

Министерство образования и науки Российской Федерации

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

ШЛЕЙКИН А.Г., СКВОРЦОВА Н.Н., БЛАНДОВ А.Н.

ПРИКЛАДНАЯ ЭНЗИМОЛОГИЯ

Учебное пособие

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

Санкт-Петербург

2019

УДК 577(075.8)

Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов Н.Н. Прикладная энзимология. – СПб: Университет ИТМО, 2019. – 160 с.

Рецензент: Арсеньева Т.П., доктор техн. наук, профессор факультета пищевых биотехнологий и инженерии.

Представлены теоретическое содержание дисциплины, методы биохимических исследований, вопросы и задания для самоподготовки, тесты для контроля знаний, использованные литературные источники и интернет-сайты. Издание предназначено для самостоятельной и аудиторной работы студентов бакалавриата и магистратуры направлений: 19.03.01, 19.04.01, 19.04.02.



Университет ИТМО – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2019

©Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н., 2019

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты – это белки, способные ускорять химические реакции. Из существующих в природе около 25 000 различных ферментов на сегодняшний день описано немногим более 3000 наименований и ещё меньшее их количество используется в практических целях. Между тем ферменты – чрезвычайно эффективные катализаторы, способные ускорять химические реакции в 10^8 - 10^{12} раз. Большинство катализируемых ими реакций не могли бы протекать в биологических системах спонтанно. Следующей не менее важной особенностью ферментов является их избирательность действия по отношению к разным веществам, химическим связям и различным видам изомеров одного и того же вещества. Их действие зависит от температуры, кислотности, ионной силы раствора и строго контролируется не только на этапах синтеза и жизненного цикла, но и посредством специфических активаторов и ингибиторов.

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

Цель настоящего издания – ввести обучающихся в основные разделы теоретической энзимологии, дать представления о её прикладном значении, а также привести методы исследования, необходимые для учебных и практических целей. Безусловно, широко рассмотреть все аспекты современной энзимологии в рамках данного пособия невозможно. Однако, несмотря на прикладной характер издания авторы считают необходимым хотя бы кратко осветить

основные кинетические параметры ферментативных реакций. Приводятся сведения и о применении ферментных препаратов в различных отраслях производства. В пособие включены методы исследования свойств ферментов и определения их активности в различных биологических средах. Поэтому пособие может быть также использовано аспирантами и другими научными работниками в практических целях. Поскольку главное предназначение пособия учебное, в него включены вопросы для контроля знаний и тесты для самопроверки.

ЧАСТЬ 1. ОСНОВЫ ЭНЗИМОЛОГИИ

1. Химическая природа и строение ферментов

Ферменты – вещества, которые присутствуют в тканях и клетках всех живых организмов и способны во много раз ускорять протекающие в них химические реакции.

В отличие от большинства катализаторов неорганической природы, ферменты обладают более высокой эффективностью и специфичностью действия. В то время как небелковые катализаторы обычно ускоряют реакции в 10^1 – 10^3 раз, степень ускорения реакций под действием ферментов составляет 10^6 – 10^{12} .

В основном ферменты – это специфические белки. Однако в 80-х годах XX века Т. Чек и С. Альтман обнаружили каталитические свойства у низкомолекулярных полирибонуклеотидов, которые были названы рибозимами (в классификацию ферментов не входят), а в 1989 году это открытие было удостоено Нобелевской премии по химии. В данном разделе обсуждение будет посвящено самой крупной группе ферментов – высокоспециализированным белковым молекулам.

Ферменты, как и все белки, обладают рядом характерных свойств: амфотерностью, электрофоретической подвижностью и неспособностью к диализу через полупроницаемые мембраны. Ферменты имеют большую молекулярную массу: от десятков тысяч до нескольких миллионов дальтон. Им присущи все особенности структурной организации белковых молекул (первичный, вторичный, третичный и четвертичный уровни организации).

Ферменты могут быть простыми белками, целиком построенные из полипептидных цепей и распадающиеся при гидролизе только на аминокислоты. Простыми белками являются гидролитические ферменты (например, протеазы, липазы, рибонуклеаза), выполняющие

свою функцию в отсутствие кофермента. В большинстве случаев ферменты – сложные белки. Сложные белки (холоферменты) содержат наряду с белковой частью (апоферментом) небелковый компонент (кофермент или простетическую группу) (Рис. 1).



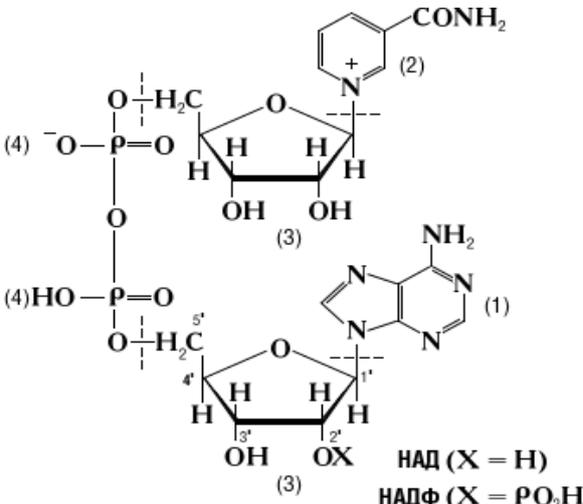
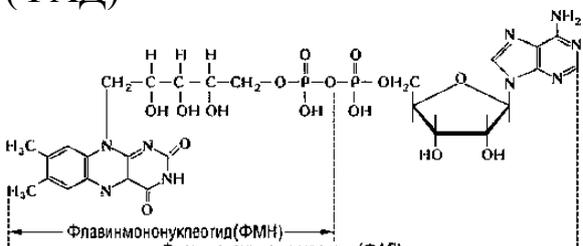
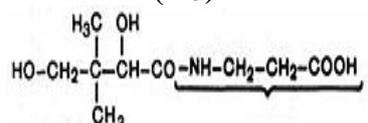
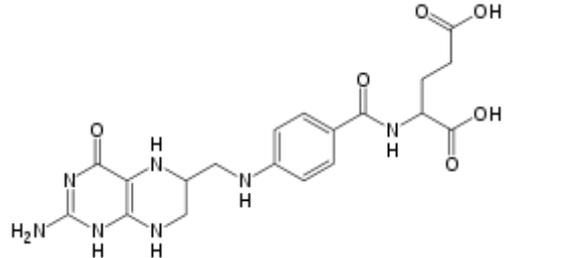
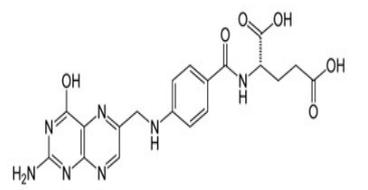
Рис.1. Схема строения ферментов

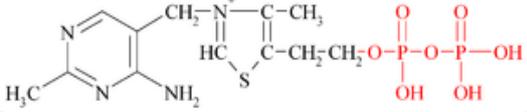
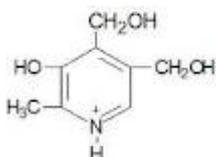
Апофермент обеспечивает специфичность действия фермента. Коферменты чаще всего связаны с белковой частью молекулы нековалентными взаимодействиями: водородными, гидрофобными, или ионными связями. Реже встречается ковалентное связывание апофермента с коферментом (тетрагидрофолат и биотин). Коферменты и другие простетические группы принимают непосредственное участие в процессе катализа.

Следует отметить одну отличительную особенность двухкомпонентных ферментов: только при объединении апофермента с коферментом или кофактором они приобретают каталитическую активность. Более 25% всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов.

Большая часть коферментов являются производными водорастворимых витаминов (табл.1).

Таблица 1.
Коферменты и простетические группы ферментов

Наименование	Витамин	Переносимые частицы
<p>Никотинамидадениндинуклеотид (НАД), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ)</p>  <p>НАД (X = H) НАДФ (X = PO₃H₂)</p>	<p>Никотинамид, (РР)</p>	<p>Электроны и протоны</p>
<p>Флавиномононуклеотид (ФМН), флавинадениндинуклеотид (ФАД)</p>  <p>Флавиномононуклеотид(ФМН) Флавинадениндинуклеотид(ФАД)</p>	<p>Рибофлавин, (В₂)</p>	<p>Электроны и протоны</p>
<p>Коэнзим А (CoA)</p>	<p>Пантотеновая кислота (В₅)</p> 	<p>Ацильные группы</p>
<p>Тетрагидрофолиевая кислота (ТГФ)</p> 	<p>Фолиевая кислота</p> 	<p>Метильные, формильные группы</p>

Тиаминдифосфат (ТДФ) 	Тиамин, (В ₁)	Оксогруппы
Пиридоксальфосфат	Пиридоксин, (В ₆) 	Амино- и карбоксильные группы

Вещество, химическое превращение которого катализирует фермент, носит название *субстрат*. Фермент, соединяясь с субстратом, образует *фермент-субстратный комплекс* (рис. 2):

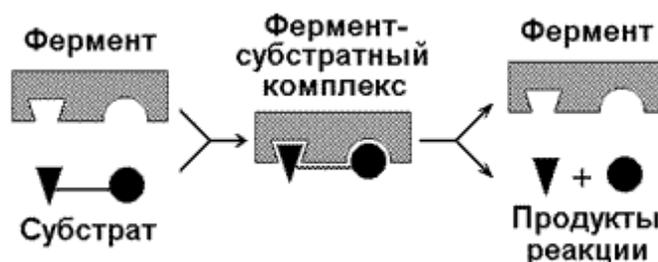


Рис. 2. Образование фермент-субстратного комплекса в ходе катализируемой реакции.

Молекулы субстратов, участвующие в ферментативных реакциях, часто имеют небольшие размеры по сравнению с молекулами ферментов, поэтому было высказано предположение, что при образовании фермент-субстратных комплексов в непосредственный контакт с молекулой субстрата, вступает ограниченная часть аминокислотных остатков пептидной цепи. Таким образом возникло представление об активном центре фермента.

Активный центр – это уникальная комбинация аминокислотных остатков в молекуле фермента, обеспечивающая непосредственное связывание с молекулой субстрата и прямое участие в акте катализа. К каталитически активным аминокислотным радикалам белка относятся нуклеофильные группы (имидазол гистидина, оксигруппа серина или тирозина, тиоловая группа цистеина, ε-аминогруппа лизина, ионизированные карбоксилы

аспарагиновой и глутаминовой кислот и др.) и электрофильные группы (ион имидазолия гистидина, неионизованные карбоксильные группы аспарагиновой и глутаминовой кислот).

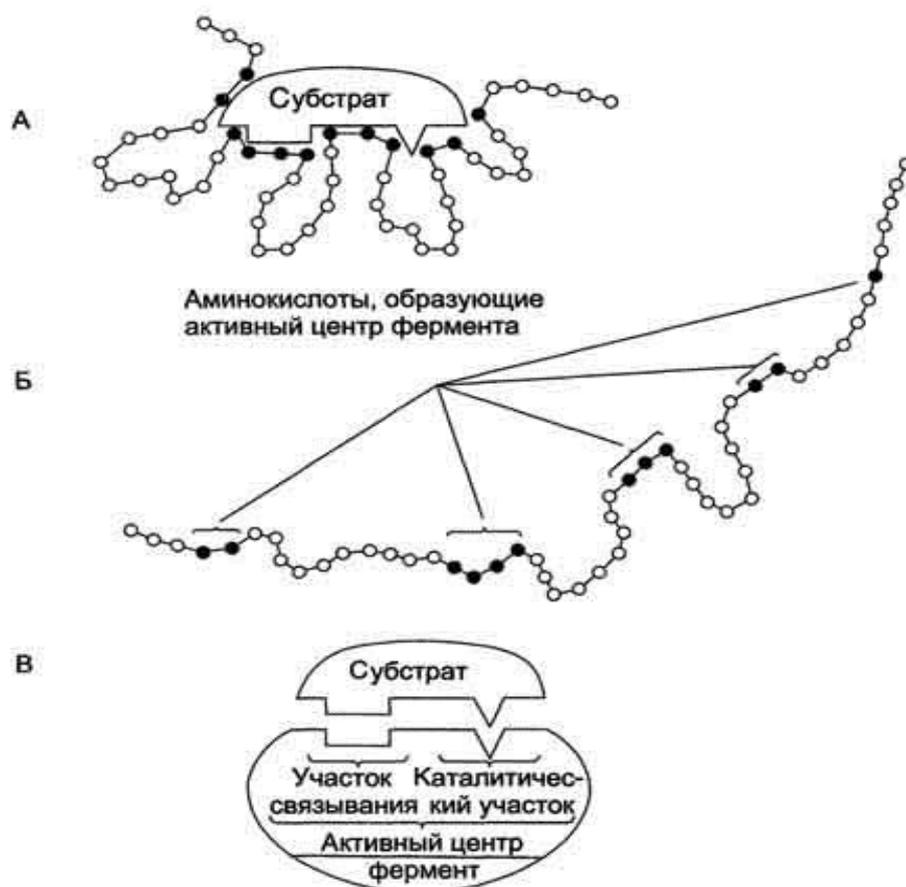


Рис. 3. Строение активного центра фермента.

А - присоединение субстрата к ферменту в активном центре; Б - положение аминокислотных остатков, формирующих активный центр фермента, в первичной структуре белка; В - активный центр фермента условно разделяется на участок связывания и каталитический участок.

В первичной структуре молекулы фермента группы активного центра обычно удалены друг от друга (рис. 3Б). Однако в третичной структуре аминокислотные остатки, принимающие участие в катализе, ориентированы в сближенном состоянии, удобном для их взаимодействия с молекулой субстрата (рис. 3А). Субстратная специфичность объясняется пространственным соответствием активного центра фермента и его субстрата

В активном центре фермента *участок связывания* обеспечивает формирование комплекса фермента с субстратом. *Каталитический участок* обеспечивает химическое превращение субстрата. Каждый фермент имеет один или несколько активных центров, с которыми связывается субстрат. Эти центры высокоспецифичны, т.е. «узнают» только «свой» субстрат или близкородственные соединения. В молекуле фермента может присутствовать также *аллостерический центр* (или центры) (от греч. *allos* – другой, иной и *steros* – пространственный, структурный). Это участок молекулы фермента, с которым связываются определенные, обычно низкомолекулярные, вещества эффекторы: активаторы или ингибиторы (рис. 4).

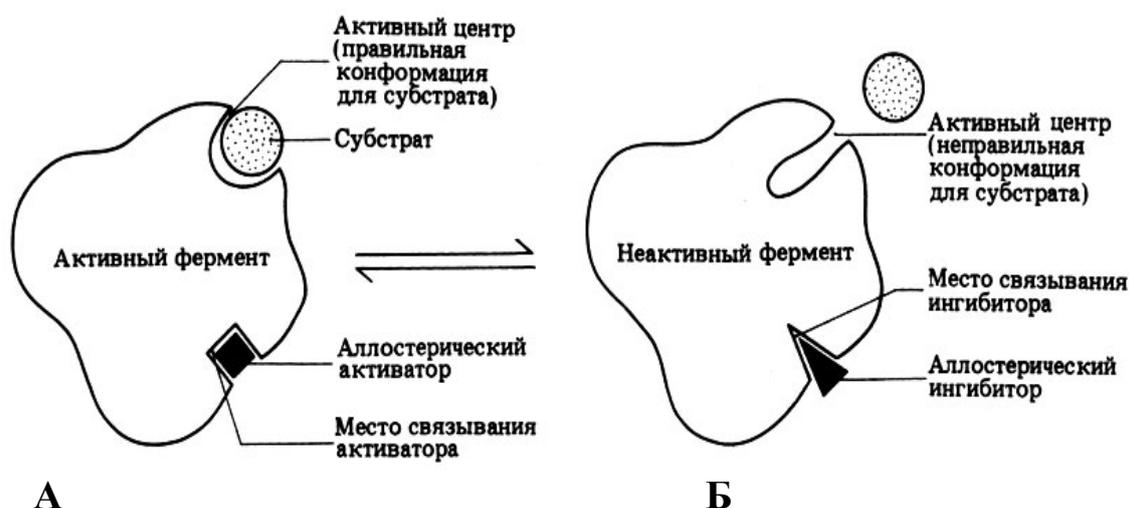


Рис. 4. Схема действия аллостерического центра фермента под влиянием эффекторов (А- активация активного центра, Б – ингибирование активного центра)

Присоединение эффектора к аллостерическому центру изменяет пространственную структуру молекулы фермента и, соответственно, конфигурацию активного центра, вызывая снижение (Б) или повышение (А) ферментативной активности. Ферменты, активность каталитического центра которых подвергается изменению под влиянием аллостерических эффекторов, связывающихся с аллостерическим центром, называются *аллостерическими ферментами*.

Многие ферменты характеризуются наличием разных форм, которые существуют в одном организме, но, как правило, в разных его клетках, тканях или органах. Эти формы называются *изоферментами*.

Изоферменты выполняют одну и ту же каталитическую функцию, но могут значительно различаться по степени каталитической активности, по особенностям регуляции или другим свойствам. Изоферменты могут незначительно различаться по аминокислотной последовательности и пространственной конфигурации, по субъединичному составу и свойствам.

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

2. Механизм действия ферментов

Необходимой стадией ферментативного катализа является соединение фермента E с субстратом S, в результате чего образуется фермент-субстратный комплекс ES:



Процесс ферментативного катализа можно разделить на три стадии:

- 1) диффузия субстрата к ферменту и образование фермент-субстратного комплекса (ES);
- 2) преобразование первичного комплекса в один или несколько активированных фермент-субстратных комплексов (ES^* , ES^{**} ...);
- 3) отделение продуктов реакции (P) от активного центра и диффузия его в окружающую среду.

Первая стадия обычно непродолжительна и зависит от концентрации субстрата в среде, а также его диффузии к активному центру фермента. Комплекс образуется практически мгновенно.

Вторая стадия наиболее медленная и лимитирует скорость всего катализа в целом. Её длительность зависит от энергии активации данной химической реакции. Образование фермент-субстратного комплекса способствует снижению энергии активации E_a , для достижения молекулой субстрата переходного (активированного) состояния и осуществления реакции (рис. 5). По завершении реакции (конечное состояние) фермент-субстратный комплекс распадается на продукт (продукты) реакции и фермент. Третья стадия практически мгновенна. Она определяется скоростью диффузии продуктов реакции в окружающую среду. Фермент по окончании реакции возвращается в

своё исходное состояние и может взаимодействовать с новой молекулой субстрата.

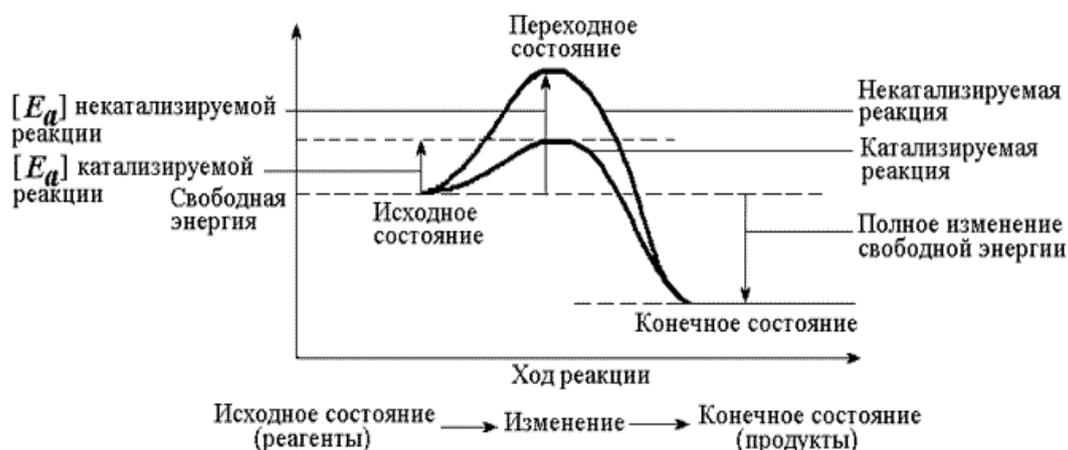


Рис. 5. Влияние фермента на энергетический барьер и энергию активации реакции.

Ферменты не могут влиять на положение равновесия ускоряемых реакций; при этом в ходе реакций они не расходуются и не претерпевают необратимых изменений. Ферменты с термодинамической точки зрения ускоряют химические реакции за счет снижения энергии активации путем увеличения числа активированных молекул, которые на более низком энергетическом уровне становятся реакционноспособными

3. Основы кинетики ферментативных реакций

Ферментативная кинетика изучает скорости реакций, катализируемые конкретными ферментами, а также закономерности влияния природы реагирующих веществ на скорости ферментативных реакций. Отличительная особенность ферментативных реакций – явление насыщения активного центра фермента субстратом.

Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации субстрата $[S]$ и количества присутствующего фермента $[E]$. В большинстве биохимических реакций концентрация фермента очень мала, а субстрат присутствует в избытке. При проведении ферментативной реакции в условиях избытка субстрата скорость реакции будет пропорциональна концентрации фермента. Графическая зависимость такой реакции имеет вид прямой линии (рис. 6):



Рис. 6. Зависимость скорости ферментативной реакции (v) от концентрации фермента.

Количество фермента часто невозможно определить в абсолютных величинах, поэтому на практике пользуются условными величинами, характеризующими активность фермента.

Стандартная единица фермента – это такое количество фермента, которое катализирует превращение одного микромоля (мкМ) данного субстрата за одну минуту при заданных условиях. Стандартная единица фермента обозначается буквой **E** (единица) или буквой **U** (unit).

Катал – каталитическая активность, при которой ферментативная реакция осуществляется со скоростью равной 1 молю в секунду в заданной системе измерения активности. Каталитическая активность в 1 катал (кат) при практическом применении оказывается слишком большой величиной, поэтому в большинстве случаев каталитические активности выражают в микро-каталах (мккат), нано-каталах (нкат) или пико-каталах (пкат).

Стандартная единица фермента находится и катал находятся в следующих соотношениях:

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль S/сек} = 60 \text{ моль S/мин} = \\ = 60 \times 10^6 \text{ мкмоль/мин} = \mathbf{6 \times 10^7 \text{ E (U)}};$$

$$1 \text{ E (U)} = 1 \text{ мкмоль/мин} = 1/60 \text{ мкмоль/с} = \\ = 1/60 \text{ мккат} = \mathbf{16,67 \text{ нкат}}.$$

Концентрации субстрата $[S]$ определяет, сколько молекул фермента соединится с субстратом с образованием фермент-субстратного комплекса $[ES]$. При малых $[S]$ скорость реакции возрастает пропорционально концентрации субстрата. Однако при

достаточно большом увеличении скорость реакции перестает зависеть от $[S]$ – наступает насыщение, когда все молекулы фермента оказываются занятыми субстратом.

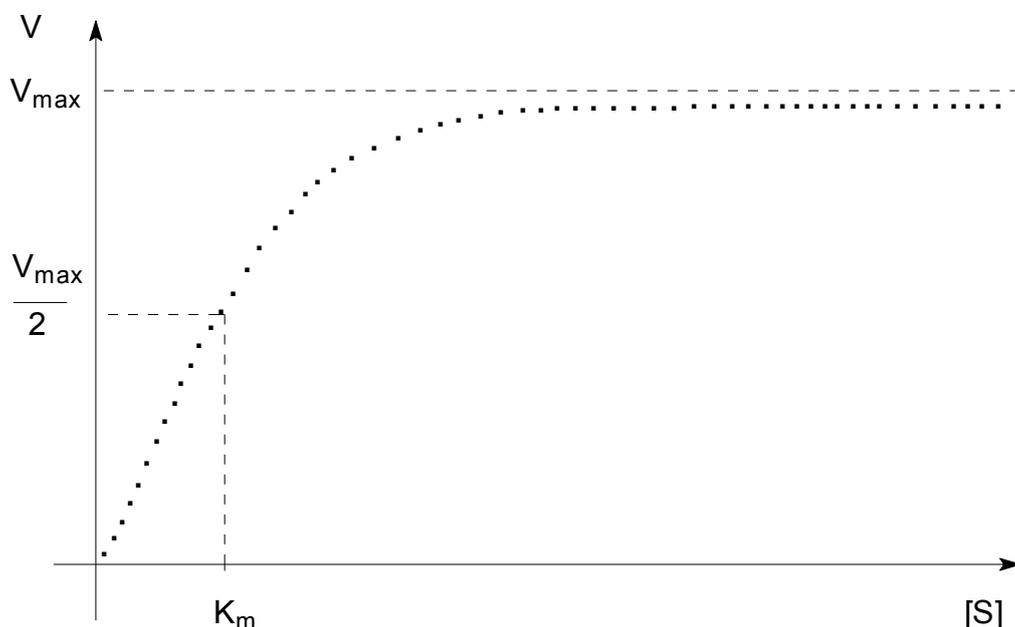


Рис. 7. Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата

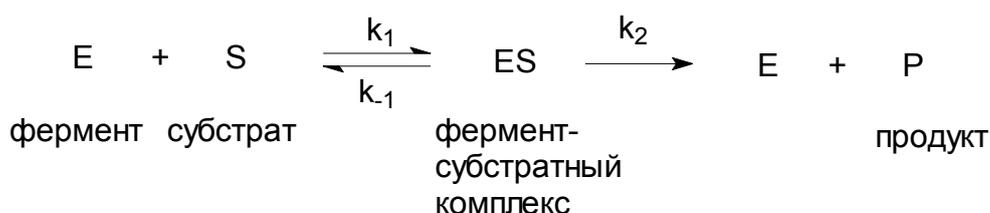
На графике (рис. 7) показано, что K_m равна концентрации субстрата $[S]$, при которой скорость ферментативной реакции v составляет половину от V_{max} . K_m имеет размерность моль/л.

Константа Михаэлиса является важным параметром при исследовании ферментов, характеризующим **степень сродства фермента к субстрату**. Константа Михаэлиса численно равна отношению суммы констант скоростей реакций, в которых фермент-субстратный комплекс распадается, к константе скорости реакции, в которой он образуется:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Определение величины K_m имеет важное значение при выяснении механизма действия эффекторов на активность ферментов.

Классическое уравнение Михаэлиса-Ментен выводят из следующей кинетической схемы реакции:



Здесь k_1 , k_{-1} , k_2 – константы скоростей соответствующих реакций. При этом вторая стадия предполагается необратимой, и определяет скорость ферментативной реакции V :

$$V = k_2 \cdot [ES]$$

В этом уравнении и далее квадратные скобки обозначают концентрацию соответствующего вещества в моль/л или ммоль/л. При больших концентрациях субстрата весь фермент находится в составе комплекса с субстратом, и скорость реакции при этом будет максимальной:

$$[ES] = [E]_0 \quad V_{\max} = k_2 \cdot [E]_0$$

Здесь $[E]_0$ – общая концентрация фермента, внесенная в систему (свободный и связанный). В данной теории используется гипотеза квазистационарного состояния, т.е. предполагается, что $[ES] = \text{const}$, т.е. скорость его образования равна скорости расхода. Следовательно:

$$k_1 \cdot [E][S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m \quad (\text{константа Михаэлиса})$$

Запишем уравнение материального баланса по ферменту:

$$[E]_0 = [E] + [ES]$$

Выразим отсюда $[E]$ и подставим ее в выражение для константы Михаэлиса, а затем преобразуем полученное уравнение:

$$[E] = [E]_0 - [ES]$$

$$\frac{([E]_0 - [ES]) \cdot [S]}{[ES]} = K_m$$

$$\frac{[E]_0 \cdot [S]}{[ES]} - [S] = K_m$$

$$\frac{[E]_0}{[ES]} = \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

$$[ES] = [E]_0 \cdot \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

Затем подставим [ES] в формулу для скорости ферментативной реакции:

$$V = k_2 \cdot [ES] = k_2 \cdot [E]_0 \cdot \frac{K_m + [S]}{[S]}$$

Отсюда и вытекает уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{где} \quad K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (\text{константа Михаэлиса})$$

Графически это показано выше, на рис. 7

Основными кинетическими параметрами ферментативной реакции являются константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции при насыщающих концентрациях субстрата. При этом, как следует из уравнения, K_m численно равна концентрации субстрата, соответствующей $V = V_{\max}/2$.

Для более удобного графического представления экспериментальных данных Г. Лайнуивер и Д. Бэрк преобразовали уравнение по методу двойных обратных величин исходя из того принципа, что если существует равенство между двумя какими-либо величинами, то и обратные величины также будут равны. Выражение, обратное уравнению Михаэлиса-Ментен, представляет собой **уравнение Лайнуивера-Бэрка**:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Зависимость обратных величин носит линейный характер (линеаризация уравнения Михаэлиса-Ментен), что позволяет экстраполировать прямую до пересечения с осями координат и легко определить кинетические параметры реакции (а также тангенс угла наклона прямой, равный отношению K_m / V_{\max}):

Благодаря этому уравнению можно определять в одном эксперименте константу Михаэлиса K_m и максимальную скорость V_{\max} исследуемой ферментативной реакции.

В графическом варианте метод Лайнуивера и Бэрка называют еще методом двойных обратных величин (рис. 8):

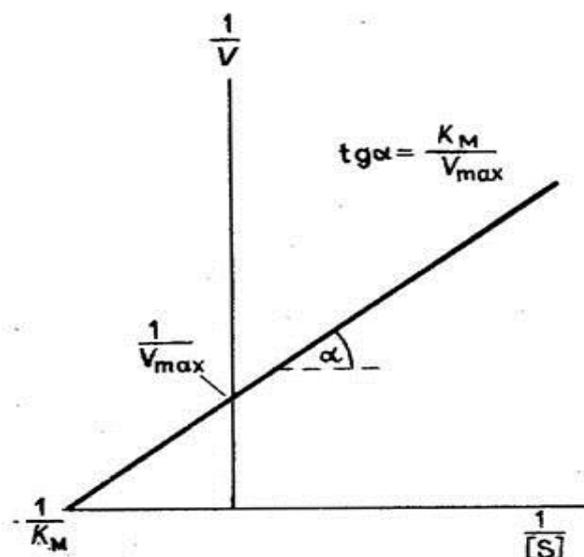


Рис. 8. График Лайнуивера-Бэрка

При построении графика на оси абсцисс откладывают величину, равную $1/[S]$, а на оси ординат — $1/V$: Тангенс угла наклона прямой будет равен величине K_m/V_{max} ; отрезок, отсекаемый прямой от оси ординат, представляет собой $1/V_{max}$ (обратная величина максимальной скорости). Если продолжить прямую линию за ось ординат, то на абсциссе отсекается отрезок, соответствующий обратной величине константы Михаэлиса — $1/K_m$.

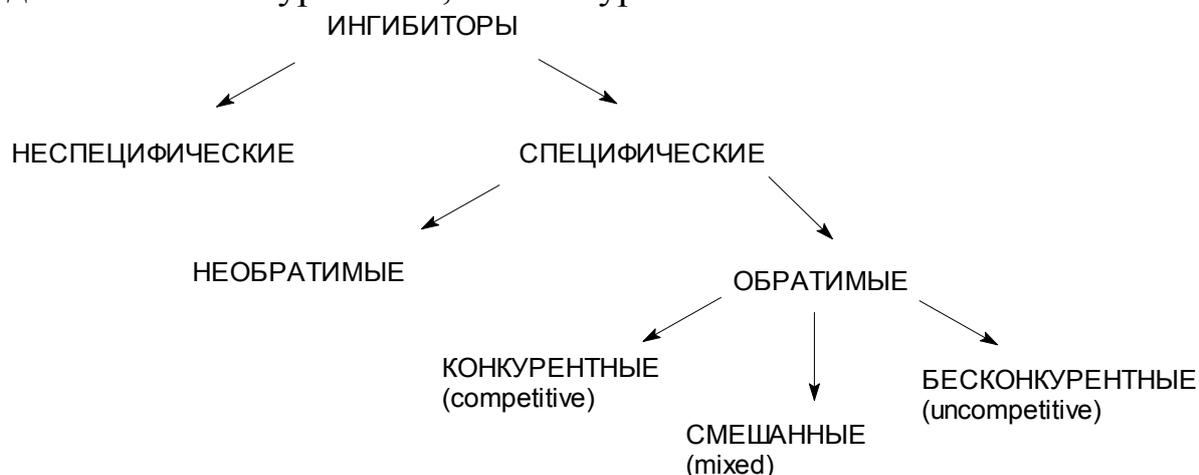
Таким образом, величину K_m можно вычислить из данных наклона прямой и длины отрезка, отсекаемого от оси ординат, или из длины отрезка, отсекаемого от оси абсцисс в области отрицательных значений. Следует подчеркнуть, что по методу двойных обратных величин значения V_{max} , как и величину K_m , можно определить более точно, чем по графику, построенному в прямых координатах (рис. 7). Поэтому данный метод нашел широкое применение в исследованиях ферментов.

4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Температура и рН относятся к неспецифическим факторам, так как в той или иной мере влияют на активность всех ферментов. Кроме того, существуют вещества, которые в очень низких концентрациях повышают активность ферментов (активаторы), или, напротив, снижают ее (ингибиторы). Активаторы и ингибиторы могут действовать в активном центре или в удалённом от него, аллостерическом центре молекулы фермента.

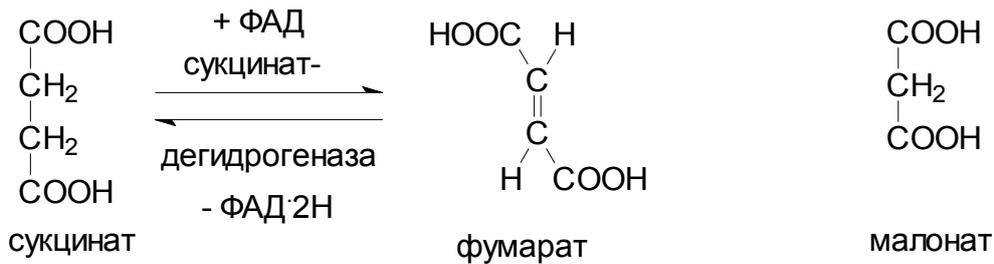
К числу веществ, повышающих активность ферментов, относятся катионы металлов или анионы и некоторые другие вещества. Чаще всего активаторами ферментов являются катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} и Na^{+} , а из анионов – Cl^{-} . Активаторы могут облегчать образование фермент-субстратного комплекса или стабилизировать его. Активатор тиоловых ферментов глутатион (трипептид γ -глутамилцистеилглицин) защищает активный центр фермента от действия окислителей и тем самым повышает его каталитическую активность. В отличие от коферментов и кофакторов активаторы усиливают каталитическое действие, но их отсутствие не препятствует протеканию ферментативной реакции.

Ингибиторы, замедляющие протекание ферментативной реакции, делятся на неспецифические (денатурирующие реагенты, инактивирующие все ферменты и вообще все белки) и специфические. Последние воздействуют лишь на определенные ферменты и делятся на необратимые и обратимые. Необратимые ковалентно модифицируют активный центр или всю молекулу фермента и после их удаления активность не восстанавливается. Обратимые временно тормозят работу фермента, поэтому их удаление приводит к восстановлению активности фермента. Обратимые ингибиторы делятся на конкурентные, бесконкурентные и смешанные:



4.1. Конкурентные (competitive) ингибиторы

Конкурентные (competitive) ингибиторы по своей структуре похожи на субстрат, встраиваются в активный центр фермента, но не подвергаются ферментативному превращению и блокируют его работу. Классическим примером подобной ситуации является ингибирование сукцинатдегидрогеназы малонатом, по структуре похожим на сукцинат:



Конкурентные ингибиторы могут быть похожи и на кофермент, также встраиваются в активный центр, но не способны осуществлять функции кофермента (как в случае изониазида и пиридоксамина). В любом случае такое ингибирование преодолевается повышением концентрации субстрата, т.к. при этом он вытесняется из активного центра, и максимальная скорость реакции сохраняется неизменной, но константа Михаэлиса, косвенно характеризующая сродство фермента к субстрату, увеличивается (а сродство соответственно уменьшается за счет наличия ингибитора):

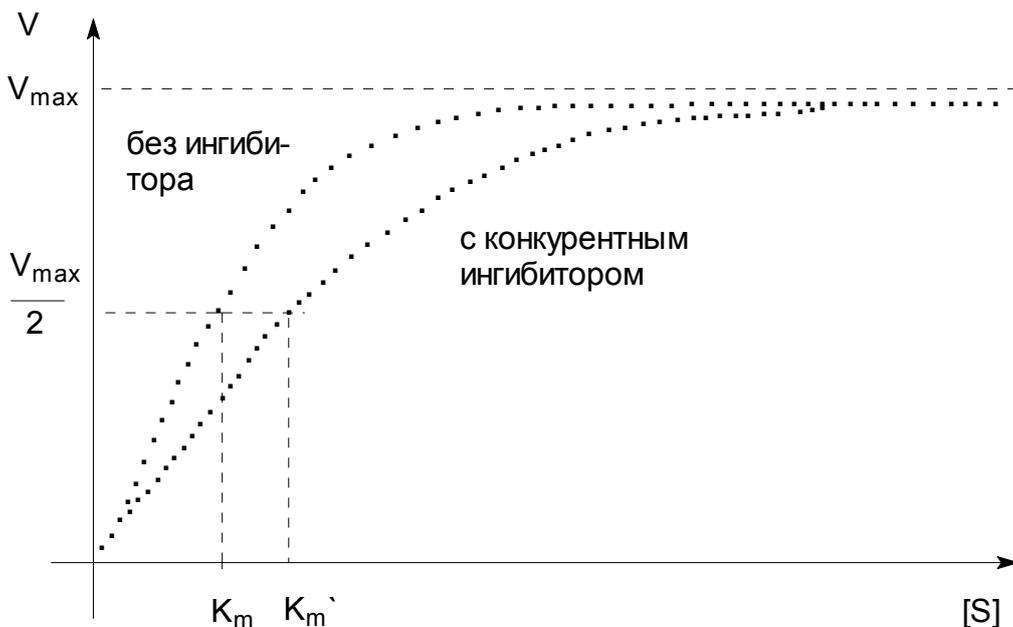


Рис. 9а. Конкурентное ингибирование.

