

## **Тағам биотехнологиясының заманауи тенденциялары**

**Дәріс №8**

**Тақырып: Ферменттерді өндіру және өндірісте пайдалану**

1. Ферменттердің маңызы, олардың алыну көздері
2. Өнеркәсіптік ферменттік препараттар
3. Ферменттердің биосинтезіне әсер ететін факторлар
4. Ферменттік препараттардың қолданылуы

## 8.1 Ферменттердің маңызы, олардың алыну көздері

**Ферменттер (энзимдер)** – барлық тірі организмдерде пайда болып, қызмет атқаратын ақуыз табиғатындағы катализаторлар. Ферменттер реакция процесінде өзгермейді және қолданылмайды, тек олардың қатысуымен ғана реакциялар жүреді. Ферменттердің қатысуымен реакциялардың жылдамдығы химиялық катализаторлардың әсерінен бірнеше есе жоғары болады. Ферментативті реакцияларға өнімдердің 100% шығуы тән. Ферменттер өте нақты әрекет етеді, тек белгілі бір заттармен реакцияға түседі. Қазіргі уақытта табиғатта 3000-нан астам ферменттер белгілі.

Көптеген биотехнологиялар биокатализаторларды қолдануға негізделген, олардың қажеттілігі үнемі артып келеді. Ферменттердің шексіз көзі микроорганизмдер болып табылады, олардан қазіргі уақытта белгілі барлық ферменттерді алуға болады. Көптеген ферменттер папайя жемістерінен алынатын папаин (ет жұмсартқыш) болып табылады. Микроорганизмдердің ферменттер өндіру қабілетін мутагендік факторлардың көмегімен 2-5 есе арттыруға болады. Плазмидтерді ауыстыру арқылы ферменттердің массасы өнімнің 50%-ын құрайды.

Микроорганизмдермен синтезделген ферменттер сыртқы және ішкі ферменттер болып бөлінеді. Сыртқы ферменттерге амилоза, целлюлаза, лактаза, липаза, пектиноза, протеаза жатады, ал ішкі ферменттерге аспарагиназа, каталаза, инвертаза жатады.

Сыртқы ферменттер микроорганизмдерден бөлінген культуралық сұйықтықтан алынады. Ішкі ферменттерді алу үшін клеткалық қабықшалар механикалық, физикалық, химиялық (қышқылдар, еріткіштер әсері), ферментативтік және биологиялық әдістермен бұзылады.

Ферменттер азық-түлік, фармацевтика, текстиль, тері және басқа салаларда, медицинада, ауыл шаруашылығында, химиялық синтезде пайдаланылады. Ферменттердің технологиялық қолданылуы соңғы уақытқа дейін бірнеше себептермен шектелген, олардың ең маңыздысы:

1. Ферменттерді бастапқы реагенттерден және реакция өнімдерінен бөліп алу жұмыстарының күрделілігі;
2. Ферменттердің сақтау, әр түрлі әсерлер (жоғары температура) кезінде тұрақсыздығы;
3. Ферменттердің тазартылуы және белсенді күйде алынуының күрделілігі.

## 8.2 Өнеркәсіптік ферменттік препараттар

Микробтық ферменттерді қолдану кейбір өнеркәсіптік салаларда 70 жылдан астам уақыттан бері басталды. Олардың көпшілігі гидролаздар (гидролиз

реакциялары) болып табылады, себебі олар өнеркәсіптік биотехнологияда негізгі рөл атқарады. Барлық қолданылатын ферменттердің 99%-ы 16 препаратқа келеді.

Төменде ферменттердің кейбір топтарын қарастырамыз:

### **1. Амилитикалық ферменттер**

Оларға L-амилаза, β-амилаза, глюкоамилаза жатады. Олар крахмал мен гликогеннің гидролизінде әрекет етеді. Крахмал гидролизі кезінде молекулалар қарапайым полисахаридтер – декстриндерге, содан кейін глюкозаға бөлінеді. Бұл ферменттер спирт өнеркәсібінде, нан пісіруде қолданылады.

### **2. Протеолитикалық ферменттер**

Олар гидролаздар тобында пептидгидролаздар болып табылады. Олар ақуыздар мен пептидтердегі пептидті байланыстардың гидролизін жылдамдатады. Олардың маңызды ерекшелігі – ақуыз молекуласындағы пептидті байланыстарға таңдамалы әсер етуі. Мысалы, пепсин тек ароматикалық амин қышқылдарымен байланыстарға әсер етеді, трипсин тек аргинин мен лизин арасындағы байланыстарға әсер етеді. Протеаздар рН 1.5-3.7 (қышқылдық протеаздар), рН 6.5-7.5 (протеаздар), рН >8.0 (сілтілі протеаздар) болады. Протеаздар ет өнеркәсібінде ет жұмсартуда, тері өнеркәсібінде теріні жоюда және жұмсартуда, кино өндірісінде пленкалардағы желатин қабатын жоюда, парфюмерияда тіс пастасы, кремдер, лосьондар жасау кезінде, синтетикалық жуғыш құралдар өндірісінде ақуызды ластануларды жоюда, медицинада қабыну процесстерін, күйіктерді, тромбоастарды емдеуде қолданылады.

