностным методом на жидкой питательной среде определенного состава или на отрубях, а также глубинным методом. Амилаза, выделяемая бактериями в среду, обладает главным образом, разжижающим и декстринирующим действием на крахмал и малой осаживающей способностью. Этим она отличается от амилаз плесневых грибов, солода и поджелудочной железы.

При сравнительно низкой температуре бактериальная амилаза проявляет свою активность в широком диапазоне рН, т. е. от 5 до 9 при оптимуме рН 6,5-7. Оптимальной температурой ее является 55°C. Бактериальной амилазой можно вызвать быстрое разжижение крахмала при температуре 75° С и даже при 100° С. В последнем случае необходимо нейтральное значение рН. При температуре 100°C действие фермента амилазы кратковременное, но эффективное, крахмал полностью разжижается.

Фермент α -амилаза способен беспорядочно гидролизовать полисахаридную цепь крахмала и других длинноцепочечных углеводов по α -(1→4)-связям с образованием преимущественно α -мальтозы, т.е. остатки мономеров при таком расщеплении имеют α -конфигурацию. Продуктами расщепления оказываются, помимо мальтозы, также олигомеры, содержащие от 3 до 7 остатков глюкозы. Так, амилоза крахмала под действием α -амилазы превращается в глюкозу и мальтозу. Амилопектин, содержащий в молекуле α -(1→6)-связи, полностью не гидролизуется, поэтому остается разветвленный полисахарид (с более низкой степенью разветвленности по сравнению с крахмалом), так называемый «остаточный декстрин».

Все α -амилазы являются кальцийзависимыми ферментами. Полное удаление кальция приводит к инактивации фермента. Повторное введение кальция в среду может частично восстановить его активность.

α -Амилазы богаты тирозином и триптофаном, а также глутаминовой и аспарагиновой кислотами (25% от массы белка). Наличие этих кислот

связывают с осаживающей способностью, которую проявляют эти энзимы. Серосодержащие аминокислоты входят в состав α -амилаз в сравнительно малых количествах, либо вообще отсутствуют. Кроме того, некоторые α -амилазы, выделенные из грибов, имеют углеводный фрагмент, в состав которого могут входить манноза, ксилоза.

α -Амилаза обладает слабокислыми свойствами, при этом оптимальный диапазон рН для проявления ее максимальной активности составляет 6,7-7,0, т.е для действия фермента наиболее благоприятна нейтральная среда.

Далее были проведены аналогичные опыты по синтезу протеазы бактериальными культурами, что накопление максимального количества внутриклеточной протеазы (нейтральной) происходило к 36-48- часам, а выход во внеклеточное пространство происходила в два этапа, 60 и 84 часам роста *B.subtilis*, т.е. секреция протеазы происходила в стационарной фазы роста культуры.

Исследования синтезирующихся внеклеточных белков и спектра амилаз в составе КЖ показали, что при росте и развитии в глубинной культуре бактериальной культурой синтезируются различные ферменты. Исследуемая культура *B.subtilis-15*, в питательной среде с крахмалсодержащими субстратами синтезировало в преобладающем количестве амилолитические, затем протеолитические ферменты. Исследуемые штаммы культур *Bacillus subtilis* обладали различной степенью амилолитической активности. Из 15 изученных штаммов только 7 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 15,11,9,7,5,3,2. Активность испытуемых штаммов бактерий к росту и образованию зоны гидролиза вокруг колоний распределялись следующим образом: 15>11>9>7>5>3>2>8>6 Так, видно из

таблице 1, в экспериментально подобранных оптимальных условиях в КЖ активность α -амилазы составляла 192 ед/мл, тогда как в идентичных условиях роста и развития данной культуры активности сопутствующих ферментов, в частности глюкоамилазы составляла 5,3 ед/мл, нейтральной протеазы-4,8 ед/мл, кислой протеазы-2,6 ед/мл, щелочной протеазы-6,9 ед/мл. Данные по изучению состава и активности сопутствующих ферментов представлены в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1. Активности некоторых гидролитических ферментов содержащихся в КЖ *B.subtilis* 15

Ферменты	Активность в КЖ, ед/мл	Удельная активность, ед/мг
α -амилаза	192,0	78,56
Глюкоамилаза	5,3	1,85
Нейтральная протеаза	4,8	1,75
Кислая протеаза	2,6	1,05
Щелочная протеаза	6,7	2,68

Помимо вышеуказанных исследуемых факторов температура культивирования микроорганизмов, как и другие факторы, также оказывает существенное влияние на биосинтез ферментов и на скорость роста и накопления ферментов. Если микроорганизм термостабилен, то с повышением температуры культивирования возрастает и скорость накопления фермента и даже иногда суммарное количество синтезируемого фермента. Следует отметить, что среди бактериальных продуцентов довольно часто встречаются термофильные микроорганизмы, для которых оптимальная температура культивирования 35-55°C.

Оптимум температуры культивирования для активного биосинтеза α -амилазы *B.subtilis* и сопутствующей протеазы изучали при различных диапазонах температуры 28°C, 30°C, 32°C, 37°C и 40°C в динамике роста и развития продуцента, при которых также были изучены изменение количество белка и изменение количества растущих клеток .

Таблица 3.1.2. Амилолитическая способность некоторых штаммов бактерии *Bacillus subtilis* в глубинной культуре.

