



Ферменттердің микробтық синтезі.
Микроорганизмдердегі ферменттер синтезінің

реттелуі туралы жалпы түсініктер ●

6 ДӘРІС

- ▶ Фермент препаратын негізгі тұтынатындар болып тамақ өндірісі және ауылшаруашылығы саналады.

Ферменттің негізгі алынатын көзі болып микроорганизмдер және жануарлар мен өсімдіктердің мүшелері мен ұлпасы саналады.

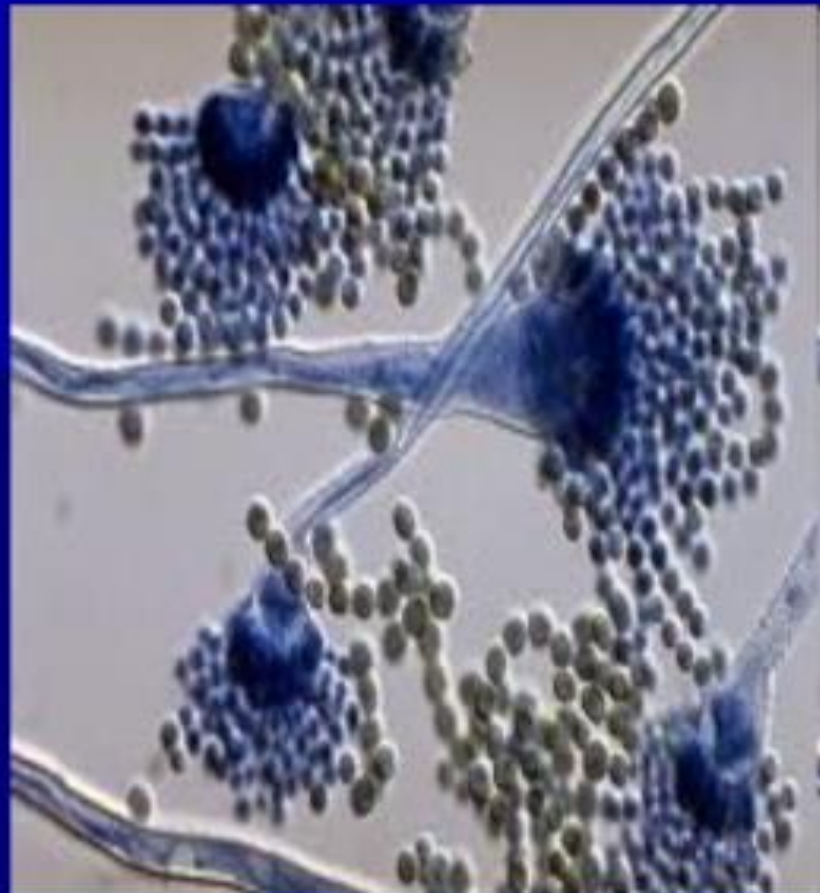
Ферменттің микроорганизм продуценттері:

*Aspergillus, Penicillium,
Rhizopus*
(саңырауқұлақтар туысы)

Bacillus
(бактерия туысы)

Saccharomices
(ашытқы туысы)