### **3. Пектолитикалық ферменттер**

Олар пектинді заттардың молекулалық массасын төмендету және вискостың төмендеуімен сипатталады (пектин – пектин қышқылдары мен протопектиндер). Олар жемістерде, тамырларда, сабақтарда (лен) кездеседі. Пектинді заттардың молекулалық массасы 20000-дан 200000-ға дейін болады. Барлық пектиноздар гидролазалар мен трансэлиминазаларға бөлінеді. Олардың қолданылуы текстиль өнеркәсібінде ластанған кендерді алдын ала өңдеуде, шарап өндірісінде шарапты тазартуда, консервілеуде жеміс шырындарын дайындауда пайдаланылады.

### **4. Целлюлолитикалық ферменттер**

Олар целлюлоза молекулаларын деполимеризациялауға ғана әсер етеді, әдетте олар комплекс түрінде әрекет етеді, бұл өз кезегінде целлюлозаны глюкозаға гидролиздеуді қамтамасыз етеді. Олардың қолданылуы гидролиз өнеркәсібінде – целлюлозадан глюкоза алу, медициналық – өсімдіктерден дәрілік заттарды (стероидтер) бөлу, азық-түлік өнеркәсібінде өсімдік майларының сапасын жақсарту, ауыл шаруашылығында – сүтқоректілердің жем құрамында қосымша ретінде пайдаланылады. Дүниежүзінде шамамен 530 т протеаздар, 350 т глюкоамилаза, 350 т L-амилаза, 70т глюкоизомераза өндірілуде.

## **8.3 Ферменттердің биосинтезіне әсер ететін факторлар**

Ферменттерді микроорганизмдерден алу мүмкін екендігі туралы пікір бар. Көптеген микроорганизмдер салыстырмалы түрде қарапайым және қоректік ортада өседі. Оларды өндіру мен пайдалану қиындықтарын жеңу ферменттердің иммобилизациясы арқылы шешіледі.

Ферменттердің иммобилизациясы – оларды ерімейтін күйге ауыстыру процесі, бұл кезде катализдік белсенділігі толық немесе жартылай сақталады. Иммобилизацияны жүзеге асыру үшін әдетте келесі әдістер қолданылады:

**Коваленттік байланыс:** Ферменттер молекулаларын ерімейтін тасымалдаушыларға байлау. Бұл тасымалдаушылар органикалық (табиғи және синтетикалық полимерлер) және бейорганикалық материалдардан болуы мүмкін. Органикалыққа целлюлоза, хитин, агароза, декстриндер, қағаз, мата, полистирол, ион алмастырушы шайырлар жатады; бейорганикалыққа – пористік шыны, силикагельдер, силихромдар, керамика, металдар және басқалар жатады.

**Гель немесе полимер торына ферменттерді ендіру.**

**Коваленттік байланыстыру:** Ферменттерді өзара немесе инертті ақуыздармен (біфункционалдық реагенттер арқылы) байланыстыру.

**Адсорбция:** Ферменттерді ерімейтін тасымалдаушыларға (кейде иониттерге) бекіту.

**Микрокапсулалау:** Фермент ерітіндісін жартылай өткізгіш капсулаларға (5-300 мкм) орналастыру. Иммобилизацияның нәтижесінде ферменттер гетерогенді катализаторлардың артықшылықтарына ие болады. Оларды реакциялық қоспадан алып тастау және субстраттар мен өнімдерден ажырату үшін қарапайым фильтрация қолданылады.

Иммобилизацияланған ферменттер сыртқы әсерлерге ерігіш ферменттерге қарағанда тұрақтырақ. Иммобилизация принципі тек ферменттерге ғана емес, сонымен қатар ферменттермен таңдамалы байланыс жасайтын заттарға да қолданылады. Бұл әдіс хроматография арқылы ферменттерді бөлу мен тазартуды жеңілдетеді.