№	Продуценты	Активность в КЖ, ед/мл α -амилаза	Удельная активность, ед/мг
1.	<i>Bacillus subtilis</i> 15	192,1	78,56
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 11	132,5	54,01
3.	<i>Bacillus subtilis</i> 9	119,3	48,69
4.	<i>Bacillus subtilis</i> 7	116,7	47,72

Проведенные выше эксперименты показали, что для исследуемого штамма *B.subtilis*, оптимизирован состав питательной среды с внесением различных источников азота и углерода, макро-микроэлементов, при которой было установлена, что новая питательная среда был самой благоприятной для максимального роста и развития отобранного штамма бактерии, а также ферментообразования. Подобраны также физико-химические условия и оптимальные параметры роста (температура, pH, объема посевного материала, посуда), а также условия культивирования. Оптимальной температурой культивирования является 30°C. Однако культивировании штамма при других значениях температуры резко влиял на активность α -амилазы. Эти данные свидетельствуют, что температура культивирования микроорганизмов, помимо изученных других факторов, оказывает существенное влияние на биосинтез ферментов.

Также, в амилолитически активные КЖ обнаружено другие сопутствующие гликолитические и амилолитические ферменты, выраженные с различными активностями. 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* - 15. *Bacillus subtilis* на оптимальных питательных средах легко споролирует. Споры эллипсоидного или цилиндрические, размерами 0,6-0,9 x 1,0-1,5 мкм.

Таким образом, отобранный нами штамм 15 бактерии *Bacillus subtilis* выбран объектом дальнейших наших исследований и был использован как активный продуцент амилолитических ферментов, а именно α -амилазы.

3.2. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ АМИЛАЗ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ГЛУБИННЫХ КУЛЬТУР.

Средой для выращивания продуцентов являются пшеничные отруби с добавлением до 25 % солодовых ростков, увлажненных водой, подкисленной 0,1 н. раствором серной или соляной кислоты. Выход готовой культуры составляет обычно 70–80 масс. % от массы среды. Продуцентами α -амилазы и глюкоамилазы чаще всего являются бактерии *B. Subtilis*-15. Режимы выращивания зависят от физиологии продуцента.

Выращенная культура влажностью 36–50 % может быть высушена и использована как готовый препарат (Пх), а также может быть переработана с получением очищенных препаратов. Процесс очистки начинается с водной экстракции при 20-25 °С с отбором 20-22% раствора.

Средняя концентрация СВ в экстрактах - 11-14 %. Экстракт может быть использован для получения очищенных препаратов путем осаждения ферментов органическими растворителями или солями. Амилазы выпадают в осадок почти полностью (93-96 %) при концентрации этанола в растворе 69-72 %, ацетона – 60-62 и изопропанола – 54-55 %.

Для получения амилолитических ферментных препаратов в нашей стране преимущественно используется глубинный способ культивирования. В качестве продуцентов используют грибы рода *Aspergillus*, спороносные бактерии, относящиеся к группам *B. subtilis* - *mesentericus*, дрожжеподобные организмы родов *Endomycopsis*, *Endomyces* и многие другие микроорганизмы. Большие перспективы имеют работы по созданию продуцентов термофильных амилаз, которые могут работать в слабокислой (это важно для крахмалопаточного производства) и сильнощелочной средах.

Главным источником углерода для всех продуцентов α -амилазы является крахмал различного происхождения, который вводится в среду в клейстеризованном состоянии. Может использоваться и крахмалсодержащее сырье. Биосинтез α -амилазы протекает более интенсивно, если крахмал

частично гидролизовать, не допуская накопления в среде низкомолекулярных углеводов (таблица 3.2.1.). Состав питательной среды может включать и другие различные углеводсодержащие вещества.

Таблица 3.2.1. Влияние способа обработки крахмала на биосинтез α -амилазы

Способ обработки крахмала	рН культуральной жидкости	Активность α -амилазы	
		ед. АС/мл	% от контроля
Гидролизат крахмала при длительности гидролиза, τ :			
10 мин	5,70	177,0	158,5
60 мин	5,65	168,0	150,5
1,5 ч	5,72	180,0	161,0
18 ч	5,68	180,0	161,0
Контроль (мальтоза)	5,60	111,6	100,0

Таблица 3.2.2. Рекомендуемые варианты состава питательной среды (%) для получения препаратов, содержащих α -амилазу.

Компоненты	<i>B. subtilis</i>	
	амилаза	комплекс амилазы и протеазы
Ферментативный гидролизат:		
крахмала	9,0	3,0
кукурузной муки (по крахмалу)	9,0	—
кормовых дрожжей (по СВ)	0,2	—
Щелочной экстракт кукурузной муки (10 % СВ)	—	0,5
Неорганические вещества:		
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1,2	1,2
CaCl_2	0,01	0,05
MgSO_4	0,05	0,05
KCl	0,15	0,15

Получение ферментных препаратов может быть использована без дальнейшей обработки для осахаривания крахмалистого сырья в спиртовом производстве или в виде фильтрата для осахаривания крахмалистых клейстеров в крахмалопаточной промышленности.

Для получения ферментных препаратов с индексом ГЗх фильтрат или культуру концентрируют, после чего смесь направляется на сушку. Высушивание препарата должно осуществляться при температуре на входе в распылительную сушилку не выше 100-120°C, на выходе - не более 50-60 °С. При сушке и концентрировании большое значение имеет правильный выбор стабилизатора фермента.