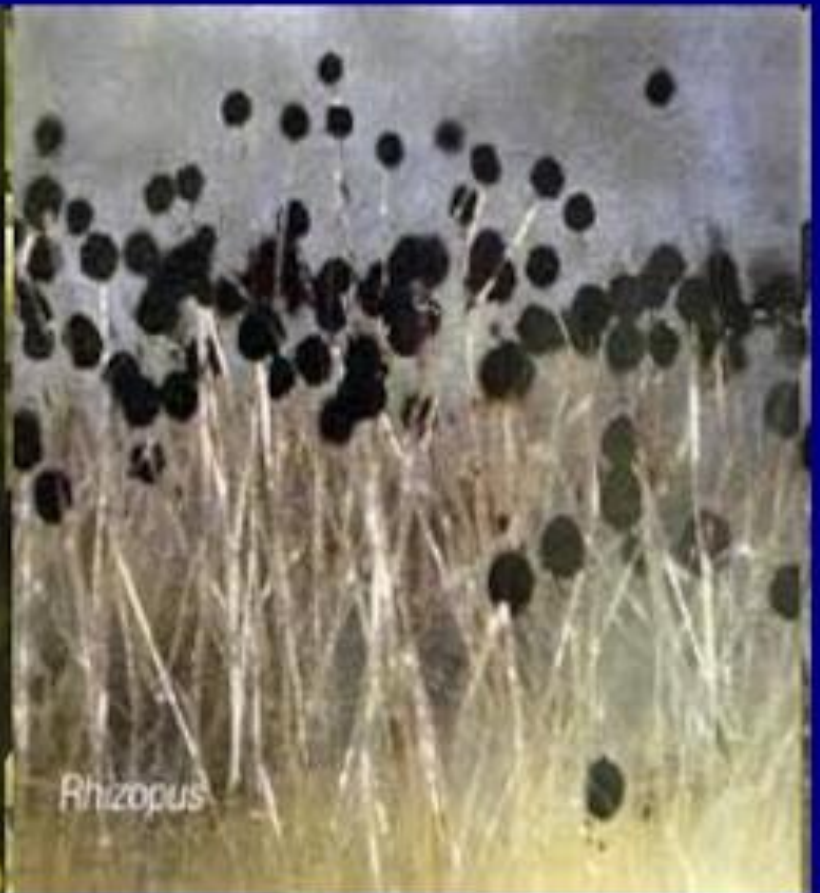
- Егер фермент препаратын беттік әдіспен культивирлесе “II” деп, ал түптік әдіспен культивирлесе “I” деп белгілейді.