В обратных координатах график будет выглядеть так:

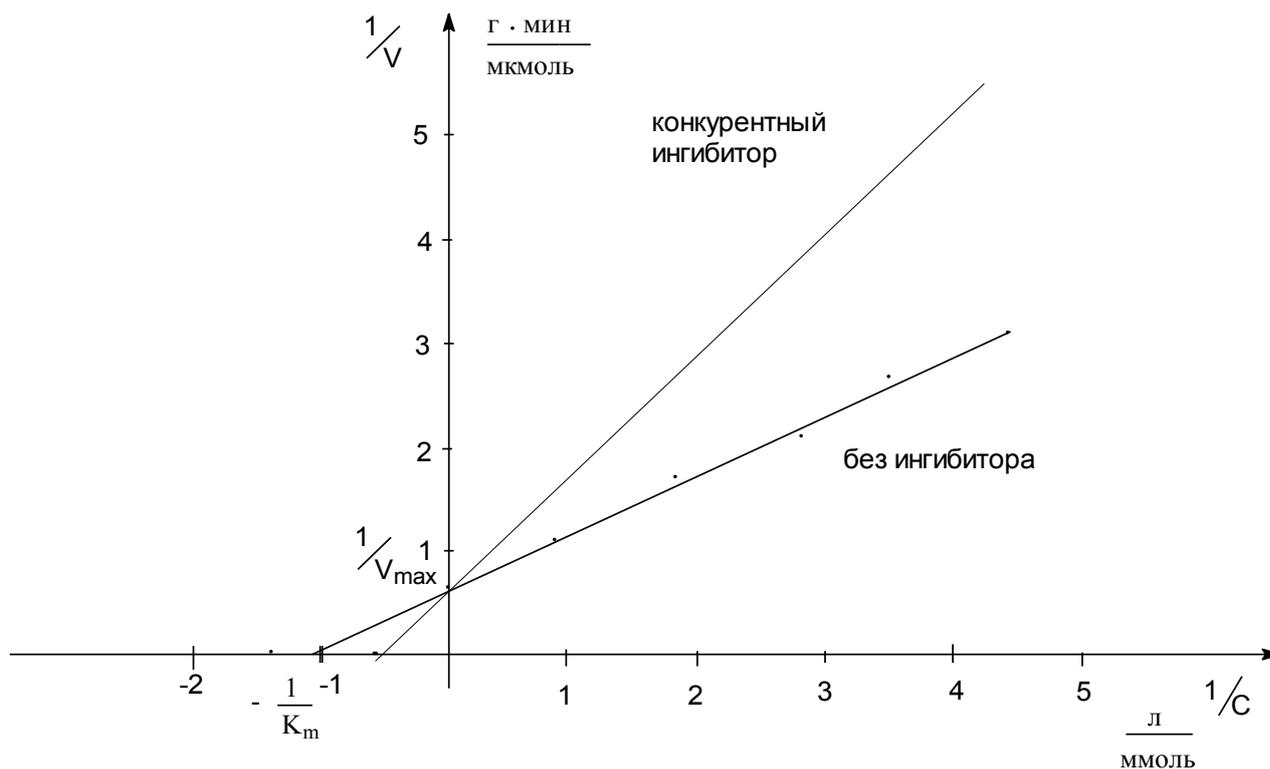
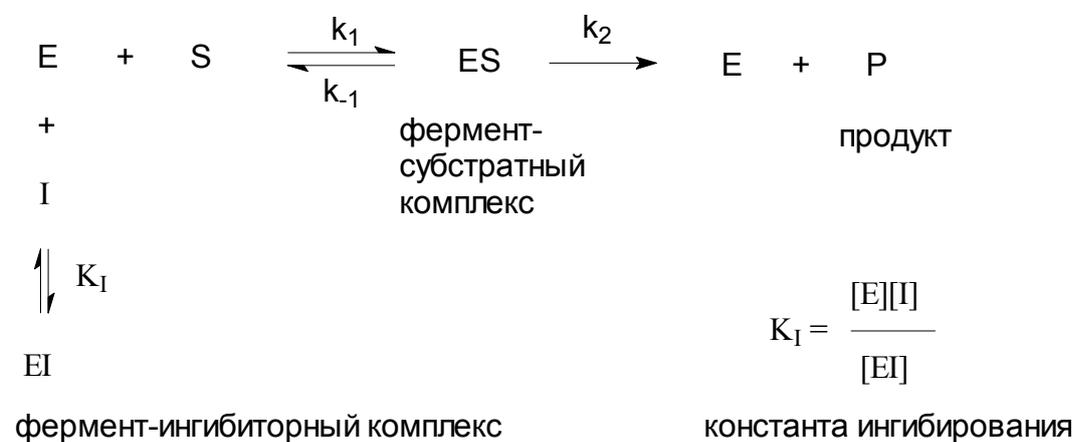


Рис. 9б. Конкурентное ингибирование в обратных координатах.

Конкурентное ингибирование может быть описано следующей кинетической схемой:



Запишем уравнение материального баланса по ферменту, в котором в данном случае будет три слагаемых:

$$\begin{aligned}
 [E]_0 &= [E] + [ES] + [EI] = [E] * \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [ES] \\
 [E]_0 * \frac{K_I}{[I] + K_I} &= [E] + [ES] * \frac{K_I}{[I] + K_I}
 \end{aligned}$$

Выразим отсюда $[E]$ и подставим в выражение константы Михаэлиса:

$$\frac{\left([E]_0 * \frac{K_I}{[I] + K_I} - [ES] * \frac{K_I}{[I] + K_I}\right) * [S]}{[ES]} = K_m$$

$$[S] * \frac{[E]_0}{[ES]} * \frac{K_I}{[I] + K_I} = K_m + [S] * \frac{K_I}{[I] + K_I}$$

Теперь выразим отсюда $[ES]$ и преобразуем выражение в форму, похожую на уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$[ES] = [E]_0 * \frac{K_I}{[I] + K_I} * \frac{[S]}{K_m + [S] * \frac{K_I}{[I] + K_I}}$$

$$[ES] = [E]_0 * \frac{[S]}{K_m * \frac{[I] + K_I}{K_I} + [S]}$$

$$V = V_{max} * \frac{[S]}{K_m * \frac{[I] + K_I}{K_I} + [S]}$$

$$K'_m = \frac{[I] + K_I}{K_I} * K_m$$

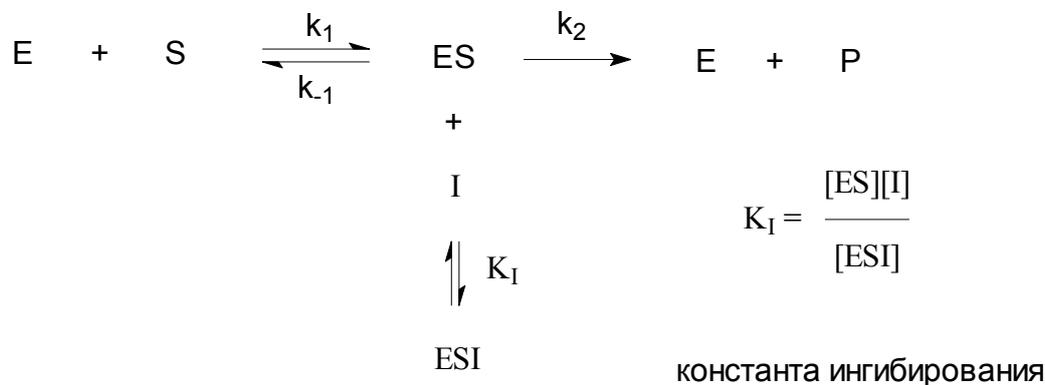
$$K_I = \frac{K_m}{K'_m - K_m} * [I]$$

Отсюда видно, что V_{max} при конкурентном ингибировании не изменяется, в то время как величина K_m увеличивается. По ее изменению можно рассчитать K_I .

4.2. Бесконкурентные (uncompetitive) ингибиторы

Бесконкурентные (uncompetitive) ингибиторы воздействуют не на активный центр фермента, а на фермент-субстратный комплекс,

соединяются с ним с образованием неактивного фермент-субстрат-ингибиторного комплекса ESI, что может быть описано следующей кинетической схемой:



Запишем уравнение материального баланса по ферменту, в котором в данном случае будет три слагаемых:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ESI] = [E] + [ES] * \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] * \frac{K_I + [I]}{K_I}$$

Выразим отсюда [E] и подставим в выражение константы Михаэлиса:

$$\frac{\left([E]_0 - [ES] * \frac{K_I + [I]}{K_I}\right) * [S]}{[ES]} = K_m$$

$$[S] * \frac{[E]_0}{[ES]} = K_m + [S] * \frac{K_I + [I]}{K_I}$$

Теперь выразим отсюда [ES] и преобразуем выражение в форму, похожую на уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$[ES] = [E]_0 * \frac{[S]}{K_m + [S] * \frac{K_I + [I]}{K_I}}$$

$$[ES] = [E]_0 * \frac{K_I}{[I] + K_I} * \frac{[S]}{K_m * \frac{K_I}{[I] + K_I} + [S]}$$

$$V = V_{max} * \frac{K_I}{[I] + K_I} * \frac{[S]}{K_m * \frac{K_I}{[I] + K_I} + [S]}$$

$$V'_{max} = \frac{K_I}{[I] + K_I} * V_{max}$$

$$K_I = \frac{K'_m}{K_m - K'_m} = \frac{V_{max}}{V_{max} - V'_{max}}$$

При этом графики зависимости V от $[S]$ в прямых и в обратных координатах будут выглядеть следующим образом:

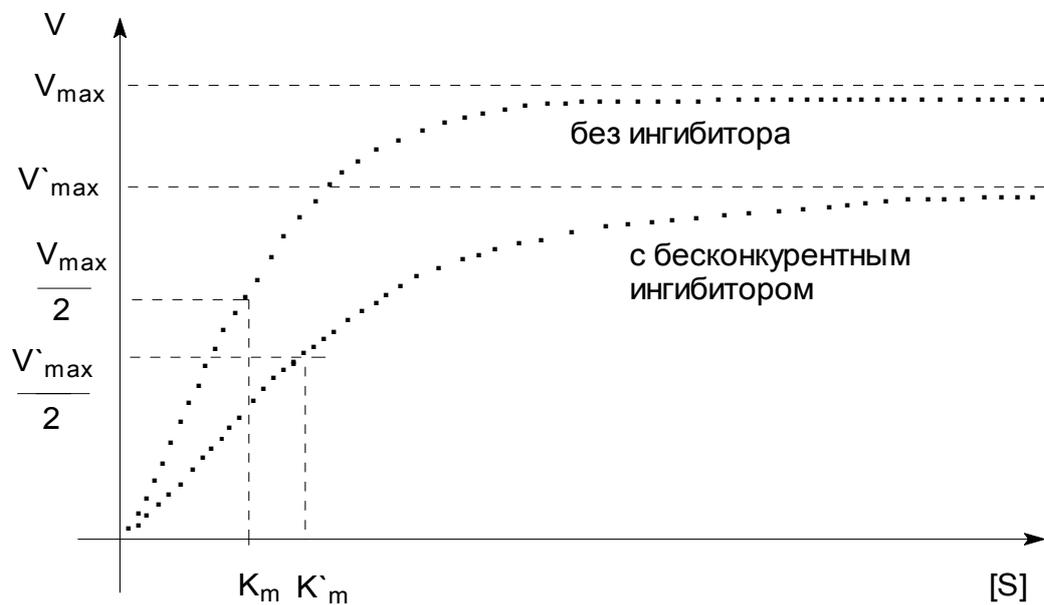


Рис. 10а. Бесконкурентное ингибирование.

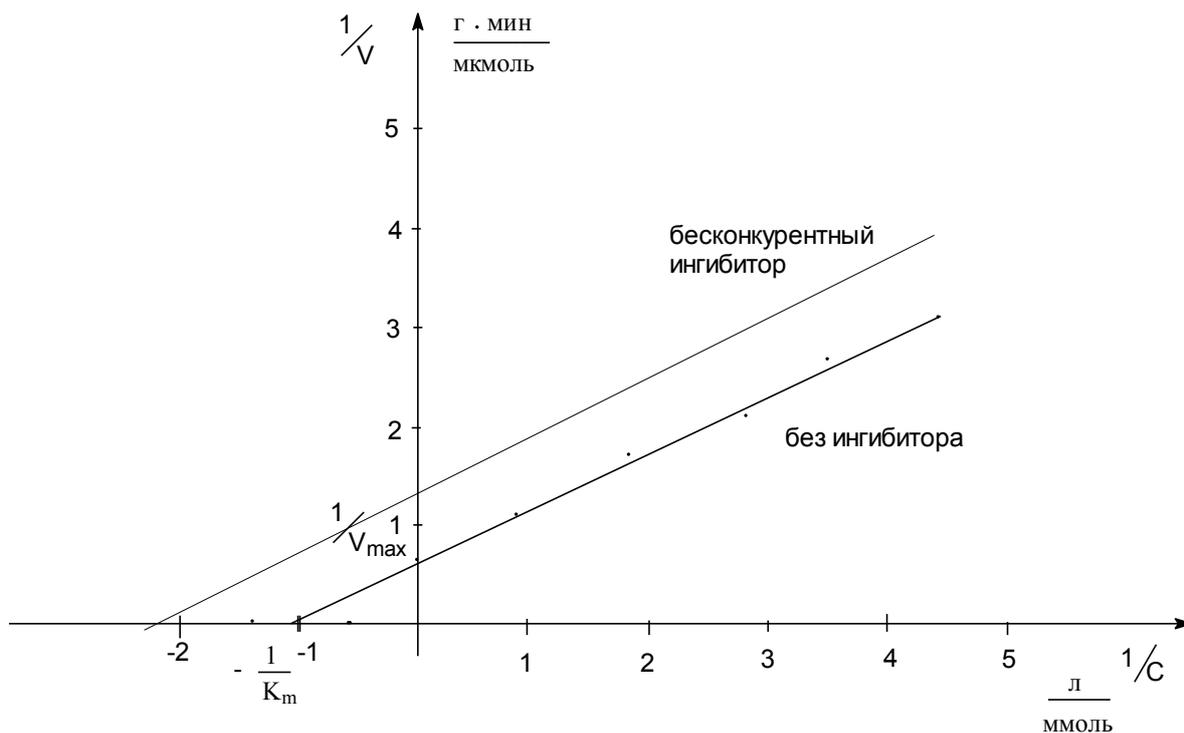


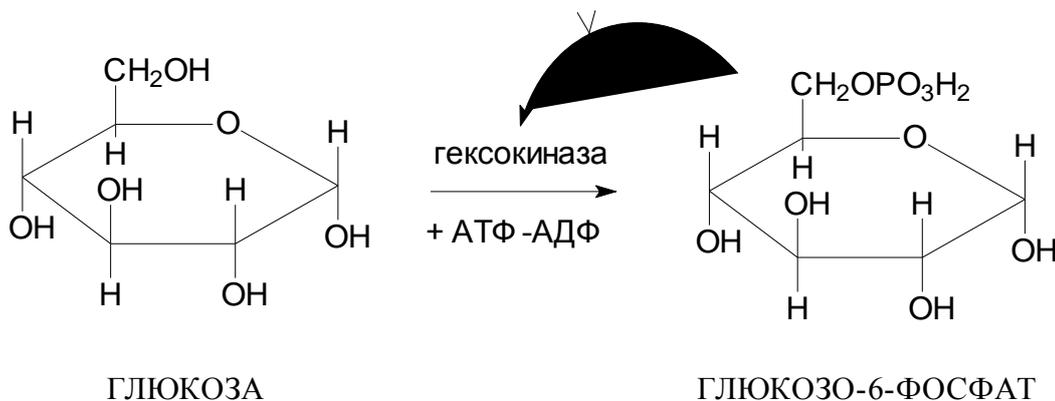
Рис. 10б. Бесконкурентное ингибирование в обратных координатах.

На этом графике прямые Лайнуивера-Бэрка идут параллельно, так как изменяются как максимальная скорость, так и константа Михаэлиса, причем оба параметра пропорционально уменьшаются и тангенс угла наклона прямой в итоге не изменяется. Уменьшение K_m говорит об увеличении сродства фермента к субстрату, но это происходит за счет непродуктивного связывания в неактивный комплекс ESI и в итоге скорость уменьшается.

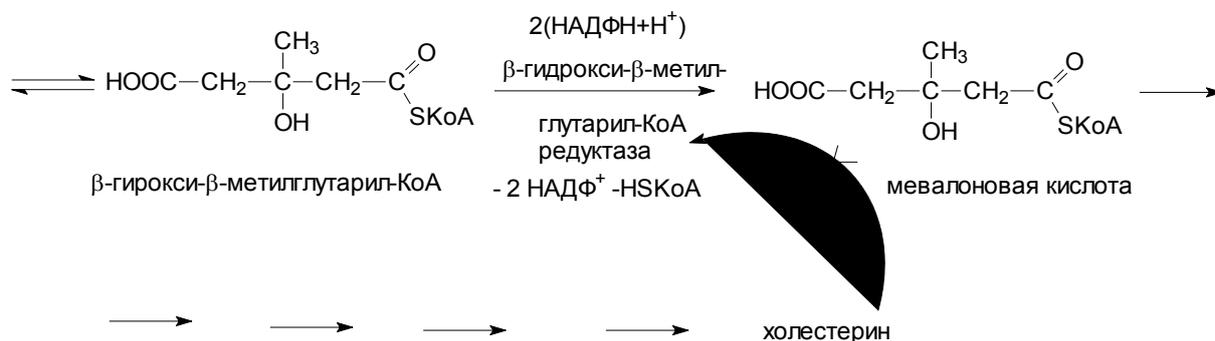
Часто встречается бесконкурентное аллостерическое ингибирование, т.е. связанное с воздействием на регуляторный аллостерический центр фермента, не имеющий отношение к активному центру и часто удаленный от него, но присоединение ингибитора ведет к изменению формы молекулы фермента и ухудшению пространственного соответствия с молекулой субстрата. Часто ингибирование ферментов производят продукты ферментативных реакций, что препятствует синтезу избытка продукта (регуляция по принципу обратной связи):



При этом роль ингибитора может играть не обязательно продукт работы данного фермента, как, например, глюкозо-6-фосфат для гексокиназы:



Конечный продукт всей цепочки превращений может подавлять активность первого фермента цепочки или катализирующего лимитирующую (самую медленную), часто необратимую стадию процесса, как, например, β -гидрокси- β -метилглутарилкоэнзим А редуктаза ингибируется холестерином, в синтезе которого играет лимитирующую роль:

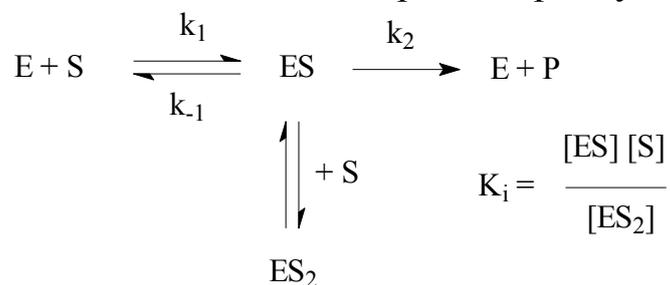


Следует отметить, что кинетические исследования предполагают минимальную степень конверсии субстрата в продукт, чтобы исключить влияние обратимости или ингибирование продуктом, и вид графика Лайнуивера-Бэрка будет отклоняться от линейности лишь при несоблюдении этого условия и накоплении в смеси существенных количеств продукта.

Иногда может наблюдаться и ингибирование субстратом. При этом на графике зависимости скорости от концентрации субстрата в области больших концентраций происходит уменьшение скорости, и на графике будет наблюдаться максимум.

Субстратное ингибирование (ингибирование избытком субстрата) можно рассматривать в качестве частного случая бесконкурентного ингибирования. Помимо изменения свойств среды

при больших $[S]$ причиной такого явления может быть образование неактивного комплекса с двумя молекулами субстрата ES_2 и тогда субстрат фактически играет роль бесконкурентного ингибитора, а кинетическая схема весьма похожа на рассмотренную:



Здесь K_i – константа ингибирования субстратом, то есть константа диссоциации двойного фермент-субстратного комплекса. Проведем для этого случая вывод уравнения Михаэлиса-Ментен:

$$\begin{aligned}
 V &= k_2[ES] \\
 V_{max} &= k_2[E]_0 \\
 k_1[E][S] &= k_{-1}[ES] + k_2[ES]
 \end{aligned}$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$$

Запишем уравнение материального баланса по ферменту, в котором в данном случае будет три слагаемых:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [ES_2] = [E] + [ES] * \left(1 + \frac{[S]}{K_{I2}} \right)$$

Выразим отсюда $[E]$ и подставим в выражение константы Михаэлиса:

$$\frac{\left([E]_0 - [ES] * \frac{K_I + [S]}{K_I} \right) * [S]}{[ES]} = K_m$$

$$[S] * \frac{[E]_0}{[ES]} = K_m + [S] * \frac{K_I + [S]}{K_I}$$

Теперь выразим отсюда $[ES]$ и преобразуем выражение в форму, похожую на уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$[ES] = [E]_0 * \frac{[S]}{K_m + [S] * \left(1 + \frac{[S]}{K_I} \right)}$$

$$V = V_{max} * \frac{[S]}{K_m + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$$

График зависимости в прямых величинах будет в этом случае иметь максимум, но достигнуть V_{max} будет невозможно:

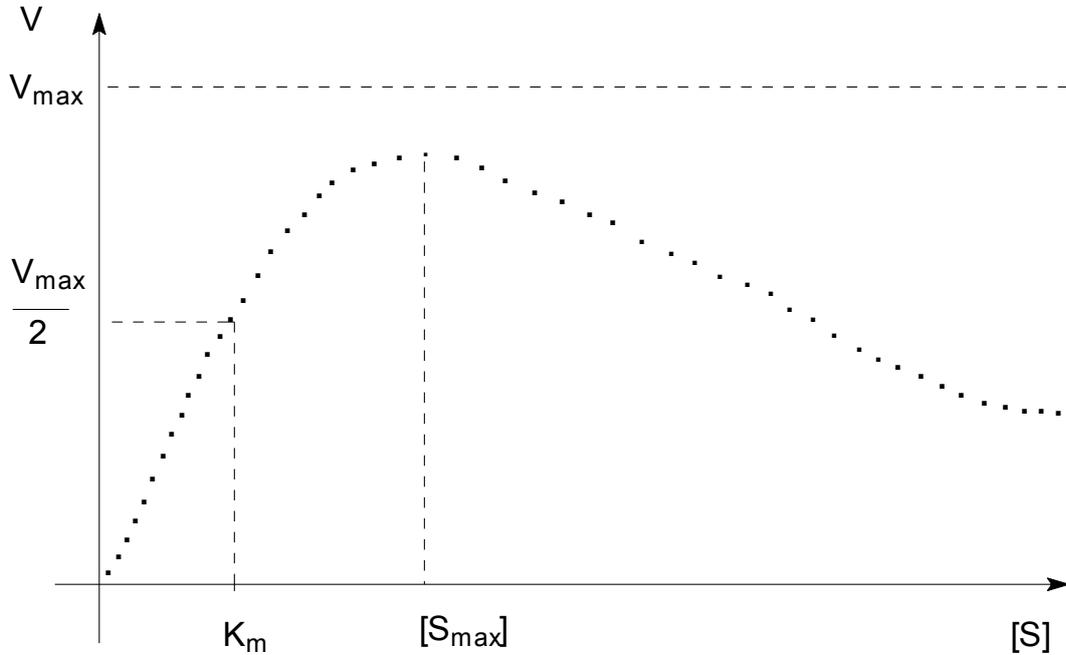


Рис. 11а. Субстратное ингибирование.

Тогда уравнение Лайнуивера-Бэрка будет иметь следующий вид:

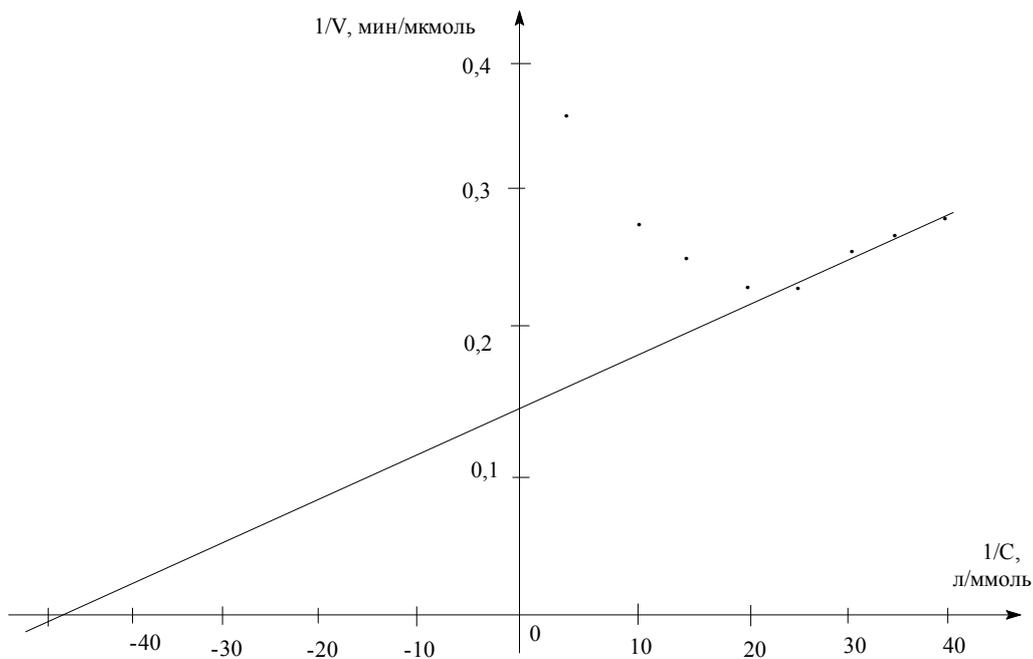


Рис. 11б. Субстратное ингибирование в обратных координатах.

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} * \left(1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_I} \right)$$

При этом на графике Лайнуивера-Бэрка в области больших концентраций субстрата наблюдается отклонение от линейности.

Для того, чтобы найти $[S]$, соответствующую минимуму, продифференцируем обратную скорость (обозначим ее y) по обратной концентрации (обозначим ее x). В точке экстремума производная обращается в ноль. Исходя из этого находят концентрацию субстрата, при которой кривая имеет минимум $[S_{min}]$:

$$\frac{1}{V} = y \frac{1}{[S]} = x$$

$$y = \frac{1}{V_{max}} \left(1 + K_m * x + \frac{1}{x * K_I} \right)$$

$$\frac{dy}{dx} = \frac{1}{V_{max}} \left(K_m * \frac{1}{x^2 * K_I} \right) = \frac{1}{V_{max}} \left(K_m - \frac{[S]^2}{K_I} \right) = 0$$

$$[S_{min}] = \sqrt{K_m * K_I}$$

$$K_I = \frac{[S_{min}]^2}{K_m}$$

Непосредственно по графику рассчитать K_i невозможно, т. к. на первом участке кривой зависимость не является линейной. Однако в точке минимума на графике Лайнуивера-Бэрка производная $d(1/V)/d(1/[S])$ обращается в ноль. Отсюда следует, что $K_i = [S_{min}]^2 / K_m$. Это дает возможность рассчитать константу ингибирования исходя из точки экстремума на графике.

Впрочем, следует заметить, что ингибирование субстратом – нечастое явление, физиологический смысл которого не вполне ясен (как полагают, это может предотвращать чрезмерный синтез биологически активных продуктов при больших концентрациях субстрата).

Кинетические параметры реакции определяются экстраполяцией линейного участка графика в области малых концентраций до пересечения с осями, как и в обычном случае.

Иногда наблюдается, наоборот, активация субстратом (рис. 12).

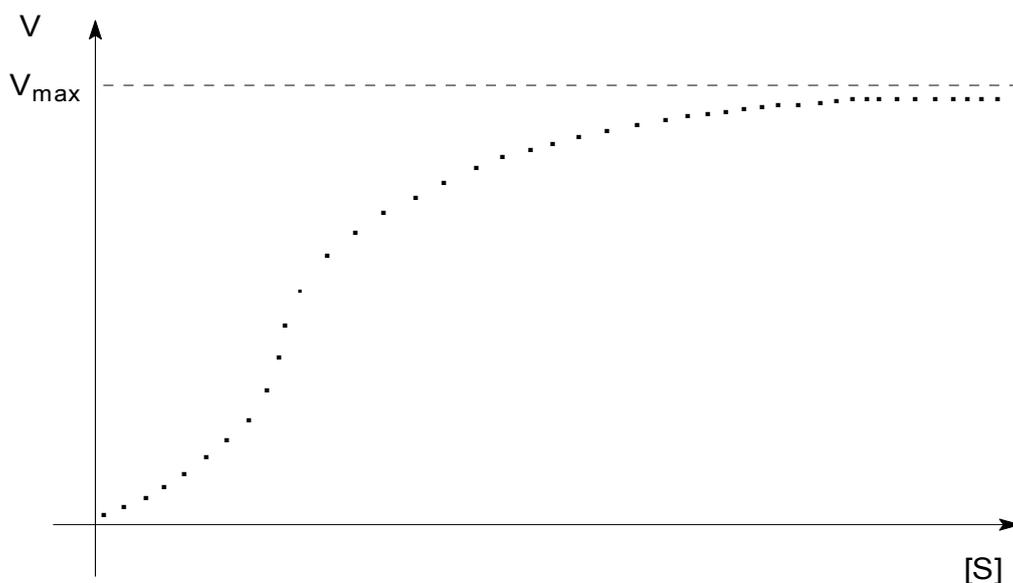
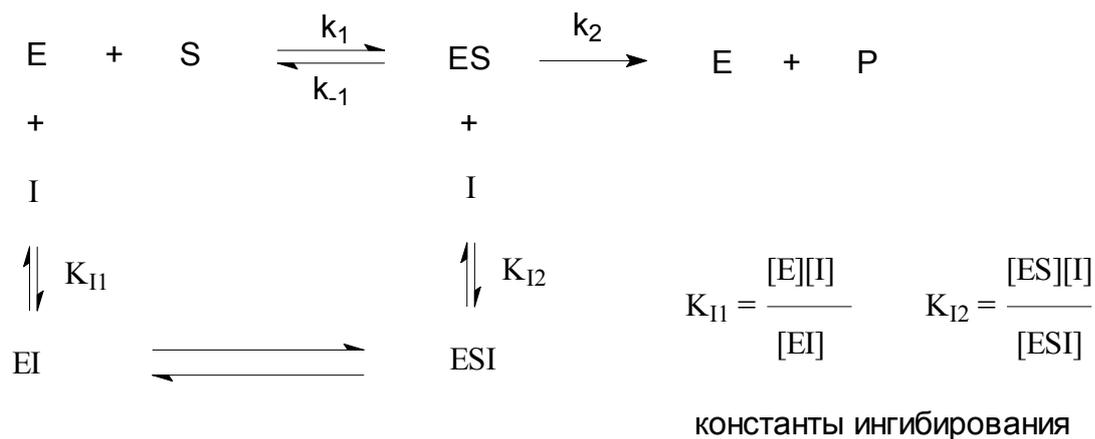


Рис. 12. Активация фермента субстратом.

Обычно это бывает для ферментов, содержащих несколько активных центров (например, НАД-зависимые лактатдегидрогеназа и алкогольдегидрогеназа дрожжей состоят из четырех субъединиц с четырьмя активными центрами). Тогда присоединение первой молекулы субстрата облегчает присоединение второй и так далее. Этот эффект называется кооперативным. Он проявляется в белках четвертичной структуры и, в частности, характерен для присоединения кислорода к гемоглобину, содержащему четыре гема. В этом случае на графиках зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, построенных в прямых координатах, наблюдается S-образная зависимость, похожая на кривую диссоциации оксигемоглобина.

4.3. Смешанное (mixed) ингибирование

Нередко наблюдается смешанное (mixed) ингибирование, когда ингибитор взаимодействует и с самим ферментом, и с фермент-субстратным комплексом. При этом константы диссоциации (ингибирования) обоих комплексов могут и не совпадать. Это описывается следующей кинетической схемой:



Сделаем вывод уравнения Михаэлиса-Ментен для этого случая:

$$K_{I1} = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$K_{I2} = \frac{[ES][I]}{[ESI]}$$

$$V = k_2[ES]$$

$$V_{max} = k_2[E]_0$$

$$k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m$$

Запишем уравнение материального баланса по ферменту, в котором в данном случае будет четыре слагаемых:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI] + [EIS] = [E] * \left(1 + \frac{[I]}{K_{I1}}\right) + [ES] * \left(1 + \frac{[I]}{K_{I2}}\right)$$

Выразим отсюда [E] и подставим в выражение константы Михаэлиса:

$$\begin{aligned}
 [E]_0 * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}} &= [E] + [ES] * \frac{K_{I2} + [I]}{K_{I2}} * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}} \\
 \left([E]_0 * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}} - [ES] * \frac{K_{I2} + [I]}{K_{I2}} * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}} \right) * [S] &= K_m [ES]
 \end{aligned}$$

$$[S] * \frac{[E]_0}{[ES]} * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}} = K_m + [S] * \frac{K_{I2} + [I]}{K_{I2}} * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}}$$

Теперь выразим отсюда [ES] и преобразуем выражение в форму, похожую на уравнение Михаэлиса-Ментен:

$$[ES] = [E]_0 * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}} * \frac{[S]}{K_m + [S] * \frac{K_{I2} + [I]}{K_{I2}} * \frac{K_{I1}}{[I] + K_{I1}}}$$

$$[ES] = [E]_0 * \frac{K_{I2}}{[I] + K_{I2}} * \frac{[S]}{K_m * \frac{[I] + K_{I1}}{K_{I1}} * \frac{K_{I2}}{[I] + K_{I2}} + [S]}$$

$$V = V_{max} * \frac{K_{I2}}{[I] + K_{I2}} * \frac{[S]}{K_m * \frac{[I] + K_{I1}}{K_{I1}} * \frac{K_{I2}}{[I] + K_{I2}} + [S]}$$

$$V'_{max} = \frac{K_{I2}}{[I] + K_{I2}} * V_{max}$$

$$K'_m = \frac{[I] + K_{I1}}{K_{I1}} * \frac{K_{I2}}{[I] + K_{I2}} * K_m$$

Отсюда видно, что и K_m и V_{max} изменяются, но в неодинаковой степени, поэтому прямые не будут параллельными, а точка их пересечения будет зависеть от соотношения констант ингибирования. Если связывание с ферментом более прочное, то K_m увеличивается и прямые будут пересекаться в 2 квадранте (рис. 13а), а если более прочное связывание с фермент-субстратным комплексом, то K_m уменьшается (как при бесконкурентном ингибировании) и прямые пересекутся в 3 квадранте (рис. 13б).

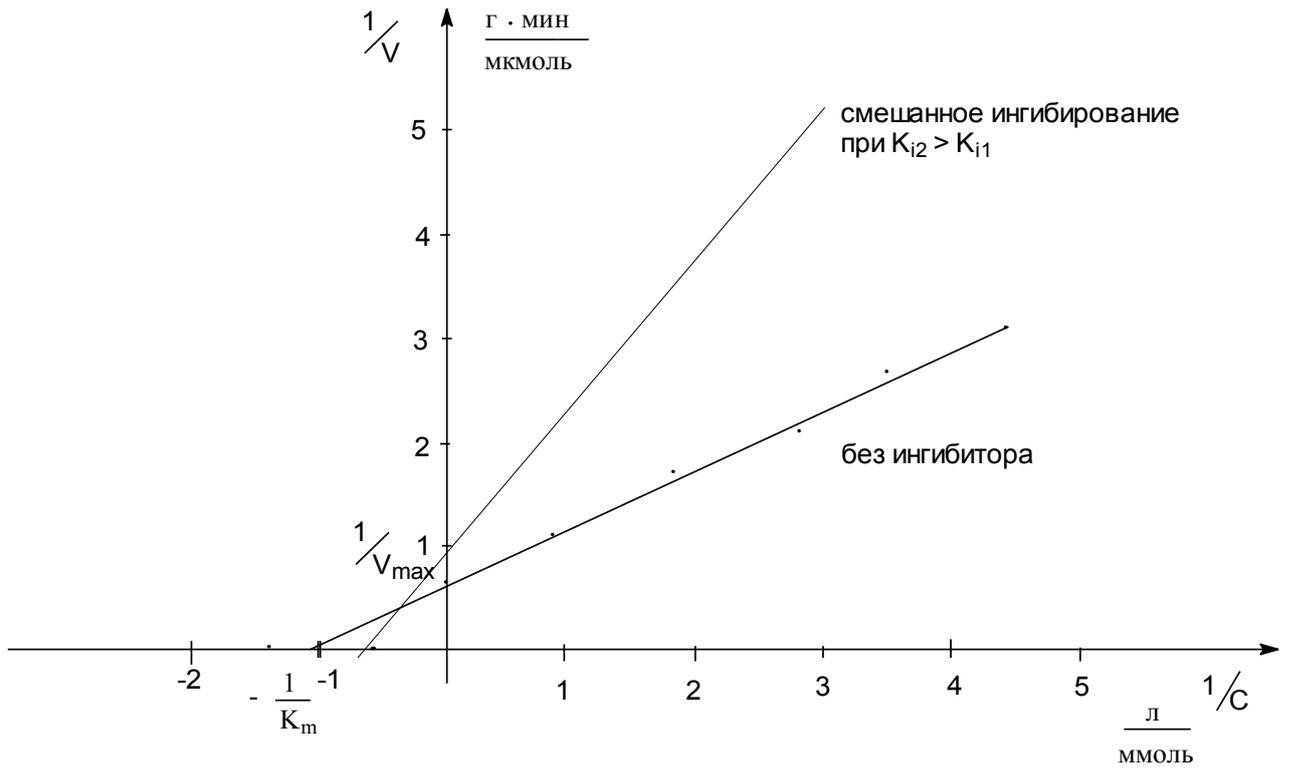


Рис. 13а. Смешанное ингибирование при более прочном связывании ингибитора с ферментом.