3. ДИНАМИКА РОСТА, РАЗВИТИЯ И НАКОПЛЕНИЯ α -АМИЛАЗЫ БАКТЕРИЕЙ *Bacillus subtilis* -15 И *Bacillus subtilis* -11.

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 – 15 и 11 на подобранной ранее питательной среде.

При росте и развитии бактериальной культурой синтезируются различные метаболиты, в том числе и гидролитические ферменты. Исследуемая культура *Bacillus subtilis* – 15, в питательной среде с крахмалсодержащими субстратами в преобладающем количестве синтезировала амилолитические (α -амилазу, глюкоамилазу) и другие сопутствующие ферменты. Так например, а КЖ активность α -амилазы составляло 192 ед/мл, глюкоамилазы 155 ед/мл, β -галактозидазы-119 ед/мл и др. глюкозидазы, нейтральной протеазы - 142 ед/мл, кислой протеазы – 138 ед/мл, щелочной протеазы 3,5 ед/мл. Полученные данные по изучению состава и активность сопутствующих ферментов представлены в таблице 3.3.1

Таблица 3.3.1. Активность амилолитических и некоторых гидролитических ферментов, сопутствующих в в КЖ *Bacillus subtilis* –15.

№	Ферменты	Активность в КЖ, ед/мл	Удельная активность, ед/мг
1	α -амилаза	192,1	78,56
2	Глюкоамилаза	155	63,38
3	Нейтральная протеаза	142	58,07
4	Кислая протеаза	138	56,40
5	Щелочная протеаза	133	54,30
6	β -глюкозидаза	127	51,93
7	α -галактозидаза	119	48,66

Таблица 3.3.2. Активность амилалитических и некоторых гидролитических ферментов, сопутствующих в в КЖ *Bacillus subtilis* –11.

№	Ферменты	Активность в КЖ, ед/мл	Удельная активность, ед/мг
1	α -амилаза	132,5	54,01
2	Глюкоамилаза	155	63,38
3	Нейтральная протеаза	142	58,07
4	Кислая протеаза	138	56,40
5	Щелочная протеаза	133	54,30
6	β -глюкозидаза	127	51,93
7	α -галактозидаза	119	48,66

Далее в лабораторных условиях нами были проведены исследования по изучению накопления α -амилазы. Было обнаружено, что появление активности обоих ферментов наблюдается к 32-35 часам роста продуцента, а максимальное амилалитическая активность от 132,5 ед/мл до 192,1 ед/мл проявляется к 50-55 часам, в то время как протеолитическое достигает максимума от 119 ед/мл до 155 ед/мл к 65-75 часам роста культуры. Активность обоих ферментов снижались после 83 часов роста бактерии.

Следует отметить, что в процессе культивирования штамма наблюдалась повышение рН КЖ от 6,5 до рН 7,5, что объясняется синтезом фермента протеазы. К 83 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 истощения источников углерода и азота в питательной среде. Активность сопутствующего α -амилазе фермента – нейтральной протеазы быстро возрастает в первой половине экспоненциальной фазы роста *Bacillus subtilis* – 15 и *Bacillus subtilis* – 11. Было отмечено, к концу ферментативного процесса, сначала лизиса клеток, её активность вновь возрастает и достигает вторичного максимума, т.е. доходит от 155 ед/мл до 155 ед/мл в КЖ.

3.4. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ.

Биохимические процессы, протекающие при хранении сырья и при производстве пищевых продуктов, связаны с действием естественных и специально вносимых ферментов микробиологического, растительного или животного происхождения. Таким образом, при работе с ферментами всегда следует учитывать наличие эндогенных ферментов, которые в процессе приготовления пищевых продуктов могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние.

В настоящее время деятельность большинства отраслей промышленности основана на использовании ферментативных процессов; развивается также производство самих ферментных препаратов.

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Они имеют ряд особенностей, которые отличают их от неорганических катализаторов:

– огромная скорость катализа: ферменты в $10^8 \dots 10^{20}$ раз повышают скорость реакций;

– специфичность действия: они катализируют только строго определенные реакции. Выделяют следующие основные типы специфичности: абсолютная специфичность (фермент катализирует превращение только одного субстрата); групповая специфичность (фермент действует на группу родственных субстратов, обладающих определенными структурными особенностями); специфичность по отношению к определенным типам реакций (ферменты действуют независимо от того,

какие группы присутствуют вблизи той связи, на которую направлено действие фермента); стереохимическая специфичность (фермент катализирует превращение только одной стереохимической формы субстрата);

– лабильность, которая обусловлена их белковой природой, сложной пространственной конфигурацией. Ферменты могут изменять свою активность под действием рН, температуры, присутствия активаторов или ингибиторов и др.;

Многие ферменты являются двухкомпонентными, поскольку состоят из белковой части - апофермента и связанного с ним небелкового компонента - кофермента, который в процессе ферментативного катализа не подвергается изменениям, однако может представлять собой субстрат для отдельных ферментов. Коферментами могут выступать витамины и их производные и др.

В соответствии с химическим строением их подразделяют на коферменты:

- алифатического ряда (глутатион, липоевая кислота);
- ароматического ряда (коэнзим Q-убихинон);
- гетероциклические соединения (производные витаминов В₆, В₁, Н, фолиевой кислоты);
- нуклеотиды и нуклеозиды (коэнзим А, НАД/НАДФ, ФАД/ФАДФ).