Соңғы уақытта иммобилизацияланған микроорганизмдер қолданылуда, олар табиғи ферменттер жиынтығын қамтиды. Бұл ферменттер микроорганизмдерде ең табиғи жағдайда болады, бұл олардың термиялық тұрақтылығы мен жұмыс ұзақтығын жақсартады. Клеткалардағы ферменттер катализдік қасиеттерін ұзақ уақыт сақтайды. Олар гетерогенді биокатализаторлар ретінде технологиялық мақсатта толық пайдаланылады.

Клеткаларды иммобилизациялау әдетте оларды ерімейтін тасымалдаушыларға (көбінесе ион алмастырушы шайырларға) адсорбциялау, бифункционалдық реагенттер (мысалы, глутар альдегиді) арқылы коваленттік байланыстыру немесе полимерге ендіру арқылы жүргізіледі, содан кейін белгілі бір өлшем мен конфигурациядағы бөлшектерге қалыптастырылады.

Иммобилизацияланған микроорганизмдер көбінесе олардың көбеюін болдырмайды және катализатор ретінде сақталуын жақсартады.

Клеткалар синтездейтін ферменттердің құрамы мен мөлшері организмнің мұрагерлік қасиеттеріне байланысты. Мутагендік факторлардың (иондандырғыш және иондандырмайтын сәулелер, изотоптар, антибиотиктер, мұрагерлік элементтерге жоғары әсер ететін химиялық қосылыстар) әсерімен өнеркәсіптік маңызы бар мутанттар штаммдары алынады.

Технологиялық процестердің тиімділігі ферменттердің өнімділігіне байланысты және қоректік орта құрамына тәуелді. Бұл ортада көміртек, азот, фосфор және басқа элементтердің көзі ғана емес, сондай-ақ биосинтезді индукциялайтын

немесе репрессиялайтын заттар болуы қажет. Мысалы, липаза ферменті индукциялық ортада синтезделмейді, ал май қосу оны жүздеген есе көбейтеді. Сол сияқты, крахмал қосып, минералды фосфорды алып тастау басқа фермент – фосфатазаның қарқынды синтезін қамтамасыз етеді.

Процесс жылдамдығын арттыру үшін қоректік ортаға әртүрлі экстрактілер мен қосымша өсу факторлары қосылады, әсіресе амин қышқылдары. Олар клеткаларға оңай өтеді және ферменттің түзілуіне әсер етеді. Мұнда әрекет механизмі клеткадағы фермент синтезі үшін қажетті бос амин қышқылдарының жетіспеушілігін өтейді. Өсу факторлары ретінде пурин негіздері мен олардың туындылары, РНҚ және оның гидролиз өнімдері қолданылады. Бұл факторларды ферменттер өндірушілер үшін қоректік орта құрастыруда ескеру қажет. Өнеркәсіптік ортада органикалық көміртек пен азоттың көздері ретінде картоп, жүгері, күріш крахмалы, жүгері экстракты, соя ұны жиі қолданылады. Микроорганизмдер минералды азот қосылыстарын пайдаланады, олар күрделі азотты органикалық қосылыстарға айналады.

Қоректік ортаның оптималды құрамы әр өнім беруші үшін екі әдіспен анықталуы мүмкін: эмпирикалық таңдау әдісімен және математикалық оптимизация әдістерін (ЭВМ) қолданумен.

Барлық технологиялық процестер ферменттік препараттарды өндіру екі негізгі топқа бөлінеді: бірінші топта ферментация сұйық қоректік ортада тереңдік әдісімен жүргізіледі, ал екінші топта беткі мәдениет арнайы дайындалған рыхлый және ылғалдандырылған қоректік ортада өсіріледі.

#### **8.4 Ферменттік препараттардың қолданылуы**

Микробтық емес шығу тегі бар ферменттер көптеген себептерге байланысты, мысалы, төменгі тұрақтылық, жоғары құн, маусымдылық және басқа факторлар, салыстырмалы түрде сирек қолданылады. Бірақ кейбір жағдайларда микробтық аналогтың болмауынан коммерциялық мақсаттар үшін өсімдіктік және жануарлар текті ферменттер бөлінеді. Мысалы, жануарлар тектес ренин, инжирден алынған фицин, папаин және басқалары. Өсімдіктік және жануарлар тектес ферменттерді өндірістік көлемде алу үшін соңғы уақытта ұлпаларды және жеке органдарды өсіру әдісі табысты қолданылады. Бұл әдіс ферменттердің құнын айтарлықтай төмендетуге және коммерциялық ферменттердің үлесін арттыруға көмектеседі.