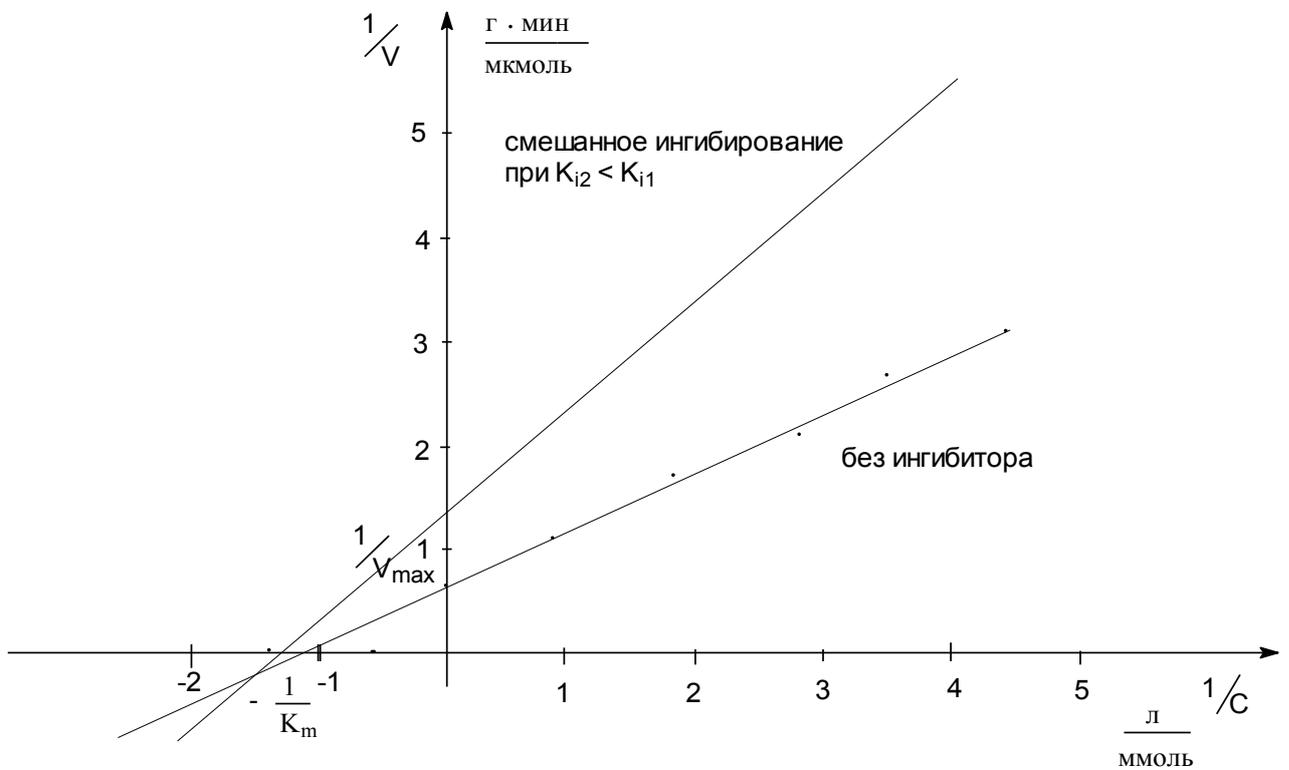


Рис. 13б. Смешанное ингибирование при более прочном связывании ингибитора с фермент-субстратным комплексом.

Если же константы ингибирования численно совпадают, то полученное выражение значительно упрощается:

$$V = V_{max} * \frac{K_I}{[I] + K_I} * \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$$V'_{max} = \frac{K_I}{[I] + K_I} * V_{max}$$

$$K_I = \frac{V'_{max}}{V_{max} - V'_{max}} * [I]$$

В прямых координатах зависимость величины максимальной скорости реакции от концентрации субстрата следующая:



Рис. 14а. Смешанное ингибирование при равных константах связывания.

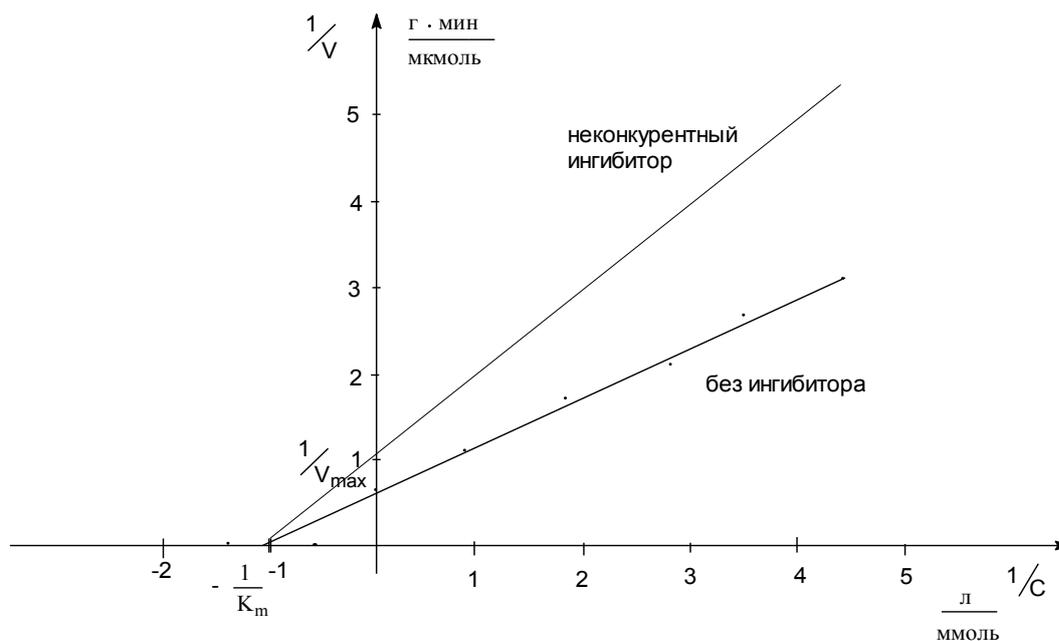


Рис. 14б. Смешанное ингибирование при равных константах связывания в обратных координатах.

Таким образом, неконкурентное ингибирование – частный случай смешанного при численном совпадении обоих констант ингибирования.

5. Основные свойства ферментов

5.1. Отличия ферментов от неорганических катализаторов

От неорганических катализаторов ферменты отличаются рядом характерных особенностей, которые перечислены ниже.

Ферменты чрезвычайно эффективны и проявляют в $10^8 - 10^{20}$ раз более высокую каталитическую активность: 1 молекула фермента может превратить от 1000 до 1 млн. молекул субстрата за 1 минуту. Эта скорость недостижима для небиологических катализаторов.

Ферменты проявляют каталитическую активность в условиях умеренной температуры (температура тела), нормального давления и в области близких к нейтральным значениям pH среды.

Ферменты отличаются высокой специфичностью действия в отношении как химической природы субстрата, так и типа реакции, т.е. каждый фермент катализирует в основном только определенную химическую реакцию.

Ферменты термолабильны и неустойчивы по отношению к кислотам и щелочам.

Активность ферментов в клетках строго контролируется: воздействуя на фермент, можно регулировать скорость соответствующей реакции.

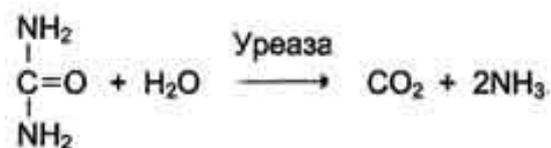
Ферменты не вызывают в отличие от неорганических катализаторов каких-либо побочных реакций.

Скорость ферментативной реакции прямо пропорциональна количеству фермента.

5.2. Специфичность действия ферментов

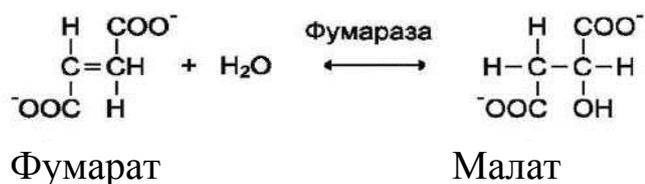
По субстратной специфичности – способности избирательно ускорять определенную реакцию – различают ферменты, обладающие **абсолютной специфичностью** (т.е. действующие только на одно конкретное вещество и катализирующие только определенное превращение этого вещества), и ферменты, обладающие **относительной или групповой специфичностью** (т.е. катализирующие превращения молекул, обладающих определенным сходством) и **стереоспецифичностью**.

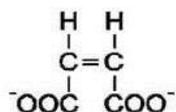
Так, ферментом с абсолютной специфичностью являются уреаза, катализирующая гидролиз мочевины:



Относительная субстратная специфичность характерна для многих ферментов, катализирующих превращение группы субстратов сходной химической структуры. Например, алкогольдегидрогеназа катализирует превращение этанола и других алифатических спиртов, но с разной скоростью.

Примером стереохимической субстратной специфичности является фумаратгидратаза, которая катализирует превращение только одного стереоизомера субстрата:





Малеинат

Фермент катализирует присоединение молекулы воды к кратной связи транс-аниона фумаровой кислоты, но не к ее стереоизомеру – цис-аниону малеиновой кислоты. Фермент лактатдегидрогеназа катализирует превращение только L-формы молочной кислоты, но полностью инертен к ее D-форме.

5.3. Термолабильность ферментов

Чувствительность к изменению температуры, является одним из характерных свойств ферментов.

Оптимальной температурой для действия большинства ферментов является 37 – 45 °С (рис. 15). При низких температурах (0° или ниже) ферменты, как правило, не денатурируются, хотя активность их падает почти до нуля.

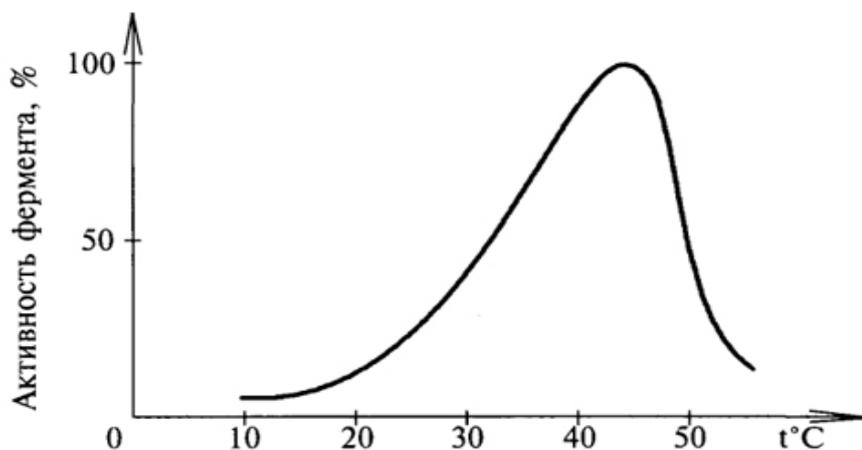


Рис. 15. Зависимость скорости ферментативной реакции от температуры

На восходящем участке кривой скорость ферментативной реакции по закону действующих масс пропорциональна температуре, нисходящая ветвь кривой обусловлена в основном денатурацией фермента и, как следствие, дезинтеграцией его активного центра.

5.4. Влияние рН среды на активность ферментов

Ферменты крайне чувствительны к изменению концентрации водородных ионов. При этом меняется степень ионизации функциональных групп в боковых радикалах аминокислотных остатков, особенно в активном центре фермента, что приводит к изменению конформации белковой макромолекулы. Изменение рН влияет также на степень связывания фермента с субстратом. Как и температурная зависимость, рН-зависимость скорости ферментативной реакции имеет колоколообразную форму (рис. 16).

Функциональные группы активного центра фермента наиболее эффективно взаимодействуют с субстратом, имея оптимальную степень ионизации, обусловленную соответствующим значением рН. Это соответствует максимальной скорости реакции; отклонение от этих значений приводит к снижению скоростей реакций, а при крайних значениях рН – и к денатурации белка-фермента.

Влияние рН на образование фермент-субстратного комплекса, кроме ионизации функциональных группировок фермента, может оказывать существенное влияние на определенные группы субстрата, что также влияет на скорость реакции.

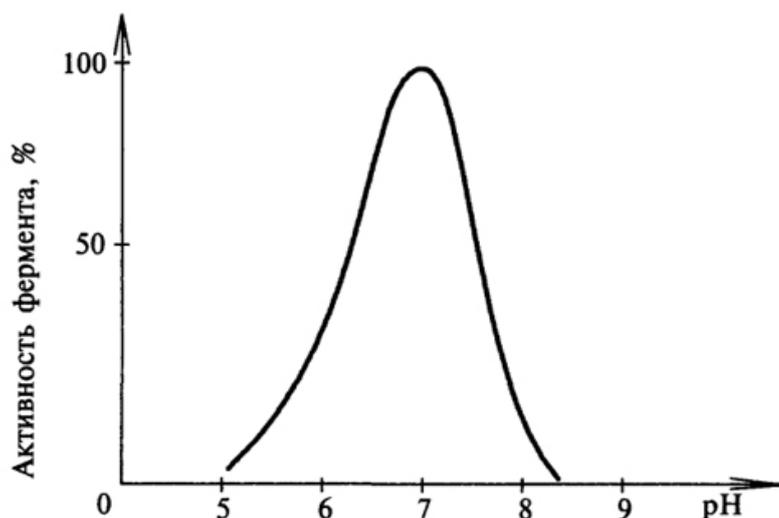


Рис. 16. Зависимость скорости ферментативной реакции от рН среды.

При графическом изображении на кривой колоколообразной формы имеется определенная точка, при которой фермент проявляет максимальную активность; эту точку называют оптимумом рН среды

для действия данного фермента (рис. 16). В табл. 2 приведены оптимальные значения pH среды для ряда ферментов.

Таблица 2.

Оптимумы pH среды для действия
некоторых ферментов

<i>Фермент</i>	<i>pH</i>
Пепсин	1,5–2,5
Амилаза слюны	6,8–7,0
Амилаза из солода	4,9–5,2
Уреаза	7,0–7,2
Липаза панкреатическая	7,0–8,5
Трипсин	7,5–8,5
Аргиназа	9,5–10,0

6. Классификация и номенклатура ферментов

Международный союз биохимии и молекулярной биологии в 1961 г. разработал систематическую номенклатуру, согласно которой все ферменты разбиты на 6 основных классов в зависимости от типа катализируемой химической реакции.

Каждый фермент имеет общепринятое рабочее название, и систематическое, применяемое для однозначной идентификации фермента. Рабочие названия образуются из объединения названия субстрата, типа реакции и окончания "-аза". Например: ЛАКТАТ + ДЕГИДРОГЕНИзация + АЗА = ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА. Систематическое название фермента формируется следующим образом: название субстратов: название типа химического превращения + аза. Та же лактатдегидрогеназа будет иметь систематическое название "L-ЛАКТАТ:НАД⁺ОКСИДОРЕДУКТАЗА".

Каждый из шести классов ферментов имеет свой порядковый номер, строго закреплённый за ним.

I. **Оксидоредуктазы** – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. с участием двух субстратов (перенос e⁻ или атомов водорода с одного субстрата на другой). К числу оксидоредуктаз относятся дегидрогеназы,

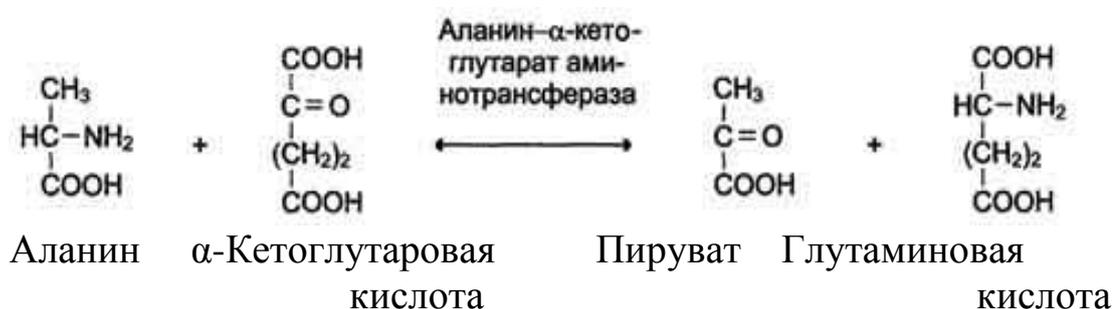
участвующие в энергетических процессах. В этот подкласс входят ферменты, катализирующие реакции дегидрирования (отщепления водорода). Все ферменты этой группы обладают высокой субстратной специфичностью.

Пример реакции:

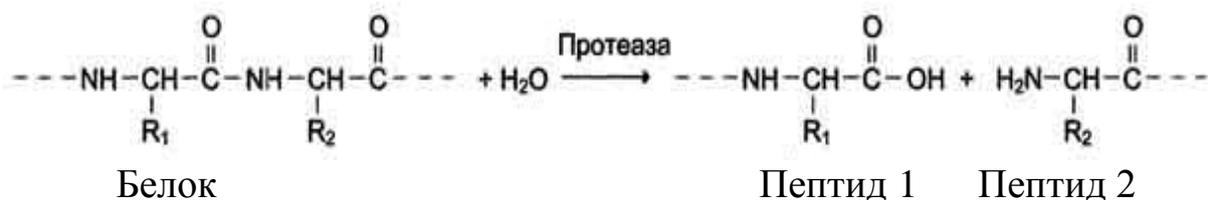


II. **Трансферазы** – ферменты, которые катализируют обратимые реакции внутримолекулярного или межмолекулярного переноса атомов или группы атомов. Подразделяют в зависимости от переносимой группы: аминотрансферазы, ацилтрансферазы, метилтрансферазы, фосфотрансферазы (киназы).

Пример реакции:



III. **Гидролазы** – ферменты, катализирующие реакции гидролиза, т.е. реакции расщепления веществ с присоединением элементов воды по месту расщепляемой связи. Пример реакции:



Наименование ферментов составляют по формуле "субстрат-гидролаза" или прямым присоединением к названию субстрата суффикса "аза", например протеаза, липаза, фосфолипаза, рибо-

нуклеаза. Для отдельных классов гидролаз применимы специальные термины, характеризующие гидролиз определённой химической связи: эстеразы, фосфатазы и др.

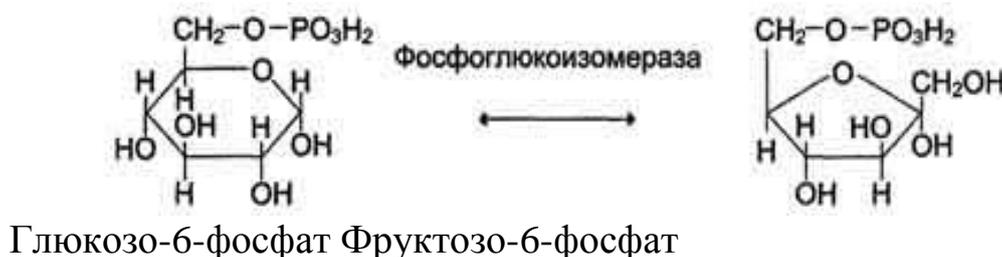
Гидролазы широко представлены в живых организмах. К ним относятся ферменты, участвующие в переваривании белков, углеводов, и липидов в желудочно-кишечном тракте (протеазы, гликозидазы и липазы соответственно). Многие гидролазы применяются в пищевых технологиях.

IV. **Лиазы** – ферменты, катализирующие отщепление от субстратов негидролитическим путём определённой группы или присоединение молекулы воды по двойной связи. При отщеплении могут элиминироваться CO_2 , H_2O , NH_2 , SH_2 и другие группы.

Пример реакции:

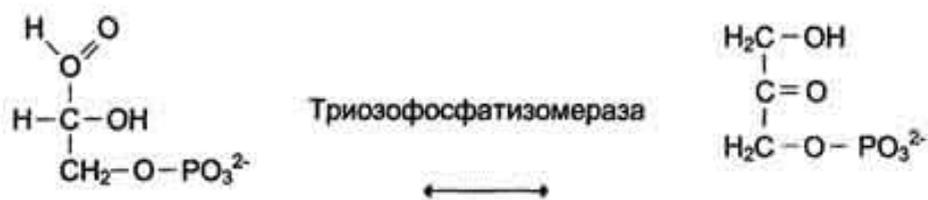


V. **Изомеразы** – ферменты, которые катализируют различные внутримолекулярные превращения. Подразделяют в зависимости от типа реакции изомеризации. Например, фермент фосфоглюкоизомераза катализирует изомерные превращения гексоз:



Изомеразы могут катализировать внутримолекулярные окислительно-восстановительные реакции, осуществляя взаимопревращения альдоз и кетоз, или перемещения двойных связей внутри молекулы.

Пример реакции:



Глицеральдегид-3-фосфат

Дигидроксиацетонфосфат

Когда изомеризация состоит во внутримолекулярном переносе группы, фермент называют «мутазой».

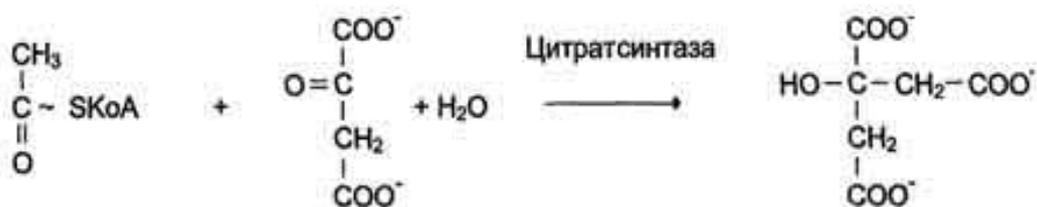
VI. **Лигазы (синтетазы)** – ферменты, которые катализируют реакции присоединения двух молекул с образованием ковалентной связи. Этот процесс энергозависимый и сопряжён с разрывом фосфоэфирной связи в молекуле АТФ или с разрывом макроэргических связей других соединений. Пример реакции с использованием энергии гидролиза АТФ:



Глутаминовая кислота

Глутамин

Пример реакции, в которой используется энергия макроэргической связи, заключённой в молекуле субстрата:



Ацетил-КоА

Оксалоацетат

Цитрат

Разделение ферментов на классы строгое и не допускает произвольного изменения номеров. Каждый класс состоит из многочисленных подклассов и подподклассов с учётом химической группы субстрата, превращение которой катализирует фермент, донора и акцептора преобразуемых группировок и т.д. Например, гидролазы (класс 3) по типу гидролизуемых субстратов делятся на ферменты, катализирующие гидролиз эфиров карбоновых кислот (подкласс 3.1), гликозидов (подкласс 3.2), простых эфиров и тиоэфиров

(подкласс 3.3), пептидов (подкласс 3.4) и т.д. В свою очередь, подклассы делятся на подподклассы, а внутри подподклассов каждый фермент получает порядковый номер (последняя цифра шифра).

Шифр фермента состоит из четырех групп цифр, разделенных точками. Первая цифра обозначает отнесение фермента к классу, вторая – к подклассу, третья – к подподклассу, четвертая – порядковый номер фермента. Например, шифр фермента глюкозооксидазы по классификации: КФ 1.1.3.4.

Таблица 3.

Примеры ферментативных реакций

Тип химической реакции	Фермент	Источник	Катализируемая реакция
Гидролиз	Трипсин	Тонкий кишечник	Белки + H ₂ O → Разные полипептиды
Гидролиз	α-Амилаза	Пшеница, ячмень, батат и т.д.	Крахмал + H ₂ O → Гидролизат крахмала + Мальтоза
Гидролиз	Тромбин	Кровь	Фибриноген + H ₂ O → Фибрин + 2 Полипептида
Гидролиз	Липазы	Кишечник, семена с большим содержанием жиров, микроорганизмы	Жиры + H ₂ O → Жирные кислоты + Глицерин
Гидролиз	Щелочная фосфатаза	Почти все клетки	Органические фосфаты + H ₂ O → Дефосфорилированный продукт + Неорганический фосфат

Гидролиз	Уреаза	Некоторые растительные клетки и микроорганизмы	Мочевина + H ₂ O → Аммиак + Диоксид углерода
Фосфоролиз	Фосфорилаза	Ткани животных и растений, содержащие полисахариды	Полисахарид (крахмал или гликоген из <i>n</i> молекул глюкозы) + Неорганический фосфат → Глюкозо-1-фосфат + Полисахарид (<i>n</i> - 1 глюкозных единиц)
Декарбоксилирование	Декарбоксилаза	Дрожжи, некоторые растения и микроорганизмы	Пировиноградная кислота → Ацетальдегид + Диоксид углерода
Конденсация	Альдолаза	Все животные клетки; многие растения и микроорганизмы	2 Триозофосфат → Гексозодифосфат
Конденсация	Оксалоацетат - трансацетилаза	То же	Щавелевоуксусная кислота + Ацетилкофермент А → Лимонная кислота + Кофермент А
Изомеризация	Фосфогексозо- изомераза	То же	Глюкозо-6-фосфат Фруктозо-6- фосфат

Гидратация	Фумараза	То же	Фумаровая кислота + H ₂ O → Яблочная кислота
Гидратация	Карбоангидраза	Разные ткани животных; зеленые листья	Диоксид углерода + H ₂ O → Угольная кислота
Фосфорилирование	Пируваткиназа	Почти все (или все) клетки	АТФ + Пировиноградная кислота → Фосфоенолпировиноградная кислота + АДФ
Перенос фосфатной группы	Фосфоглюкомутаза	Все животные клетки; многие растения и микроорганизмы	Глюкозо-1-фосфат → Глюкозо-6-фосфат
Трансаминирование	Трансаминаза	Большинство клеток	Аспарагиновая кислота + Пировиноградная кислота → Щавелевоуксусная кислота + Аланин
Синтез, сопряженный с гидролизом АТФ	Глутаминсинтетаза	То же	Глутаминовая кислота + Аммиак + АТФ → Глутамин + АДФ + Неорганический фосфат
Окисление-восстановление	Цитохром-оксидаза	Все животные клетки, многие растения и микроорганизмы	O ₂ + Восстановленный цитохром c → Окисленный цитохром c + H ₂ O

Окисление-восстановление	Оксидаза аскорбиновой кислоты	Многие растительные клетки	Аскорбиновая кислота + O ₂ → Дегидроаскорбиновая кислота + Пероксид водорода
Окисление-восстановление	Цитохром <i>c</i> редуктаза	Все животные клетки; многие растения и микроорганизмы	НАД·Н (восстановленный кофермент) + Окисленный цитохром <i>c</i> → Восстановленный цитохром <i>c</i> + НАД (окисленный кофермент)
Окисление-восстановление	Лактатдегидрогеназа	Большинство животных клеток; некоторые растения и микроорганизмы	Молочная кислота + НАД (окисленный кофермент) → Пировиноградная кислота + НАД·Н (восстановленный кофермент)

7. Имобилизованные ферменты

Общая характеристика.

...Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками:

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Каталитическую активность иммобилизованных ферментов можно регулировать путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук. Иммобилизовать ферменты можно как путем связывания на нерастворимых носителях, так и путем внутримолекулярной или межмолекулярной сшивки белковых молекул низкомолекулярными бифункциональными соединениями, а также путем присоединения к растворимому полимеру.

Носители для иммобилизованных ферментов

Для получения иммобилизованных ферментов используется ограниченное число как органических, так и неорганических носителей. К носителям предъявляются следующие требования:

- высокая химическая и биологическая стойкость;
- высокая химическая прочность;
- достаточная проницаемость для фермента и субстратов, пористость, большая удельная поверхность;
- возможность получения в виде удобных в технологическом отношении форм (гранул, мембран);
- легкая активация;
- высокая гидрофильность;
- невысокая стоимость.

Классификация носителей схематично представлена на рисунке 4.

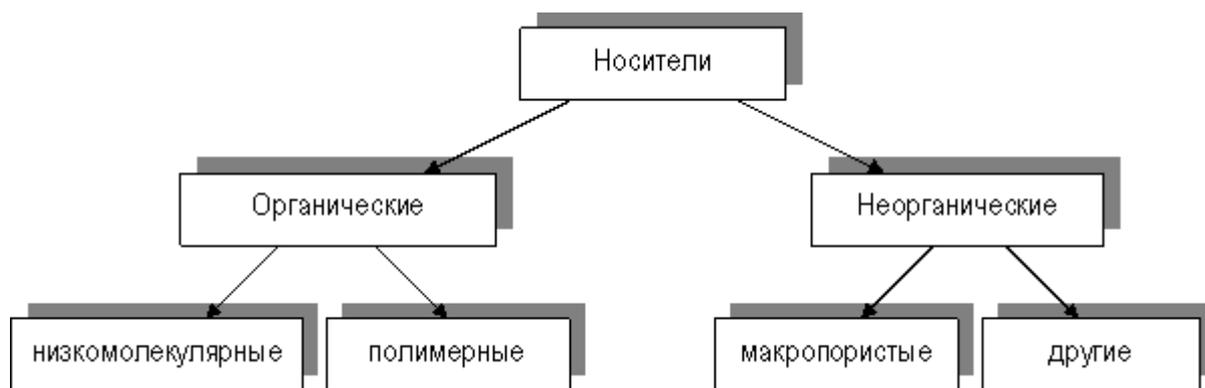


Рис. 17. Классификация носителей для иммобилизованных ферментов

Следует отметить, что органические носители (как низко-, так и высокомолекулярные) могут быть природного или синтетического происхождения. Природные полимерные органические носители делят в соответствии с их биохимической классификацией на 3 группы: полисахаридные, белковые и липидные.

Синтетические полимеры также можно разделить на группы в связи с химическим строением основной цепи макромолекул: полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные.

Для иммобилизации ферментов наиболее широко используются природные полисахариды и синтетические носители полиметильного типа, остальные применяются значительно реже. Большое значение природных полимеров в качестве носителей для иммобилизации объясняется их доступностью и наличием реакционно-способных функциональных групп, легко вступающих в химические реакции. Характерной особенностью этой группы носителей также является их высокая гидрофильность. Недостаток природных полимеров - неустойчивость к воздействию микроорганизмов и довольно высокая стоимость.

Наиболее часто для иммобилизации используются такие полисахариды, как целлюлоза, декстран, агароза и их производные. Целлюлоза гидрофильна, имеет много гидроксильных групп, что позволяет модифицировать её, замещая эти группы. Для увеличения механической прочности целлюлозу гранулируют путем частичного гидролиза, в результате которого разрушаются аморфные участки. На их место для сохранения пористости между кристаллическими участками вводят химические сшивки. Гранулированную целлюлозу довольно легко превратить в различные ионообменные производные, такие как ДЭАЭ-целлюлоза, КМЦ и другие.

Широко распространены носители на основе декстрана, выпускаемые под названием "сефадексы". При высушивании они легко сжимаются, в водном растворе сильно набухают. В этих носителях размер пор в геле регулируется степенью сшитости. К группе декстранов относят и крахмал. Химически модифицированный крахмал сшивается агентами, такими как формальдегид. Таким способом был получен губчатый крахмал, обладающий повышенной устойчивостью по отношению к ферментам, гидролизу. Водорастворимые препараты на основе декстрана часто применяются как носители лекарственных средств в медицине.

Хорошим носителем считается агар. Его свойства улучшаются после химической сшивки, например, диэпоксидными соединениями. Такой агар становится устойчивым к нагреванию, он прочен, легко модифицируется.

Белки в качестве носителей обладают рядом достоинств: вместительны, способны к биодegradации, могут применяться в качестве тонкой (толщиной 80 мкм) мембраны. Иммобилизацию ферментов на белковых носителях можно проводить как в отсутствие, так и в присутствии сшивающих агентов. Белки используются и в фундаментальных биологических исследованиях, и в медицине. К недостаткам белков в качестве носителей относят их высокую иммуногенность (за исключением коллагена и фибрина). Наиболее часто для иммобилизации используются структурные (кератин, фибрин, коллаген), сократительные (миозин) и транспортные (альбумин) белки.

Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, для получения гелей, микрокапсул. Полимеры на основе стирола применяются сорбционной иммобилизации. Они могут иметь макропористую, изопористую структуру, а также гетеропористую структуру. Для получения полимерных гидрофильных носителей широко используется акриламид - производное акриловой кислоты.

Широкое распространение получил метод включения ферментов и клеток в полиакриламидный гель, имеющий жесткую пространственную сетчатую структуру. Полиакриламидный гель устойчив к химическим воздействиям. Очень интересную группу представляют полиамидные носители. Это группы различных гетероцепных полимеров с повторяющейся амидной группой -C(O)-NH-. Например, полимеры на основе N-винилпирролидона используются для получения иммобилизованных ферментов,

способных медленно распадаться в организме. Кроме того, они биологически инертны, что особенно важно при использовании в медицинских целях. Существенным недостатком большинства полимерных носителей является их способность накапливаться в организме. В этом отношении предпочтение отдается природным полимерам, которые гидролизуются ферментами. Поэтому в состав лекарственных препаратов часто входит декстран, а из синтетических носителей - полимеры на основе N-винилпирролидона. В настоящее время ведутся эксперименты по созданию синтетических полимеров, расщепляющихся с образованием нетоксичных продуктов обмена.

Методы иммобилизации ферментов

Существует два основных метода иммобилизации ферментов: физический и химический.

Физическая иммобилизация ферментов представляет собой включение фермента в такую среду, в которой для него доступной является лишь ограниченная часть общего объема. При физической иммобилизации фермент не связан с носителем ковалентными связями. Существует четыре типа связывания ферментов:

- адсорбция на нерастворимых носителях;
- включение в поры геля;
- пространственное отделение фермента от остального объема реакционной системы с помощью полупроницаемой перегородки (мембраны);
- включение в двухфазную среду, где фермент в растворимом состоянии может находиться только в одной из фаз.

8. Модифицированные и рекомбинантные ферменты

По экономическим и технологическим соображениям получать ферменты с помощью микроорганизмов более выгодно, чем выделять из растительных или животных источников. Большинство штаммов, используемых в настоящее время в пищевой промышленности, были выделены из относительно небольшого числа бактериальных и грибковых видов: *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* или *Aspergillus oryzae*, *E.coli*. Одним из преимуществ использования видов *Bacillus* для масштабного производства ферментов является их способность секретировать ферменты непосредственно в культуральную среду.

Пример использования ГИ в технологии получения сыра - замена дефицитного натурального химозина рекомбинантным аналогом. Ген, кодирующий химозин, был клонирован из геномной библиотеки коров

и перенесен в дрожжи, которые после этого стали продуцентами ценного фермента. Источником химозина может служить также рекомбинантный штамм *E. coli* K-12.

В последние годы был разработан подход к генетическому конструированию продуцентов для улучшения свойств рекомбинантных ферментов, известный как направленная эволюция. Работы по направленной эволюции белков, а именно по химическому и радиационному мутагенезу, начали проводиться с начала 80-х годов. Суть направленной эволюции, заключается в проведении случайных замен на уровне генов с последующим отбором мутантных вариантов, отвечающих цели улучшения свойств фермента. Методы проведения случайной замены разнообразны. Они включают перегруппировку фрагментов ДНК, укорачивание гена по отдельным фрагментам, наращивание цепи со случайными ошибками. С использованием направленной эволюции производят фермент глюкозооксидазу для замены подозреваемого в канцерогенных свойствах консерванта бромата калия в хлебопечении.

В 2009 г. мировой объем продаж ферментов и ферментных препаратов составил 440 млн. евро, в том числе ферментов, произведенных с применением традиционных (классических) штаммов-продуцентов 180 млн. евро (41 % от общего объема продаж), гомологичных ГММ 1-2 классов безопасности – 132 млн. евро (30 % от общего объема продаж). Объем продаж ферментов из гетерологичных ГММ 3 класса безопасности составил 128 млн. евро (29 % от общего объема продаж на мировом продовольственном рынке).

К активно развивающимся областям энзимологии относится разработка биологических методов модификации ферментов. Особенно многообещающим является направление, получившее название «белковая инженерия». Методы белковой инженерии, основанные на знании зависимости между аминокислотной последовательностью, трехмерной структурой и каталитической активностью ферментов, позволяют успешно модифицировать ферменты для улучшения их технологических свойств.

Широко используется способ замены определенных аминокислот в структурах молекул ферментов. Показано, что замена в молекуле фосфолипазы A2 Asn89 на Asp и Glu92 на Lys вблизи N-терминального конца спирали 5 увеличивает ккал/моль, а замена Asp56 на Ser, Ser60 на Gly и Asn67 на Tyr значительно увеличивает активность и средство фосфолипазы A2 к фосфолипидным мицеллам.

Путем замены аминокислот в структурах молекул ферментов изменяют также их субстратную специфичность.

Изменение соотношения активности к растворимому и нерастворимому субстратам у целлобиогидролаз достигается путем замены внешних остатков ароматических аминокислот, которые захватывают конец молекулы полисахарида и направляют ее внутрь активного центра.

Увеличение стабильности ферментов к температуре и экстремальным значениям рН достигается путем таких замен среди сближенных в его третичной структуре аминокислотных остатков, которые приводят к образованию дополнительных нековалентных гидрофобных связей, солевых мостиков или ковалентных S-S-связей, повышающих общую стабильность глобулы молекулы фермента.

Во многих случаях замены осуществляются на основе сопоставления совершенствуемых структур с соответствующими структурами аналогов из экстремофильных родственных организмов (термо-, ацидо- и алкалофильных).

Иногда повышение стабильности ферментов достигается введением в его структуру специального термостабилизирующего модуля, обнаруженного у некоторых бактерий.

Повышение стабильности ферментов к протеолизу осуществляется либо путем удаления сайтов узнавания протеаз из структуры доменов, либо путем увеличения степени гликозилирования через введение в них аминокислот; служащих сайтами O- или N-гликозилирования.