Существуют единицы активности ферментов: стандартная единица фермента – Е (U) (количество фермента, которое катализирует превращение одного мкмоль данного субстрата за одну минуту при заданных условиях); удельная активность (число единиц (Е или U), отнесенное к одному мг белка в ферментном препарате); молекулярная активность (число молекул данного субстрата или эквивалентов затронутых групп, превращаемых за одну минуту одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата); катал (кат) (каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью 1 моль/с в заданной системе измерения активности. 1 Е (U) = 16,67 нкат);

Ферментные препараты в отличие от ферментов содержат помимо активных ферментов множество балластных веществ. Кроме этого, ферментные препараты бывают комплексными, т. е. состоящими из

нескольких ферментов, и состоящими из индивидуального фермента.

Название ферментного препарата включает название основного фермента и название микроорганизма-продуцента, с окончанием «-ин». Помимо этого, в названии отражается способ культивирования микроорганизма и степень очистки.

Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности позволяет интенсифицировать технологический процесс, улучшить качество готовой продукции, увеличивать ее выход, экономить ценное сырье.
Табл.3.4.1

В зависимости от цели применения к ферментным препаратам предъявляются определенные требования в отношении состава ферментов, оптимальных условий их действия, степени их очистки, что особенно важно для микробных препаратов, требующих химического, микробиологического и токсикологического контроля, применяемых наполнителей, стоимости и др.

Табл.3.4.1 Применение ферментных препаратов в пищевой промышленности

Отрасль	Этапы технологически» процессов и технологические цели применения ферментов
Технология переработки зерна	Повышение выхода муки и круп, улучшение качества клейковины, производство модифицированной муки зернобобовых
Хлебопечение	Сокращение расхода муки, улучшение теста, замедление черствения изделий, улучшение цвета корочки, производство охлажденного и замороженного теста
Пивоварение	Использование неосоложенного сырья, разжижение, усиление ферментируемое™, улучшение фильтрации, контроль содержания азота, получение низкокалорийного пива, стабилизация пива
Технология молочных продуктов	Коагуляция молока, замена сычужного фермента в производстве сыра, модификация молочного белка, создание сырного аромата, получение ферментативно модифицированных сыров, удаление перекиси водорода, получение молочного сахара
Производство вина, фруктовых соков, газированных напитков, консервов	Осветление, мацерация сырья, удаление крахмала из сока, увеличение выхода, получение сладких ликеров, стабилизация вин и соков, производство соков с мякотью и пюре
Переработка крахмала	Увеличение выхода, модификация крахмала, разжижение, осахаривание, получение глюкозо-фруктовых и зерновых сиропов
Спиртовая промышленность	Конверсия сырья, разжижение крахмала, осахаривание, улучшение роста дрожжей, увеличение выхода спирта

Производство кофе	Сепарация зерен, контроль вязкости зкетрактов, улучшение вкуса и аромата
Производство белков	Гидролиз белков и полисахаридов, снижение вязкости, производство модифицированных пептидов и белков
Производство сахара	Удаление крахмала, белков и полисахаридов
Производство ароматизаторов	Синтез тонких ароматов, получение натуральных ароматических эфиров и т. д.
Производство масел и жиров	Увеличение выхода, модификация жиров, экстракция масла, получение биологически активных веществ (лецитина, токоферолов, каротинов и др.)
Технология мясопродуктов	Увеличение выхода, тендеризация мыса, получение мясных экстрактов, текстуризация белков, продление сроков хранения
Производство растительных экстрактов	Увеличение экстрактивности, сокращение длительности экстракции, улучшение фильтрации, повышение выхода пигментов, производство чая и чайных экстрактов, сокращение времени экстракции, усиление аромата и цвета
Производство пектина	Упрощение технологии, увеличение выхода, регулирование степени этерификации

3.4.1. ВЫБОР ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ПИЩЕВЫХ ЦЕЛЕЙ

При выборе ферментов для пищевых производств необходимо учитывать:

источник, форму и наличие разрешения на их использование;

доступность качественного продукта;

удобство в использовании (предпочтительны иммобилизованные или растворимые ферменты);

стоимость за единицу активности фермента .

Используемые в пищевой промышленности ферменты имеют широкий спектр применения , включающий функции синтеза и разложения (деградации). При выборе фермента для конкретного пищевого процесса следует принимать во внимание его источник и биохимические характеристики, что важно при сертификации. В табл. 3.4.2. представлены некоторые области применения ферментов и уровень их концентрации.

Таблица 3.4.2. Применение ферментов в пищевых технологиях.

Продукт	Фермент	Назначение	Применяемая форма	Допустимая концентрация или время

Хлебопечение Злаковые и крахмалы	Амилазы	Ускорение ферментации, улучшение качества муки для получения буханок большого объема, улучшение цвета корки и структуры мякиша	Жидкость или таблетки	0,002-0,006 % к массе муки
Спиртные напитки Пивоварение	Амилазы	Снижение вязкости пульпы	Жидкость	0,025%
		Конверсия крахмала в сахар для ферментации		0,003 %
Производство соков Фрукты и овощи	Амилазы	Удаление крахмала для улучшения выделения сока	Жидкость или порошок	0,0005-0,002 %
Производство овощных консервов	Амилазы	Приготовление и умягчение пюре	Жидкость	—

3.4.2. ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ФЕРМЕНТОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ.