Aspergillus

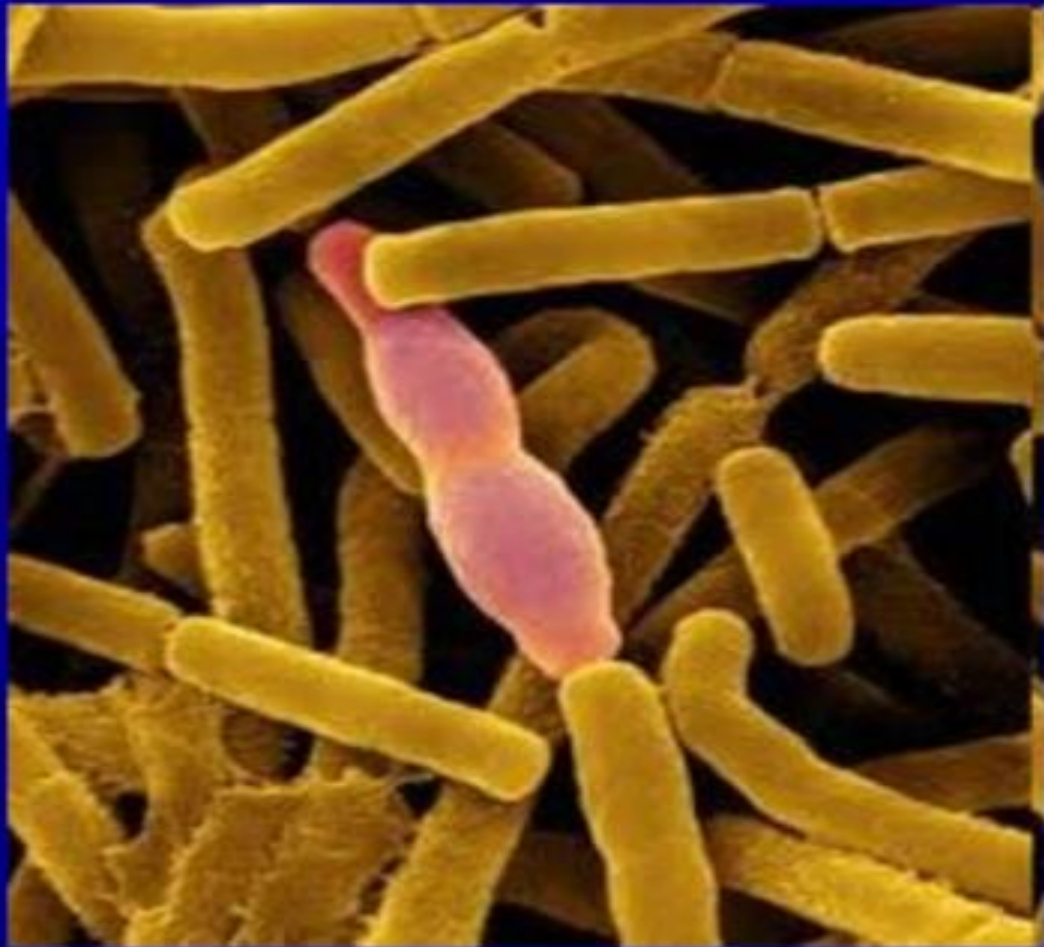


Penicillium,

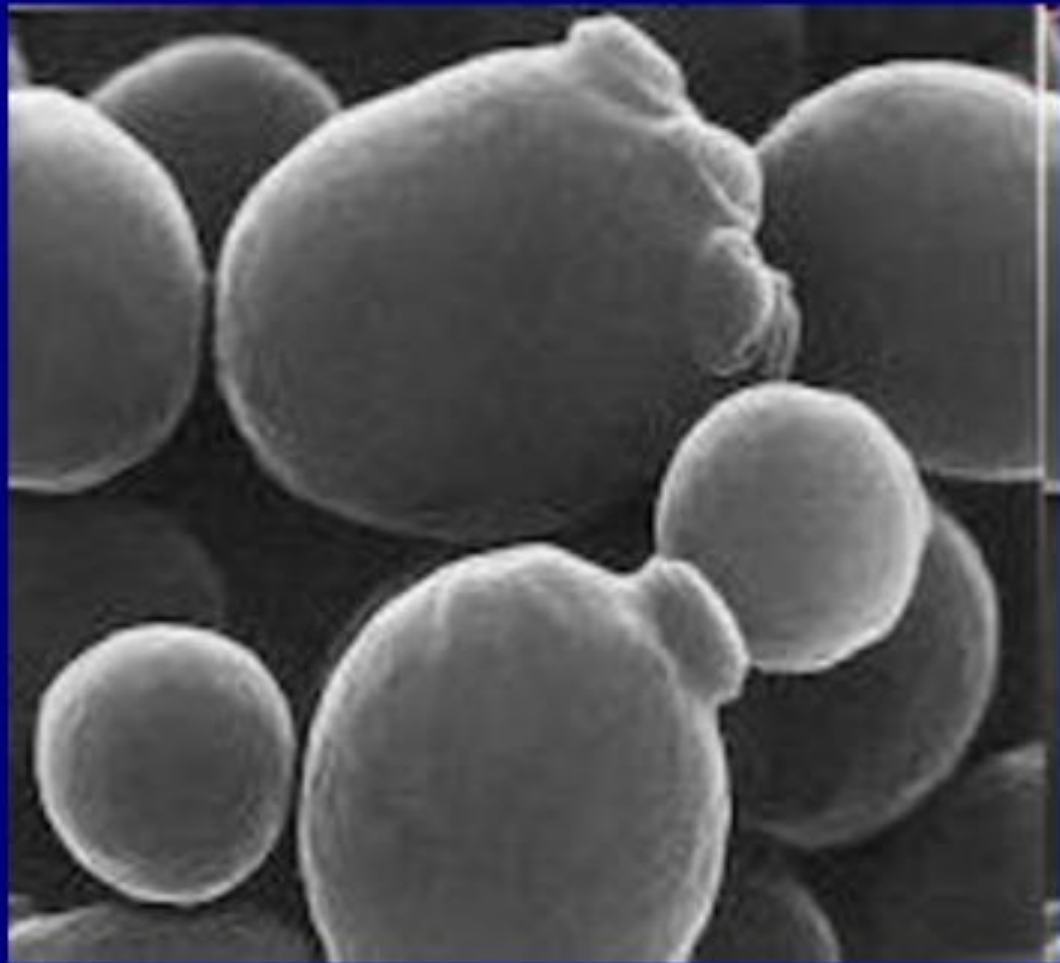


Rhizopus


(саңырауқұлақтар туысы)



Bacillus
(*бактерия туысы*)



Saccharomyces
(*ашытқы туысы*)

- 
- ▶ Өндірістік фермент препараты әр түрлі балласты қоспа заттардан тұрады. Фермент препаратын тазартуға концентрлеу дәрежесі, оның аты индексінің алдындағы санымен көрсетіледі. Егер индексі “2х” болса, онда фермент препараты ерімейтін заттардан босаған концентрленген сироптан алынғанын білдіреді.

Құрғақ фермент препараты алдында “3х” индексі болады.

“2х” және “3х” индекспен белгіленген ферменттер техникалық фермент препараттары деп аталады.

ФЕРМЕНТ ПРЕПАРАТЫ ӨНДІРІСІНІҢ ТЕХНОЛОГИЯСЫ



Фермент препараты өндірісі микроорганизмдерді беттік және түптік культивирлеу әдісімен микробиологиялық өндірісте алынғаны негізделген.

Қазіргі кезде ферменттің микроорганизм-продуцентін беттік және түптік культивирлеу әдісімен алу жүзеге асырылады.



БЕТТІК КУЛЬТИВИРЛЕУ ӘДІСІ

- ▶ Фермент препараты өндірісінің беттік культивирлеу әдісі келесі негізгі сатылардан тұрады:

Егіс материалын алу;
Қоректік ортаны дайындау;
Микроорганизм – продуцентін өсіру;
Культураны кептіру және тазартылған фермент препаратын алу.

Егіс материалын алу.