Модификация ферментов осуществляется также с помощью изменения их модульной структуры путем включения или удаления субстратсвязывающего домена. Например, в результате введения в молекулы гликозилтрансфераз целлюлозосвязывающего домена они приобретают способность «сшивать» оборванные концы молекул в аморфных участках на поверхности целлюлозного волокна. Удаление «ненужных» модулей уменьшает массу молекулы, в результате чего повышается эффективность диффузии фермента в субстрат.

Изменение характера действия и субстратной специфичности ферментов достигается, например, делецией петель, перекрывающих активный центр экзогидролаз, что превращает их в родственные эндогидролазы.

Один из видов биологической модификации - энзиматическая модификация ферментов. Ферменты используют для модификации протеинов уже более 20 лет. В пищевых технологиях ферменты

используются для регулирования функционально-технологических и нутритивных свойств белков, а также для регулирования функционально-физиологических свойств пищевых белков,

В 90-х годах XX в. ферменты начали использовать для модификации других ферментов. Сложность осуществления таких реакций обусловлена стерическими факторами, затрудняющими взаимодействие молекул ферментов. Одним из немногочисленных примеров подобной модификации является модификация фосфолипазы А₂ тканевой транслгутаминазой.

Все шире используются в качестве продуцентов ферментов генетически измененные микроорганизмы. Модификация их генома производится с целью увеличения гиперпродукции продуцируемых этими микроорганизмами ферментов или создания возможности синтеза нехарактерных для данного микроорганизма ферментов.

С целью увеличения гиперпродукции ферментов микроорганизмы подвергают воздействию различных мутагенов (ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, химических агентов), вызывающих как губительную мутацию у большей части микробной популяции, так и мутации, способствующие увеличению продукции ферментов. Для каждого мутагена и микроорганизмы подбирают условия мутагенной обработки, позволяющие увеличить количество выживших мутировавших клеток. Оставшиеся жизнеспособными микробные клетки подвергают скринингу по геномным вариантам, отбирая наиболее активных продуцентов определенных ферментов.

Данный метод, называемый методом классической мутации, впервые был описан в конце 30-х годов XX в., и активно использовался в 1950-1970 годах. Ему на смену пришли методы модификации генома микроорганизмов, основанные на достижениях генной инженерии. В частности, рекомбинантная ДНК (рДНК) технология, позволяющая внедрять в геном микроорганизма гены, ответственные за синтез необходимых ферментов. Стремительное развитие генетической инженерии привело к появлению нового сегмента биокатализаторов – рекомбинантных ферментов. В настоящее время, согласно Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, производство ферментов является одним из приоритетных направлений промышленной биотехнологии.

В настоящее время налажено промышленное производство микроорганизмов-продуцентов рекомбинантных ферментов. Например, ген, ответственный за выработку фермента химозина, выделенный из эукариотического организма, внедряют в геном

микроорганизмов *Escherihia coli*, *Kluuveromyces lactis* или *Aspergillus awamori*, которые становятся продуцентами данного фермента. Бактерии *Bacillus subtilis* используют как продуценты рекомбинантного фермента ацетолактатдекарбоксилазы.

Использование микроорганизмов-продуцентов рекомбинантных ферментов имеет ряд преимуществ. Один и тот же микроорганизм может использоваться как продуцент различных ферментных препаратов, что унифицирует технологию их получения. Выход ферментов значительно увеличивается, например выход глюкоамилазы и эндоксилазы, продуцируемых рекомбинантными штаммами *Aspergillus* превышает выход этих ферментов из традиционных штаммов в 10-30 раз.

Рекомбинантные ферменты отличаются высокой чистотой, что имеет особое значение в пищевых технологиях. Например, использование свободных от протеазной активности амилаз в хлебопечении позволяет улучшить реологические свойства теста, поскольку не происходит разрушения структуры белков клейковины.

Рекомбинантные ферменты широко применяются в пищевых технологиях (табл. 4). Однако, если в непищевых отраслях промышленности рекомбинантные ферменты применяют без ограничений, то пищевые продукты, полученные с использованием рекомбинантных ферментов, должны быть соответственно маркированы для информирования потребителя. Кроме как из природных источников, ферменты могут быть получены путем искусственного синтеза. Перспективен синтез ферментов, не имеющих полипептидных структур, но содержащих аналоги активных центров существующих ферментов.

Таблица 4.

Рекомбинантные ферменты, применяемые в производстве пищевых продуктов.

Рекомбинантный фермент	Организм продуцент	- Область применения
α -ацетолактат-декарбоксилаза	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Производство напитков

Аминопептидаза	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Производство молочных продуктов
α -Амилаза	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Производство напитков, хлебопечение
Арабинофуранозидаза	<i>Aspergillus niger</i>	Производство напитков
Каталаза	<i>Aspergillus niger</i>	Производство продуктов, содержащих куриные яйца
Химозин	<i>Aspergillus niger</i>	Производство сыров
Циклодекстрингликозил трансфераза	<i>Bacillus licheniformis</i>	Переработка крахмала
α -Глюканаза	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Производство напитков
Глюкоамилаза	<i>Aspergillus niger</i>	Производство напитков, хлебопечение
Глюкозоизомераза	<i>Streptomyces lividans</i>	Переработка крахмала
Глюкозооксидаза	<i>Aspergillus niger</i>	Хлебопечение
Глюкозооксидаза	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Хлебопечение, переработка крахмала
Липаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	Производство жиров
Мальтогенная амилаза	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Хлебопечение, переработка крахмала
Пектинлиаза	<i>Aspergillus niger</i>	Производство напитков

Пектинэстераза	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Производство напитков
Фосфолипаза А	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Хлебопечение, переработка жиров
Фосфолипаза В	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Хлебопечение, переработка крахмала
Полигалактозидаза	<i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Производство напитков
Протеаза	<i>Aspergillus oryzae</i>	Производство сыров
Пуллуланаза	<i>Bacillus licheniformis</i>	Переработка крахмала
Ксиланаза	<i>Aspergillus niger</i>	Производство напитков, хлебопечение

Созданы ферменты, содержащие синтетические полимеры циклодекстринов и металлопроизводных стероидов, являющиеся матриксом, в котором дополнительные реакционные группы ориентированы как активные центры ферментов.

Циклодекстрины широко используются для создания синтетических ферментов, поскольку способны к гидрофобному связыванию в центральной полости активных соединений. На основе β -циклодекстрина получены различные синтетические гидролитические ферменты, ферменты с химотрипсиновой, трансамилазной и рибонуклеазной активностью. Синтетический химотрипсин был получен путем включения в молекулу β -циклодекстрина каталитических групп - имидозолилбензойной кислоты или других имидазольных соединений.

Поскольку синтетические ферменты не содержат аминокислотных остатков, они менее подвержены действию таких факторов, как температура, рН, ионная сила, чем природные ферменты, для конформационной стабильности и биологических функций которых данные факторы являются лимитирующими. Эти

свойства синтетических ферментов расширяют возможности ферментативных технологий, в том числе и в пищевой промышленности.

9. Производство ферментных препаратов

Производство ферментных препаратов является одной из наиболее масштабных и динамически развивающихся отраслей биотехнологии. Большие объемы производства и широкий ассортимент ферментных препаратов обусловлены их востребованностью в различных отраслях промышленности, медицине, научных исследованиях.

В соответствии с современной классификацией идентифицировано около 2000 ферментов. Промышленностью выпускается около 250 наименований ферментных препаратов. При этом порядка 99% приходится на препараты 18 ферментов. Основными из них являются:

- бактериальные и грибные протеиназы;
- бактериальные и грибные α -амилазы, глюкоамилазы, декстраназы;
- глюкоизомеразы;
- молокосвертывающие ферментные препараты;
- пектолитические, целлюлолитические и гемицеллюлолитические препараты;
- дрожжевые, бактериальные и грибные β -галактозидазы;
- препараты β -фруктофуранозидазы;
- липазы и липоксигеназы.

Наибольший удельный вес в общем объеме производства (до 60 %) занимают α -амилазы для переработки крахмала и протеиназы, выпускаемые для синтетических моющих средств. Другими потребителями ферментных препаратов являются (в %): производство соков и вин – 10; спиртовая промышленность – 8; пивоварение – 6; сыроделие – 5; хлебопечение – 5; прочие отрасли -6. В ближайшие 10-15 лет наиболее востребованными для промышленного производства будут ферментные препараты, содержащие амилазы, протеиназы, глюкоизомеразу, целюлазы, мацеразы, молокосвертывающие ферменты. Перспективным является получение комплексных ферментных препаратов и мультиэнзимных комплексов для использования в определенных биотехнологических производствах, в т.ч. в пищевой биотехнологии.

9.1. Классификация и номенклатура ферментных препаратов.

Большинство производимых промышленностью ферментных препаратов являются препаратами гидролитических ферментов. В состав ферментных препаратов помимо основного фермента входят, как правило, ряд сопутствующих ферментов и других веществ белковой природы. В связи с этим, товарные ферментные препараты классифицируют по основному веществу.

В России используется система названий ферментных препаратов, в которой учитывается природа основного фермента, источник получения и степень очистки. Наименование препаратов включает сокращенное название основного фермента и видовое название продуцента. После названия препарата указывается способ культивирования продуцента (Г- глубинное, П – поверхностное), далее следует буква х. Для очищенных препаратов также указывается степень очистки:

2 – жидкий неочищенный концентрат исходной культуры;

3 – сухой препарат, полученный путем распылительной сушки неочищенного раствора фермента (экстракта из поверхностной культуры или культуральной жидкости);

10 – сухие препараты, полученные осаждением ферментов органическими растворителями или методом высаливания;

15, 18, 20 – препараты, очищенные от балластных веществ и частично от сопутствующих ферментов.

Для препаратов с индексом очистки выше 20 указанная номенклатура не применяется, т.к. речь идет о высокоочищенных или гомогенных ферментах. Для таких препаратов используют наименования в соответствии с существующей номенклатурой и классификацией ферментов. Тривиальные названия также используются для препаратов ферментов, выделенных из растительных или животных источников.

9.2. Источники получения ферментных препаратов.

Из всех существующих природных источников ферментов практический интерес для крупнотоннажного производства ферментных препаратов представляют микроорганизмы, некоторые растения или отдельные органы растений и животных, способные накапливать значительные количества ферментов.

Растительное сырье. Источником ферментов может служить пророщенное зерно злаков, которое может использоваться непосредственно как технический ферментный препарат или исходное сырье для получения очищенных препаратов. В качестве сырья для получения протеиназ используют латекс дынного дерева и фикусовых, сок зеленой массы ананаса.

Органы и ткани животных. Ферменты животного происхождения выделяют из органов, в которых протекают интенсивные биохимические процессы. В качестве сырья для получения ферментных препаратов широко используют поджелудочную железу, слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней, сычуги КРС, сычужки молочных телят и ягнят, семенники половозрелых животных. В таблице 1 представлены основные наименования ферментных препаратов, выделяемых из животного и растительного сырья.

Микроорганизмы. Преимуществами микроорганизмов как продуцентов ферментов по сравнению с растительными и животными объектами являются:

- высокая продуктивность;
- возможность использования дешевых и доступных субстратов;
- способность микроорганизмов переключаться с синтеза одного фермента на другой;
- относительно короткий (16-100 часов) технологический цикл производства товарных форм препаратов;
- перспектива совершенствования используемых продуцентов с использованием методов генетической инженерии.

Продуцентами тех или иных ферментов как целевых продуктов биосинтеза могут быть микроорганизмы различных таксономических групп: бактерии, дрожжи, грибы, актиномицеты.

Таблица 5.

Ферментные препараты животного и растительного происхождения.

Наименование фермента	Источник получения
Лактатдегидрогеназа	Сердце КРС
Каталаза	Печень свиней и КРС
Сычужный фермент	Сычуги молодняка КРС
Щелочная фосфатаза	Кишечник КРС
Гиалуронидаза	Семенники КРС
Фумараза и трансаминаза	Сердце свиней

Панкреатин (трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза, эластаза)	Поджелудочная железа свиней
Пепсин	Желудок свиней, кур
Аминоацилаза	Почки свиней
Амилазы	Ячмень, солод
Протеазы: папаин фицин бромелаин	Дынное дерево Фиговое дерево Ананас
Кислая фосфатаза	Картофель
Пероксидаза	Хрен

В качестве промышленных продуцентов ферментов используются как природные штаммы микроорганизмов, так и мутанты со свойствами сверхпродуцентов. Продуценты, выделенные из естественных источников и адаптированные к условиям биореактора как правило продуцируют комплекс близких по строению и специфичности действия ферментов, в этом плане преимуществом мутантных штаммов является свойство моноферментности, т.е. способность направленно синтезировать один целевой продукт.

9.3. Способы выражения активности ферментных препаратов.

Комиссия по ферментам Международного биохимического союза рекомендовала использовать следующие единицы активности ферментных препаратов.

Стандартная единица активности – количество фермента, которое катализирует превращение 1 микромоля данного субстрата за одну минуту при заданных условиях (при температуре 30 °С, оптимальных значениях концентраций субстрата и фермента, рН среды). Обозначается буквами Е или U.

Удельная активность – это число единиц Е, отнесенное к одному миллиграмму белка в ферментном препарате.

Молекулярная активность – число молекул данного субстрата или эквивалентов прореагировавших групп, превращаемых за 1 минуту одной молекулой фермента при оптимальной концентрации субстрата.

Катал – каталитическая активность, способная осуществлять реакцию со скоростью равной 1 моль/с в заданной системе измерения активности.

Активность условного препарата. В технологии ферментных препаратов принято использовать понятие активности условного ферментного препарата, характеризуемое как активность, измеренная по основному ферменту в стандартных единицах в препарате на единицу массы препарата. Активность основного фермента в стандартном условном препарате устанавливается нормативной документацией на данный препарат. Для пересчета фактически выработанной продукции в условные тонны используют формулу:

$$Q_{\text{усл.}} = Q_{\text{тов.}} * A_{\text{ф}} / A_{\text{усл.}}$$

9.4. Технология выделения ферментных препаратов из сырья растительного и животного происхождения.

Технология производства ферментных препаратов из растительного и животного сырья включает два основных этапа: сбор ферментсодержащего сырья; выделение и очистка целевого продукта.

В промышленных условиях ферменты из растительного сырья получают в тропических и субтропических странах (папаин, фицин, бромелаин). В условиях умеренного климата растительные ферменты для пищевой промышленности получают в виде пророщенного солода. В промышленных условиях очищенные ферментные препараты из солода не производят.

Принципиальная технологическая схема получения ферментных препаратов из животного сырья включает следующие операции.

Сбор сырья. При переработке мяса различных животных в самый первый момент разделки туши производят сбор ферментного сырья. Каждый вид сырья собирается в отдельные емкости отдельно по каждому виду животных.

Консервирование сырья. Сырье немедленно консервируется с использованием низких температур, обработкой поваренной солью, ацетоном, этиловым спиртом или же высушивается.

Наибольшее распространение в производственных условиях получила обработка низкими температурами и хранение органов и тканей животных до момента переработки в замороженном состоянии.

Широко используется метод обезвоживания измельченного сырья при низких температурах ацетоном или этиловым спиртом. Хороший эффект дает добавление к органическим растворителям небольшого количества (1,5-2,0 %) октанового спирта, который обеспечивает более полное разрушение липоидно-протеиновых комплексов, что способствует в дальнейшем более полному извлечению ферментов из

животной ткани. Обработка растворителями позволяет удалить из сырья основное количество влаги – 80-90 %. Обезвоженное сырье после отделения растворителей высушивают. В таком виде его можно использовать в течение года для получения препаратов различной степени очистки.

Для получения технических препаратов допускается консервирование животного сырья поваренной солью. Этот метод используется, например, при получении панкреатина. Метод консервации высушиванием используется при заготовке сычужков.

Из заготовленного на мясокомбинатах животного сырья, на специальных заводах органопрепаратов получают ферментные препараты различной степени очистки.

Измельчение сырья. В зависимости от вида используемого сырья применяют различные методы измельчения и разрушения клеток.

Клеточные оболочки могут быть разрушены попеременным замораживанием и оттаиванием (дефростацией), управляемым автолизом, обработкой дубильными веществами, органическими растворителями, за счет снижения внешнего осмотического давления и другими методами.

Клеточные оболочки и ткани, содержащие большое количество влаги, можно разрушить механическим измельчением или прессованием. Такой метод дает хорошие результаты только тогда, когда внутриклеточные ферменты не связаны с клеточными структурами, т.е. находятся в свободном состоянии.

Разрушить клеточные стенки можно также при помощи ультразвука, но следует помнить, что неграмотное использование этого приема может привести к разрушению и самих ферментов.

Наиболее часто в настоящее время практикуют механическое измельчение сырья на специальных мясорубках, волчках, куттерах и машинах, дающих тончайшие срезы с замороженного сырья (микротомы).

Экстракция ферментов. Животные ткани, особенно поджелудочная железа, содержат большое количество различных ферментов, которые обладают различной растворимостью и стабильностью и не могут быть экстрагированы из измельченного сырья по единой технологической схеме. Экстрагирование следует вести при условиях, исключающих возможность автолиза и необратимой денатурации белков, т.к. эти нежелательные процессы могут коснуться и ферментов, вызвав их инактивацию.

В отличие от экстракции ферментов из поверхностной культуры микроорганизмов, которая осуществляется только водой, извлечение ферментов из измельченной животной ткани можно проводить тремя видами экстрагентов: водным раствором кислот при рН 1,0-2,0; водой или водными растворами солей при рН 7,0-8,0; концентрированным водным раствором органических растворителей (этиловый спирт, метанол, ацетон, глицерин).

В зависимости от свойств экстрагируемого фермента принимаются те или другие условия экстрагирования, обеспечивающие минимальные потери активности фермента и максимальное извлечение его из обработанной ткани.

При экстракции ферментов из животного сырья довольно часто прибегают к подкислению экстрагента, что влечет за собой торможение автолитических процессов. Некоторые ферменты малочувствительны к автолитическим процессам и поэтому легко извлекаются водно-солевыми растворами. Такие же ферменты, как карбоксипептидаза, амилазы, панкреатопептидаза, ϵ -эластаза и коллагеназа извлекаются слабыми растворами электролитов, например, хлористого натрия, но почти сразу инактивируются при экстракции растворами кислот с рН ниже 3,0.

Отделение твердой фазы от экстракта преследует цель как можно полнее освободить экстракт от суспендированных частиц. Очень часто при разделении происходит разогрев обработанной массы, что влечет за собой быструю инактивацию ферментов. В этой связи основная задача при отделении твердой взвеси состоит в сокращении до минимума длительности процесса, охлаждении обрабатываемых масс или же использовании разделяющих машин с принудительным охлаждением обрабатываемой массы. Если выделяемый фермент очень не стабилен, то часто вместо центрифугирования используют фильтрацию под вакуумом или просто декантируют экстракт с осевшей твердой взвеси. Для отделения экстракта могут быть использованы центрифуги периодического и непрерывного действия.

Выделение и очистка ферментов. Методы выделения и очистки ферментов из экстрактов животных тканей и из культур микроорганизмов. Ферменты могут быть выделены осаждением и фракционированием органическими растворителями (этиловый, метиловый, изопропиловый спирты, ацетон, хлороформ, диоксан), солями (сульфат аммония, натрия или магния, ацетат натрия, хлористый натрий). Полученные экстракты могут быть очищены

диализом, ультрафильтрацией, сконцентрированы вакуум-выпариванием, вымораживанием.

Обессоливание. Препараты ферментов, полученные из тканей и органов животных, предназначаются в основном для пищевой, медицинской промышленности и медицины. Поэтому к ним предъявляются особо жесткие требования в отношении содержания солей и микрофлоры. Если препараты получают методом вываливания, то независимо от степени очистки фермента в препарате содержится от 30 до 50 % соли. Обессоливание ферментных препаратов методом диализа и особенно электродиализа не всегда приводит к положительным результатам ввиду чрезмерного вымывания через проницаемые мембраны стабилизирующих ионов и непрочно связанных простетических групп из фермента.

Наиболее часто для получения препаратов медицинского назначения используют очистку более современными методами, например, ультрафильтрацией, которая позволяет не только очистить экстракт, но и сконцентрировать его, либо проводят очистку на ионообменниках с помощью гельфильтрации.

Стерилизация ферментных растворов. Ферментные препараты, предназначенные для использования в лечебных целях, не должны содержать микрофлоры, т.е. должны быть стерильными.

Ферменты относятся к термостабильным веществам, поэтому их нельзя подвергать термической стерилизации. Для стерилизации ферментов используют так называемую обезвоживающую фильтрацию, называемую иначе холодной стерилизацией. Фильтрацию ведут через специальные мелкопористые перегородки или свечи. Микроорганизмы задерживаются этими перегородками вследствие молекулярного притяжения и адгезии к внутренним стенкам фильтрационных каналов.

Получение сухих ферментных препаратов. Сухие ферментные препараты из животных тканей, не предназначенные для лечебных целей, получают так же, как и препараты микробного происхождения.

Препараты, предназначенные для лечебных целей, сушат в стерильных условиях. Обычно для этого используют метод сублимационной сушки стерильного раствора фермента в ампулах или флаконах.

9.5. Технология получения ферментных препаратов из культур микроорганизмов.

Технологический процесс получения микробных ферментных препаратов включает три этапа:

- получение посевной культуры продуцента;
- производственное культивирование продуцента глубинным или поверхностным способом при параметрах, обеспечивающих максимальный выход целевого продукта или продуктов ферментации;
- получение технических или очищенных ферментных препаратов из культур микроорганизмов или культуральной жидкости.

Получение посевного материала. Технологическая схема получения посевной культуры продуцента во многом зависит от способа производственной ферментации.

При производстве ферментных препаратов на основе поверхностного культивирования продуцентов в основном используют культуры микроскопических грибов. Посевной материал может в данном случае быть приготовлен двух видов:

1) культура, выращенная на твердой питательной среде с титром спор не менее $7 \cdot 10^8$ в 1 г;

2) мицелиальная масса продуцента, выращенная глубинным способом на жидкой питательной среде.

Независимо от вида посевного материала, технологический процесс включает следующие этапы:

- приготовление питательной среды;
- стерилизация среды, оборудования и коммуникаций;
- охлаждение среды в кюветах или биореакторе до температуры инокуляции;
- засев среды исходным штаммом продуцента;
- выращивание культуры до определенного возраста;
- консервирование посевного материала.

Для производственного культивирования продуцентов глубинным способом посевной материал также готовят глубинным способом для грибов и актиномицетов в виде мицелиальной массы, для бактерий – в виде молодой спороносной культуры. При этом соблюдается следующая последовательность операций:

- активизация исходной культуры на агаризованной среде;
- выращивание культуры жидкой среде в колбах на качалке;
- культивирование продуцента в малом и, если необходимо, в большом инокуляторе.

Посевная доза продуцента для производственной ферментации может варьироваться в широких пределах (1-15 %). Исходя из этого,

количество стадий инокуляции определяется производительностью предприятия и оптимальной посевной дозой продуцента.

Для производственного культивирования микроскопических грибов в асептических условиях достаточной является доза внесения спорового материала 0,02-0,05 %, при культивировании в неасептических условиях – 0,2-1,0 % от массы питательной среды. При использовании мицелиальной массы посевную дозу увеличивают до 1,5-2,5 %. При глубинном культивировании продуцентов посевную дозу устанавливают: для спорового материала 0,2-1,0 %, для мицелиальной массы микромицетов и для дрожжевых культур – 1,0-2,5 %; для культур актиномицетов и бактерий – 5-6 %, а в отдельных случаях – до 15-20 %.

Производственное культивирование продуцента. Данный этап технологического процесса включает основные операции, характерные для большинства биотехнологических производств:

- приемка и подготовка сырья;
- приготовление синтетических или комбинированных питательных сред;
- стерилизация питательных сред, растворов, аппаратуры;
- установление оптимальных для синтеза целевого продукта значений температуры, рН среды, интенсивности аэрации;
- инокуляция культуры продуцента и производственная ферментация.

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

Особенности состава питательных сред для поверхностного культивирования.

При поверхностном культивировании микромицетов на твердых средах основой большинства производственных питательных сред являются пшеничные отруби, имеющие следующий состав (%): крахмал – 16-20; белок - 10-12%, жир – 3-4; целлюлоза – 30-40; зола – 2,5-3. Отруби являются дорогостоящим сырьем, поэтому их частично заменяют компонентами выполняющими функции разрыхлителей (например, древесные опилки) или обогатителей питательной среды

(солодовые ростки, лузга крупяных культур, свекловичный жом, картофельная мезга, выжимки плодов и ягод).

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

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

Таблица 6.

Примеры производственного культивирования продуцентов ферментов поверхностным способом.

Фермент	Продуцент	Состав среды	Параметры ферментации
α-амилаза	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus niger</i>	Пшеничные отруби с добавлением до 25% солодовых ростков; влажность среды (40-50) %	t = (40-45) °C τ = (36-48) час. pH _{нач.} = 4,0-5,0
пектолитические ферменты	<i>Aspergillus awamori</i> <i>Aspergillus foetidus</i>	Жом свекловичный (66-70%), отруби (30-35%), добавки (NH ₄) ₂ SO ₄ , NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ HPO ₄ ; влажность среды (55-60) %	t = 30 °C первые 40 час., затем 24 °C τ = (36-48) час. pH _{нач.} = 4,0-5,0
целлюлазы	<i>Trichoderma reesei</i> <i>Trichoderma lignorum</i> <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Пшеничные отруби (60-80%), солодовые ростки (20%), добавки свекловичного жома; лузги зерновых; соломы и др.; влажность среды (60-65) %	t = (35-40) °C τ = (55-65) час. pH _{нач.} = 4,0-4,5
гемицеллюлазы	<i>Aspergillus foetidus</i> <i>Trichoderma roseum</i>	Зерновая шелуха (45%), солодовые	t = (23-25) °C τ = (50-65) час.

		ростки (45%), дрожжевой автолизат (10%); влажность среды (55-60) %	pH _{нач.} = 5,0-5,5
протеиназы	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Пшеничные отруби с добавлением до солодовых ростков, соевой муки и др.; влажность среды (62-65)%	t = (40-45) °C τ = (36-48) час. pH _{нач.} = 5,6-6,2

Особенности состава питательных сред для глубинного культивирования.

При составлении питательных сред для глубинного культивирования продуцентов в качестве основы используют гидролизаты растительного сырья, спиртовую барду, свеклосахарную мелассу и гидрол (разбавленные до оптимального для роста продуцента содержания растворимых веществ), молочную сыворотку.

Таблица 7.

Примеры производственного культивирования продуцентов глубинным культивированием.

Фермент	Продуцент	Состав среды	Параметры ферментации
α-амилаза	<i>Bacillus subtilis</i>	2%-й раствор крахмала с добавками (NH ₄) ₂ HPO ₄ , KCl, MgSO ₄ *7H ₂ O, CaCl ₂ , 5%-го щелочного экстракта соевых бобов	t = (50-55) °C τ = (48-60) час. pH = 7,2
полигалакт- уриназа	<i>Zygodospora marxiana</i>	Молочная сыворотка (2%),	t = (30-34) °C

		добавки (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ * 7H ₂ O, NaCl, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ * 3H ₂ O	τ = (80-96) час. pH = 3,3-3,5
целлюлаза	<i>Trichoderma reesei</i>	Крахмал (1,5%), отруби (1,25%), 20%-йр-р NH ₄ OH (0,6%), добавки (NH ₄) ₂ SO ₄ , K ₃ PO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂	t = (35-40) °C τ = 96 час. pH = 4,0-4,5
липаза	<i>Rhizopus oryzae</i>	Крахмал (4%), добавки соевой муки, дрожжевого автолизата, MgSO ₄ , кормовых дрожжей на основе биомассы <i>Candida</i> <i>guilliermondii</i> (с повышенным содержанием липидов).	t = (27-30) °C τ = (48-50) час. pH = 5,0-6,0

В состав питательных сред могут вводиться малорастоворимые источники углерода и других питательных веществ, однако их высокое содержание приводит к повышению вязкости среды, что в свою очередь, затрудняет диффузию растворенных веществ и кислорода, снижает разделяемость системы по завершении ферментации.

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

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

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

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

Примеры производственного культивирования продуцентов ферментных препаратов глубинным и поверхностным способами приведены в руководстве: Грачева И.М., Кривова А.Ю., 2000.

9.6. Получение товарных форм ферментных препаратов.

Принципиальная схема очистки ферментных препаратов определяется способом производственного культивирования продуцента, локализацией фермента в процессе биосинтеза, требуемой степенью очистки.

Получение неочищенных ферментных препаратов.

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

Очистка культуральной жидкости от твердых взвесей. Большинство продуцентов накапливают большую часть синтезируемых ферментов в питательной среде, поэтому первой стадией очистки является отделение биомассы продуцента и взвешенных частиц. Очистку проводят на фильтрах различных конструкций (барабанные, фильтр-прессы) или центробежным способом на сепараторах-кларификаторах, бактофугах.

Экстрагирование ферментов из поверхностных культур. Поскольку ферменты являются водорастворимыми белками, в большинстве случаев используется водная экстракция. С физико-химической и биохимической точек зрения оптимальные условия твердофазно-жидкофазной экстракции белковых веществ достигаются при температуре 35-40 °С, однако для предотвращения развития

микрофлоры в водных экстрактах ферментов в производственных условиях процесс экстракции осуществляют при температуре 22-25 °С. Для получения концентрированных экстрактов при минимальных потерях ферментов с твердой фазой используют специальные экстракционные установки (диффузионные батареи, двухшнековые экстракторы непрерывного действия), позволяющие сконцентрировать жидкую фракцию до 7-14 % сухих веществ.

Концентрирование нативных растворов ферментов методом вакуум-выпаривания. Сгущение культуральных жидкостей и водных экстрактов проводят при получении готовых форм ферментных препаратов в виде высококонцентрированных растворов, при подготовке растворов к высушиванию различными способами, а также для получения пересыщенных растворов при выделении кристаллических форм ферментов. Температура продукта при вакуум-выпаривании не должна превышать 35-40 °С. Для концентрирования ферментных растворов применяют вакуум-выпарные установки с интенсивным тепло- и массообменом в тонком слое продукта (пленочные, пластинчатые аппараты). Такой режим обработки обеспечивает минимальное время контакта упариваемого продукта с теплоносителем.

Мембранные методы обработки ферментных растворов. Для очистки ферментных растворов от низкомолекулярных примесей при малых объемах переработки используют метод диализа (проточные диализаторы), электродиализ применяют в крупнотоннажных производствах для глубокого обессаливания. Концентрирование с одновременной глубокой очисткой от примесей осуществляют методом ультрафильтрации. Для стерилизации нативных растворов ферментов применим метод микрофильтрации.

Осаждение ферментов из растворов проводят следующими методами:

- осаждение органическими растворителями;
- высаливание;
- осаждение органическими полимерами (полиэтиленгликоль, декстраны);
- фракционирование ферментных растворов путем избирательной денатурации балластных белков при нагревании, изменении рН среды, воздействии органических растворителей.

Фракционирование и очистка ферментов от балластных белков методами адсорбции используется при получении высокоочищенных препаратов и гомогенных ферментов. В различных условиях могут

быть реализованы методы ионообменной адсорбции, аффинной адсорбционной хроматографии, лигандообменной хроматографии (взаимодействие с хелатированными ионами), иммуноадсорбции, гель-фильтрации.

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

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

10. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ И ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В пищевых технологиях используют в основном ферменты, присутствующие в пищевом сырье, которые поступают в организм человека при потреблении свежих фруктов и овощей, орехов, молока, сброженных и консервированных продуктов. В пищевых продуктах ферментов содержится мало – миллиграммы на килограмм продукта. При кулинарной и технологической обработке пищевых продуктов ферменты, как правило, инактивируются.

В кондитерском производстве применяется *инвертаза* дрожжей, превращающая сахарозу в глюкозу и фруктозу, предотвращая кристаллизацию сахарозы при высоких ее концентрациях.

В пивоварении для замены солода используют *амилазы*. Эти ферменты находят свое применение также при производстве патоки и растворимого крахмала. В хлебопечении амилазы на 30 % ускоряют

процесс созревания теста, улучшают качество хлеба, предотвращая процесс черствения.

При переработке молока ферменты используют в нескольких технологических процессах. В производстве сыра одной из основных стадий является коагуляция молока, которая осуществляется при помощи *реннина*.

Целлюлазы используют при приготовлении растворимого кофе, а также при обработке цитрусовых. *Кислая липаза* применяется в хлебопечении; она катализирует процесс образования моноглицеридов, препятствующих очерствению хлеба.

Ферменты – вещества белковой природы и поэтому неустойчивы при хранении, а также чувствительны к тепловым воздействиям. Кроме того, ферменты не могут быть использованы многократно из-за трудностей в отделении их от реагентов и продуктов реакции. Решить эти проблемы помогает создание *иммобилизованных ферментов*. Иммобилизовать ферменты можно связыванием с нерастворимыми носителями, а также присоединением к растворимому полимеру. Для получения иммобилизованных ферментов используются как органические, так и неорганические носители, к которым предъявляются определенные требования, включающие как физико-химические, так и экономические характеристики. Для иммобилизации ферментов наиболее широко используются природные полисахариды и синтетические носители полиметильного типа.

Преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными предшественниками:

1. Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2. Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3. Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4. Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук.

Промышленные процессы с применением иммобилизованных ферментов внедрены, прежде всего, в пищевую и фармацевтическую промышленность. В пищевой промышленности с участием иммобилизованных ферментов идут крупномасштабные процессы получения глюкозы, яблочной и аспарагиновой кислоты, оптически активных L-аминокислот, диетического безлактозного молока, сахаров из молочной сыворотки и др.

Глюкозоизомераза, иммобилизованная на целлюлозном носителе, применяется для получения глюкозо-фруктозных сиропов с преимущественным содержанием фруктозы.

Крупномасштабным производством является получение глюкозы из крахмала с использованием иммобилизованной **амилоглюкозидазы** в проточных перемешиваемых реакторах.

Для просветления пива используют **протеиназы**, в частности папаин, иммобилизованный на хитине.

Для удешевления процесса производства сыра в ряде случаев применяют бактериальные **реннины**, иммобилизованные на нерастворимых носителях.

Отходом при производстве сыра является молочная сыворотка, содержащая большое количество лактозы. Последняя содержит галактозу и глюкозу, представляющую большую пищевую ценность. Однако получение глюкозы из лактозы при помощи растворимой лактазы нетехнологично, поэтому был разработан метод гидролиза лактозы при помощи иммобилизованной на ацетилированной целлюлозе **лактазы**. Для стабилизации молока его обрабатывают **протеиназами**. Так, обработанное иммобилизованным **трипсином** молоко меньше подвержено окислению и в течение двух недель не утрачивает своего вкуса.

Применение иммобилизованных ферментов в промышленности получило название **инженерной энзимологии**. Примеры свидетельствуют об огромных возможностях инженерной энзимологии в различных областях народного хозяйства. Например, иммобилизованная **β -галактозидаза**, присоединенная к магнитной стержню-мешалке, позволяет получить диетический молочный продукт, который могут потреблять люди с наследственной непереносимостью лактозы. Обработанное таким образом молоко,

кроме того, хранится в замороженном состоянии значительно дольше и не подвергается загустеванию.

В настоящее время налажено промышленное производство генетически модифицированных микроорганизмов-продуцентов **рекомбинантных ферментов**. Например, ген, ответственный за выработку фермента химозина, выделенный из эукариотического организма, внедряют в геном бактерии *Escherihia coli*, которая становится продуцентом данного фермента. Бактерии *Bacillus subtilis* используют как продуценты рекомбинантного фермента ацетолактатдекарбоксилазы, который находит применение в пивоваренной, спиртовой и винодельческой промышленности.

Рекомбинантные ферменты отличаются высокой чистотой, что имеет особое значение в пищевых технологиях. Например, использование свободных от протеазной активности амилаз в хлебопечении позволяет улучшить реологические свойства теста, поскольку не происходит разрушения структуры белков клейковины.

В табл. 8 приведены примеры отраслей пищевой промышленности, использующих ферменты в технологических процессах

Таблица 8.

Технологические цели применения ферментов в различных отраслях пищевых производств

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 черствления 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 экстрактов, 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 мяса, 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

Современные методы модификации ферментов позволяют увеличивать стойкость ферментов к действию различных химических реагентов и ингибиторов, рН, температурному воздействию; изменять рН оптимум ферментов, их субстратную специфичность и связывающие свойства; регулировать предпочтения к определенным кофакторам и, тем самым изменять каталитические свойства ферментов.

Продолжается поиск новых возможностей использования ферментов в пищевой промышленности. Основными направлениями исследования являются:

- модификация свойств индивидуальных ферментов с целью повышения их активности и удешевления целевых продуктов;
- скрининг новых микроорганизмов-продуцентов ферментов;
- получение новых рекомбинантных ферментов с заданными свойствами;
- применение ферментативных реакций для получения ценных пищевых ингредиентов и биологически активных веществ;
- разработка пищевых нанотехнологий с использованием ферментов.

В табл. 9 приведены ферменты разных классов, наиболее часто применяемые в промышленных целях, их источники и сферы применения. Представленные данные показывают, что наиболее востребованы в различных отраслях производства ферментные препараты, катализирующие гидролитические реакции, особенно гликолитические и протеолитические ферменты. Растущие потребности рынка, необходимость расширения ассортимента изделий и совершенствование технологических процессов являются стимулами развития прикладной энзимологии. В современных технологиях находят всё большее применение не только ферменты, ускоряющие процессы расщепления, но и обладающие связывающим действием. Ярким примером является фермент трансглутаминаза, катализирующая образование изопептидных связей в белках,

производство и применение которой выросло за последние годы в десятки раз.

Таблица 9.

Источники и сферы применения наиболее часто применяемых ферментов.