Подобно другим пищевым добавкам использование ферментов в пищевых продуктах нормируется законом. В различных странах требования, предъявляемые к ферментам, неодинаковы. Большинство развитых стран следует правилам Объединенного комитета экспертов по пищевым добавкам ФАО-ВОЗ, однако единого соглашения для европейских стран не существует. В Бельгии и Италии ферменты рассматривают как средства переработки. В Греции, Ирландии, Нидерландах и Великобритании не существует контроля за использованием ферментов. Однако в Великобритании источник поставки должен быть официально разрешен регулирующими агентствами. Во Франции и Германии ферменты относят к пищевым добавкам, и если они разрешены во Франции, не требуется разрешения на их использование в Германии. Существуют строгие нормативы на использование ферментов в Дании; разрешение на их использование выдается Датским национальным пищевым институтом. В Канаде энзимы рассматриваются как пищевые добавки и сертифицируются соответственно. В США ферменты могут быть использованы в пищевых

продуктах, если имеют статус GRAS («общепринятые, безопасные»). Ферменты, не входящие в этот список, рассматриваются как добавки и могут быть использованы только после разрешения. В Японии коммерческие ферменты рассматривают как синтетические продукты, которые должны быть включены в список Пищевого комитета и подлежат сертификации.

В Узбекистане ферменты в пищевой промышленности применяют в соответствии с рядом общих гигиенических правил.

Для получения ферментных препаратов пищевого назначения в качестве продуцентов используются органы и ткани здоровых сельскохозяйственных животных, культурных растений, непатогенные и нетоксичные специальные штаммы микроорганизмов бактерий и низших грибов.

Изготовители ферментных препаратов в нормативной и технической документации обязаны указывать источник получения препарата и вид организма - продуцента, давать их характеристику, включая активность (основную и дополнительную).

Ферментные препараты микробиологического происхождения не должны содержать жизнеспособных форм продуцентов ферментов. Препараты бактериального происхождения не должны иметь антибиотической активности. Препараты грибного происхождения не должны содержать микотоксинов.

Контаминация ферментных препаратов посторонней микрофлорой не должна превышать следующих лимитов: количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов - не более $5 \cdot 10^4$ КОЕ/г; не допускаются бактерии группы кишечных палочек в 0,1 г, а патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *E. coli*, - в 25 г продукта.

Ферментные препараты, разрешенные для применения в пищевой промышленности, и их продуценты приведены в табл. 3.4.3.

Ферментный препарат	Источник получения
<i>Ферментные препараты животного происхождения</i>	
α-Амилаза	Поджелудочные железы крупного рогатого скота, свиней
Каталаза	Печень крупного рогатого скота, лошадей
Лизоцим	Белок куриных яиц
Липаза	Желудки, поджелудки, сычуги, слюнные железы крупного рогатого скота
Пепсин	Желудки свиней
Пепсин птичий	Преджелудок кур
Сычужный фермент	Желудки, сычуги крупного рогатого скота, телят, коз, козлят, овец, ягнят
Трипсин	Поджелудочные железы крупного рогатого скота, свиней
Фосфолипаза	Поджелудочные железы телят, ягнят, козлят
Химозин	То же
<i>Ферментные препараты растительного происхождения</i>	
Бромелаин	Ананас (<i>Ananas spp.</i>)
Липозидаза	Соя
Мальткарбогидразы	Ячмень, ячменный солод
Папаин	Папайя (<i>Carica papaya</i>)
Химпапаин	То же
Фицин	Инжир (<i>Ficus spp.</i>)
Алкогольдегидрогеназа	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
α-Амилаза	<i>Aspergillus niger Aspergillus oryzae Bacillus hcheniformis Bacillus stearothermophilus Bacillus subtilis Rhizopus delemar Rhizopus oryzae</i>
β-Амилаза	<i>Bacillus cere us Bacillus megaterium Bacillus subtilis</i>
Арабинофуранозидаза	<i>Aspergillus niger</i>
α-Галактозидаза	<i>Aspergillus niger Mortierella vinacea sp. Saccharomyces carlsbergensis</i>
Гемицеллюлаза	<i>Aspergillus niger Aspergillus oryzae Bacillus subtilis Rhizopus delemar Rhizopus oryzae Sporotrichum dimorphosporum Trichoderma reesei</i>
β-Глюканаза	<i>Aspergillus niger Bacillus subtihs Tnchoderma harzianum</i>
Эндо-β-глюканаза	<i>Aspergillus niger Aspergillus oryzae Bacillus circulans Bacillus subtihs Penicilkum emersonn Rhizopus delemar Rhizopus oryzae Tnchoderma reesei Disporotnchum dimorphosporum</i>
Глюкоамилаза или амилоглюкозидаза	<i>Aspergillus awamon Aspergillus niger Aspergillus oryzae Rhizopus amhizus Rhizopus delemar Rhizopus mveus Rhizopus oryzae Tnchoderma reesei</i>
β-Глюкозидаза	<i>Trichoderma harzianum</i>