Қатты қоректік ортада өсірілген микроскопиялық саңырауқұлақ культураларын, сонымен қатар, сұйық қоректік ортада түптік культивирлеу әдісімен спора (конидий) немесе мицелиалы массасы алынған. Қатты қоректік орта ретінде көбінесе, ылғал бидай кебегіне 5-10% ағаш үгінділерін қоспа ретінде қосады, ағаш үгінділерін қоректік орта бос тығыз болмас үшін және борпылдақ болу үшін қолданады.

Қоректік ортаны дайындау

Ферменттің микроорганизм – продуцентін өсіретін шикізат болып негізінде ауылшаруашылығының және тамақ өндірісінің қалдықтары – бидай кебегі, бидай сабаны, қызылша сығындысы және т.б. Қоректік ортаның құрамы тығыз болмай бастау болу үшін ағаштың үгіндісін, солод өскіні, сұлының қауызын қосады. Бидайдың кебегі қоректік орта үшін бағалы шикізат болып саналады, өйткені микроорганизмдердің өсуіне қажетті және алмастырмайтын аминқышқылы, минералды тұздар, микроэлементтер және басқа да заттар болады.

Фермент өндірісінің негізгі шикізаттары



бидай крахмалы



жүгері экстракты



солод өскіні



қызылша сығындысы



ағаш үгіндісі



сұлы қауызы

Ферменттік микроорганизм – продуцентінің культурасын өсіру

▶ Өндірістік жағдайда микроорганизм – продуцентін қатты қоректік ортада өсіру арнайы өсіруші камерада немесе механикаландырылған қондырғыда өсіріледі. Залалсызданған қоректік ортаны 40°C температураға дейін салқындатып, үздіксіз араластыра отырып, егіс материалын қосады және залалсызданған суды қосады, себебі соңғы ылғалдылығы 58-60% болуы керек. Микроорганизмнің өсіру процесінің ұзақтығы нақтылы жағдайда 24-48 сағатты құрайды. Өсіру процесі аяқталғаннан кейін дайын культура кептіруге жіберіледі.