Фермент	Источник или тип	Применение
Гидролазы		Моющие средства для стирки и мытья посуды; промышленные средства для очистки труб и емкостей; производство текстиля, пульпы и бумаги, производство этанола
α -амилаза	Бактериальная α -амилаза (напр., <i>Bacillus subtilis</i>), грибковая α -амилаза (напр., <i>Aspergillus niger</i>), щелочная α -амилаза	Производство текстиля, крахмальных сиропов, средств для стирки и мытья посуды, ферментативного этанола, кормов для животных; расшлихтовка бумаги
β -амилаза	Синтезируется штаммами вида <i>Bacillus</i>	Пивоварение; производство мальтозного сиропа, целлюлазных детергентов для

		мытья посуды, кормов, текстиля; производство биоэнергии
β -глюканаза	экзо- β -1,4-глюканаза, эндо- β -1,4-глюканаза	Пивоварение
β -глюкозидаза		Трансформирует изофлавоновые фитострогены соевого молока
Декстраназа	Производится различными микроорганизмами (напр., <i>Leuconostoc mesenteriodes</i>)	Гидролизует полисахарид декстран
Декстриназа		Расщепляет декстрин на две молекулы глюкозы
α -галактозидаза		Повышает эффективность производства сахарозы; может использоваться при переработке сахарной свеклы
Глюкоамилаза	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Endomyces</i>	Производство мальтозного сиропа и сиропа с высоким содержанием фруктозы
Гемицеллюлаза Пентозаназа/Ксиланаза	<i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Penicillium simplicissimum</i>	Хлебопечение, производство соков, обработка

		древесной пульпы
Инвертаза		Производство инвертного сиропа из тростникового и свекловичного сахара
Лактаза	<i>Kluyveromyces lactis, Asperigillus oryzae, Bacillus</i>	Удаляет лактозу из молочных продуктов
Нарингиназа		Устраняет горечь кожуры цитрусовых
Пектиназа		Переработка фруктов
Пуллуланаза	<i>Klebsiella aerogenes, Bacillus acidipullulyticus, Bacillus subtilis</i>	Снижает скорость очерствения выпечки
Протеазы		Пивоварение, хлебопечение, переработка белков; производство спирта- ректификата, стиральных и моющих средств, жидкостей для очистки линз, химикатов; выделка кожи и меха

Кислая протеаза	<i>Endothia parasitica</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i>	Хлебопечение – облегчает работу с тестом
Щелочная протеаза	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Производство детергентов, выделка кожи и меха
Папаин, бромелаин, фицин	Папайя, ананас, инжир	Пищевая промышленность
Пепсин	Свинные или говяжьих желудки	Производство сыра
Аминопептидаза	<i>Lactococcus lactis</i>	Производство продуктов питания и кормов
Субтилизин	<i>Bacillus subtilis</i> штамм <i>Carlsberg</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	Для разделения хиральных изомеров химических соединений и фармакологическ их средств
Эстеразы	Фосфолипазы, прегастральные эстеразы, фосфатазы	Производство очистителей, молочных продуктов, химикатов, выделка кожи и меха
Аминоацилаза	Свинные почки, <i>Aspergillus melleus</i>	Разделение оптических изомеров аминокислот
Глютаминаза	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i>	Конверсия глютамина в глютамат

Лизоцим	Белок куриных яиц, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i>	Антибактериальный агент в производстве молочной продукции
Пенициллиновая ацилаза	<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Escherichia coli</i>	Химический синтез антибиотиков
Изомераза		В пищевой промышленности для переработки глюкозного сиропа в сироп с высоким содержанием фруктозы
Оксидоредуктазы		Производство химикатов, отбеливателей; отбеливание пульпы
Алкогольдегидрогеназа	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Thermoanaerobium brockii</i>	Синтез хиральных изомеров химических соединений
Оксидазы аминокислот	Свиные почки, змеиный яд	Разделение рацемических смесей аминокислот
Каталаза	<i>Aspergillus niger</i>	Удаление сахаров из смесей веществ
Хлоропероксидаза	Водоросли, бактерии, грибы, культуры тканей млекопитающих	Синтез стероидов

Пероксидаза	Хрен	Отбеливатели для стирки и бумажного производства
Лиазы		
Ацетолактатдекарбоксилаза		Пивоваренная промышленность
Аспаргат-бета-декарбоксилаза		Производство L-аланина из L-аспарагиновой кислоты
Гистидаза	<i>Achromobacter liquidum</i>	Производство косметики
Трансферазы		
Циклодекстрингликозилтрансфераза		Производство циклодекстринов из крахмала
Трансглутаминаза	<i>Streptoverticillium mobaraense</i>	Переработка пищевого сырья и производство безглютеновых продуктов

10.1. ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ В МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Применение ферментных препаратов в молочной промышленности долгое время носило ограниченный характер. Традиционно ферментные препараты в молочной промышленности использовали для концентрирования казеиновой и жировой частей молока. После внесения сычужного фермента (химозина) или его заменителей в специально подготовленное молоко, из расчета 10—30 частей на миллион, происходит активированное ферментом формирование белковой структуры, которая в последующем самопроизвольно сжимается, выделяя межмицеллярную жидкость — сыворотку с растворенными в ней солями, лактозой и сывороточными белками. В результате измельчения сгустка и его перемешивания через несколько часов заканчивается процесс получения казеинового

концентрата с включенными в его структуру жировыми шариками. По затратам энергии этот процесс значительно эффективнее, чем выпаривание в вакуум-выпарной установке и фракционирование на центрифугах.

В формировании консистенции, вкуса и запаха сыров и творога помимо химозина участвуют и другие ферменты. Они поступают в сырную массу из клеток заквасочных культур, внесенных в молоко перед выделением сырной (творожной) массы.

Методами генного конструирования создан микробный суперпродуцент химозина, что значительно расширяет возможности обеспечения сыродельной промышленности молокосвертывающими препаратами. Активность сухих препаратов химозина составляет 100 тыс. условных единиц. За условную единицу принимают то количество молока, которое свертывается ферментом при 35 °С в течение 40 мин. Разработаны и инструментальные методы оценки активности молокосвертывающих препаратов. Один из них — «Химотест — Углич» основан на автоматическом многократном замере и компьютерной обработке данных о константе скорости реакции химозина или пепсина с казеиновыми мицеллами в условиях стационарной и нестационарной кинетики.

Широкое распространение в молочной промышленности начинает получать и другой ферментный препарат — β-галактозидаза. Под действием этого фермента молекула молочного сахара расщепляется на глюкозу и галактозу. Последствия такого превращения значительны. Питьевое молоко с гидролизованным молочным сахаром становится доступным для людей, страдающих непереносимостью лактозы.

В концентратах молочной сыворотки, прошедших ферментативную обработку β-галактозидазой, количество растворенных молекул увеличивается в 1,5—1,8 раза. Соответственно возрастает и осмотическое давление в плазме сгущенной сыворотки, что дает возможность хранить гидролизованные сывороточные концентраты в течение нескольких месяцев при комнатной или ниже комнатной (10-15 °С) температуре. Применение ферментного препарата повышает и потребительские качества сывороточных концентратов, так как сладость смеси углеводов после гидролиза лактозы повышается в 5—6 раз и приближается к значению такого показателя для сахарозы. Это позволяет изготавливать из молочной сыворотки глюкозо-галактозные сиропы, которые призваны заменить

свекловичный сахар в мороженом, сгущенных молочных консервах, кондитерских и хлебобулочных изделиях.

Промышленные препараты β -галактозидазы имеют два способа их применения. В одном из них фермент находится в свободном состоянии, его вносят в молочный продукт, где и происходит энзиматическая трансформация лактозы. Учитывая достаточно высокую стоимость препарата, этот метод не всегда оправдан с экономической точки зрения. В другом случае фермент на конечном этапе его производства закрепляется на каком-либо инертном носителе. Шарики этого носителя с иммобилизованной на его поверхности β -галактозидазой загружают в реактор — ферментер, через который прокачивается обрабатываемое молоко или сыворотка. Стоимость ферментативной обработки в этом случае снижается, однако возрастают трудности с очисткой и дезинфекцией носителя и фермента.

По мере развития молекулярной биотехнологии можно ожидать снижения стоимости и широкое внедрение рекомбинантных ферментов в технологические процессы производства молочных продуктов. Например, введение специальных ферментных препаратов в сырную массу создаст условия для программного управления процессами созревания сыров и получения готового продукта с заданными свойствами.

10.2. Применение ферментных препаратов в хлебопечении

Основные задачи, решаемые с помощью ферментов в хлебопечении, следующие:

- корректировка хлебопекарных свойств пшеничной и ржаной муки при нестабильном ее качестве (укрепление клейковины, расслабление, «структуризация» клейковины, увеличение сахарообразующей способности и ферментативной активности муки и др.);
- приготовление специальных полуфабрикатов;
- улучшение биотехнологических свойств хлебопекарных дрожжей;
- интенсификация технологического процесса, реализация ускоренных технологий приготовления хлеба;
- формирование заданных реологических свойств теста, увеличение его стабильности;

- улучшение качества хлеба и хлебобулочных изделий по физико-химическим и органолептическим показателям;
- экономия сырья, повышение водопоглотительной способности теста, увеличение выхода готовых изделий;
- продление срока сохранения свежести хлеба, снижение его крошковатости;
- введение в комплексные хлебопекарные улучшители для решения многофакторных технологических задач.

В зависимости от поставленных задач при производстве хлебобулочных изделий применяются ферментные препараты различного действия.

Амилолитические ферменты. Это основная группа ферментов, используемых для интенсификации процесса тестоприготовления. α -амилаза (3.2.1.1: α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза) — фермент, осуществляющий, как уже упоминалось ранее, беспорядочный разрыв молекулы крахмала по нескольким α -1,4-связям, сопровождающийся в основном образованием декстринов и небольшого количества мальтозы и значительным снижением вязкости субстрата.

В пшеничной муке из нормального зерна α -амилаза отсутствует, но в избытке содержится β -амилаза (3.2.1.2: α -1,4-глюканмальтогидролаза) — фермент, воздействующий на крахмал последовательным отщеплением мальтозы от невосстанавливающего конца цепочки. Недостаток субстрата с подобными концами углеводной цепочки является причиной слабого сахарообразования. При совместном действии микробной α -амилазы и зерновой β -амилазы сахарообразование значительно усиливается, так как распад молекулы на декстрины приводит к значительному увеличению числа невосстанавливающих концов.

Характер действия грибной и бактериальной α -амилаз на крахмал и их свойства значительно различаются.

По сравнению с грибной и солодовой α -амилазами бактериальная α -амилаза обладает повышенной термостабильностью, что, однако, осложняет работу с ней, так как превышение оптимальной дозы может привести к образованию липкого заминающегося мякиша.

Грибная α -амилаза термолабильна. В процессе выпечки, к моменту, когда атакуемость крахмала в результате клейстеризации резко возрастает, она быстро инактивируется и поэтому даже при значительных передозировках не портит мякиша хлеба. Различия в свойствах сравниваемых амилаз проявляются в оптимумах рН и температуры, а также температуры инактивации.

Гидролиз крахмала с помощью α -амилазы и глюкоамилазы (КФ 3.2.1.3: α -1,4-глюканглюкогидролаза) повышает содержание сбраживаемых сахаров в тесте, что приводит к интенсификации процесса брожения. За счет усиленного газообразования тесто разрыхляется, приобретает однородную консистенцию, увеличивается объем выпекаемого хлеба. Расщепление крахмала до декстринов способствует замедлению черствления хлеба, в основе которого лежат процессы ретроградации клейстеризованного крахмала и образования поперечных связей между молекулами крахмальных полисахаридов и белков клейковины. Для замедления черствления хлеба наиболее эффективна α -амилаза, при действии которой на крахмал образуются низкомолекулярные декстрины, препятствующие кристаллизации крахмала. Увеличение содержания в тесте низкомолекулярных сахаров приводит к активации меланоидинообразования при выпечке, при этом усиливается окраска корочки хлеба.

Образование сахаров в тесте особенно важно при брожении опары, в которую обычно сахар не добавляют. Амилолитические ферментные препараты в дозировках 0,002 % к массе муки существенно повышают газообразование и положительно влияют на физические свойства теста из муки твердой пшеницы. Оно становится более эластичным, менее упругим и подобным тесту, приготовленному из муки мягких пшениц.

Из отечественных препаратов применяют Амилоризин, Амилосубтилин, Глюкаваморин, Глюконигрин, Амилонигрин; из импортных чаще используются препараты фирмы «Новозаймс» (Дания): Фунгамил (грибная α -амилаза из культуры *A. oryzae*), Новамил (α -амилаза из *B. subtilis*), АМГ (глюкоамилаза из культуры *A. niger*). В процессе выпечки хлеба препараты инактивируются и не вызывают образования липкого мякиша.

При производстве хлеба на жидких дрожжах целесообразно добавлять α -амилазу пофазно: на стадии приготовления заквашенных заварок и на стадии приготовления опары.

Установлено также, что добавление в обычных дозах соли, сахара, улучшителей окислительного действия (аскорбиновой кислоты) не ингибирует α -амилазу в пшеничном тесте, поскольку накапливающийся в тесте в процессе брожения этанол также не влияет на активность α -амилазы.

Добавление в опару 0,002 % ферментного препарата Амилоризин П10Х увеличивает удельный объем хлеба на 11—15 %, улучшает его пористость на 2—3 %, повышает формоустойчивость подового хлеба

и сжимаемость мякиша, а также усиливается вкус и аромат. Значительно увеличивается содержание сахаров, которые в сочетании с продуктами гидролиза белков обуславливают и более интенсивную окраску корки.

При приготовлении теста на концентрированной молочнокислой закваске (КМКЗ) могут применяться грибные препараты как глюкоамилазы, так и α -амилазы. Физико-химические свойства КМКЗ (рН, влажность) соответствуют оптимуму действия глюкоамилазы грибов. Препарат Глюкаваморин Г20Х вносят в закваску при достижении рН 4,2, при дозировке 10—12 ед/100 г муки. Действие глюкоамилазы усиливается при дополнительном введении триполифосфата натрия (ТПФ) в количестве 0,01 % к массе муки. Содержание глюкозы в готовой закваске увеличивается в 1,6—1,9 раза и составляет 7,4—8,8% сухих веществ. Удельный объем хлеба, изготовленного на КМКЗ с глюкоамилазой, увеличивается на 10—15 %, пористость — на 2—3, общая сжимаемость мякиша — на 25—30%. В хлебе возрастает содержание альдегидов, эфиров, ароматических и гетероциклических соединений.

Качество хлеба улучшается при введении в КМКЗ наряду с глюкоамилазой хлебопекарных дрожжей (0,1 % массы муки) и сахара. Гидролиз сахарозы дрожжевой β -фруктофуранозидазой увеличивает содержание глюкозы и фруктозы в закваске в 9—10 раз, в тесте — в 1,4—1,6 раза.

Комплексные препараты, содержащие кислотоустойчивую α -амилазу и глюкоамилазу, целесообразно использовать вместе с молочной сывороткой при оптимальном рН 3,8 — 4,2. Наибольшая эффективность достигается при приготовлении теста из пшеничной муки на жидких опарах. Рекомендуемая дозировка препарата: 4 — 5 ед. амилазы и 10 — 15 ед. глюкоамилазы на 100 г муки при влажности полуфабриката 70—75%. Хлеб, приготовленный на полуфабрикате с таким ферментным препаратом, имеет более высокие удельный объем, формоустойчивость и сжимаемость мякиша (соответственно на 15, 20 и 30 %).

Комплекс амилолитических ферментов дает хорошие результаты при использовании ржаной муки с различными хлебопекарными свойствами, в том числе с пониженной автолитической активностью. Сокращается продолжительность брожения закваски, повышается подъемная сила полуфабрикатов, становится более выраженным вкус и запах хлеба.

Установлено, что осахаривание предварительно заваренной части ржаной муки в комплексе с внесением указанных ферментных препаратов в дозировке 1 ед. ОС/г муки приводит к увеличению содержания усвояемых сахаров в питательной среде на 22,5 % по сравнению с самым продуктивным контрольным вариантом. При этом температура осахаривания снижается с 68 до 40 °С, на 25 % уменьшается продолжительность процесса. Приготовление питательной среды с использованием ферментных препаратов приводит к интенсификации спиртового и молочнокислого брожения. Соответственно на 76 и 15 % увеличивается накопление основных продуктов метаболизма — CO₂ и кислот в пересчете на молочную. При этом возможно регулирование процесса путем изменения дозировки ферментных препаратов в зависимости от исходной автолитической активности партий муки.

Комплекс амилолитических ферментов используется при получении высокоосахаренных ферментативных полуфабрикатов (ВФП). Введение ВФП в рецептуру хлеба сокращает продолжительность процесса приготовления теста и расход сахара. Для приготовления ВФП пригодны различные сорта муки — пшеничной, ржаной и из зерна тритикале, а также рисовая мука, крахмальное молоко, крахмал-сырец, черствый хлеб. Осахаривание проводят в течение 6 ч при температуре 60...65 °С и рН 4 — 4,2, который устанавливают с помощью лимонной или ортофосфорной кислоты. В качестве амилолитических ферментных препаратов можно использовать грибные α-амилазу и глюкоамилазу. Вид препарата не влияет на качество ВФП при условии соблюдения дозировки ферментов: глюкоамилазы — 500 ед/100 г сырья, α-амилазы — 100 ед/100 г сырья для пшеничной муки, 50 ед/100 г сырья для муки из тритикале и ржаной. Промышленный вариант получения ВФП основан на использовании комплекса Глюкаваморина и Амилоризина. Степень конверсии крахмала в ВФП из пшеничной муки I сорта составляет 73 — 75 %, из хлеба пшеничного I сорта — 84 — 85, из рисовой муки — 66 — 68 %.

Использование ВФП в составе теста приводит к увеличению подъемной силы дрожжей, скорости сбраживания сахаров, усилению газообразования, что позволяет сократить продолжительность приготовления теста. При безопасном способе приготовления теста ВФП вводят в количестве 5—10 % к массе муки. Длительность брожения сокращается в 1,4—1,7 раза, удельный объем хлеба возрастает на 10—29 %, пористость — на 2—4, сжимаемость мякиша

— на 21—34 % к контролю (без ВФП), содержание редуцирующих сахаров — на 1,5—2,5 % к массе сухих веществ. Хлеб медленнее черствеет, что объясняется более глубоким расщеплением крахмала и белка. При опарном способе приготовления теста введение ВФП в опару приводит к сокращению длительности брожения опары до 2 ч, теста — до 30 мин. Применение ВФП позволяет снизить расход сахара в рецептуре на 2,5—5,0 % к массе муки.

Для замедления черствения хлебобулочных изделий наряду с традиционно используемыми ферментными препаратами α -амилазы возможно применение ферментных препаратов с мальтогенной α -амилазой в технологиях пшеничного и ржано-пшеничного хлеба. Установлено, что ферментный препарат, содержащий бактериальную мальтогенную α -амилазу, существенно улучшает структурно-механические свойства мякиша, увеличивает срок сохранения свежести готовых изделий до 7—12 сут.

β -Галактозидаза. В рецептуры хлебобулочных изделий часто вводят творожную молочную сыворотку, которая содержит 4,2—4,7 % сухих веществ, в том числе 0,5—1,4 % белка, 3,2—5,1 % лактозы, до 0,4 % жира, минеральные вещества и витамины. Сыворотка имеет рН 4—4,2, что соответствует активной зоне многих грибных гидролитических ферментов. В хлебопечении лактозу в чистом виде не используют из-за ее функциональных свойств: низкой растворимости и отсутствия сладости, а также часто встречающейся непереносимости организмом человека.

Лактоза не сбраживается пекарскими дрожжами, поэтому на среде с ней их бродильная активность уменьшается. В тесте с добавлением негидролизованной сыворотки отмечается депрессия газообразования, объем теста снижается на 9—13%. При расщеплении лактозы, катализируемом ферментом β -галактозидазой (3.2.1.23: β -D-галактозидгалактогидролаза), образуются глюкоза и галактоза. Эта смесь уже имеет сладкий вкус, хорошо растворяется в воде, усваивается как животными, так и микроорганизмами.

Для гидролиза лактозы могут быть использованы препараты Лактоканесцин Г10Х и Г20Х, Лактоинеквалин Г10Х, Лактофрагилин Г10Х. Чаще применяют Лактоканесцин, который содержит сопутствующие ферменты β -фруктофуранозидазу и протеазу. Он способен гидролизовать лактозу сыворотки, инвертировать сахарозу в тесте, частично гидролизовать белки сыворотки и муки. При его использовании повышается бродильная активность дрожжей, кислото- и газообразование, сокращается продолжительность брожения теста.

Рациональный способ использования сыворотки — это приготовление на ее основе 45—65%-х растворов сахара с добавлением Лактоканесцина. При этом достигается не только гидролиз лактозы, но и частичная инверсия сахарозы. Степень инверсии сахарозы повышается при добавлении прессованных хлебопекарных дрожжей, содержащих β -фруктофуранозидазу (3.2.1.26: β -D-фруктофуранозидфруктогидролаза) в количестве 0,05—0,1 % к массе раствора. Этот фермент гидролитически отщепляет концевые нередуцирующие β -D-фруктофуранозидные остатки в β -фруктофуранозидах, обладает способностью переносить остатки фруктозы на различные акцепторы, осуществляет гидролиз (инверсию) сахарозы на глюкозу и фруктозу. Дрожжи служат дополнительным источником β -фруктофуранозидазы. Использование концентрированных растворов сахарозы и молочной сыворотки интенсифицирует процесс созревания теста и улучшает его реологические свойства.

Целлюлазы и гемицеллюлазы. Эти ферменты применяют при приготовлении хлеба из ржаной муки, смеси ржаной и пшеничной, а также муки с добавками отрубей и других компонентов с повышенным содержанием структурных полисахаридов.

Гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз повышает количество сбраживаемых сахаров в тесте, что интенсифицирует процесс брожения. Расщепление β -1,3—1,4-глюкана приводит к снижению вязкости теста, что особенно важно при использовании ржаной муки. Повышаются пористость и удельный объем хлеба, мякиш становится менее липким.

Преобладающими гемицеллюлозами оболочки зерна являются разновидности ксиланов, среди них — арабиноглюкуроноксилян. Пентозные полисахариды составляют 2,5—3 % пшеничной муки. Ксиланы ассоциируются с белками клейковины, при этом белки теряют нативную структуру, происходит развертывание глобулы. Денатурация сопровождается утратой эластичности белка, что отрицательно влияет на упругие свойства теста. Гидролиз ксиланов предотвращает их ассоциацию с белками клейковины. Продукты частичного гидролиза ксиланов имеют высокую водоудерживающую способность. Образуется водонасыщенный развитый клейковинный каркас. Ксилоолигосахариды препятствуют взаимодействию крахмала с белками клейковины, что улучшает свойства теста при разделке, повышает стабильность тестовых заготовок при расстойке, увеличивает объем теста при выпечке, замедляет процесс черствения хлеба.

Отечественные препараты Целлокандин, Амилоризин имеют широкий спектр действия, эффективно расщепляют различные виды гемицеллюлоз (арабиноглюкуроноксиан пшеницы, арабиноксиан ржи, ксиан овса, 4-О-метил-глюкуроноксиан березы, арабиногалактан, лихенан, галактоманнан), целлюлозные субстраты, а также различные виды зернового сырья (пшеничные и ржаные отруби, ячменную муку). Получены положительные результаты при выпечке дарницкого хлеба с внесением 0,005 % Амилоризина за 1,5 ч до расстойки, докторских булочек — с внесением 0,025% Целлокандина за 30—40 мин до расстойки. Применение препаратов с гемицеллюлазной активностью улучшает структуру мякиша, повышает удельный объем хлеба, его пористость, хрустящие свойства корки.

Для сохранения свежести хлебобулочных изделий препараты ксиланазы сочетают с амилолитическими. Использование комплекса бактериальной α -амилазы (препарат Новамил), мальтогенной α -амилазы и ксиланазы (препарат Фунгамил) в дозе 0,01 % к массе муки увеличивает набухаемость мякиша на 30—40 %, вязкость суспензии мякиша — на 13—30, сжимаемость мякиша — на 17—44 % (интервал значений дан за период хранения 12—96 ч без упаковки).

Увеличение выпуска хлеба с повышенным содержанием структурных полисахаридов и длительным сроком хранения неизбежно расширяет спектр препаратов целлюлаз и гемицеллюлаз, применяемых в хлебопечении. В качестве таких препаратов рекомендуются Вильзим АК, Поликанесцин, Биобейк, Фермизим, Бейкзайм, Ультразим, Целловиридин, Пентопан, Фунгамил.

В современном хлебопечении в основном используют муку различных сортов, химический состав которой значительно беднее по сравнению с целым зерном. При традиционно сложившихся схемах помола зерна самые ценные в пищевом отношении части зерна, богатые белком, витаминами, неперевариваемыми растительными волокнами, удаляются.

В связи с этим среди населения большинства стран мира растет популярность зерновых продуктов, и, в частности, хлеба из цельного зерна.

Общепринятые технологии производства зернового хлеба предусматривают удаление богатого клетчаткой и гемицеллюлозой наружного слоя зерновых.

Для совершенствования технологии производства зернового хлеба применяют ферментные препараты целлюлолитического

действия Пентопан 500 ВГ, содержащий ксиланазу, и Фунгамил Супер АХ (фирмы «Новозаймс», Дания), содержащий ферментный комплекс из ксиланазы и α -амилазы, а также отечественный препарат Целловиридин, в состав которого входят целлобиогидро-лаза, β -глюканаза и ксиланаза.

Ферментные препараты вносят на стадии замачивания зерна при температуре 50 °С в дозах 0,003—0,006% для Пентопана 500 ВГ, 0,00575—0,015 % от массы зерна для Фунгамила Супер АХ и 0,003—0,009 % от массы зерна для Целловиридина.

Пористость и удельный объем хлеба при применении ферментных препаратов увеличиваются вследствие того, что целлюлолитические ферменты способствуют деструкции некрахмальных полисахаридов оболочек и алейронового слоя зерновки. В результате деструкции происходит накопление низкомолекулярных продуктов, используемых в процессе брожения дрожжами, что интенсифицирует газообразование в тесте, повышает пищевую ценность и удлиняет сроки сохранения свежести изделия.

Протеолитические ферменты. Их применяют для регулирования упругих свойств клейковины муки.

Для улучшения хлебопекарных качеств муки с короткорвущейся клейковиной, тесто из которой имеет низкие показатели растяжимости и разжижения, применяют протеолитические ферменты эндо- и экзопептидазы.

Для хлебопекарного производства наибольшее значение имеют пептидазы, действующие в зоне рН 3,5—5,5. Умеренный протеолиз оказывает благоприятное действие на клейковину из муки нормального хлебопекарного достоинства. Вязкость ее уменьшается, что благоприятно влияет на тесто, объем хлеба и структуру пористости мякиша.

Бактериальная протеаза по результативности превышает грибную. Это связано с тем, что в бактериальных препаратах преобладают протеазы эндотипа, которые необходимы для быстрого расщепления белка на крупные фрагменты. Применение бактериальной протеазы в дозе 0,02 % к массе муки с низкими хлебопекарными свойствами дает увеличение объема хлеба на 37 % и повышение общей хлебопекарной оценки на 1,5 балла.

В качестве препаратов нейтральной бактериальной протеазы могут использоваться отечественный Протосубтилин Г20Х и Нейтраза фирмы «Новозаймс».

Большим преимуществом грибных протеаз по сравнению с зерновыми является их довольно высокая экзопептидазная активность, благодаря чему в процессе приготовления теста происходит накопление аминокислот. Технологическое значение их очень велико как для обеспечения дрожжей питанием, так и для интенсификации образования меланоидинов в корке хлебобулочных изделий при выпечке, благодаря чему она становится румяной и ароматной.

Преимущество в этом отношении имеют препараты, полученные при поверхностном культивировании, поскольку глубинные почти не обладают экзопептидазной активностью.

Пептидазы комплексных грибных ферментных препаратов наиболее активны в кислой среде при pH 4,0. При pH 3,3 их активность несколько снижается.

Наиболее эффективны те препараты, в которых наряду с активными протеазами имеются активные амилазы. В этом случае не только увеличиваются объем хлеба и сжимаемость мякиша, но значительно усиливается окраска корки, улучшается вкус и аромат, возрастает содержание сахара в мякише.

Липаза. В хлебопекарной промышленности сравнительно недавно стали использовать ферментные препараты, содержащие липазу (КФ 3.1.1.3: триацилглицеролацилгидролаза), осуществляющую гидролиз триацилглицеридов с образованием жирных кислот, моно- и диглицеридов, которые, обладая эмульгирующими свойствами, а также функциональной способностью образовывать комплексные соединения со структурными компонентами теста — белками, крахмалом, оказывают положительное влияние на свойства теста и качество готовых изделий. Возможно также окисление свободных жирных кислот липоксигеназой пшеничной муки с образованием пероксидов. При использовании ферментного препарата Липопан улучшаются свойства клейковины, увеличивается удельный объем готовых изделий, улучшаются структурно-механические свойства мякиша, наблюдается эффект его отбеливания, замедляется процесс черствения хлеба.

В технологии хлебопечения используют гидролизованные грибной липазой масла, содержащие 60—70 % триглицеридов, 2,5 % моно- и 16 % диглицеридов и 9—10 % жирных кислот. Они способствуют улучшению физических свойств теста, интенсификации брожения и замедлению черствения готовых изделий.

Положительную биохимическую модификацию структурных компонентов муки (полярных и неполярных собственных липидов

муки) при приготовлении пшеничного хлеба возможно получить при использовании фосфолипазы. При ее применении образуются компоненты, обладающие поверхностно-активными свойствами. Фосфолипаза может быть использована в качестве заменителя пищевых эмульгаторов — стеариоиллактатов, эфиров моно-и диглицеридов с диацетилвинной кислотой — в количестве от 50 до 100 % от массы эмульгаторов с достижением аналогичного технологического эффекта.

Окислительно-восстановительные ферменты. Как и протеолитические, эти ферменты используются для регуляции реологических свойств теста. С их помощью достигается эффект, обратный действию протеаз: укрепление клейковины путем образования дополнительных дисульфидных связей за счет окисления SH-групп белков. В качестве окислительных агентов выступают соединения, образующиеся в системах с участием окислительно-восстановительных ферментов. Окисление сульфгидрильных групп белков может протекать как неферментативная химическая реакция. Эффект укрепления клейковины дополняется сопутствующим снижением протеолитической активности муки, которое вызывается переходом активатора протеаз — глутатиона — в неактивную окисленную форму.

В качестве окислительных используют системы, включающие липоксигеназу или комплекс глюкозооксидазы и каталазы. Окислительно-восстановительные ферменты постепенно вытесняют из практики хлебопечения неорганические окислители, такие, как бромат калия.

Под действием липоксигеназы (КФ 1.13.11.12: линолеат: кислородоксидоредуктаза) происходит образование гидропероксидов ненасыщенных жирных кислот, которые и окисляют далее другие соединения, в частности белки по сульфгидрильным связям, а также каротиноидные пигменты, что приводит к осветлению теста. При наличии в системе аскорбиновой кислоты происходит образование дегидроаскорбиновой кислоты, которая выполняет роль окислителя сульфгидрильных групп белков. Это усиливает действие липоксигеназы. Субстратами для нее служат свободные жирные кислоты, поэтому целесообразно вносить препарат липазы в рецептуры теста, включающие жиры.

Глюкозооксидазу (КФ 1.1.3.4: β -D-глюкоза: O_2 -оксидоредуктаза) используют в комплексе с каталазой (КФ 1.11.1.6: H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза). При окислении глюкозы глюкозооксидазой

образуются глюконовая кислота и пероксид водорода — активный окислитель. Избыточный H_2O_2 , не участвующий в окислительных процессах, может быть удален из системы, что достигается с помощью каталазы, разлагающей пероксид на воду и кислород. Окислительное действие глюкозооксидазы усиливается при сочетании с аскорбиновой кислотой, которая в присутствии пероксида водорода окисляется в дегидроформу.

Система, включающая глюкозооксидазу, может активно работать при наличии глюкозы, которая появляется при гидролизе сахарозы и мальтозы дрожжевыми ферментами — инвертазой и мальтазой. Поэтому применение глюкозооксидазы эффективно при высокой ферментативной активности дрожжей. Для повышения содержания мальтозы в среду вводят препарат грибной (мальтогенной) α -амилазы.

Окислению сульфгидрильных групп белка препятствуют ассоциированные с ними ксиланы. Для повышения доступности белка используют ксиланазы. Так складывается система: глюкозооксидаза + каталаза + аскорбиновая кислота + грибная α -амилаза + ксиланаза. Она может быть дополнена бактериальной α -амилазой для замедления черствления хлеба.

Рекомендуют следующий порядок введения компонентов в тесто: готовят суспензию ферментативно активных дрожжей с добавлением сахара, аскорбиновой кислоты и препарата глюкозооксидазы и каталазы, отдельно — раствор амилаз и ксиланазы. Эти композиции вводят в тесто, приготовляемое по интенсивной технологии. Применение комплекса ферментов дает увеличение удельного объема хлеба на 33—34 %, пористости — на 3—4, сжимаемости мякиша — на 40—41 % по сравнению с контролем, где использовалась только аскорбиновая кислота.

Окислительные системы с липоксигеназой и глюкозооксидазой существенно влияют на реологические свойства теста: повышается его упругость, снижается растяжимость, возрастает интенсивность газообразования при брожении.

С использованием окислительных систем, включающих липоксигеназу и глюкозооксидазу, разработаны комплексные хлебопекарные улучшители (Фортуна, Топаз, Шанс, Мультиэнзим и др.).

В их составе использованы препараты Глюзим (глюкозооксидаза + каталаза), Фунгамил, Новамил, Пентопан (ксиланаза), Липопан (липаза), ферментативно активная соевая мука (источник липоксигеназы), а также аскорбиновая кислота.

10.3. Применение пектолитических ферментных препаратов в виноделии

Ферментные препараты пектолитического, протеолитического, цитолитического действия, применяемые в виноделии, увеличивают выход сусла, обеспечивают стабильность вин против разных видов помутнения, улучшают качество продукции. Препарат пектолитического фермента вносится в приемный бункер на виноград, в мезгосборник, в мезгу после измельчения или в ферментатор в виде тщательно размешанной суспензии, приготовленной на сусле. Время контакта мезги с препаратом рекомендуется не менее 1,5-2ч. Точное дозирование и равномерная подача суспензии ферментного препарата могут быть обеспечены специальными дозаторами разных типов. При отсутствии дозаторов суспензия вносится вручную. При выборе необходимой дозы препарата для данного района и определенной группы сортов винограда следует предварительно проводить пробную обработку в условиях лаборатории. Доза внесенных пектолитических ферментных препаратов колеблется в зависимости от районов произрастания и сортов винограда, условий года, технологии переработки. При продолжительном контакте сусла с мезгой (24 ч и больше) следует выбирать минимальные дозы – 0,017 %, в некоторых случаях даже 0,008 % препарата активностью 3000 ед/г. Некоторые сорта, в особенности со слизистой мякотью (Ноа, Изабелла, Лидия в Молдове и Закарпатье), которые тяжело отдают сок, требуют повышенных доз препарата (0,07 – 0,08 %). При переработке белых сортов винограда для получения шампанских и столовых виноматериалов оптимальной нужно считать дозу 0,033-0,04 % (дозы приведены для препарата активностью 3000 ед/г). Температурный оптимум действия пектолитических ферментных препаратов 37 – 40 °С. Однако, специально подогревать мезгу в процессе ферментации, если этого не требует принятая для данного типа вина технологическая схема, не нужно. Пектолитические препараты эффективны и при температурах 15 – 20 °С. При использовании пектолитических ферментных препаратов рекомендуется доза сульфитации 100 – 150 мг/дм³ сусла. При ферментации сусла и мезги происходит разрушение белка и полипептидов винограда. Эти процессы протекают под действием разных естественных протеолитических ферментов. В результате этого содержание растворимых протеинов винограда снижается в несколько раз. Процесс естественного протеолиза, который проходит при

ферментации сусла и мезги, можно ускорить, внося протеолитические ферментные препараты, которые получают из плесеней *Aspergillus oryzae*, *A. flavus*, *A. awamori*.

Винодельческая промышленность фактически не имеет опыта по применению протеолитических ферментных препаратов, проводились только отдельные опыты на случайных препаратах, но перспективы по применению протеолитических ферментных препаратов в виноделии очень большие.

Ферментативный метод может быть эффективно использован с целью удаления белков из сусла и вина. С этой целью протеолитический ферментный препарат вносится в сусло в количестве 0,0005 % после сульфитации из расчета 100 мг/дм³. После отстаивания сусло снималось из осадка и сбраживалось. Содержание белка в полученных виноматериалах было незначительным, что увеличивало их стабильность. Существует необходимость проведения более широких исследований в этой области, для того чтобы отработать технологию применения различных протеолитических ферментных препаратов в виноделии.

Обработка мезги винограда до прессования широко применяется в отечественном виноделии в силу своих бесспорных преимуществ: ферментные препараты облегчают прессование виноградной мезги, увеличивают выход сусла, ускоряют его осветление, снижают склонность к коллоидным помутнениям. При внесении в мезгу очищенного ферментного препарата происходит более быстрый гидролиз белка, виноградного пектина и других полисахаридов, в результате чего увеличивается выход сусла-самотека на 10-20 %; увеличивается скорость фильтрации сусла. Органолептические качества сока и вин не снижаются. Ферментные препараты используются в дозах от 0,0005 до 0,03 % к массе винограда, мезги или сусла (в зависимости от активности препарата).

Ферментативная обработка мезги красного винограда (слегка сульфитированной, чтобы предотвратить окисление фенолов) в течение 4 ч при 45 – 50 °С дает возможность получать качественные красные вина на мезге без брожения. В результате обработки сусла пектолитическими препаратами несколько повышается содержание метилового спирта, поэтому такая обработка неприменима при выработке коньячных виноматериалов. Цитолитические ферментные препараты расщепляют целлюлозу, гемицеллюлозу и др., способствуя увеличению выхода сусла.