Экзо- α -глюкозидаза	<i>Aspergillus niger</i>
Глюкозизомераза	<i>Actinoplanes missounensis</i> <i>Arhtrobacter</i> sp <i>Bacillus coagulans</i> <i>Streptomyces albus</i> <i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Streptomyces olivochromogenes</i> <i>Streptomyces rubiginosus</i> <i>Streptomyces</i> sp <i>Streptomyces violaceoniger</i>
Глюкозооксидаза	<i>Aspergillus species</i>
Декстраназа	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>Penicillium lilacinum</i>
Изомераза	<i>Bacillus cereus</i>
Инвертаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces</i> sp
Инулиназа	<i>Aspergillus niger</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Sporotnchurn dimorphospomm</i> <i>Streptomyces</i> sp
Каталаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Micrococcus lysodeicticus</i>
Ксиланаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Sporotnchurn dimorphosponum</i> <i>Streptomyces</i> sp <i>Tnchoderma reesei</i>
Лактаза	<i>Aspergillus niger</i>
(β -галактозидаза)	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces</i> sp.
Лактопероксидаза	Согласно ТИ
Липаза	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Brevibacterium lineus</i> <i>Candida hpolytica</i> <i>Mucorjavanicus</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Rhizopus arnhizus</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Rhizopus nigrican</i> <i>Rhizopus niveus</i>
Мальтаза или α -глюкозыдаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Мелибиазз	<i>Mortierella vinacea</i> sp. <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Нитратредуктаза	<i>Micrococcus violagabnella</i>
Пектиназа	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus foetidus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Penicillium simplicissium</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Пектинлиаза	<i>Aspergillus niger</i>
Пектинэстераза	<i>Aspergillus niger</i>
Полигалактуроаза	<i>Aspergillus niger</i>
Протеаза (включая молоко-свертывающие ферменты)	<i>Aspergillus melleus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Brevibacterium lineus</i> <i>Endothia parasitica</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Micrococcus caseolylicus</i> <i>Mucor miehei</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus lactis</i>
Пуллуланаза	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella aerogenes</i>
Ферментный препарат	Источник получения
Серинпротеиназа	<i>Bacillus acidopullulyticus</i> <i>Streptomyces fradiae</i>
Танназа	<i>Bacillus hcheniformis</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i>

Целлюбиаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Trichoderma reesei</i>
Целлюлаза	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Rhizopus delemar</i> <i>Rhizopus oryzae</i> <i>Sporotrichum dimorphosporum</i> <i>Trichoderma reesei</i> <i>Thielavia tenestris</i>
Эстераза	<i>Muccor miehei</i>
Декарбоксилирование яблочной кислоты	<i>Leuconostoc oenos</i>

Ферментные препараты представляют собой очищенные и концентрированные продукты, содержащие определенные ферменты (энзимы) или комплекс ферментов, характерных для биологических сред и организмов — продуцентов. Они являются важным элементом в технологиях пищевых продуктов и применяются для интенсификации технологических процессов и повышения качества продуктов питания.

Ферменты высокого качества позволяют улучшить технологию, сократить затраты и даже получить новые продукты. Это один из наиболее эффективных и перспективных способов ускорения технологических процессов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производство ферментных препаратов является одним из ведущих направлений в развитии микробиологической промышленности. Год от года растет объем выпускаемых ферментных препаратов, расширяется их ассортимент и область применения. Ферментные препараты широко используются в самых различных отраслях пищевой и легкой промышленности, в косметике, в производстве моющих средств, в сельском хозяйстве, в аналитических исследованиях, медицинской промышленности и здравоохранении. Все больше заводов микробиологической промышленности осваивают выпуск этой продукции. Успешное развитие производства ферментных препаратов зависит от глубоких знаний, исследований в области производства, а также и от умелого использования знаний в области микробиологии, биохимии, коллоидной и физической химии, генетики, энзимологии - то есть наук, являющихся теоретической основой промышленного получения ферментных препаратов.

Как известно, ферменты занимают ключевое место в развитии современной биомолекулярной химии и технологии. Большое разнообразие реакций, катализируемых энзимами, доступность их как химических объектов, и, что очень важно, возможность изменения свойств ферментов позволяют использовать ферменты в различных сферах человеческой деятельности. В результате проведенного анализа литературы показаны и охарактеризованы ферменты класса гликозидаз, имеющие наибольший практический интерес.

В частности, описаны особенности амилолитических, целлюлолитических, пектолитических ферментов, их свойства, принципы действия, тип катализируемой реакции, местонахождение в природе. Эти ферменты позволяют эффективно перерабатывать сахаро- и крахмалосодержащее сырье и получать широкий спектр продукции.

Показано, что амилолитические, целлюлолитические и пектолитические ферменты широко применяются в различных отраслях промышленности – пищевой (получение глюкозы, кондитерских изделий, пива и спирта), текстильной, целлюлозно-бумажной промышленности, сельском хозяйстве и др. Так, осветление фруктовых соков, виноделие не обходится без использования целлюлаз в комплексе с пектиназами. Амилолитические и целлюлолитические ферментные препараты применяются в пивоварении и позволяют получать высококачественное пиво. Кроме того, эти же ферменты сегодня используют при переработке растительных материалов (культур и отходов) для получения моторного топлива (биоэтанола). Помимо этого, целлюлолитические ферменты применяются в сельском хозяйстве для получения высококачественных кормовых добавок и при силосовании соломы. Амилолитические препараты являются необходимым компонентом пищевых добавок, применяемых в хлебопечении. Кроме того, области действия ферментов расширяются с каждым годом (биополировка тканей с помощью целлюлаз, производство стиральных порошков и моющих средств, содержащих бактериальные амилазы).

Наряду с этим освещены вопросы получения высокоэффективных и стабильных ферментных препаратов из различных микроорганизмов-продуцентов (грибов и бактерий).