Техникалық ферменттер кейде өндірісте экстракциялау мен тазартудан өтеді, бұл бірнеше міндеттерді шешеді: токсиндер мен қажетсіз метаболиттерді жою, белсенділікті стандарттау. Бұл препараттың жоғары сапасын және тұрақтылығын қамтамасыз етеді, сонымен қатар препаратқа қажетті хош иіс пен түс береді. Негізгі қиындық мәдени сұйықтықтардың гомогенді еместігімен, олардың көп коллоидтық заттарымен және жоғары тұтқырлығымен байланысты.

1990 жылғы деректер бойынша, әлемдік нарықта техникалық ферменттік препараттардың сатылымы 800 миллион долларды құрады. Барлық өндірілетін техникалық ферменттердің 80%-ы үш негізгі салада қолданылады: крахмалды гидролиздеу - 40%, жуғыш құралдарды өндіру - 30%, сырды өндіру - 10%.

Крахмалды өнеркәсіптік өңдеудің негізі оны сіңірілетін қанттарға (глюкоза, мальтоза, изомальтоза), концентрленген қант-сироптарға (глюкоза, фруктоза) және

төмен молекулалық олигосахаридтер - декстриндерге айналдыру мүмкіндігі болып табылады. Бұл қосылыстар азық-түлік өнімдері мен сусындарды өндіруде пайдаланылады. Крахмалды гидролиздеудің бар әдістерінің ішінде ферментативті әдіс көптеген анықталған артықшылықтарға ие.

Ферменттерді жуғыш құралдармен қолдану. Барлық микробтық протеазалар үш класқа бөлінеді: серин протеазалары, металлопротеазалар және қышқыл протеазалары. Серин және металлопротеазалар бактериялық мәдениеттерден пайда болады, ал қышқыл протеазалар микроскопиялық саңырауқұлақтардан алынған.

Серин және металлопротеазалар. Бұл ферменттер тобы бактериялар арасында кең таралған. Металлопротеазалар сыра және спирт өнеркәсібінде қолданылады. Сыра өндірісінде протеазаларды қолдану сырадағы ақуыз компоненттерінің тұнбаға түсуін болдырмауға байланысты. Бұл мақсатта металлопротеазалармен қатар өсімдік ферменттері де қолданылады: бромелайн және папаин.

Азық-түлік спиртін өндіргенде, ячмен сарысы жарма дақылдарымен алмастырылады. Қанттарды сіңіру үшін ортаға L-амилаза және протеаза қосылады.

Қышқыл протеазалар. Бұл ферменттер бактерияларда кездеседі, бірақ жоғары саңырауқұлақтарда басым болады. Бұл ферменттер көбінесе сүтті коагуляциялау қабілетіне байланысты ренинді алмастырғыш ретінде қолданылады (сүт қышқылы).

*Aspergillus oryzae* мәдениетінен органикалық еріткіштермен алынған такадиастаза, қышқыл және бейтарап протеазалар, L-амилаза, целлюлаза және пектиназа бар ферменттік препарат болып табылады. Бұл препарат соя ақуызының гидролизі үшін және шығыс елдерінде кеңінен қолданылатын соя соусын өндіруде пайдаланылады.

Сүтті коагуляциялайтын ферменттердің коагуляциялық белсенділігі протеолитикалық белсенділіктен басым болуы керек. Коагуляция процесінің мәні казеин мен  $Ca^{2+}$  иондарынан тұратын кешеннің түзілуінде. Сычуг — теляттардың қарнынан алынған фермент ренинді қамтиды, бұл фермент сычуғтан жасалған протеолитикалық фермент ретінде ең жақсы болып саналады. Қымбат және тапшылығы бар сычуғ ферментін арзан және қол жетімді микробтық ферментпен ауыстыру сыр жасаушы өнеркәсіпті дамытуға әсер етеді.

Саңырауқұлақ протеазалары нан қамырындағы глютеннің тұрақты деңгейіне дейін ыдырату үшін кеңінен қолданылады. Бұл нан пісіру процесін стандарттауға және араластыру кезеңдерін қысқартуға мүмкіндік береді.

Глюкозооксидаза, фруктоза фуранозидаза, галактозидаза, пектин аза, папаин, трипсин, химотрипсин және кейбір саңырауқұлақтық және бактериялық протеазаларды қоса алғанда басқа ферменттер де кеңінен қолданылады, және олардың саны әр 10 жыл сайын екі еселенеді.