При переработке винограда и приготовлении вина ферменты винограда и дрожжей влияют на все биотехнологические процессы виноделия. Наибольшее влияние проявляется на стадии образования вина, т. е. при брожении. Поэтому, в зависимости от поставленной цели (получение вин того или другого типа), винодел может регулировать эти процессы, угнетая активность ферментов (при изготовлении столовых вин или шампанских виноматериалов) или, наоборот, стимулируя их активность (при изготовлении высокоэкстрактивных вин). Когда в виноградном сусле много окислительных ферментов, это приводит к покоричневению вин (оксидазный касс). В этом случае винодел должен применять специальные меры: сульфитацию, обработку бентонитом, пастеризацию и др.

Особо важное биотехнологическое значение имеют ферментативные процессы при брожении. Вместе с образованием при этом основных веществ (этиловый спирт, диоксид углерода), под действием ферментных систем дрожжей происходит образование вторичных и побочных соединений. Все эти вещества и соединения играют важную роль в формировании органолептических качеств вина, создании общего фона аромата и букета вин.

Ферментативные процессы (окислительно-восстановительные, гидролитические и др.) играют значительную роль в биотехнологии таких специальных типов вин, как херес и шампанское. Эти процессы проходят очень энергично в течение послетиражной выдержки бутылок с вином на первом году, а также при непрерывной шампанзации, в период выдержки хересных виноматериалов под пленкой хересных дрожжей.

В практике виноделия в последнее время очень распространены ферментные препараты, полученные из разных микроорганизмов (главным образом из плесневых грибов).

Оптимальный диапазон действия рН промышленных пектолитических препаратов находится в пределах 4.–5. В зоне рН сусел и вин активность ферментных препаратов доходит до 70 %. Температурный оптимум действия препаратов находится в пределах 35.–45 °С. Поэтому в виноделии рекомендуется мезгу подогреть. Применение в практике виноделия пектолитических ферментных препаратов повышает общий выход сусла, в том числе выход сусла-самотека до 30 %, ускоряет в 2.–3 раза осветление сусла.

Комбинированная обработка мезги ферментными препаратами с ее нагреванием значительно повышает эффективность процесса. Сульфитация мезги умеренными дозами (до 150 мг/дм³) до ее

нагревания предотвращает окисление фенольных и ароматических соединений от окисления и позволяет сохранить в вине цвет и сортовые тона. При изготовлении мускатных вин такая комбинированная обработка дает положительные результаты. Это приводит к значительному усилению мускатного аромата, хорошо сохраняющегося в сухом вине.

Комплекс ферментов, включающих гемицеллюлазу, целюлазу, целобиазу, а также пектолитические и протеолитические ферменты, представляет собой цитолитические ферментные препараты. Они имеют разную активность, зависящую от свойств продуцента и условий его получения.

В виноделии для увеличения выхода сусла используются цитолитические ферментные препараты. Обработка мезги этими препаратами при оптимальной температуре 40 °С увеличивает выход сусла из винограда, ускоряет его осветление, повышает содержание сахаров в сусле в результате гидролиза полисахаридов и др.

Применение в виноделии протеолитических ферментных препаратов направленно на предотвращение белковых помутнений в готовых винах. Внесение препарата в сусло, виноматериал или вино приводит к гидролизу белковых веществ и увеличению содержания в нем аминного азота. При такой обработке вино становится более стойким к белковым помутнениям. Эффективность биохимических процессов в виноделии при обработке вина протеолитическими ферментными препаратами значительно повышается, если комбинировать ее с подогревом.

ЧАСТЬ 2. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

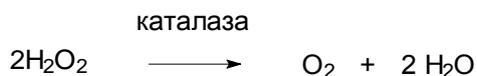
2.1. Качественные реакции на присутствие ферментов

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

2.1.1. Обнаружение активности каталазы в крови

Каталаза – окислительно-восстановительный фермент, широко встречающийся в животных и растительных тканях. Биологическая роль каталазы заключается в расщеплении токсичного для тканей пероксида водорода, образующегося в ходе физиологических

окислительно-восстановительных процессов, и в повышенных количествах – в условиях патологии. Схема реакции:



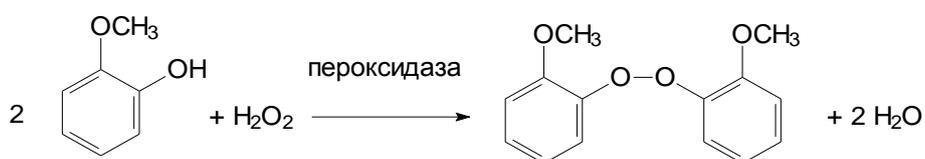
Материалы исследования и реактивы. Кровь дефибринированная, 1 %-й раствор пероксида водорода.

Приборы. Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают около 1 мл крови и затем добавляют 10 – 20 капель раствора пероксида водорода. Происходит бурное выделение кислорода, жидкость в пробирке вспенивается. Повторяют пробу с прокипяченной кровью. Отмечают различие.

2.1.2. Обнаружение активности пероксидазы в картофеле

Окислительно – восстановительный фермент *пероксидаза* широко распространен в природе. Особенно в больших количествах этот фермент находится в растительных тканях (хрен, картофель и др.). В организме животных пероксидаза содержится преимущественно в крови, мышечной ткани, молоке. В молочной промышленности с помощью реакции на пероксидазу контролируют эффективность пастеризации молока. Пероксидаза катализирует окисление многих фенолов (например, гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамина и других) с помощью перекиси водорода. Так, при окислении гваякола с участием пероксидазы картофеля образуется продукт коричневого цвета в реакции:



Материалы исследования и реактивы. Сырой и вареный картофель, 5 %-й спиртовой раствор гваякола, 1 %-й раствор пероксида водорода.

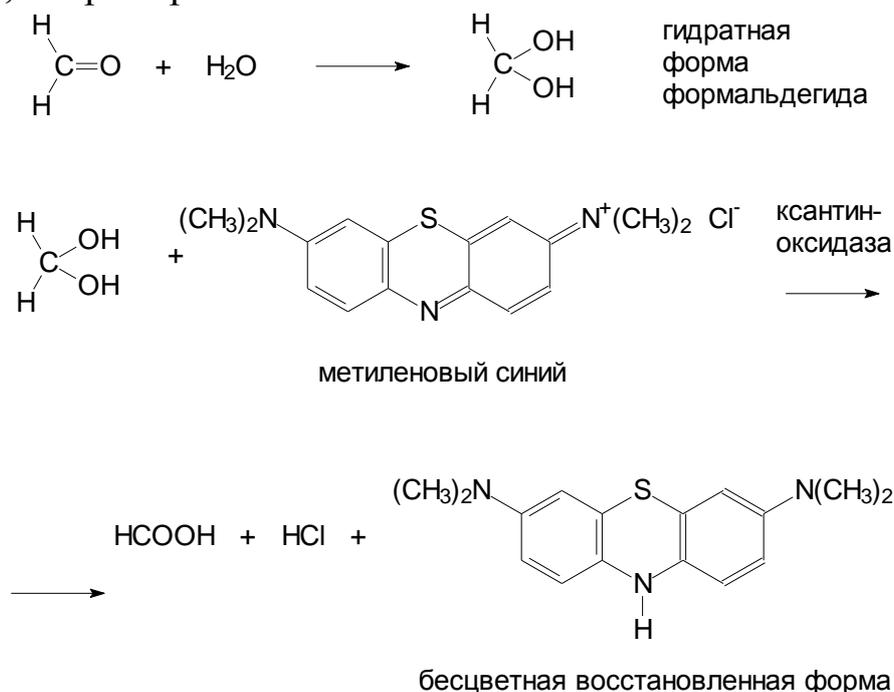
Приборы. Нож, пипетки или капельницы.

Ход определения. На тонкий срез картофеля (сырого и вареного) наносят по 1 – 2 капли растворов гваякола и пероксида водорода. На сыром картофеле образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. На вареном картофеле

пятно не образуется. Необходимо отметить результаты и объяснить различия в опытах с сырым и вареным картофелем.

2.1.3. Обнаружение активности ксантиноксидазы в сыром молоке

Ксантиноксидаза относится к группе окислительно-восстановительных ферментов, называемых *оксидазами*. Оксидазы катализируют окисление многих органических веществ с участием кислорода. Так, содержащаяся в крови и в коровьем молоке ксантиноксидаза окисляет пуриновые основания (гипоксантин и ксантин) до мочевой кислоты, а также различные альдегиды до соответствующих карбоновых кислот, например, формальдегид до муравьиной кислоты. При этом акцептором атомов водорода окисляющегося субстрата может быть как кислород, так и другие вещества, например метиленовый синий в соответствии со схемой:



Материалы исследования и реактивы. Молоко сырое и кипяченое, 1,5 %-й раствор формальдегида, 0,02 %-й раствор метиленового синего.

Приборы. Штативы с пробирками, пипетка на 1мл, водяная баня.

Ход определения. Берут две пробирки, в одну наливают около 5 мл сырого молока, в другую – 5 мл кипяченого молока. В обе пробирки добавляют по 1 мл раствора формальдегида и 4 капли раствора метиленового синего. Смесь взбалтывают и ставят в водяную баню с

температурой 37–40°С. Через некоторое время молоко в первой пробирке обесцветится вследствие катализируемого ксантиноксидазой восстановления метиленового синего в неокрашенную восстановленную форму. При этом формальдегид окисляется в муравьиную кислоту. Во второй пробирке с кипяченым молоком обесцвечивания метиленового синего не произойдет вследствие тепловой денатурации фермента.

2.1.4. Обнаружение активности амилазы в слюне

Гидролитический фермент слюны α -амилаза катализирует реакцию гидролиза α -1,4-гликозидных связей крахмала с образованием дисахарида мальтозы. Расщепление крахмала идет через стадии образования промежуточных продуктов гидролиза, называемых декстринами, которые дают с раствором йода различное окрашивание:

крахмал	синяя окраска с йодом
↓	
амилодекстрины	синяя окраска с йодом
↓	
эритродекстрины	красно-бурая окраска с йодом
↓	
ахродекстрины	отсутствие окраски с йодом
↓	
мальтоза	отсутствие окраски с йодом

Декстрины, близкие к крахмалу (амилодекстрины), дают сине-фиолетовое окрашивание с йодом, эритродекстрины – красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза вообще не дают окрашивания.

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10–20 раз, 1 %-й раствор крахмала, раствор йода.

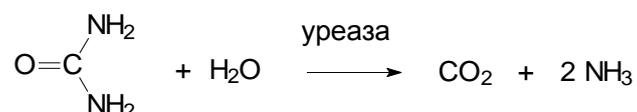
Приборы. Пробирки, стеклянные палочки, часовые стекла.

Ход определения. В пробирку наливают 5–10 мл 1 %-го раствора крахмала и около 2 мл разбавленной в 10–20 раз слюны. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню с температурой 37–40°С. Затем через 2, 4, 6 и 8 минут стеклянной палочкой отбирают 1–2

капли раствора крахмала из пробирки и смешивают на часовом стекле с одной каплей раствора йода. Вначале жидкость с йодом будет давать синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться йодом в темно-коричневый, красный цвет и, наконец, перестанут окрашиваться совсем (останется желтый цвет йода).

2.1.5. Обнаружение активности уреазы в соевой муке

Уреаза – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз мочевины до диоксида углерода и аммиака в реакции:



Уреаза содержится в соевых бобах, синтезируется некоторыми микроскопическими грибами и бактериями.

Материалы для исследования и реактивы. Соевая мука, 2 %-й раствор мочевины, 1 %-й раствор фенолфталеина.

Приборы. Штатив с пробирками, пипетка на 5 мл, водяная баня.

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

2.2. Изучение свойств ферментов

2.2.1. Специфичность действия ферментов

Ферменты *специфичны в отношении как типа катализируемых реакций, так и субстратов*, на которые они действуют. Так, амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на белки. Сычужный фермент действует на казеин молока, но не действует на полисахариды и т. д.

Материалы исследования и реактивы. 1 %-й раствор крахмала, молоко, слюна, разбавленная в 5 – 10 раз, 0,1 %-й раствор йода в 0,2 %-ом растворе йодида калия, 1 %-й раствор сычужного фермента.

Приборы. Пробирки, водяная баня, пипетки на 1 и 5 мл.

Ход определения. Берут 4 пробирки, нумеруют их. В пробирки 1 и 2 наливают по 5 мл раствора крахмала, а в пробирки 3 и 4 – по 5 мл молока. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 1 мл разбавленной слюны, а в пробирки 2 и 4 – по 1 мл раствора сычужного фермента. Все 4 пробирки ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С на 10–15 минут. По истечении указанного времени наблюдают произошедшие изменения в пробирках с молоком, а расщепление крахмала проверяют прибавлением в пробирки 2–3 капель раствора йода в йодиде калия. Полученные результаты заносят в табл. 10:

Таблица 10.

Состав реакционной среды.

Компоненты				
	1	2	3	4
Крахмал	+	+	–	–
Молоко	–	–	+	+
Амилаза	+	–	+	–
Сычужный фермент	–	+	–	+
Изменение цвета раствора				

Результаты опыта объясняются тем, что створаживание белка молока происходит вследствие частичного гидролиза казеина при участии сычужного фермента, а крахмал расщепляется только под действием амилазы слюны.

2.2.2. Термолабильность ферментов

Одним из характерных свойств ферментов является *термолабильность*, т.е. чувствительность фермента к изменениям температуры. Большинство ферментов при нагревании выше 70°С утрачивают свои каталитические свойства, т.е. инактивируются.

Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. В термолабильности ферментов можно убедиться при исследовании ускорения гидролиза крахмала *амилазой*.

Материалы исследования и реактивы. 1 %-й раствор крахмала, слюна, разбавленная в 10 раз, 0,1 %-й раствор йода в 0,2 %-ом растворе йодида калия.

Приборы. Пробирки, водяная баня, пипетки на 1 и 5 мл.

Ход определения. В одну из пробирок наливают около 1 мл прокипяченной в течение 5–8 мин разбавленной слюны, в другую – около 1 мл некипяченной разбавленной слюны. В обе пробирки наливают по 3 мл раствора крахмала. Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки помещают в водяную баню с температурой 37–40 °С на 10 мин.

Затем в обе пробирки прибавляют по 2–3 капли раствора йода и по окраске смесей делают выводы о протекании гидролиза крахмала.

2.2.3. Влияние рН среды на активность ферментов

Для разных ферментов существуют определенные значения рН (кислотности раствора), при котором фермент наиболее активен (*оптимум рН*).

Например, для пепсина оптимум рН 1,5–2,5, для щелочной фосфатазы рН 9–10 и т.д. Для амилазы слюны оптимум рН 6,8; в кислой и щелочной среде активность амилазы снижается. Оптимум рН для амилазы слюны можно установить при определении степени гидролиза крахмала при различных значениях рН. О расщеплении крахмала судят по его реакции с раствором йода. При определенном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью, но по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную среду расщепление крахмала произойдет частично или же крахмал совсем не будет расщепляться.

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10–20 раз, 1%-й раствор крахмала, раствор йода, буферные растворы с рН 3,0, 7,0 и 9,0.

Приборы. Штатив с пробирками, термостат или водяная баня 37–40 °С.

Ход определения. В три пробирки наливают по 3 мл разбавленной слюны. В пробирки добавляют 1 мл буферного раствора с рН 3,0; 7,0 и 9,0 соответственно и по 3 мл раствора крахмала. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню с

температурой 37–40 °С. Через 10 минут пробирки вынимают, добавляют в каждую по 2–3 капли раствора йода и по окраске жидкости судят о степени гидролиза крахмала. Результаты наблюдений заносят в табл. 2 и делают вывод об оптимальном значении рН для действия фермента амилазы.

Таблица 11.

Исследование оптимального значения рН α -амилазы.

Номер пробирки	рН раствора	Окраска с йодом
1	3,0	
2	7,0	
3	9,0	

2.2.4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Активаторы и ингибиторы прямо или косвенно (аллостерически) влияют на активный центр фермента и изменяют его каталитическую активность. *Активаторами* часто служат ионы металлов I или II групп, некоторые анионы, трипептид глутатион и др. *Ингибиторами* могут быть неорганические соли, промежуточные или конечные продукты реакции, структурные аналоги субстратов, некоторые белки и другие вещества. Действие активаторов и ингибиторов можно наблюдать на примере активности амилазы.

Материалы для исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 3–5 раз, 1 %-й раствор крахмала, 1 %-й раствор хлорида натрия, 1 %-й раствор сульфата меди, раствор йода.

Приборы. Штатив с пробирками, пипетки на 1 и 5 мл.

Ход определения. В три пробирки наливают по 3 мл разбавленной слюны. В первую пробирку добавляют 1 мл раствора хлорида натрия, во вторую 1 мл 1 %-го раствора сульфата меди, в третью 1 мл воды. После этого в каждую пробирку отмеривают по 1 мл раствора крахмала и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.

Далее из каждой пробирки отбирают по 0,5 мл содержимого в другие пробирки, добавляют туда по капле раствора йода и наблюдают окраску. То же самое проделывают два раза с интервалом в 5 мин. Результаты заносят в табл. 3 и делают выводы.

Таблица 12.

Исследование активации и ингибирования α -амилазы.

Время инкубации, мин	Окраска с йодом		
	NaCl	CuSO ₄	H ₂ O
5			
10			
15			

2.3. Методы количественного определения активности ферментов

Активность фермента обычно определяют по скорости убыли субстрата или по скорости накопления продуктов реакции. За единицу активности фермента принят *катал* (кат), равный количеству фермента, которое катализирует превращение 1 моля субстрата за 1 с. Кроме того, применяются кратные единицы, например, 1 нкат (нанокатал), т.е. $1 \cdot 10^{-9}$ кат. Более широко употребляется международная единица активности ферментов. *Активность* в международных единицах соответствует количеству субстрата в микромолях, превращенного за 1 мин: $1\text{Е} = 1 \text{ мкмоль/мин}$. *Удельная активность* – это отношение активности к массе очищенного фермента или к массе белка. Она выражается в кат/кг или Е/мг.

2.3.1. Определение активности липазы

Гидролитический фермент *липаза* широко распространен в тканях животных и растений. Особенно много его содержится в поджелудочной железе, тканях мышц, семенах различных растений; также в значительных количествах его образуют плесневые грибы и некоторые бактерии. Липаза катализирует реакцию расщепления жиров на глицерин и жирные кислоты, которая начинается обычно с отщепления остатка жирной кислоты в первом положении:



Образующиеся при этом жирные кислоты можно нейтрализовать щелочью. По количеству щелочи, пошедшей на титрование свободных

жирных кислот, образующихся за определенный промежуток времени, судят об активности липазы.

Материалы исследования и реактивы. Молоко пастеризованное, липаза поджелудочной железы, 0,1н и 0,01н растворы гидроксида натрия, 0,1 %-й раствор фенолфталеина.

Приборы. Колбы конические на 100 мл, градуированная пипетка на 1 мл, водяная баня, термостат на 37 °С.

Ход определения. В колбу отмеривают 50 мл пастеризованного молока, прибавляют 3 – 5 капель фенолфталеина и нейтрализуют 0,1н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Затем колбу на 3–5 мин ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С и после этого в нее добавляют 3 мл раствора липазы (замечая при этом время). Содержимое колбы тщательно перемешивают, отбирают в коническую колбу 5 мл смеси, охлаждают под струей водопроводной воды и титруют из микропипетки 0,01н раствором NaOH. Полученные результаты выражают графически, откладывая по вертикали количество пошедшего на титрование 0,1н раствора NaOH, а по горизонтали – время инкубации. Вычисляют активность А в мкмоль/мин по формуле:

$$A = (V_3 - V_0) / 0,9.$$

2.3.2. Определение активности трипсина

Трипсин относится к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз (протеолитические ферменты). Он катализирует реакцию расщепления пептидных связей в белках и полипептидах. Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в казеине, который инкубируют с данным ферментом.

Материалы исследования и реактивы. Раствор казеина, раствор трипсина, 0,1н раствор гидроксида натрия, раствор формалина (формол), 1 %-й раствор фенолфталеина.

Приборы. Колбы конические на 100 мл, пипетка на 10 мл, водяная баня, термостат на 37 °С.

Ход определения. В колбу отмеривают 50 мл раствора казеина, подогревают на водяной бане до 35–37 °С и прибавляют 2 мл трипсина. Сразу отбирают 10 мл раствора и определяют в нем аминный азот методом формольного титрования. Колбу с казеином и трипсином ставят в термостат при 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин отбирают по 10 мл раствора и в отобранных пробах определяют содержание аминного азота. Прирост аминного азота выражают графически,

откладывая по вертикали количество аминного азота, а по горизонтали – время инкубации). Вычисляют активность A в мкмоль/мин по формуле: $A = (V_3 - V_0) / 0,18$

Определение аминного азота методом формольного титрования. К 10 мл исследуемого раствора прибавляют 5–6 капель фенолфталеина и титруют 0,1н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (не записывая объем). Затем в раствор добавляют 2 мл формола и вновь титруют 0,1н раствором NaOH до слабо-розового окрашивания (записывая объем). Количество израсходованной щелочи после добавления формола умножают на 1,4 и получают количество аминного азота в мг (1 мл 0,1н раствора NaOH соответствует 1,4 мг аминного азота).

2.3.3. Методы определения активности амилазы

2.3.3.1. Определение активности амилазы методом серийных разведений.

Метод основан на определении наименьшего количества *амилазы*, полностью расщепляющей при стандартных условиях (оптимальном значении pH и температуры) весь добавленный крахмал. Амилазная активность слюны выражается количеством 0,1 %-го раствора крахмала в мл, которое расщепляется 1 мл неразведенной слюны при температуре 37 °С в течение 30 мин. В норме амилазная активность слюны равна 160 – 320.

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10 раз (1 мл слюны смешивают с 9 мл воды), 0,1 %-й раствор крахмала, раствор йода в йодиде калия.

Приборы. Штатив с пробирками, пипетка на 1 мл, термостат на 37°С.

Ход определения. В 10 пробирок наливают по 1 мл воды. Далее в первую пробирку добавляют 1 мл разбавленной в 10 раз слюны и хорошо перемешивают. Затем 1 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую пробирку и также тщательно перемешивают. 1 мл жидкости из нее переносят в третью пробирку и т. д. Из последней (десятой) пробирки 1 мл смеси выливают. В каждую пробирку вносят по 1 мл раствора крахмала и перемешивают. Все пробирки помещают в термостат при 37 °С на 30 мин. После инкубации пробирки охлаждают водопроводной водой и добавляют по 1–2 капли раствора

йода. Жидкость в пробирках окрашивается в желтый, розовый и фиолетовый цвет. Результаты наблюдений заносят в табл. 13:

Таблица 13.

Определение активности фермента методом разведения.

Окраска с йодом	Разведение слюны в пробирках									
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/12	1/25	1/51	1/102
	0	0	0	0	0	0	80	60	20	40
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
Желтая										
Розовая										
Фиолетовая										

Отмечают последнюю пробирку с желтой окраской жидкости, где гидролиз крахмала прошел полностью, и делают расчет амилазной активности слюны.

Пример. Допустим, что желтая окраска появилась в четвертой пробирке, где слюна была разбавлена в 160 раз. Умножив величину разведения на 2 (раствор крахмала в опыте в мл), получим амилазное число для данного раствора $160 \cdot 2 = 320$, т.е. под влиянием амилазы, содержащейся в 1 мл неразбавленной слюны, произошло расщепление 320 мл 1 %-го раствора крахмала.

2.3.3.2. Определение активности альфа-амилазы фотокolorиметрическим методом.

Материалы исследования и реактивы. Слюна, разбавленная в 10 раз (1 мл слюны смешивают с 9 мл воды), 0,15 %-й раствор крахмала-индикатора, раствор йода в йодиде калия ($D^{400} = 0,22 \pm 0,01$). Приготовление раствора крахмала: взвесить 1,5 г крахмала-индикатора, перенести в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавить около 30 мл дистиллированной воды, поместить в кипящую водяную баню при постоянном перемешивании до появления опалесценции. Колбу охладить, добавить 10 мл ацетатного буферного раствора (рН 4,7), объем в колбе довести до 100 мл дистиллированной водой.

Приборы. Штатив с пробирками, колбы на 50 мл, пипетки на 1 и на 10 мл, термостат на 37 °С, фотоэлектроколориметр.

Ход определения: 5 мл исследуемого раствора фермента (например, раствора разбавленной в 10 раз слюны) выдерживают в термостате при 37 °С 5-7 минут, затем добавляют 10 мл раствора крахмала. Выдерживают в термостате при 37 °С 10 минут. Из смеси отбирают по 0,25 мл, помещают в колбу вместимостью 50 мл, куда было ранее внесено по 25 мл йодного реагента ($D_{400}=0,22\pm 0,01$). Измеряют оптическую плотность при длине волны 670 нм на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Активность α -амилазы рассчитывают по формуле:

$(D_k - D_0) / D_k \cdot 0,1 = C$, где

$0,02 < C < 0,07$

D_k - оптическая плотность контрольного раствора;

D_0 - оптическая плотность опытного раствора;

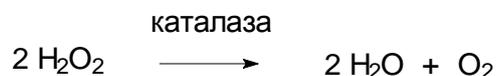
C - безразмерная величина, выражающая соотношение оптических плотностей опытного и контрольного растворов.

a - разведение.

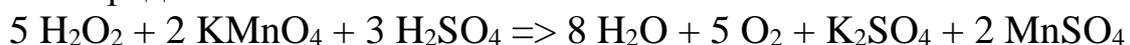
Амилолитическая активность = $(7,26 \cdot C - 0,03766) / a$.

2.3.4. Методы определения активности каталазы.

Фермент *каталаза* содержится в сыром молоке, особенно много каталазы находится в молозиве и в молоке, полученном от животных, больных маститом. Каталаза присутствует также в крови человека и животных, и в любых в растительных и животных тканях, являясь одним из компонентов антиоксидантной системы организма. Каталаза вызывает разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород в реакции:



Активность каталазы может быть выражена количеством миллиграммов перекиси водорода, разрушенной за 30 мин при определенных условиях опыта. Для определения наличия перекиси водорода используется титрование ее раствором перманганата калия в кислой среде:



2.3.4.1. Определение активности каталазы молока по методу А.Н. Баха и С.Р. Зубковой

Материалы исследования и реактивы. Молоко сырое, разведенное в 2 раза (5 мл молока смешивают с 5 мл воды), 1 %-й раствор перекиси водорода, 10 %-й раствор серной кислоты, 0,1н раствор перманганата калия.

Приборы. Конические колбы на 100 мл, пипетки градуированные на 5 и 10 мл, пипетки на 1 мл.

Ход определения. В две конические колбы отбирают по 7 мл дистиллированной воды. Затем в одну из них прибавляют 1 мл разведенного в 2 раза сырого молока, а в другую 1 мл разведенного молока, но предварительно прокипяченного. В обе колбы добавляют по 1 мл 1 %-го раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин. Затем в каждую колбу прибавляют по 3 мл 10 %-й серной кислоты для прекращения действия каталазы и оттитровывают остаточное количество пероксида водорода 0,1н раствором перманганата калия до появления светло-розового окрашивания. По разности между контрольным и опытным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству расщепленного с участием фермента пероксида водорода.

Пример. Допустим, что на титрование контрольной пробы пошло 8 мл, опытной – 2 мл 0,1н раствора KMnO_4 . Количество пероксида водорода, разложенного каталазой, содержащейся в 1 мл разведенного в 2 раза молока, составит $8 - 2 = 6$ мл, или $6 \cdot 1,7 = 10,2$ мг (1 мл 0,1н раствора KMnO_4 эквивалентен 1,7 мг пероксида водорода). Следовательно, в 1 мл сырого молока содержится количество каталазы, способное за 30 мин разложить $10,2 \cdot 2 = 20,4$ мг пероксида водорода.

2.3.4.2. Определение активности каталазы картофеля

Материалы исследования и реактивы. Картофель, 1 %-й раствор перекиси водорода, 10 %-й раствор серной кислоты, 0,1н раствор перманганата калия.

Приборы. Мерные колбы на 100 мл и конические колбы на 200 мл, пипетки градуированные на 5 и 20 мл, воронки, бюретки.

Ход определения. Растирают в ступке 1 г сырого картофеля с кварцевым песком, постепенно добавляя 2-3 мл воды. Для уменьшения кислотности среды добавляют на кончике шпателя карбонат кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа. Растертую

массу количественно переносят в мерную колбу и объем жидкости доводят водой до 100 мл. Смесь оставляют стоять в течение 30-60 мин, после чего фильтруют через складчатый фильтр. В две конические колбы на 200 мл отбирают мерной пипеткой по 20 мл вытяжки, и одну из них доводят до кипения (контрольная проба). В обе колбы добавляют по 2 мл 1%-го раствора перекиси водорода и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Затем в каждую колбу прибавляют по 3 мл 10 %-й серной кислоты для прекращения действия каталазы и титруют остаточное количество пероксида водорода 0,1н раствором перманганата калия до появления светло-розового окрашивания. По разности между контрольным и опытным титрованием находят количество перманганата, эквивалентное количеству расщепленного с участием фермента пероксида водорода.

Пример. Допустим, что на титрование контрольной пробы пошло 8 мл, опытной – 2 мл 0,1н раствора KMnO_4 . Количество пероксида водорода, разложенного каталазой, составит $8 - 2 = 6$ мл, или $6 * 1,7 = 10,2$ мг (1 мл 0,1н раствора KMnO_4 эквивалентен 1,7 мг пероксида водорода). Следовательно, в 1 г сырого картофеля содержится количество каталазы, способное за 30 мин разложить $10,2 * 5 = 51$ мг пероксида водорода. Таким образом,

$$m(\text{H}_2\text{O}_2) = (V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыт}}) * 1,7 * 5$$

2.3.5. Определение активности сычужного фермента

Сычужный фермент обладает способностью свертывать молоко и широко применяется при получении творога и сыра. Активность сычужного фермента выражается в условных единицах, характеризующих количество молока, которое свернется под действием 1 г фермента при 35°C в течение 40 мин.

Материалы исследования и реактивы. Молоко сырое, 1 %-й раствор сычужного фермента (порошка).

Приборы. Химический стакан на 100 мл, пипетка градуированная на 1 мл, секундомер, водяная баня (температура бани в течение всего опыта должна быть равна 35°C).

Ход определения. В химический стакан наливают 50 мл молока и ставят в водяную баню с температурой 35°C . Через 3–5 мин к молоку прибавляют 0,5 мл 1 %-го раствора сычужного фермента, быстро перемешивают и включают секундомер. Наблюдают за свертыванием молока легким покачиванием стакана или прикосновением к молоку стеклянной палочкой; появление хлопьев и сгустка показывает начало

свертывания. По секундомеру отмечают продолжительность свертывания, то есть время с момента внесения в молоко сычужного фермента до появления хлопьев. Активность сычужного фермента вычисляют по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 40}{0.005 \cdot n}$$

где X – активность сычужного фермента в условных единицах (у.е.);

a – количество взятого молока, мл;

n – продолжительность свертывания молока, минуты.

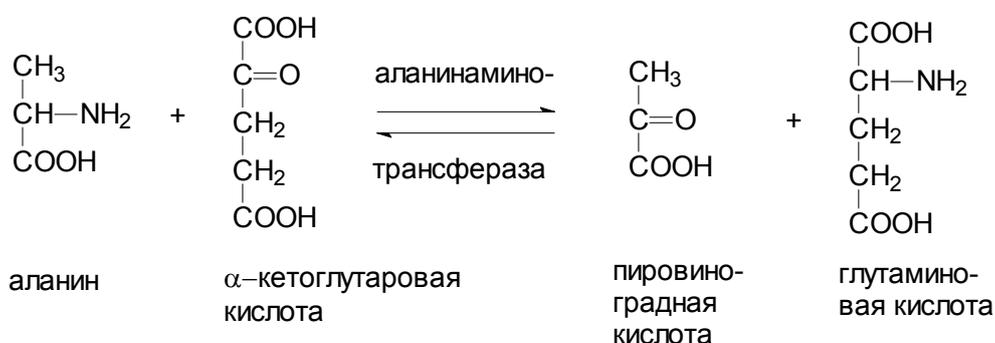
Пример. К 50 мл молока прибавляем 0,5 мл 1 %-го раствора сычужного фермента, что соответствует 0,005 г. Молоко свернулось в течение 4 мин. Активность фермента будет равна:

$$X = \frac{50 \cdot 40}{0.005 \cdot 4} = 100\,000 \text{ у.е.}$$

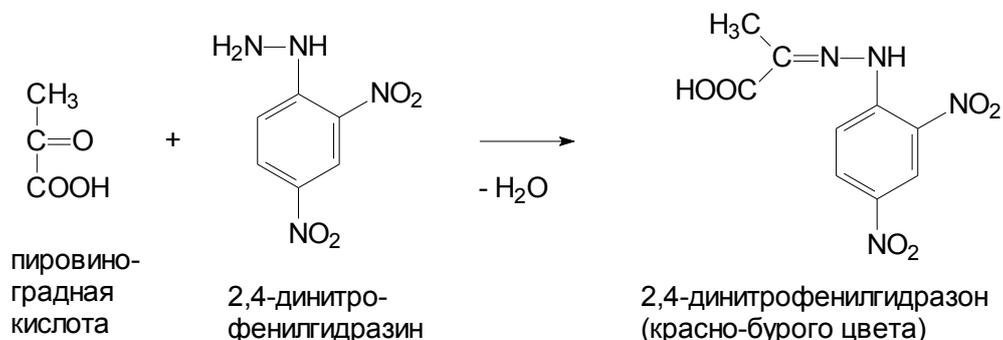
Следовательно, 1 г сычужного фермента свертывает 100 кг молока в течение 40 мин при температуре 35 °С.

2.3.6. Определение активности аланинаминотрансферазы в мышечной ткани животных

Аминотрансферазы (трансаминазы) катализируют межмолекулярный перенос аминогруппы с аминокислот на кетокислоты, причем коферментом в этой реакции служит пиридоксальфосфат, который выполняет роль промежуточного акцептора аминогруппы. Например, аланинаминотрансфераза (АлАТ) катализирует перенос аминогруппы с аланина на α -кетоглутаровую кислоту в реакции:



По количеству образовавшейся пировиноградной кислоты можно судить об активности фермента. Пировиноградную кислоту определяют колориметрически по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином, приводящей к образованию окрашенного 2,4-динитрофенилгидразона по схеме:



Материалы исследования и реактивы. Мясо или рыба. Субстратная смесь, приготовленная следующим образом: в 100 мл фосфатного буфера с pH 7,4 растворяют 1,78 г DL-аланина (или 0,89 г α-аланина) и 29,2 мг α-кетоглутаровой кислоты (смесь хранится в замороженном виде); 0,02 %-й раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 1н HCl; 0,4н раствор NaOH.

Приборы. Фотоэлектрический колориметр ФЭК-Н-57 с зеленым светофильтром с λ=560 нм и кюветами с рабочим расстоянием 10 мм; термостат на 38°С.

Ход работы. На технических весах взвешивают около 0,4 г мяса или рыбы (с точностью до 0,01 г) и растирают в ступке с кварцевым песком, предварительно добавив 4 мл воды. Полученный гомогенат фильтруют через бумажный фильтр. В две пробирки вносят по 0,5 мл только что размороженной субстратной смеси, в одну из них добавляют 0,2 мл воды (контроль), а в другую – 0,2 мл фильтрата гомогената. Содержимое обеих пробирок хорошо перемешивают и помещают в термостат при +38°С на 30 мин. После этого в обе пробирки прибавляют по 0,5 мл 0,02 %-го раствора 2,4-динитрофенилгидразина и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем в каждую пробирку прибавляют по 5,0 мл раствора гидроксида натрия, перемешивают и измеряют оптическую плотность рабочего раствора относительно контроля.

Активность аланинаминотрансферазы выражают в условных единицах. За единицу активности принимают образование 1 мкмоль пировиноградной кислоты за 1 мин. Количество пировиноградной кислоты находят по калибровочной кривой, построенной с помощью

ряда стандартных растворов разных концентраций, содержащих динитрофенилгидразоны пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот. Активность (А) рассчитывают по формуле

$$A = \frac{C}{M \cdot t}$$

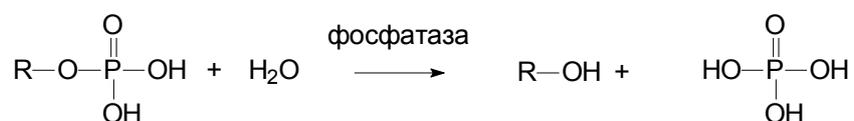
где C – количество пировиноградной кислоты в мкмольях;

M – навеска мяса или рыбы в граммах, делённая на 20 (т.к. в эксперименте используется 1/20 часть полученного гомогената);

t – время инкубации (30 мин).

2.3.7. Методы определения активности фосфатаз

Фосфатазы – ферменты класса гидролаз, содержащиеся в тканях животных и растений и катализирующие отщепление фосфатного остатка от молекул сложных эфиров фосфорной кислоты и спиртов или фенолов в реакции:



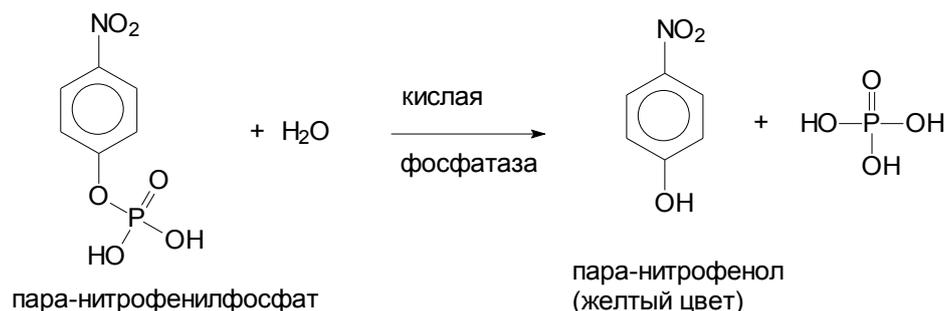
По оптимальному значению рН фосфатазы могут быть кислыми или щелочными. Они различаются по локализации в тканях и клетках. Определение активности кислой фосфатазы может быть использовано для контроля качества колбасы, а щелочной – пастеризованного молока.