Культураны кептіру.


- ▶ Дайын культураның ылғалдылығы қоректік орта мен мицелий байланысқан 35-58% болады. Ферменттің инактивациясы болмас үшін өнім ылғалдылығы 10-13% дейін кептірілуі керек. Кептіру процесі әр түрлі концентрациялы кептіргіш қондырғыда кептіріледі. Кептіргіште фермент активтілігін төмендету үшін кептіргіштегі культивирлеу ұзақтығы кемінде 5-8 мин, ал температурасы 42°C жоғары болмауы керек. Кептірілген культураны крафт-қапшығында 18-30кг буып түйеді. Фермент препаратының номенклатурасы бойынша “Пх” деп белгілейді.
- ▶

Техникалық және тазартылған фермент препаратын алу.

- ▶ Техникалық фермент препаратын алу үшін культура продуцентін ерімейтін балласты заттардан тазарту керек. Бұл процесс экстракциялау әдісімен жүргізіледі. Фермент суда жақсы еритіндіктен экстрагент ретінде суды алады. Ферментті экстракциялау арнайы батареямен қосылған диффузорда жүргізіледі.

Түптік культивирлеу әдісі

- ▶ Фермент препаратын түптік культивирлеу әдісімен алу, беттік культивирлеу әдісімен салыстырғанда бірқатар ерекшелігі бар. Себебі, бұл әдіс масса алмасуын реттеумен қоректік орта құрамының өзгеруінің арқасында ферменттің максималды бөлінуіне мүмкіндік жасайды. Одан басқа да түптік культивирлеу процесі толығымен автоматтандырылған және механикаландырылған.

- 
- ▶ Түптік культивирлеу әдісімен фермент препараты алу өндірісінің технологиялық процесі келесі негізгі сатылардан тұрады:
 - Егіс материалын алу;
 - Қоректік ортаны дайындау және залалсыздау;
 - Ауаны залалсыздандыру;
 - Өндірістік ферменттерде микроорганизм продуцентін өсіру;
 - Дайын өнімді бөліп алу және тазарту.

Егіс материалын дайындау

▶ Бастапқы микроорганизм-продуцентінің культурасын қисық агарланған қоректік ортасы бар пробиркаға егеді, 28-32°C температурада өсіреді. Өскен пробиркадағы культураға су құйып, суспензия түрінде микроорганизмді сұйық қоректік ортасы бар, сыйымдылығы 750мл колбаға егеді. Культивирлеу процесі шайқағышта 30-40сағат аралығында жүргізіледі, продуценттің әрқайсысының қолайлы температурасы 28-37°C аралықта болады. Колбада өскен культураны алдымен кіші инокуляторда, содан соң үлкен инокуляторда егеді.

▶

Қоректік ортаны дайындау

Қоректік ортаның құрамы микроорганизм-продуцентінің физиологиялық-биологиялық ерекшеліктеріне қарай таңдалады. Фермент өндірісінің шикізаты ретінде көбінесе жүгері ұны, бидай крахмалы, картоп және жүгері экстракты мен қызылша сығындысы қолданылады. Ферменттің көмірсу көзі целлюлозалық биосинтезде ортада целлюлоза, аллиполитикалық ферменттің биосинтезінде-липидтер болады. Қоректік орта құрамында макро және микроэлемент түрлері болу керек.

Ферментация

Ферменттің микроорганизм продуцентін өндірісте культивирлеу құрылысы әр түрлі ферменттерде периодты культивирлеу процесімен жүргізіледі.