Жақын болашақта ферменттік препараттарды қолданудың айтарлықтай өсуі лигноцеллюлозалық субстраттарды ферментативті гидролиз арқылы қант алу мүмкіндігімен байланысты болады. Бұл бағытта көптеген жұмыстар жүргізілуде: 200-ден астам микроскопиялық саңырауқұлақтар мәдениеті таңдалды, олар экзогенді целлюлаздарды жоғары мөлшерде синтездейді; 20-дан астам бактериялық трансформанттар мәдениеті алынған, олар целлюлаздардың жеке компоненттерін синтездейді (негізінен эндоглюканаза); 50-ден астам коммерциялық целлюлаздық препараттарды өндіру технологиялары жасалған, олар целлюлаздық

белсенділіктермен ерекшеленеді, лигноцеллюлозалық материалдарды алдын ала өндеудің түрлі технологиялары әзірленді, бұл ферментативті гидролиз нәтижесінде глюкозаның шығуын арттырады және басқалары. Бұл мәселені жақын арада шешу үмітін береді, және осындай ферменттердің өндірісі қазіргі ферменттік индустрияның ауқымынан асып түседі деп күтілуде.

Ферменттік препараттардың жоғары тазалықтағы өндірісі саладағы негізгі бағыт болып табылады, өйткені соңғы онжылдықта ферменттерді өнеркәсіптік ауқымда тазартудың әдістері айтарлықтай жетілдірілді. Бұл медицинада ферменттердің кеңірек қолданылуына ықпал етеді, бірақ тазартылған ферменттердің саны әлі де бірнеше ондықты құрайды.

Иммобилизацияланған ферменттер. 20-25 жыл бұрын иммобилизацияланған ферменттерді қолдану ферменттік индустрияны, әсіресе ферменттерді бөлу мен алудың қымбаттығы мен күрделілігін түбегейлі өзгерте алады деп есептелген. Иммобилизацияланған ферменттер медицинада, фармацевтикада, химиялық және тамақ өнеркәсібінде, сондай-ақ аналитикалық мақсаттарда кеңінен қолданылады, мысалы, қанттар, аминқышқылдары және басқа қосылыстардың концентрациясын анықтауға арналған ферменттік электродтар ретінде. Сонымен қатар, иммобилизацияланған ферменттер радиологиялық және ферментативті иммуносорбентті талдау сияқты жаңа бағыттардың дамуына әкелді. Алайда, осыған қарамастан, иммобилизацияланған ферменттер практикалық мақсаттарда күтілген ауқымда қолданылмайды.

Иммобилизацияланған ферменттердің алу әдістері мен түрлері бірнеше рет сипатталды; сондай-ақ оларға арналған көптеген шолулар мен түпнұсқа жарияланымдар бар, сондықтан авторлардың пікірінше, бұл кітапта бұл мәселелерді егжей-тегжейлі қарастыру тиімсіз. Тек иммобилизацияланған ферменттердің ерітілген аналогтарымен салыстырғанда артықшылықтарын атап өтеміз:

- иммобилизацияланған ферменттер реакциялық ортадан оңай бөлінеді және қайта қолданылуы мүмкін;
- иммобилизацияланған ферменттер экстрималды жағдайларға жоғары тұрақтылықты көрсетеді және белсенділікті ұзақ уақыт бойы сақтайды;
- иммобилизацияланған ферменттерді қолдану үздіксіз технологияларды дамытуға мүмкіндік береді;
- иммобилизация әдістерімен көпферменттік иммобилизацияланған композицияларды жасау мүмкіндігі бар, бұл өз кезегінде әртүрлі процестердің тізбектес ферменттік реакцияларын жүзеге асыруға мүмкіндік береді.

Иммобилизацияланған ферменттер белгілі бір кемшіліктермен сипатталады. Иммобилизация нәтижесінде жүйенің белсенділігі сирек төмендейді. Бұл әртүрлі себептерге байланысты болуы мүмкін. Мысалы, ферментті тасымалдаушыға ковалентті байланысу жақын маңдағы белсенді ортаның амин қышқылдарының қалдықтарын тартуы мүмкін. Иммобилизацияланған ферменттер тасымалдаушыда бекітілгендіктен, олар қозғалмайтын немесе ерімейтін субстраттарға (целлюлоза, ксилан, лигнин және басқалар) әсер етпейді.

Иммобилизацияланған ферменттердің тағы бір кемшілігі — иммобилизацияның жоғары құны, бұл оны экономикалық тұрғыдан ақтаусыз етеді. Осылайша, иммобилизацияланған ферменттерді қолдану кезінде практикалық іске

асырудың экономикалық негізділігімен байланысты кешенді мәселелерді шешу қажет.

**Өзін-өзі тексеру сұрақтары:**

1. Ферменттерді алу үшін қандай көздер бар?
2. Қандай өнеркәсіп салаларында ферменттік препараттар қолданылады?
3. Иммуобилизацияланған ферменттер дегеніміз не, қалай алынады?
4. Қандай өнімдерді өндіруде ферменттер қолданылады?