2.3.7.1. Определение активности кислой фосфатазы в мясе и колбасе

В ходе термической обработки мяса при изготовлении вареных колбас *кислая фосфатаза* полностью разрушается (для этого необходима температура 80 °С при выдержке в течение 20 мин). Поэтому обнаружение в вареной колбасе остаточной активности этого фермента говорит о нарушении термического режима в ходе ее производства, что может быть использовано для контроля качества продукции.

Метод определения кислой фосфатазы основан на ее способности катализировать гидролиз пара-нитрофенилфосфата с образованием

пара-нитрофенола, натриевая соль которого окрашена в желтый цвет по схеме:



Материалы исследования и реактивы. Мясо, вареная колбаса. Ацетатный буферный раствор pH 5,4, который готовят смешением одного объема 1н раствора уксусной кислоты и пяти объемов 1н раствора ацетата натрия. Раствор гидроксида натрия (40 %). Раствор субстрата: растворяют 0,8 г бариевой соли пара-нитрофенилфосфата в 100 мл 0,001н соляной кислоты, раствор фильтруют от осадка и, если он имеет желтую окраску, взбалтывают его 2–3 раза в делительной воронке с диэтиловым эфиром до получения бесцветного водного слоя, который отделяют от эфира. Раствор субстрата хранят на холоду в темной склянке.

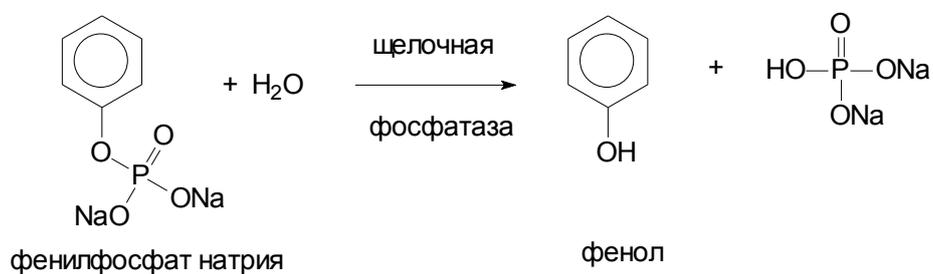
Приборы. Пробирки, термостат, воронки, бумажные фильтры.

Ход определения. Растирают в ступке 2 г вареной колбасы (пробу берут из внутренней части изделия) с 5 мл воды. Также растирают в ступке с кварцевым песком 2 г мяса с 5 мл воды. Оба гомогената фильтруют через складчатый фильтр, наливают в две пробирки по 1 мл полученных фильтратов, прибавляют по 2 капли ацетатного буфера и по 0,5 мл субстратного раствора. Затем пробирки помещают в термостат при 40 °С на 1 ч. После этого в каждую пробирку добавляют по 1 капле 40 %-го раствора NaOH. При этом в пробирке с гомогенатом мяса появляется желтое окрашивание натриевой соли пара-нитрофенола, а в пробирке с гомогенатом колбасы в случае надлежащего технологического режима при ее производстве раствор остается бесцветным. Количественное определение активности фосфатазы может быть осуществлено фотоколориметрически с синим светофильтром. Ее определяют исходя из значения оптической плотности раствора по градуировочному графику, построенному для ряда растворов пара-нитрофенола.

2.3.7.2. Определение активности щелочной фосфатазы в молоке

Щелочная фосфатаза полностью инактивируется при температуре 63 °С с выдержкой в течение 30 мин, т.е. в условиях, применяемых для пастеризации молока, сливок или кисломолочных продуктов. Поэтому обнаружение в этих продуктах остаточной активности этого фермента говорит о нарушении термического режима в ходе ее производства, что может быть использовано для контроля качества продукции.

Метод определения щелочной фосфатазы основан на ее способности катализировать гидролиз динатриевой соли фенолфосфорной кислоты с образованием фенола, который дает с индикатором 4-аминоантипирином окрашенный в розовый цвет комплекс по схеме:



Материалы исследования и реактивы. Молоко пастеризованное и сырое, раствор субстрата (смесь динатрийфенилфосфата с 4-аминоантипирином, для его приготовления непосредственно перед определением смешивают растворы А и Б в соотношении 1:9). Раствор А: 1,25 г динатриевой соли фенолфосфата растворяют в 100 мл буферного раствора (40 г хлорида аммония растворяют в 200 мл дистиллированной воды, добавляют 348 мл 25 %-го водного аммиака и общий объем доводят водой до 1 л). Раствор Б: 0,8 г 4-аминоантипирина растворяют в 900 мл дистиллированной воды), осадитель белков системы цинк-медь (растворяют 30 г сульфата цинка и 6 г сульфата меди в 1 л дистиллированной воды).

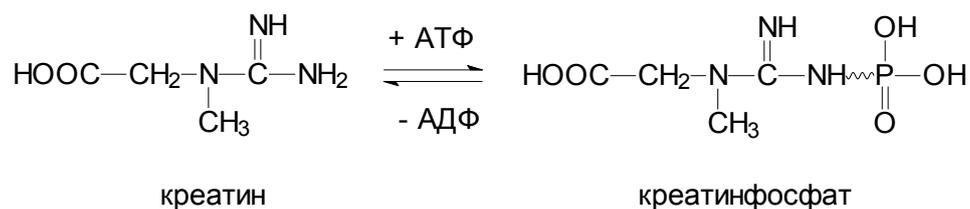
Приборы. Пробирки, термостат, воронки, бумажные фильтры.

Ход определения. В две пробирки наливают по 3 мл сырого и пастеризованного молока, добавляют по 2 мл раствора субстрата, содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню (или термостат) с температурой 40 – 45 °С на 30 мин. Затем в каждую пробирку добавляют по 5 мл осадителя белков системы цинк-медь, перемешивают, ставят в термостат на 10 мин, вынимают пробирки из термостата и отмечают окраску раствора над осадком белка.

При наличии фосфатазной активности (сырое молоко или плохое качество пастеризации) раствор окрасится в розовый или красный цвет, а при хорошем качестве пастеризации – останется бесцветным.

2.3.8. Определение активности креатинфосфокиназы в мышечной ткани животных

Креатинфосфокиназа (КФК)– фермент класса трансфераз, катализирующий перенос фосфатного остатка с АТФ на креатин, или наоборот, с креатинфосфата на АДФ согласно схеме:



Метод определения активности КФК основан на ее способности катализировать образование креатина из смеси креатинфосфата с АДФ, а креатин образует окрашенное соединение с диацетилом в присутствии α -нафтола в щелочной среде. Количество окрашенного продукта определяется фотоколориметрически при длине волны 535 нм.

Материалы исследования и реактивы. Гомогенат мышечной ткани, 0,1 М трис-малеиновый буфер с рН 6.5, 0,008 М раствор АДФ, 0,048 М раствор ацетата магния на трис-малеиновом буфере, 0,16 М раствор креатинфосфата на трис-малеиновом буфере, щелочная смесь (водный раствор, содержащий 6 % NaOH и 16 % Na₂CO₃), 1 %-й раствор α -нафтола в щелочной смеси (готовится непосредственно перед опытом), 0,025 %-й раствор диацетила (готовится следующим образом: растворяют 6 г диметилглиоксима в 200 мл 5н раствора серной кислоты и перегоняют при 100°C; полученный раствор хранится в морозилке, а перед анализом рабочий раствор готовится путем его разведения в 20 раз), раствор 1мг креатина в 10 мл трис-малеинового буфера для построения калибровочной кривой.

Приборы. Пробирки, термостат, фотоколориметр со светофильтром 535 нм.

Ход определения. В ступке растирают 0,4 г мяса с кварцевым песком, прибавляют 0,4 мл воды и фильтруют. В две пробирки отмеривают по 0,7 мл трис-буферного раствора, 0,2 мл раствора креатинфосфата и 0,3 мл раствора АДФ. Обе пробирки прогревают при

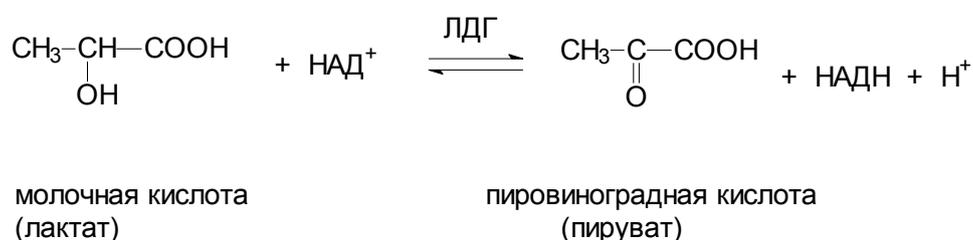
37°C 5 мин. Затем в одну пробирку добавляют 0,4 мл фильтрата гомогената мяса, а в другую – 0,4 мл воды и помещают обе пробирки в термостат при 37°C на 30 мин. Затем добавляют по 1 мл раствора α-нафтола и 0,5 мл рабочего раствора диацетила и помещают пробирки в темное место на 30 мин для завершения реакции. Затем измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 535 нм против контрольного раствора, не содержащего фермента. Количество образовавшегося креатина определяют по калибровочному графику, построенному с помощью стандартной смеси, которую готовят путем смешения 1 мл стандартного раствора креатина, 1 мл раствора α-нафтола и 0,5 мл рабочего раствора диацетила. Полученную смесь также выдерживают в темном месте 30 мин и измеряют ее оптическую плотность против воды. Активность фермента (*A*) выражают на 1 г мышечной ткани в мкмоль/г·мин и рассчитывают по следующей формуле:

$$A = \frac{5 \cdot Q}{131 \cdot t}$$

где *Q* – количество креатина в мкг, образовавшееся в ходе креатинфосфокиназной реакции; *t* – время инкубации в мин; 131 – молекулярная масса креатина.

2.3.9. Определение активности лактатдегидрогеназы методом Варбурга

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) – фермент класса оксидоредуктаз, катализирующий окисление молочной кислоты в пировиноградную с участием кофермента НАД⁺, а также обратный процесс восстановления пирувата до лактата:



Измерение активности ЛДГ может быть произведено в ходе восстановления пирувата по убыли восстановленной формы НАДН

спектрофотометрически с помощью измерения оптической плотности (D) при длине волны света 340 нм.

Материалы исследования и реактивы. Сыворотка крови; 0,01 М раствор пирувата натрия (растворяют 1,1 мг пирувата натрия в 1 мл дистиллированной воды); 0,2 М фосфатный буфер с рН 7,8; 0,001 %-й раствор НАДН (растворяют 5 мг НАДН в 5 мл 0,2 М фосфатного буфера с рН 7,8).

Приборы. Спектрофотометр со светофильтром на 340 нм, кюветы с толщиной слоя 1 см и емкостью 3 мл, секундомер.

Ход определения. В контрольную кювету вносят 0,1 мл сыворотки и 2,9 мл фосфатного буфера, перемешивают и помещают в камеру спектрофотометра в качестве кюветы сравнения. В другую кювету вносят 0,1 мл сыворотки, 0,2 мл раствора НАДН и 2,6 мл фосфатного буфера. Через 2 мин вносят 0,1 мл 0,01 М раствора пирувата натрия, перемешивают и включают отсчет времени по секундомеру. Затем записывают значения D через каждую минуту в течение 3–5 минут. Строят графическую зависимость D от времени и проводят расчет по начальному участку графика, где сохраняется пропорциональная зависимость D от t . Затем рассчитывают активность ЛДГ (A) в мкмоль/мин на 1 мл сыворотки по следующей формуле:

$$A = \Delta D \cdot 10000 / (\Delta t \cdot 2,07)$$

где ΔD – изменение оптической плотности в течение промежутка времени Δt .

2.3.10. Интерактивное лабораторное занятие по теме: «Определение активности трипсина»

I. Методика проведения экспериментальной работы

Трипсин относится к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз (протеолитические ферменты). Он катализирует реакцию расщепления пептидных связей в белках и полипептидах.

В работе изучают зависимость скорости реакции расщепления (V) белка молока казеина от концентрации фермента [E] (трипсина) и субстрата [S] (казеина). О скорости реакции расщепления казеина трипсином (V) можно судить по нарастанию аминного азота в казеине, который инкубируют с данным ферментом. Активность фермента (A , мкг/мин) рассчитывают по количеству субстрата, который расщепился под действием фермента за единицу времени.

Материалы исследования и реактивы. Раствор казеина, раствор трипсина, 0,1н раствор гидроксида натрия *NaOH*, раствор формалина (формол), 1% раствор фенолфталеина.

Приборы и материалы. Колбы конические на 100 мл, пипетка на 10 мл, водяная баня, термостат на 37 °С, фильтровальная бумага.

Ход определения. В колбу отмеривают *X* мл раствора казеина, подогревают на водяной бане до 35–37 °С и прибавляют *Y* мл раствора трипсина (по указанию преподавателя реакцию смесь доводят до необходимого объема дистиллированной водой). Сразу отбирают 5 мл раствора и определяют в нем аминный азот методом формольного титрования (t_0, V_0). Колбу с казеином и трипсином ставят в термостат при 37 °С, затем через t_1, t_2 и t_3 минут отбирают по 5 мл раствора и в отобранных пробах (V_1, V_2, V_3 , соответственно) определяют содержание аминного азота.

Прирост аминного азота (мкг) выражают графически (откладывая по вертикали количество аминного азота, а по горизонтали – время инкубации).

Активность фермента (*A*, мкг/мин) рассчитывают по формуле:

$$A = (V_3 - V_1) / (t_3 - t_1)$$

Определение аминного азота методом формольного титрования. К 5 мл исследуемого раствора прибавляют 5–6 капель фенолфталеина и титруют 0,1н раствором *NaOH* до слабо-розового окрашивания. Затем в раствор добавляют 2 мл формола и вновь титруют 0,1н раствором *NaOH* до слабо-розового окрашивания.

Количество израсходованной щелочи после добавления формола умножают на 1,4 и получают количество аминного азота в мг (1 мл 0,1н раствора *NaOH* соответствует 1,4 мкг аминного азота).

II. Методические указания для преподавателя

1. Лабораторная работа проводится после чтения лекции по теме «Ферменты», и практического занятия по теме «Классификация ферментов. Ферментативные реакции». Длительность занятия 4 часа.

2. Студенты получают задание найти информацию о строении и свойствах трипсина в сети Интернет, с указанием конкретных сведений:

- ✓ Строение фермента;
- ✓ Активный центр фермента;
- ✓ Оптимум действия фермента (температура, значение pH среды);
- ✓ Специфичность действия фермента.

3. Преподаватель делит группу студентов на две подгруппы. Каждая подгруппа делится на бригады по два человека. В каждой подгруппе назначаются эксперт и референт.

4. Референты анализируют информацию о трипсине и делают краткое сообщение перед аудиторией.

5. Каждая подгруппа получает задание:

1-я подгруппа исследует зависимость скорости реакции расщепления (V) белка молока казеина от концентрации фермента [E] (трипсина);

2-я подгруппа исследует зависимость скорости реакции расщепления (V) белка молока казеина от концентрации субстрата [S] (казеина).

6. *1-я подгруппа* проводит загрузку опытов в соответствии с *таблицей 14*, в которую также заносит результаты расчётов экспериментальных результатов.

Таблица 14.

Зависимость активности трипсина от концентрации фермента.

№ бригады	Загрузка опыта			Результаты эксперимента (V) (количество аминного азота, мкг)				A , мкг/мин
	Х мл раствора казеина	У мл раствора трипсина	H_2O (дист.) мл	t_0	t_1 (30 мин)	t_2 (60 мин)	t_3 (90 мин)	
1	50	2	-					
2	25	2	25					
3	10	2	40					

7. *2-я подгруппа* проводит загрузку опытов в соответствии с *таблицей 15*, в которую также заносит результаты расчётов экспериментальных результатов.

Таблица 15.

Зависимость активности трипсина от концентрации субстрата.

№	Загрузка опыта	Результаты эксперимента (V) (количество аминного азота, мкг)	A , мкг /

брига- -ды										МИ Н
	Хмл раствор а казеи- на	У мл раствор а трип- сина	H_2O дист. , мл	t_0 0 МИ Н	t_1 15 МИ Н	t_2 30 МИ Н	t_3 45 МИ Н	t_4 60 МИ Н	t_5 90 МИ Н	
4	50	4	-							
5	50	2	2		-		-			
6	50	1	3		-		-			

8. Таблицы полностью заполняются результатами экспериментов каждой бригадой на аудиторной доске.

Студенты в индивидуальных отчётах обязательно заполняют ячейки с результатами эксперимента по заданию своей бригады.

Расчёт активности фермента A проводит каждая бригада по данным своего эксперимента.

9. Графики зависимости V/t :

- ✓ каждый студент чертит в индивидуальном отчёте по результатам эксперимента бригады;
- ✓ каждая бригада чертит на едином для подгруппы графике на аудиторной доске.

10. Эксперты подгрупп проводят анализ полученных результатов на основании графического представление экспериментальных данных. С помощью преподавателя обсуждают возможные отклонения экспериментальных результатов от теории.

11. Студенты каждой подгруппы формулируют вывод по результатам экспериментов подгруппы, эксперт формирует единую редакцию вывода.

Каждый студент заносит вывод подгруппы в индивидуальный отчёт.

12. Студенты каждой подгруппы формулируют общий вывод по экспериментальным результатам в целом, эксперты объединяют формулировки и формируют общий вывод в единой редакции.

Каждый студент заносит общий вывод в индивидуальный отчёт.

13. Индивидуальная (балльная) оценка каждому студенту выставляется при готовности каждого члена бригады к выполнению следующих условий:

- ✓ наличие индивидуального отчета, содержащего результаты экспериментов бригады, выводы по экспериментальным результатам бригады и подгруппы, а также общий вывод по работе;

- ✓ ответы на устные вопросы преподавателя или тестирование по теме занятия;

Индивидуальная оценка включает умение работать в группе и активность в обсуждении результатов.

2.3.11. Определение активности препаратов пероксидазы

Метаболические процессы в клетках растений сопровождаются образованием активных форм кислорода, защита от которых осуществляется антиоксидантной системой клетки, в состав которой входят низко- и высокомолекулярные соединения (глутатион, аскорбиновая кислота, таурин и гипотаурин, мочевая кислота). Действие компонентов системы антиоксидантной защиты в основном сводится к подавлению образования свободных радикалов по схеме:

- супероксидный анион-радикал ($\bullet\text{O}_2^-$): $\text{O}_2 + e^- \rightarrow \bullet\text{O}_2^-$
- гидропероксидный радикал $\text{HO}_2\bullet$: $\text{O}_2 + e^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HO}_2\bullet$
- пероксид водорода H_2O_2 : $\text{O}_2 + 2e^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
- гидроксидный радикал $\text{HO}\bullet$: $\text{O}_2 + 3e^- + 3\text{H}^+ \rightarrow \text{HO}\bullet + \text{H}_2\text{O}$

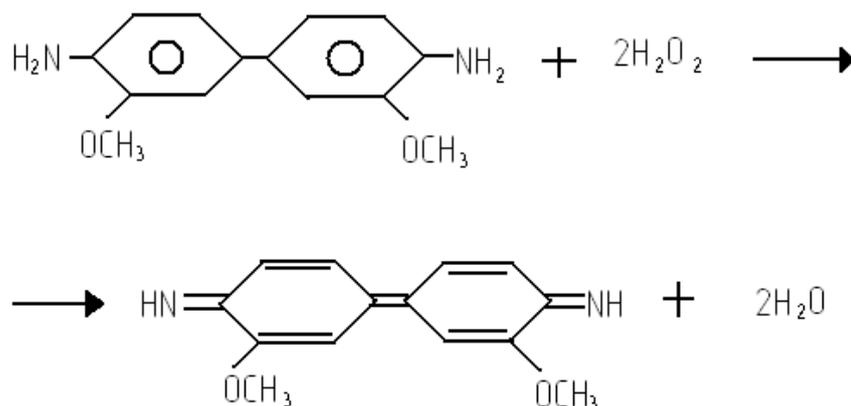
Кроме того, компоненты способствуют поддержанию нормального уровня свободно-радикальных процессов и перекисного окисления липидов в тканях.

Активные формы кислорода выполняют в клетках важные сигнальные функции не только при стрессе, но и в обычных условиях произрастания растений. АФК активируют синтез митохондриальной ДНК и регулируют таким образом дыхательную активность клетки. Стрессовые воздействия (низкая температура, ультрафиолет, химические соединения и др.) могут быть инициаторами окислительных процессов.

Одним из компонентов антиоксидантной системы является фермент пероксидаза. Пероксидаза – широко распространенный в живых организмах фермент. Будучи по своей природе полифункциональным, этот белок участвует во многих процессах жизнедеятельности растений, таких как рост, морфогенез, защита от стрессов. Фермент относится к классу оксидоредуктаз и катализирует окисление различных полифенолов, алифатических и ароматических аминов, а также жирных кислот (пероксидаза жирных кислот), цитохрома (цитохромпероксидаза), глутатиона (глутатионпероксидаза) с помощью перекиси водорода (H_2O_2) или органических перекисей. Наиболее широко распространена и подробно изучена растительная пероксидаза (главным образом из корней хрена), простетическая группа которой близка к гему гемоглобина. Субстратами пероксидазы

могут быть фенолы, фитогормоны, цитохром *c*, НАДФН, триозы, аскорбат, флавоноиды и др.

Метод определения каталитической активности пероксидазы основан на реакции окисления *o*-дианизидина пероксидом водорода по схеме:



Скорость ферментативной реакции контролируют на фотоэлектроколориметре (ФЭК) по поглощению продукта окисления при длине волны 460 нм.

Работа проводится в 2 этапа.

Цель этапа №1 - определить активность пероксидазы (ПО) в тканях растений; сравнить её величину у разных видов растений (пп. 1-3, 7а).

Цель этапа №2 - определить кинетические характеристики ферментативной реакции (пп. 1, 4 – 7б).

Реактивы и материалы:

Растительный материал (листья или корни высших растений); фосфатный буфер с рН 6,7, дистиллированная вода; мерная колба объёмом 100 мл, фарфоровая ступка, фильтровальная бумага, секундомер

Приборы: ФЭК, светофильтр с λ 460 нм, три кюветы с рабочим расстоянием 2 см.

Ход работы:

Навеску растительного материала около 200 мг (необходимо точно записать массу) растирают в ступке с небольшим количеством (около 5 мл) 0.06 М фосфатного буфера, рН 6,7. Растёртую массу количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки тем же буфером, хорошо перемешивают и оставляют на 15 мин. Затем раствор фильтруют через двойной бумажный фильтр. Фильтрат (вытяжку) используют для определения активности фермента.

Активность фермента измеряют на ФЭК'е при 460 нм.

Для измерения оптической плотности используют три кюветы по 8 мл (контроль и две химические повторности). В каждую из трёх кювет вносят:

0,3 мл *o*-дианизидина,

1 мл 0,06 М фосфатного буфера, рН 6,7,

1 мл вытяжки.

После этого в контрольную кювету вносят 2 мл дистиллированной воды, устанавливают её внутри ФЭК'а и вводят в световой луч. Ручками грубой и точной настройки нуля устанавливают "0" оптической плотности по контрольной кювете.

1. Одну из опытных кювет устанавливают внутри ФЭК'а и вводят в световой луч. Автоматической пипеткой вносят в опытную кювету 1 мл 0,3% раствора перекиси водорода и одновременно включают секундомер. Записывают значения оптической плотности через каждые 20 секунд. Необходимо снять 7 – 10 точек. Таким же способом измеряют изменение оптической плотности во второй опытной кювете.

2. Строят график зависимости оптической плотности D_{460} от времени t . На графике находят линейный участок (АВ) и вычисляют скорость изменения оптической плотности: $D_{460} = (D_{460}^B - D_{460}^A)/(t^B - t^A)$. (D_{460} вычисляется по численным значениям, а не измеряется по графику!)

3. Активность пероксидазы ($A_{ПО}$) рассчитывают по формуле:

$$A_{ПО} = \frac{D_{460} \cdot N}{m_{сыр.} \cdot l_{кюв.}} \left[\frac{\text{ед. опт. плотн.}}{\text{г сыр. массы} / \text{сек}} \right]$$

D_{460} – скорость изменения оптической плотности [ед. опт. плот. / сек]

N – разведение

$m_{сыр.}$ – сырая масса навески [г]

$l_{кюв.}$ – толщина кюветы [см]; (в данном опыте $l = 2$ см)

4. Провести измерения (см. п.1) при разных концентрациях субстрата (*o*-дианизидина). Рассчитать скорости ферментативной реакции v в молях/сек (М/с) при разных концентрациях субстрата $[S]$, (М). Построить график зависимости v от $[S]$.

5. Рассчитать обратные величины: $1/v$, (М⁻¹·с) и $1/[S]$, М⁻¹. Построить график зависимости $1/v$ от $1/[S]$.

Таблица 16.

Кинетические характеристики реакции: зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

№ п/п	[S] (М)	1/[S] М ⁻¹	v Моль/сек (М/с)	1/v (М ⁻¹ ·с)	Константа Михаэлиса К _М

6. Определить К_М и V_{max} методом двойных обратных величин (методом Лайнуивера-Бэрка) согласно примера на рис. 18.

7. В выводах:

а) указать рассчитанную активность фермента, сравнить активность фермента в разных органах / видах растений, объяснить возможные причины различий на основе сведений о функциях фермента в растительных тканях;

б) сопоставить кинетические характеристики с активностью фермента.

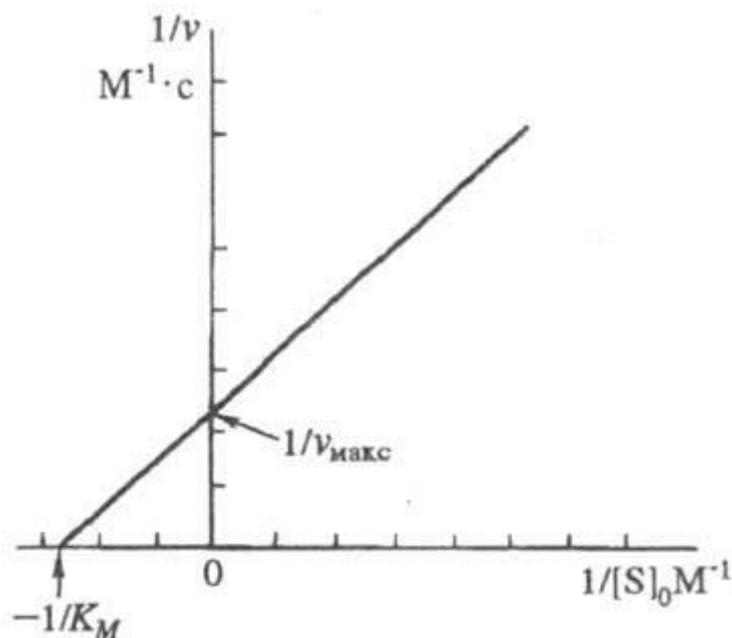


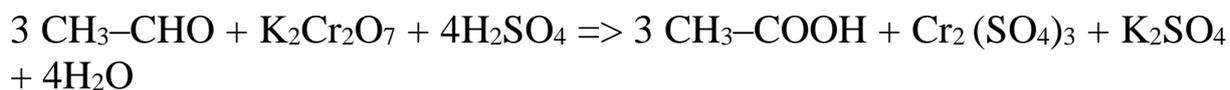
Рис. 18. Пример определения К_М и V_{max} методом двойных обратных величин.

2.3.12. Определение активности алкогольдегидрогеназы в дрожжах

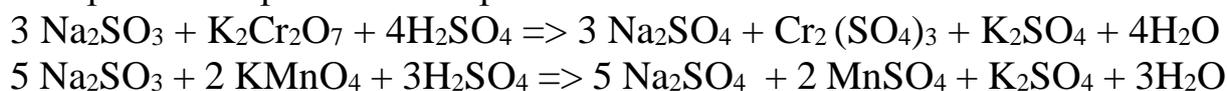
Фермент, катализирующий окисление спирта в ацетальдегид, называется алкогольдегидрогеназа (АДГ):



Данная реакция является обратимой, и обратная ей реакция представляет собой последний этап спиртового брожения в дрожжевых клетках. Количественное определение активности данного фермента основано на определении количества образующегося уксусного альдегида с помощью его окисления бихроматом калия:



Затем бихромат калия восстанавливают избытком сульфита натрия, который оттитровывают перманганатом калия:



$5 \text{Na}_2\text{SO}_3 + 2 \text{KMnO}_4 + 3\text{H}_2\text{SO}_4 \Rightarrow 5 \text{Na}_2\text{SO}_4 + 2 \text{MnSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$
Материалы и реактивы: Дрожжи; 1 % этиловый спирт, 1% раствора CuSO_4 , 10% раствор H_2SO_4 , 0,1 н раствор $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, 0,1 н раствор Na_2SO_3 (его готовят непосредственно перед экспериментом, растворяя 3,25 г сухого сульфита натрия в 500 мл воды) и 0,1 н раствор KMnO_4 .

Посуда и приборы. Мерная колба на 50 см³; коническая колба на 100 – 150 см³; пипетки; бюретки, бумажный фильтр; фарфоровая ступка с пестиком.

Ход определения. В ступке растирают 2 г дрожжей. Растертую массу с помощью дистиллированной воды количественно переносят в мерную колбу на 50 см³, доводя объем жидкости до метки. Полученный раствор настаивают в течение 5 мин, после чего смесь фильтруют через бумажный фильтр.

Контрольное титрование: 1 мл фильтрата гомогената дрожжей смешивают в колбе с 1 мл 1% этилового спирта, добавляют 2 капли 1% раствора CuSO_4 для инактивации фермента, 2 мл 10% H_2SO_4 и 20 мл 0,1 н $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Смесь оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем приливают 25 мл 0,1 н Na_2SO_3 , при этом окраска раствора из

оранжевой переходит в зеленую, и титруют 0,1 н KMnO_4 до исчезающего фиолетового цвета перманганата калия.

Опытное титрование: 1 мл фильтрата гомогената дрожжей смешивают в колбе с 1 мл 1 % этилового спирта и помещают на 30 мин в водяную баню с температурой воды 35-40 °С. Затем добавляют 2 капли 1 % раствора CuSO_4 для инактивации фермента, 2 мл 10% H_2SO_4 и 20 мл 0,1 н $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Смесь оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем приливают 25 мл 0,1 н Na_2SO_3 , при этом окраска раствора из оранжевой переходит в зеленую, и титруют 0,1 н KMnO_4 до исчезающего фиолетового цвета перманганата калия.

$$A (\text{АДГ}) = \frac{(V_{\text{контр}} - V_{\text{опыта}}) \cdot 0,1}{2 \cdot 30 \cdot 0,04} \quad \text{мкмоль / г мин}$$

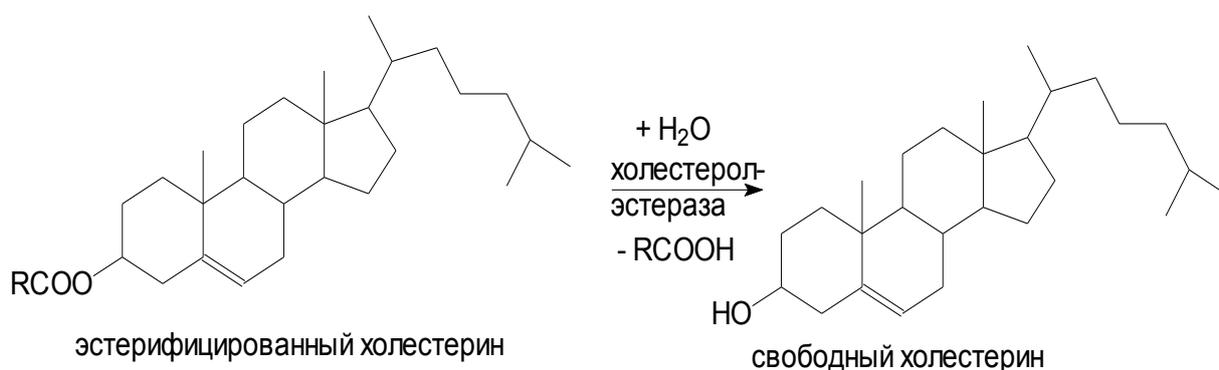
Где 0,1н – концентрация растворов, $\frac{1}{2}$ – эквивалент этанола, 30 мин – время, 0,04 – масса дрожжей в 1 мл фильтрата.

2.4. Применение ферментов в аналитических целях

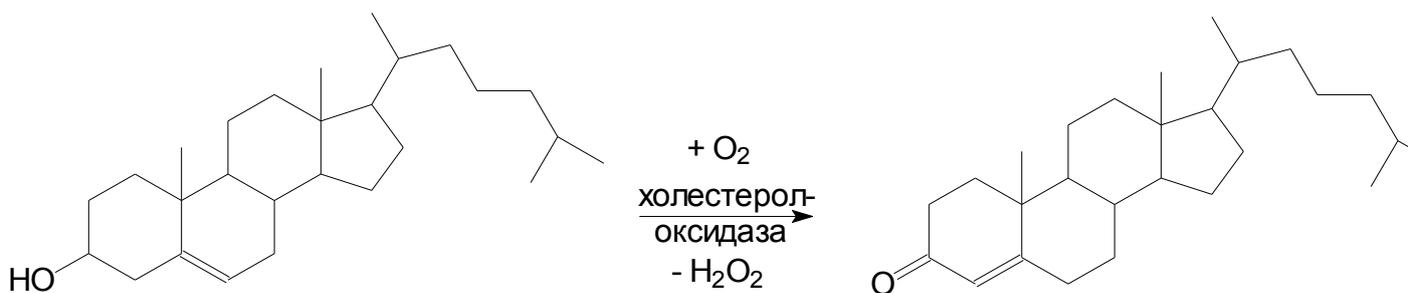
2.4.1. Определение содержания общего холестерина в сыворотке крови

Принцип метода. Общий холестерин складывается из свободного и эстерифицированного.

В первой реакции эстерифицированный холестерин превращается в свободный под действием фермента холестеролэстеразы (входит в набор для определения):



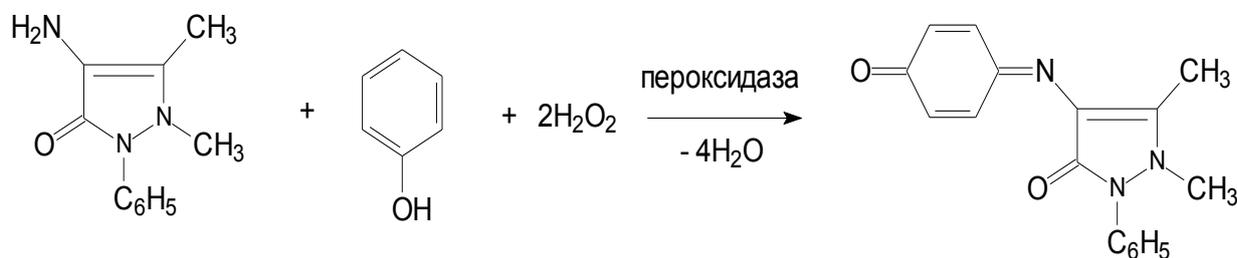
Затем при участии фермента холестеролоксидазы свободный холестерин окисляется кислородом по схеме:



холестерин (холестерол)

4-холестен-3-он

Образующаяся при этом перекись водорода при участии фермента пероксидазы вызывает окислительное азосочетание 4-аминоантипирина и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель):



4-аминоантипирин

фенол

хинониминный краситель

Интенсивность окраски реакционной смеси пропорциональна концентрации холестерина и определяется фотоколориметрически при длине волны 500 нм.

Ход определения. В пробирке смешивают 0,1 мл сыворотки крови и 2 мл смеси ферментов и реагентов (монореагент из набора) и оставляют стоять при комнатной температуре 25 минут. Затем измеряют оптическую плотность при 500 нм, приняв за 100 % пропускания смесь 0,1 мл дистиллированной воды с 2 мл смеси ферментов и реагентов. Кроме того, готовят калибровочную пробу, с помощью которой производится расчет. Для этого смешивают 0,1 мл калибровочного раствора холестерина из набора, в котором его концентрация равна 5,17 ммоль/л, и также 2 мл смеси ферментов и реагентов. Ее оптическую плотность также измеряют через 25 минут после смешения. Расчет содержания холестерина проводят по формуле:

$$C_{\text{холестерина}} = \frac{D_{\text{пробы}}}{D_{\text{калибровки}}} * 5,17 \text{ ммоль/л}$$

Оценка результата. Нормальное содержание холестерина в сыворотке крови у детей и взрослых отражено в табл. 17.

Таблица 17.

Уровни содержания холестерина в крови здоровых людей.