Көбінесе культивирлеу процесі араластырғыш қондырғымен жабдықталған, аэратор арқылы залалсызданған ауа үздіксіз беріліп отыратын ферменттер қолданылады. Температура, ауа шығыны, рН ортасы және ферментация процесінің ұзақтығы өсірілетін микроорганизм продуценттің қасиетіне байланысты болады.





Техникалық препаратты алу үшін культуралды сұйықтықты биомассада бөледі, содан соң 25-30°C температурада вакуум буландырғыш аппаратта құрғақ заттың көлемі 50% болғанша концентрлейді. Буландырудан кейін келіп түскен тұнбаны сепарирлеуге жіберіледі. Фермент концентратына натрий хлоридінің белгілі мөлшерін құяды. Алынған стандартты сироп тазартылған дәрежесі бойынша «Г2х» индекске ие болады, көлемі 40-50кг ыдыстарға құяды. Биомассада культуралды сұйықтықты бөлгеннен кейін құрғақ препаратты алу үшін 10-12% дейін концентрлейді және стандарттау үшін натрий хлоридін қосады, құрғақ заттың құрамы 50% кем болмауы керек және шашыратқыш кептіргіште кептіріледі. Тазартылған және техникалық фермент препараттарын алу

Иммобилизденген ферменттер


- ▶ Қазіргі уақытта өндірісте қолданылатын фермент препараттарының бағасы қымбат, ал өндірістік циклде бірден ерігіштігіне байланысты қолданылады. Бұл жағдай периодты процестерді үздіксіз технологиялық режимге ауыстыруға, сондай-ақ ферменттативті реакцияны басқаруға мүмкіндік бермейді. Фермент препараттарының құрылысының қазіргі заманғы білімі, оның активтілік орталығының құрамы, функциялық топтың мәні каталитикалық активтілігінің байқалуы ферменттердің *пролонгирлеуші әсеріне немесе иммобилизденген фермент препараттарын құруға мүмкіндік жасады*. Фермент иммобилизациясының негізі оларды ерімейтін негізге бекіту немесе жартылай өткізгіш мембрана қабықшаға енгізу.


- ▶ *Иммобилизованная фермент* дегеніміз-ерімейтін биокатализаторлар, оларда ферменттер химиялық немесе физикалық (адсорбция күшімен) түрде қандайда бір тасмалдағышпен байланысқан, матрицаға немесе микрокапсулаға бекітілген. Ферментті тасмалдағыштар немесе матрицалар мүлдем ерімейтін, химиялық және биологиялық тұрақтылығы мен ерекшеленетін, механикалық беріктігі жоғары болуы тиіс. Иммобилизованная ферменттерді алу үшін полимерлі тасымалдағыш негізіндегі табиғи (целлюлоза және оның туындылары) және жасанды (полистирол, полиакриламид, полиамид) полимерлер кеңінен қолданылады. Тасымалдағыш ретінде сонымен қатар саңылауы бар шыныны, сазды, силикагельді, мата, қағаз және т.б. материалдарды қолданады


- ▶ Ферменттер иммобилизациясы өте қиын мақсатта және әрбір фермент үшін жеке–жеке есептелінеді. Ферменттерді иммобилизациялаудың химиялық және физикалық әдістері бар. Физикалық әдістер ақуыздардың әртүрлі беттерде адсорбцияланатын қабілетіне негізделген. Адсорбция әдісі өте қарапайым, бірақ оның кемшілігі болып, иммобилизделген ферменттердің оңай десорбциясына байланысты.

- ▶ Фермент тасымалдағышпен өзара әрекетке түспейтін иммобилизациялық әдісі бар. Онда фермент гель торымен ұяшықтарына енгізілген болуы мүмкін. Гель түтікшесінің үлкендігі фермент молекуласының көлемінен кіші болуы тиіс, бірақ олар субстраттың ферментке әсер етуіне кедергі жасамауы тиіс. Фермент иммобилизациясы үшін акриламид гелі кеңінен қолданылады. Бұл әдіс субстрат жоғарғы молекулалы заттар болғанда жарамсыз болады.