Таким образом, в работе показаны наиболее практически значимые ферменты – гликозидазы и отдельные их группы, дана характеристика этих ферментов, описаны механизмы их действия и области промышленного применения.

ВЫВОДЫ

1. Доказано, что для получения максимальной продукции амилолитических ферментов оптимальными условиями являются низкие концентрации крахмала (0,05-0,025%) и культивирования бактерий в течение 24 часов.

2. Ряд выделенных нами штаммов бактерий рода *Bacillus subtilis* способны продуцировать α -амилазы, стабильные в области высоких температур и щелочных значений pH, что делает их перспективными для дальнейших исследований и возможного практического использования.

3. Были испытаны более 15 местных штаммы, активно гидролизующие 25 % крахмал с образованием большой зоны разжижения в течение 16-18 часов. Активность испытуемых штаммов бактерий к росту и образованию зоны гидролиза вокруг колоний распределялись следующим образом: 15>11>9>7>5>3>2>8>6.

4. Наиболее активным продуцентом α -амилазы оказался *Bacillus subtilis*-15, способный образовать максимальную активность в течение 30-35 часов роста α -амилазу 192,1 ед/мл и др. не менее важные гидролитические ферменты.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова А.А. Л.И. Войно, И.С. Иванова. Пищевая биотехнология. М.: Колос С, 2008 - 427 с.
2. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов - М.: Агропромиздат., 2008 - 358с.
3. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии: Учеб. пособие для вузов. - М.: Колосс, 2004.
4. Кислухина О. В. Ферменты в производстве пищи и кормов. Издательство: М.: ДеЛи принт, 2002 г
5. Кулев Д.Х., Шарова Н.Ю. Биосинтез и выделение лимонной кислоты и амилолитических ферментов. Издательство. М., ДеЛи принт, 2008.
6. Варбанец Л.Д., Мышь К.В., Мацелюх О.В. и др. в-амилазы *Bacillus subtilis* //Микробиол. журн. - 2006. - 68, № 2. - С. 30-38.
7. Бакулина, Л. Ф. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии / Л. Ф. Бакулина, И. В. Тимофеев, Н. Г. Перминова, А. Ф. Полушкина, Н. И. Печоркина// Биотехнология. - 2001. - № 2. - С. 48-56.
8. Цурикова Н.В., Нефедова Л.И., Костылева Е.В. и др. Получение активного штамма *Bacillus licheniformis* - продуцента термостабильной β -амилазы //Приклет. Биохимия и Микробиология - 2002. - 38, № 5. - С. 502-506.
9. Звягинцева, И. С. Деградация нефтяных масел нокардиоподобными бактериями / И. С. Звягинцева, Э. Г. Суровцева, М. Н. Поглазова, В. С. Ивойлов, С. С. Беляев // Микробиология. - 2001. - Т. 70, № 3. - С. 321-328.
10. Плотникова, Е. Г. Бактерии - деструкторы полициклических ароматических углеводов, выделенные из почв и донных отложений района солеразработки / Е. Г. Плотникова, О. В. Алтынцева, И. А. Кошелева, И.Ф. Пунтус, А. Е. Филонов, Е. Ю. Гаврилов, В. А. Демаков, А. М. Боронин // Микробиология. - 2001. - Т. 70, № 1. - С. - 61-69.

11. Антипова Л.В., Глотова И.А., Кочергина Н.И. Микробные ферментные препараты для обработки вторичного сырья мясной промышленности.//Конференция «Биосинтез ферментов микроорганизмами»: Тез. докл., Москва, 26 - 27 октября 1993г - Москва, -С.33.

12. Антипова Л.В., Глотова И.А., Кочергина Н.И., Чурсин В.И., Макарова Е.Г. Разработка и использование специальных микробных препаратов для обработки кожевенного сырья.//Кожевенно-обувная промышленность. – 1994. - № 5-8. С.25 - 27.

13. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов.-М.: Агропромиздат. -1987. - С.391.

14. Детерман Г. Гель-хроматография. - М.: Мир. -1970. - С.352.

15. Караваева Н.Н., Садыкходжаева Н.Г. Получение высокоустойчивого препарата протеолитических ферментов гриба *Torula thermophila* шт.Уз. ПТ при культивировании в ферментере. // Приклад. биохимия и микробиология. - 1985. - Т.ХХI. - № 1. - С.24 - 27.

16. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии. - М.: Высшая школа. - 1980. - С.272.

17. Крестьянова И.Н., Васильева Л.И., Бартошевич Ю.Э., Ахпаров В.Л., Нахапетян Л.А. Изоэлектрическое фокусирование препарата протеолитических ферментов из *Streptomyces 771*. // Приклад. биохимия и микробиология. -1983. - Т.ХIХ. - № 2. - С.217 - 225.

18.Расулундзатуву М.З. Биосинтез и исследование протеолитического комплекса *Streptomyces fulvoviricus* ВКМАс - 161. // Автор. дисс. канд. техн. наук. - Воронеж. - 1989. - С.21.

19. Рожанская Т.И., Морголина Н.А., Андреева Т.В. Использование ультрафильтрации в процессах очистки протеолитических ферментов. //Материалы 2 Всесоюзного симпозиума по химии протеолитических ферментов. –Углич. - 1979. - С.134.

20.Галич И.П., Амилазы микроорганизмов.// Киев, Наука думка, 1987, 190с.