Содержание общего холестерина	Дети и подростки до 18 лет	Взрослые
Рекомендуемый уровень	<4,4 ммоль/л	<5,2ммоль/л
Приемлемый уровень	4,4-5,2 ммоль/л	5,2-6,2 ммоль/л
Повышенный уровень	>5,2 ммоль/л	>6,2 ммоль/л

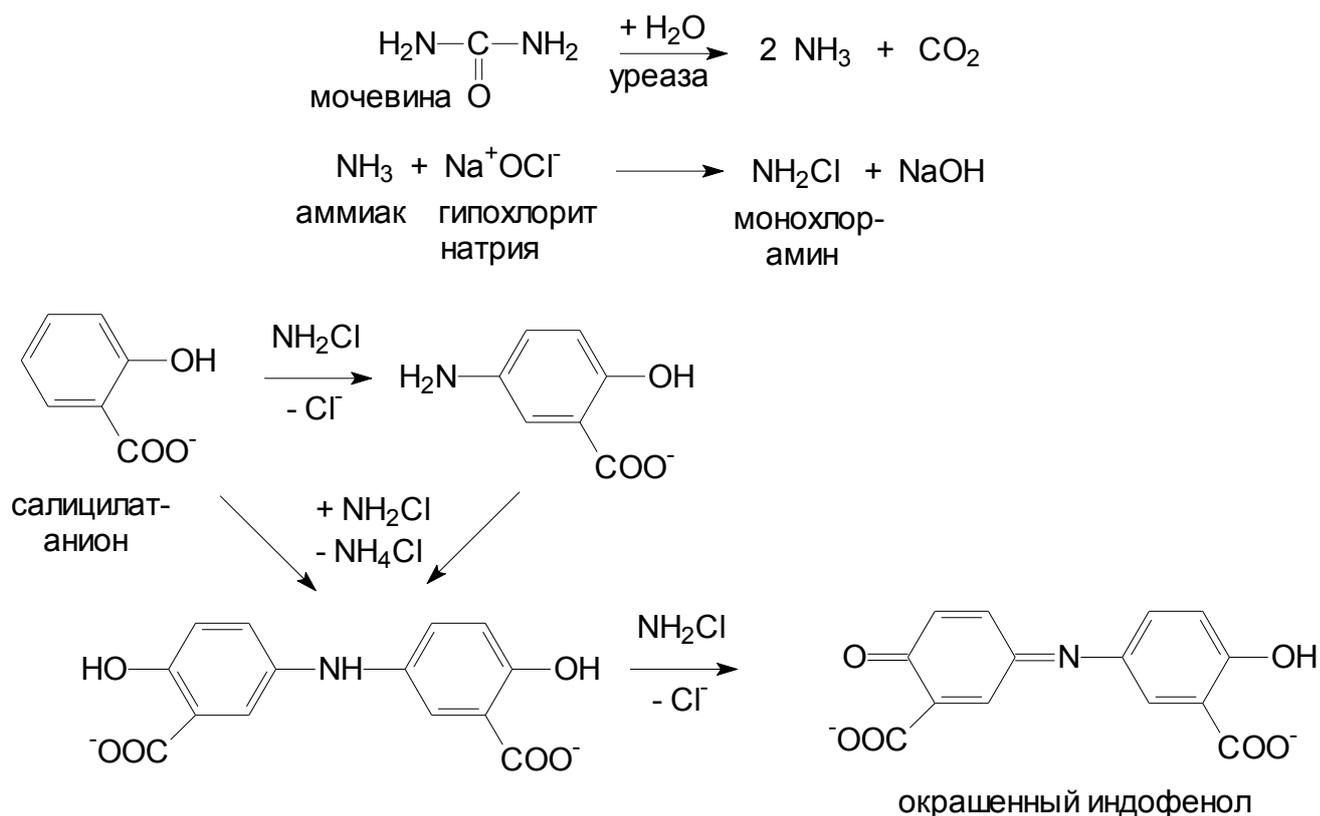
2.4.2. Определение содержания мочевины в сыворотке крови

Мочевина является главным конечным продукта азотистого обмена. Его синтез осуществляется преимущественно в печени, поэтому при нарушении метаболической функции гепатоцитов в крови повышается содержание аммиака и снижается концентрация мочевины.

Из крови мочевина удаляется почками. Соответственно, при нарушении выделительной функции почек в крови увеличивается содержание мочевины и развивается азотемия.

Методы определение содержания мочевины в сыворотке крови широко применяются в клинической лабораторной диагностике. Среди них наиболее точным является энзиматический метод с применением препарата микробной уреазы.

Принцип метода. Мочевина под действием фермента уреазы гидролизуется до аммиака и углекислого газа. Аммиак в щелочной среде, реагируя с гипохлоритом натрия, образует активный окислитель монохлорамин, который через ряд стадий окисляет салициловую кислоту в окрашенный в зеленый цвет индофенол по схеме:



Интенсивность окраски пропорциональна концентрации мочевины в пробе и измеряется фотометрически при длине волны 595 нм (можно использовать светофильтр 570-620 нм).

Ход определения. В пробирку отмеряют 0,1 мл исследуемой сыворотке и добавляют 0,9 мл воды (разведение в 10 раз), перемешивают, отбирают 0,1 мл в другую пробирку и приливают 0,1 мл раствора уреазы (реагент 1 в наборе). Затем выдерживают при комнатной температуре 5 мин, после чего добавляют по 1 мл реагентов 2 и 3 (салицилат-нитропруссидный реагент и гипохлорит натрия). Пробу перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 15 мин. Затем измеряют оптическую плотность полученного раствора при 600 нм, приняв за 100% пропускания холостую пробу, где вместо разведенной сыворотки берут 0,1 мл воды. Расчет содержания мочевины производят с помощью калибровочной пробы с известной концентрацией мочевины (8,33 ммоль/л), с которой делают те же операции, что и с сывороткой. Концентрацию мочевины находят по формуле:

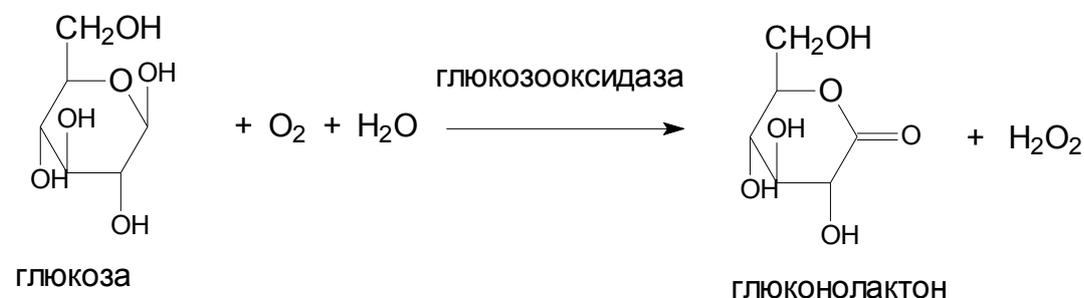
$$C_{\text{мочевины}} = \frac{D_{\text{пробы}}}{D_{\text{калибровки}}} * 8,33 \text{ ммоль/л}$$

Оценка результата. Нормальное содержание мочевины в сыворотке крови составляет 2,5-8,3 ммоль/л. Превышение нормы говорит об

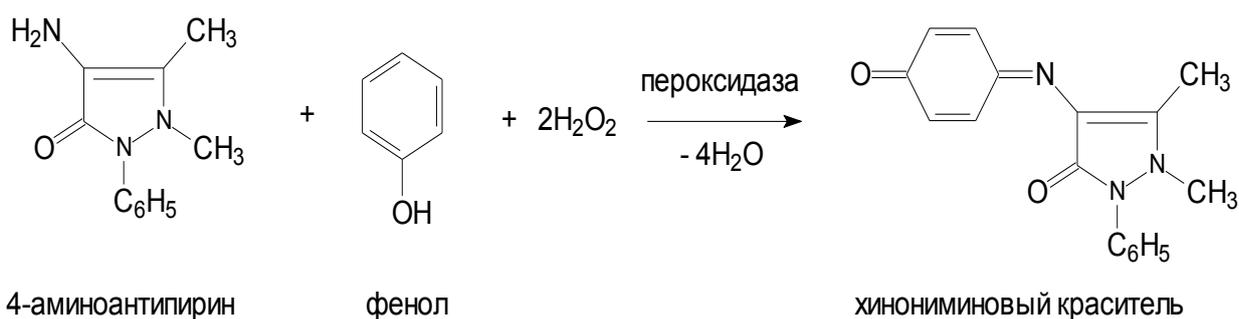
острой или хронической почечной недостаточности (если более 16-20 ммоль/л). Если более 35 – тяжелая почечная недостаточность, а если более 50, то наступает почечная кома. Возможно повышение и в случае диеты с высоким содержанием белка. Понижение может наблюдаться при белковом голодании, а также при печеночной недостаточности, когда печень недостаточно превращает его в мочевину и аммиак накапливается в крови.

2.4.3. Определение концентрации глюкозы крови глюкозооксидазным методом

Принцип метода: β -D-глюкоза под действием глюкозооксидазы окисляется до D-глюконолактона в реакции:



Образующаяся при этом перекись водорода при участии фермента пероксидазы способствует окислительному азосочетанию 4-аминоантипирин и фенола с образованием окрашенного соединения (хинониминный краситель) по схеме



Интенсивность окраски реакционной смеси пропорциональна концентрации глюкозы и определяется фотоколориметрически с помощью калибровочного раствора глюкозы с концентрацией 10 ммоль/л.

Ход определения: 0,5 мл плазмы крови и 0,5 мл калибровочного раствора глюкозы разводят в мерных колбах дистиллированной водой до объема 100 мл и тщательно перемешивают. В три пробирки

наливают по 1 мл смеси рабочих реагентов, в первую добавляют 1 мл дистиллированной воды, а во вторую и третью по 1 мл разбавленных растворов калибровочного раствора глюкозы и плазмы. Пробирки оставляют на 30 мин при комнатной температуре и затем измеряют оптическую плотность опытной и калибровочной смеси против контрольной (холостой) пробы при длине волны 500 нм (можно использовать светофильтр от 490 до 540 нм).

Расчет концентрации глюкозы в плазме крови проводят по формуле:

$$C \text{ (ммоль/л)} = \frac{D_{\text{пробы}}}{D_{\text{калибровки}}} * 10$$

Нормальное содержание глюкозы в крови составляет 3,3-5,5 ммоль/л.

Вопросы для самоподготовки

1. Дайте определение ферментов.
2. Приведите общие свойства и отличия ферментов от катализаторов небелковой природы.
3. Расскажите о строение ферментов.
4. Охарактеризуйте активный центр фермента. Что такое аллостерический центр фермента? Ответ проиллюстрируйте схемой.
5. В чем состоят функции контактного и каталитического участков активного центр фермента?
6. Приведите схему, демонстрирующую механизм катализа.
7. В чем отличие энергии активации ферментативной реакции?
8. Опишите теорию ферментативного катализа Михаэлиса –Ментен.
9. Приведите график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации фермента.
10. Опишите график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата.
11. Опишите физический смысл константы Михаэлиса.
12. Какая зависимость позволяет графическое определение константы Михаэлиса?
13. Нарисуйте и прокомментируйте график зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации фермента.
14. Приведите уравнение Лайнуивера-Бэрка как результат преобразования уравнения Михаэлиса-Ментен.

15. Какие кинетические характеристики ферментативной реакции можно определить по графику уравнения Лайнуивера-Бэрка?
16. Назовите принцип международной классификации ферментов.
17. Дайте общую характеристику ферментов класса оксидоредуктаз.
18. Дайте общую характеристику ферментов класса трансфераз.
19. Дайте общую характеристику ферментов класса гидролаз.
20. Дайте общую характеристику ферментов класса лиаз.
21. Дайте общую характеристику ферментов класса изомераз.
22. Дайте общую характеристику ферментов класса лигаз.
23. Приведите примеры использования гидролаз в молочной промышленности.
24. Приведите примеры использования гидролаз в хлебопечении.
25. Приведите примеры использования гидролаз в переработке мяса.
26. Какие ферменты используются для получения глюкозы из крахмала?
27. Что такое иммобилизованные ферменты?
28. Какие носители используют для иммобилизации ферментов?
29. Приведите примеры использования иммобилизованных ферментов в пищевых технологиях.
30. Что такое рекомбинантные ферменты?

Тесты для самопроверки

Тема 1. Энзимология как научная дисциплина.

1. Энзимология является составной частью

Ботаники

Механики

Физики

Биохимии

2. Впервые использовал термин «катализатор»

Лавуазье

Гей-Люссак

Вёлер

Берцелиус

3. Основные принципы катализа были сформулированы в

18 в.

19 в.

20 в.

21 в.

4. Энзимы содержатся в

Миелине

Муреине

Плазмолемме

Хитине

5. Ферментативная активность не свойственна

Прокариотам

Эукариотам

Археям

Кефалинам

6. Химическая природа энзимов была доказана

Бухнером

Фишером

Пастером

Либихом

7. В кристаллическом виде фермент впервые получен

Нейбергом

Самнером

Кюне

Бернаром

8. Биологические катализаторы являются

Пентозанами

Стеринами

Белками

Эйкозанами

9. Компарментализация обусловлена наличием в клетках

Мембран

Цитозоля

Кислорода

Воды

10. К мембранным образованиям относятся

Пектины

Гистоны

Митохондрии

Вирионы

11. В цитозоле эукариотов локализованы ферменты

Тканевого дыхания

Синтеза жирных кислот

β – окисления

Цикла трикарбоновых кислот

12. В матриксе митохондрий не происходит

Окислительное декарбоксилирование пирувата

Восстановление пировиноградной кислоты до молочной

Субстратное фосфорилирование

Синтез цитрата

13. Рибозимами называют

Катализаторы нуклеотидной природы

Производные рибозы

Витамины

Гликопротеины

14. Ферменты не содержатся в

Клеточных ядрах

Аппарате Гольджи

Плазматических мембранах

Выдыхаемом воздухе

15. Источниками ферментов не являются

Стенки растительных клеток

Внутренние органы животных

Культуры микроорганизмов

Соки растений

16. Ферментам свойственно

Ускорять реакции

Вызывать новые реакции

Смещать равновесие

Входить в состав конечных продуктов

17. Активность клеточных ферментов не зависит от
Плазмидных ДНК
Мембранных фосфолипидов
Концентрации субстрата
рН

18. Ферменты выделяют путем
Кипячения
Высаливания
Высокоэффективной газо-жидкостной хроматографии
Электролиза

19. В пищевой промышленности ферменты не применяют для
Синтеза белков
Осветления напитков
Мягчения мяса
Выработки сыра

20. Наибольшее промышленное применение находят
Трансферазы
Гидролазы
Синтетазы
Лиазы

Тема 2. Структурная и функциональная организация ферментов.

1. В отличие от небелковых катализаторов ферменты
Более эффективны
Менее специфичны
Смещают равновесие в системе
Более термостабильны
2. Ферментами являются молекулы некоторых
Аминокислот
Пептидов
Белков
Липидов

3. Не все ферменты имеют структуру
 - Первичную
 - Вторичную
 - Третичную
 - Четвертичную
4. Активный центр фермента
 - Находится в центре молекулы
 - Называется коферментом
 - Является апоферментом
 - Состоит из остатков аминокислот и простетических групп
5. На контактном участке не происходит
 - Присоединение субстрата
 - Ориентация молекулы субстрата
 - Ковалентная модификация субстрата
 - Сближение с субстратом
6. На каталитическом участке не
 - Действуют аллостерические эффекторы
 - Образуется продукт
 - Регенерирует фермент
 - Модифицируется кофермент
7. Аллостерический центр
 - Находится рядом с активным
 - Удалён от активного центра
 - Связывается с субстратом
 - Не влияет на скорость реакции
8. Кофермент – это
 - Белковая часть фермента
 - Низкомолекулярный компонент активного центра
 - Регуляторный участок фермента
 - Неактивная форма фермента
9. Катализатор
 - Влияет на константу равновесия реакции
 - Ускоряет прямую и обратную реакции на одном активном центре

Взаимодействует с продуктами реакции
Не изменяет энергию активации

10. Ограниченный протеолиз – это
 - Механизм активации ферментов
 - Реакция, протекающая при определенной температуре
 - Кратковременная реакция
 - Реакция с ограниченным набором субстратов

11. Изоферменты различаются
 - Изомерией связей
 - Набором субъединиц
 - Механизмом катализа
 - Субстратной специфичностью

12. Изоферменты не обладают
 - Органной специфичностью
 - Одинаковым молекулярным строением
 - Кинетическими различиями
 - Аллостерическими эффектами

13. Согласно теории индуцированного соответствия Кошланда
 - Не происходит изменения конформации активного центра
 - Перемещаются каталитические группы в ферменте
 - Субстрат и фермент подходят как ключ к замку
 - Субстрат не влияет на структуру фермента

14. Между молекулами фермента и субстрата не образуются связи
 - Пептидные
 - Водородные
 - Электростатические
 - Гидрофобные

15. Во взаимодействии металлоферментов с субстратом участвуют связи
 - Дисульфидные
 - Гликозидные
 - Координационные
 - Сложные эфирные

16. Проферменты – это
Неактивные предшественники ферментов
Денатурированные ферменты
Фрагменты молекул ферментов
Небелковые компоненты
17. Специфичность не бывает
Относительной
Абсолютной
Частичной
Групповой
18. Относительно специфичные ферменты
Катализируют только одну из возможных реакций превращения субстратов
Ускоряют разные химические реакции
Катализируют реакции только с одним субстратом
В разных условиях катализируют разные типы химических реакций
19. Высоко специфичные ферменты
Не могут «различать» изотопы
Проявляют избирательность в отношении α - и β - аномеров
Не различают оптические изомеры
Не регулируются действием эффекторов
20. Очистка ферментов приводит к
Частичной потере молекулярной активности
Изменению вторичной структуры
Изменению специфичности
Снижению чувствительности к ингибиторам

Тема 3. Механизм действия ферментов.

1. Катализатор
Повышает энергию активации
Снижает энергию активации
Повышает тепловой эффект
Снижает тепловой эффект

2. Высокая эффективность действия фермента обусловлена
 - Адсорбцией субстрата
 - Образованием фермент-субстратных комплексов
 - Повышением свободной энергии в системе
 - Снижением ΔS

3. Скорость ферментативной реакции не зависит от
 - Концентрации субстрата
 - pH
 - Температуры
 - Молекулярной массы кофермента

4. Образование какого из участников реакции является обратимым?
 - E*
 - S*
 - ES*
 - P*

5. Ферменты могут повышать скорость реакций максимально в ... раз
 - 2
 - 5
 - 10
 - 10^{20}

6. Переходное состояние фермент-субстратного комплекса соответствует
 - Более высокой энергии активации
 - Более низкой энергии активации
 - Более высокой ΔH
 - Более высокому энергетическому барьеру

7. Уравнение Михаэлиса-Ментен
 - Выражает зависимость действия фермента от концентрации субстрата
 - Учитывает все стадии реакции
 - Описывает вторую стадию реакции – образование *E* и *P*
 - Не учитывает стадию образования комплекса *ES*

8. Константа Михаэлиса численно равна
 - Скорости реакции
 - Отношению констант прямой и обратной реакции
 - Молекулярной активности фермента
 - Концентрации субстрата при $v = V_{max} / 2$

9. Константа диссоциации комплекса ES
 - Является мерой сродства фермента к субстрату
 - Определяет скорость реакции
 - Характеризует стадию необратимого распада комплекса ES
 - Зависит от продукта реакции

10. Уравнение Холдейна-Бриггса
 - Учитывает влияние образующихся продуктов на скорость реакции
 - Противоречит положениям Михаэлиса-Ментен
 - Не принимает во внимание образование свободных E и P
 - Не учитывает K_m

11. Уравнение Лайнуивера-Бэрка применяется для определения активности фермента
 - Скорости реакции
 - Образования ES -комплекса
 - Численных значений K_m и V_{max}

12. В бимолекулярных реакциях
 - Участвуют фермент и активатор
 - Переносятся химические группировки с одного соединения на другое
 - Не синтезируются новые вещества
 - Превращается один субстрат

13. К бимолекулярным реакциям не относятся реакции
 - Синтеза
 - Окисления
 - Восстановления
 - Изомеризации

14. Бимолекулярные реакции могут протекать по механизму
 - Единичного замещения

Элиминации
Тройного замещения
Инверсии

15. Для двойного замещения не характерно
Механизм типа «пинг-понг»
Двухсубстратная реакция
С активным центром одновременно связываются два субстрата
В каждый момент времени с ферментом связан один субстрат
16. Величины K_m для разных субстратов в бимолекулярной реакции могут быть
Кажущимися
Неопределяемыми
Всегда одинаковыми
Бесконечно малыми
17. Реакции единичного замещения – это не
Бимолекулярные реакции
Образование комплекса фермента с двумя субстратами EAB
Распад комплекса EAB с образованием продуктов реакции C и D
Мономолекулярные реакции
18. Реакция, катализируемая алкогольдегидрогеназой,
 $CH_3CH_2OH + NAD^+ \leftrightarrow CH_3COH + NAD \cdot H + H^+$, является
Мономолекулярной
Бимолекулярной
Надмолекулярной
Не зависящей от концентрации витамина B_5
19. Концентрация фермента
Не влияет на скорость реакции
Оказывает существенное влияние на скорость реакции
Не связана с начальной скоростью реакции
Определяет величину K_m
20. Начальная скорость реакции
Является мерой количества фермента

Не зависит от количества фермента
Зависит только от концентрации субстрата
Определяется величиной K_s

Тема 4. Влияние рН и температуры на активность ферментов.

1. рН влияет на
 - Степень ионизации функциональных групп в активном центре
 - Тепловой эффект реакции
 - Энергию активации
 - Энергетический барьер
2. рН не действует на
 - Протон-донорные группы
 - Протон-акцепторные группы
 - Ионизацию каталитического участка
 - Первичную структуру активного центра
3. Изменение рН среды не влияет на
 - Ионизацию субстрата
 - Ионизацию комплекса ES
 - Скорость денатурации фермента
 - Тепловой эффект реакции
4. Оптимальные значения рН
 - Всегда одинаковы для прямых и обратных реакций
 - Могут различаться для прямых и обратных реакций
 - Всегда одинаковы при действии одного фермента на разные субстраты
 - Всегда одинаковы при действии разных ферментов на один субстрат
5. рН-стабильность – это
 - Значение рН, при котором фермент сохраняет активность в течение определенного времени
 - Величина рН, при которой скорость реакции максимальна
 - рН, при котором комплекс ES стабилен
 - Устойчивость субстрата к изменениям рН среды

6. рН-стабильность фермента не зависит от
Формы препарата
Степени очистки фермента
Состава среды
 K_m
7. рН – это
Отрицательный логарифм концентрации водородных ионов
Количество протонов
Концентрация гидроксильных ионов
Степень ионизации
8. Оптимум рН большинства ферментов находится в
диапазоне рН
1-5
6-8
9-11
12-14
9. Оптимум рН пепсина соответствует значениям
1,5-2,5
3-7
8-10
11-14
10. Оптимум рН амилазы равен
1-4
4,1-7,1
7,2-7,4
7,5-12
11. Кислая и щелочная фосфатазы не различаются
Оптимумом рН
Локализацией
Типом катализируемой реакции
Степенью ионизации функциональных групп активного
центра
12. Максимальная активность большинства ферментов
проявляется в диапазоне температур (°C)

0-20
25-35
35-45
50-100

13. Температура не влияет на
Скорость расщепления комплекса ES
Сродство фермента к субстрату
Процессы ионизации компонентов реакции
Первичную структуру апофермента

14. Уравнение Аррениуса, характеризующее влияние температуры на скорость реакции применимо
К левой, восходящей части температурной кривой ферментативной реакции
Ко всей кривой зависимости активности фермента от температуры
Только к неферментативным реакциям
К правой, нисходящей части кривой зависимости скорости ферментативной реакции от температуры

15. Температурный коэффициент Q_{10} характеризует
Ускорение реакции при повышении температуры
Энергию активации
Энергетический барьер
Тепловой эффект

16. Для неферментативных химических реакций величина Q_{10} равна
0-1
4-5
6-10

17. Величина Q_{10} ферментативной реакции
0-1
1-2
2-3
4-5

18. Нисходящая (правая) ветвь температурной зависимости

объясняется

Денатурацией ферментного белка
Образованием продукта
Распадом комплекса *ES*
Превращением субстрата в продукт

19. Оптимум температуры не зависит от
Термостабильности фермента
рН среды
Солевого состава среды
Метода определения активности

20. Термостабильность ферментного препарата
Снижается при очистке фермента
Не может изменяться под действием субстрата
Не зависит от фракционирования
Не зависит от источника фермента.

Тема 5. Регуляция активности ферментов.

1. Активаторами называются
Вещества, повышающие активность фермента
Факторы, инактивирующие субстрат
Вещества, без которых реакция не протекает
Коферменты

2. Активаторы
Необратимо связаны с ферментом
Входят в состав активного центра
Действуют только аллостерически
Могут действовать по активному и аллостерическому центрам

3. К числу активаторов ферментов не относится
Глутатион
Рибофлавин
 Ca^{2+}
 Cl^-

4. Активаторы действуют путем

Участия в формировании активного центра
Связывания субстрата
Ковалентной модификации фермента
Инактивации кофермента

5. Активаторы не могут
Стабилизировать фермент-субстратный комплекс
Стабилизировать конформацию фермента
Катализировать реакцию
Аллостерически повышать активность фермента

6. Активатором α -амилазы является
 Na^+
Глутатион
 Cl^-
 Cu^{2+}

7. Активатором тиоловых ферментов служит
Кальций
Восстановленный глутатион
Селен
Дегидроаскорбиновая кислота

8. Ионы кальция не активируют
Аденилатциклазу
Пепсин
Кальпаины
Протеинкиназу

9. Примером активации фермента путем ковалентной модификации не является реакция
Фосфорилирования фосфоорилазы b
Образования пепсина из пепсиногена
Ограниченного протеолиза химотрипсиногена
Фосфорилирования гликогенсинтетазы

10. Аллостерическая активация происходит путем
Связывания активатора с активным центром
Присоединения отрицательного лиганда к аллостерическому центру

Ковалентной модификации апофермента
Действия положительного модулятора на регуляторный
центр фермента

11. Ингибирование не бывает
Обратимым
Необратимым
Конкурентным
Относительным

12. Ингибирование фермента не происходит при действии
ингибитора на
Активный центр
Аллостерический центр
Продукт реакции
Фермент-субстратный комплекс

13. Ингибитором процесса по типу обратной отрицательной
связи может служить
Конечный продукт
Субстрат
Ион металла
Витамин

14. Необратимым может быть ингибирование
Конкурентное
Бесконкурентное
Неконкурентное
Ковалентное

15. Конкурентным ингибитором может служить
Ион металла
Аналог субстрата
Продукт реакции
Репрессор синтеза

16. Неконкурентный ингибитор может связываться с
Активным центром
Фермент-субстратным комплексом
SH-группами остатков цистеина

Коферментом

17. При бесконкурентном ингибировании ингибитор связывается с
Каталитическим участком
Контактным участком
Фермент-субстратным комплексом
Аллостерическим центром

18. При конкурентном ингибировании
Повышается K_m
Снижается K_m
Повышается V_{max}
Снижается V_{max}

19. При неконкурентном ингибировании
Повышается K_m
Снижается K_m
Повышается V_{max}
Снижается V_{max}

20. Конкурентные ингибиторы
Вытесняются из активного центра субстратами
Не используются в качестве лекарственных средств
Необратимо связывают активный центр
Обратимо связывают кофермент

Тема 6. Классификация и методы определения активности ферментов

1. Одно из следующих положений не соответствует классификации ферментов
Ферменты делят на 6 классов
Название фермента включает в себя название субстрата, тип катализируемой реакции и окончание «аза»
Каждому ферменту присвоен 4-х значный шифр
Все тривиальные названия ферментов упразднены
2. Согласно действующей Международной классификации систематическое название фермента не содержит

Название субстрата
Тип реакции
Название продукта реакции
Окончание «аза»

3. Шифр фермента не включает
 - Класс
 - Подподкласс
 - Порядковый номер
 - Номер изофермента

4. Вторая цифра шифра означает, как правило,
 - Природу донора
 - Строение акцептора
 - Тип катализируемой реакции
 - Вид кофермента

5. Первый класс ферментов называется
 - Изомеразы
 - Дегидрогеназы
 - Оксидоредуктазы
 - Амилазы

6. Второй класс ферментов носит название
 - Пептидазы
 - Лиазы
 - Фосфатазы
 - Трансферазы

7. Третий класс объединяет все ферменты, катализирующие реакции
 - Гидролиза
 - Синтеза
 - Окисления
 - Восстановления

8. В четвертый класс входят ферменты, которые ускоряют реакции
 - Расщепления с образованием двойных связей или присоединения по двойным связям

Переноса тех или иных групп
Карбоксилирования
Фосфорилирования

9. Ферменты пятого класса не катализируют
Соединение отдельных мономеров в полимерные молекулы
Внутримолекулярный перенос химических группировок
Изменение геометрической конфигурации молекул
Образование цис-транс изомеров
10. Ферменты шестого класса катализируют реакции
Тканевого дыхания
Дезаминирования
Образования изомерных форм органических соединений
Синтеза, сопряженные с гидролизом макроэргических связей
11. Фермент, катализирующий реакцию: $\text{этанол} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{ацетальдегид} + \text{NAD}2\text{H}$ относится к классу
Трансфераз
Синтетаз
Оксидоредуктаз
Изомераз
12. Реакцию: $\text{Изоцитрат} \rightarrow \text{сукцинат} + \text{глиоксилат}$
катализирует фермент класса
Гидролаз
Лиаз
Трансфераз
Оксидоредуктаз
13. Реакцию: $\text{аланин} + \text{2-оксоглутарат} \rightarrow \text{пируват} + \text{глутамат}$
катализирует
Трансфераза
Дегидрогеназа
Глутаминсинтетаза
Трансглутаминаза

14. Оксидазы катализируют реакции, в которых акцептором служит

Водород
Кислород
Аммиак
Оксикислота

15. Реакции: $RR_1 + \text{НОН} \rightarrow \text{РОН} + \text{R}_1\text{Н}$ катализируют

Оксидоредуктазы
Трансферазы
Гидролазы
Лиазы

16. Фермент, шифр которого КФ 5.1.1.1.1, катализирует реакцию

Аланин + 2-оксоглутарат \rightarrow пируват + глутамат
Изоцитрат \rightarrow сукцинат + глиоксилат
L-аланин \leftrightarrow D-аланин
Этанол + $\text{NAD}^+ \rightarrow$ ацетальдегид + NADH

17. Реакцию: сахароза + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \alpha, \text{D-глюкопираноза} + \beta, \text{D-фруктофураноза}$ не катализирует фермент

β – Фруктофуранозидаза
Инвертаза
Сахараза
Глюкозооксидаза

18. Активность фермента

Нельзя определить по убыли субстрата во время реакции
Не определяется по нарастанию количества продукта за единицу времени

Это скорость реакции, соотнесенная с количеством фермента

Определяется концентрацией комплекса ES

19. 1 катал – это

Концентрация катализатора, 1 моль/л
Скорость реакции без фермента
Активность фермента, превращающего 1 моль субстрата в секунду

Активность одной молекулы фермента

20. Международная (стандартная) единица активности фермента – это

Количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкм субстрата за 1 мин

Активность, отнесенная к 1 мг белка

Число молекул субстрата, превращаемых одной молекулой катализатора за единицу времени

Активность катализатора в расчете на его молекулярную массу.

Ответы на тестовые вопросы

Тема	Вопрос/ответ																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	4	4	2	3	4	1	2	3	1	3	2	2	1	4	1	1	1	2	1	2
2	1	3	4	4	3	1	2	2	2	1	2	2	2	1	3	1	3	1	2	1
3	2	2	4	3	4	2	1	4	1	1	3	3	4	1	3	1	4	3	2	1
4	1	4	4	2	1	4	1	2	1	3	2	2	2	1	1	2	2	1	4	1
5	1	4	2	1	3	3	2	2	4	4	4	3	1	4	2	3	3	1	4	1
6	4	3	4	1	3	4	1	1	1	4	3	2	1	2	3	3	4	3	3	1

Список литературы

1. Биссвангер Х. Практическая энзимология. Пер. с англ. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – 328 с.
2. Волова, Т.Г. Введение в биотехнологию. Версия 1.0 [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т.Г. Волова. – Электрон. дан. (2 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2008.
3. Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. – М.: Изд-во «Элевар», 2000, 512 с.
4. Капрельянц Л.В. Ферменты в пищевых технологиях. Одес. нац. акад. пищ. техн.– Одесса: Друк. – 2009.
5. Кузьмина Н.А. Промышленная биотехнология. М.: 2006. http://www.biotechnolog.ru/prombt/prombt10_1.htm
6. Остроухова Е.В., Сони́на Е.Г., Гержи́кова В.Г., Верик Г.Н., Кепканов Ю.А., Дзядевич А.А. Технологическая оценка ферментных препаратов нового поколения // "Магарач" Виноградарство и виноделие. 2004. – №3. – с. 19-22.
7. Получение и использование ферментов. // Сайт «Биотехнология за рубежом». [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://beregrusskij.narod.ru/index-297.html>
8. Просеков А.Ю., Бабич О.О., Солдатова Л.С. Опыт кафедры «биотехнология» Кемеровского технологического института пищевой промышленности в области биотехнологии получения рекомбинантных ферментных препаратов. / А.Ю. Просеков, О.О. Бабич, Л.С. Солдатова // Техника и технология пищевых производств. 2012. №, с. 1–10.
9. Рябцева Е. Продукты потребления, производимые с помощью промышленной биотехнологии // Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/> по материалам ВЮ.org [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://cbio.ru/page/51/id/3075/>.
10. Современные методы конструирования ферментов с необходимыми свойствами. // [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://www.nazdor.ru/topics/medicine/western/current/450566/>.
11. Уайтхерст Р.Дж., ван Оорт М. (ред.). Ферменты в пищевой промышленности. – Пер. с англ. – СПб.: Профессия, 2014. – 408 с.
12. Ховаев А.А., Нестеренко Л.Н., Народицкий Б.С. Современные методы обнаружения и оценки безопасности генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов (ГММ), применяемых при

производстве пищевой продукции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 1. – С.108 – 113.

13. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 2. Белки. Ферменты. Витамины: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 106 с.

14. [http://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/biologiya/](http://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/biologiya/FERMENTI.html)
[FERMENTI.html](http://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/biologiya/FERMENTI.html)

15. [http://vinograd-vino.ru/sostav-vinograda-i-vina/249-](http://vinograd-vino.ru/sostav-vinograda-i-vina/249-tehnologicheskoe-znachenie-fermentov.html)
[tehnologicheskoe-znachenie-fermentov.html](http://vinograd-vino.ru/sostav-vinograda-i-vina/249-tehnologicheskoe-znachenie-fermentov.html)

16. <http://vinobio.narod.ru/9-2.html>

17. <http://www.milkbranch.ru/publ/view/310.html>

18. <http://www.cbio.ru/>

19. <http://tehnoinfo.ru/tehnolog/pish-otr/235-inaktivac-moloka.html>

20. <http://www.ronl.ru/lektsii/biologiya/846557/>

Содержание

Введение	3
Часть 1. Основы энзимологии	4
1. Химическая природа и строение ферментов	4
2. Механизм действия ферментов	9
3. Основы кинетики ферментативных реакций	11
4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов	16
4.1. Конкурентные (competitive) ингибиторы	18
4.2. Бесконкурентные (uncompetitive) ингибиторы	21
4.3. Смешанное (mixed) ингибирование	30
5. Основные свойства ферментов	35
5.1. Отличия ферментов от неорганических катализаторов	35
5.2. Специфичность действия ферментов	36
5.3. Термолабильность ферментов	37
5.4. Влияние pH среды на активность ферментов	37
6. Классификация и номенклатура ферментов	39
7. Имобилизованные ферменты	44
8. Модифицированные и рекомбинантные ферменты	49
9. Производство ферментных препаратов	57
9.1. Источники получения ферментных препаратов	57
9.2. Классификация и номенклатура ферментных препаратов	58
9.3. Источники получения ферментных препаратов	58
9.4. Способы выражения активности ферментных препаратов	60
9.5. Технология выделения ферментных препаратов из сырья растительного и животного происхождения	61
9.6. Технология получения ферментных препаратов из культур микроорганизмов	65
9.7. Получение товарных форм ферментных препаратов	70
10. Применение ферментов и ферментных препаратов в пищевой промышленности	72
10.1. Применение ферментных препаратов в молочной промышленности	82
10.2. Применение ферментных препаратов в хлебопечении	84
10.3. Применение пектолитических ферментных препаратов в виноделии	98
Часть 2. Лабораторный практикум	103
2.1. Качественные реакции на присутствие ферментов	
2.1.1. Обнаружение активности каталазы в крови	103

2.1.2. Обнаружение активности пероксидазы в картофеле	104
2.1.3. Обнаружение активности ксантиноксидазы	
в сыром молоке	104
2.1.4. Обнаружение активности амилазы в слюне	106
2.1.5. Обнаружение активности уреазы в соевой муке	107
2.2. Изучение свойств ферментов	
2.2.1. Специфичность действия ферментов	107
2.2.2. Термолабильность ферментов	109
2.2.3. Влияние рН среды на активность ферментов	110
2.2.4. Влияние активаторов и ингибиторов на активность	
ферментов	111
2.3. Методы количественного определения активности ферментов	
2.3.1. Определение активности липазы	113
2.3.2. Определение активности трипсина	114
2.3.3. Методы определения активности амилазы	115
2.3.3.1. Определение активности амилазы методом серийных	
разведений	115
2.3.3.2. Определение активности амилазы фотоколориметричес-	
ким методом	116
2.3.4. Методы определения активности каталазы	118
2.3.4.1. Определение активности каталазы молока по методу	
А.Н. Баха и С.Р. Зубковой	118
2.3.4.2. Определение активности каталазы картофеля	119
2.3.5. Определение активности сычужного фермента	120
2.3.6. Определение активности аланинаминотрансферазы в	
мышечной ткани животных	122
2.3.7. Методы определения активности фосфатаз	124
2.3.7.1. Определение активности кислой фосфатазы в мясе и	
колбасе	124
2.3.7.2. Определение активности щелочной фосфатазы	
в молоке	126
2.3.8. Определение активности креатинфосфокиназы в мышечной	
ткани животных	128
2.3.9. Определение активности лактатдегидрогеназы методом	
Варбурга	130
2.3.10. Интерактивное лабораторное занятие по теме:	
«Определение активности трипсина»	131
2.3.11. Определение активности препаратов пероксидазы	136
2.3.12. Определение активности алкогольдегидрогеназы	141
2.4. Применение ферментов в аналитических целях	143

2.4.1. Определение содержания холестерина	143
2.4.2. Определение содержания мочевины	146
2.4.3. Определение концентрации глюкозы крови глюкозо- оксидазным методом	147
Вопросы для самоподготовки	149
Тесты для самопроверки	134
Список литературы.....	155

Шлейкин Александр Герасимович
Скворцова Наталья Николаевна
Бландов Александр Николаевич

Прикладная энзимология

Учебное пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