21. Глемжа А.А., Людьюс Л.Л., Петрова Л.И., Микробные ферменты народном хозяйстве.// Вильнюс, Мокслас, 1985, 188 с.
22. Грачева И.М., Технология ферментных препаратов.// Москва, Агропромиздат, 1987, с. 335.
23. Егорова Н.С., Промышленная микробиология.// Москва, Высшая школа, 1989, 688 с.
24. 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.
25. Избранные задачи для большого практикума по микробиологии. /Под ред. Н.С. Егорова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991.
26. Квеситадзе Г.И., Грибные и бактериальные амилазы, Мецниереба, Тбилиси, 1984, 155.
27. 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.
28. Ловачева Г.Н., Мглинец А.И., Успенская Н.Р. Стандартизация и контроль качества продукции. М.: Экономика, 1990. 238 с.
29. Методические рекомендации к проведению лабораторных работ по технологии белковых препаратов, аминокислот и липидов. /Под ред. И.М.Грачевой. М.: МТИПП, 1984. 69 с.
30. 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.
31. Павлова И. Н., Кичакова Н. А., Захарова И. Я. Термостабильные амилазы штамма *Bacillus* sp. // Методы получения, анализа и применения ферментов. -Рига, 1990. -С. 34.
32. Перевозченко И. И. Сравнительное исследование α -амилаз некоторых плесневых грибов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 093. - К., 1981. -24 с.

33. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Сербя 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.
34. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. /Под ред. Н.С.Егорова. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983.
35. Рухлядева А. П., Полягалина Г. В. Методы определения активности гидролитических ферментов. -М.: Легпищпром, 1981. -С. 34-43.
36. 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.
36. 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.
- 38, 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.
39. 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
40. Decklerck N., Machius M., Joyet Ph. et al. Engineering the thermostability of *B. licheniformis* α -amylase//Biologia (Bratislava). - 2002. - V.11. -P. 203-211
41. 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.
42. Leveque E., Janecek S., Haye B., Belarbi A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes // Enzyme Microb. Technol. - 2000. - V. 26,N1. - P. 3–14.]
43. 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

44. 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.

45. 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.

46. Odibo F., Ulbrich)Hofmann R. Thermostable α -amylase and glucoamylase from *Thermomyces lanuginosus* F1 // *Acta biotechnol.* -2001. - V. 21, N 2. -P. 141–153.

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

48. Saboury A. A. Stability, activity and binding properties study of α -amylase upon interaction with Ca

49. 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.

50. 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.

51. 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.

52. 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.

53. 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. 2+and Co2 + //Ibid. - 2002. - V. 11. - P. 221–228.

54. Bessler C., Schmitt J., Maurer K.-H., Schmid R. Directed evolution of bacterial β -amylases: Toward enhanced pH-performance and higher specific activity //Prot. Sci. - 2003. - 12. - P. 2141-2149.

55. Cordiero C.A.M., Martins M.L.L., Luciano A.B. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. //Braz. J. Microbiol. - 2002. - 33, № 1. - P. 68-77.

56. Gastro G., Baigori M., Sineris F. Studies on β -amylase production by *Bacillus licheniformis* MIR-61. //Acta Biotechnol. - 1999. - 19, № 3. - P. 263-272.

57. Haki G.D., Pakshit C.D. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review //Biores. Technol. - 2003. - 89. - P. 17-34.

58. Kandra L., Gyemant G., Remenyik J., Hovansky G. Action pattern and subsite mapping of *Bacillus licheniformis* β -amylase (BLA) with modified maltooligosaccharide substrates. //FEBS Lett. - 2002. - 518. - P. 79-82.

59. Konsola Z., Liakopoulou-Kyriakides M. Hydrolysis of starches by the action of an α -amylase from *Bacillus subtilis* //Proc. Biochem. - 2004. - 39. - P. 1745-1749.

60. Lee J., Parulekar S.J. Enhanced production of β -amylase in fedbatch cultures of *Bacillus subtilis* TN 106 [pAT5]. //Biotechnol. Bioeng. - 1993. - 42. - P. 1142-1150

61. Mamo G., Gashe B.A., Gessesse A. A highly thermostable amylase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. WN11. //J. Appl. Microbiol. - 1999. - 86. - P. 557-560

62. Nazmi A.R., Reinisch T., Hinz H.-J. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* β amylase. //Arch. Biochem. Biophys. . - 2006. - 453. - P. 16-23.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

- 1. Каршиев Т.О., Якубов Р.Р., Мухамеджанова Б.А., Кудратуллаева Р.Т.**
Изучение некоторых свойств кормовых дрожжевых белков (ТХТИ)
Актуальные вопросы в области технических и социально-экономических наук. Республиканский межвузовский сборник. Часть I. Тошкент 2014. 99-100 С
- 2. Каршиев Т.О., Кобулжонова М.А., Кудратуллаева Р.** Технология получения крахмальной патоки путем ферментативного гидролиза (ТХТИ)
Актуальные вопросы в области технических и социально-экономических наук. Республиканский межвузовский сборник. Часть I. Тошкент 2014. 101-102 С
- 3. Кудратуллаева Р.Т., Овлакулов С.Т., Каршиев Т.О., Тиллашайхова Р.М.** Определение амилолитической активности местных штаммов *Vac. subtilis*(ТХТИ) Труды XXIV – научно – технической конференции молодых ученых, магистрантов и студентов бакалавриата. Тошкент 2015. 325-326 С

ПРИЛОЖЕНИЯ