- ▶ Ферменттерді иммобилизациялаудың химиялық әдісі матрица мен ақуыз молекуласының арасында ковалентті байланыстың түзілуіне негізделген. Химиялық әдістің артықшылығы пролонгирлеуші әрекеті биокатализаторларды алуға мүмкіндік береді: фермент ұзақ уақыт бойы қолданылса да ерітіндіге өтпейді.

- 
- ▶ Фермент иммобилизациясымен қатар микроорганизмдердің бүтін жасушасы да иммобилизациялануы мүмкін. Бұл әдіс полимер кеңістігінің торына жасушаның механикалық негізделуіне негізделген, онда олар өзінің тіршілік етуіне және ферменттік активтілігін сақтайды. Иммобилизация кезінде тәртіп бойынша фермент активтілігі төмендейді. Иммобилизденген формада фермент активтілігі бастапқы еритін ферменттің активтілігінің 10-90% құрайды. Осыған қарамастан, өндірісте иммобилизденген ферментті қолданған айтарлықтай тиімді.

- 
- ▶ Клеткалар мен ферменттердің иммобилизациясы үшін үшін қолданылатын таратушылар.
 - ▶ Клеткалар мен ферменттердің иммобилизациясы үшін мінсіз материалдарды қолдану, яғни олар мына қасиеттерге ие болу керек: ерімейтін болу керек, жоғары химиялық және биологиялық тұрақтылық; гидрофильділік; біршама енуі қасиеті; тез жұмыс істей алуы.
 - ▶ Әрине, аталғанның бәрі болатын мінсіз материал қазіргі таңда жоқ. Алайда, иммобилизация үшін көптеген таратушылар бар. Табиғи жағдайға байланысты таратушылар органикалық және бейорганикалық болып бөлінеді.

- 
- ▶ Көптеген ферменттердің иммобилизациясы органикалық таратушыларда жүзеге асады. Оларды өз ішінде екіге бөлуге болады: табиғи және синтетикалық полимерлі таратушылар. Сонымен қатар, класстардың әрқайсысы құрылуына байланысты топтарға бөлінеді. Табиғи полимерлерге – ақуызды, полисахаридті және липидті таратушылар, ал синтетикалыққа – полиметиленді, полиамидті және полиэфирлі таратушылар деп бөлінеді.

Органикалық полимерлі таратушылар.

- ▶ Иммобилизация көп жағдайларда ферменттердің тұрақтылығына әкеп соғады. Реакторда иммобилизденген ферменттер бір апта немесе бір ай көлемінде қолданылады, демек бұл еритін формадағы ферменттерді қолданумен салыстырғанда экономика жағынан эффективтілігі жоғары болады.
- ▶ Клеткалар мен ферменттердің иммобилизациясы үшін қолданылатын таратушылар.
- ▶ Клеткалар мен ферменттердің иммобилизациясы үшін мінсіз материалдарды қолдану, яғни олар мына қасиеттерге ие болу керек: ерімейтін болу керек, жоғары химиялық және биологиялық тұрақтылық; гидрофильділік; біршама өнуі қасиеті; тез жұмыс істей алуы.
- ▶ Әрине, аталғанның бәрі болатын мінсіз материал қазіргі таңда жоқ. Алайда, иммобилизация үшін көптеген таратушылар бар. Табиғи жағдайға байланысты таратушылар органикалық және бейорганикалық болып бөлінеді.

Органикалық полимерлі таратушылар.

- ▶ Көптеген ферменттердің иммобилизациясы органикалық таратушыларда жүзеге асады. Оларды өз ішінде екіге бөлуге болады: табиғи және синтетикалық полимерлі таратушылар. Сонымен қатар, класстардың әрқайсысы құрылуына байланысты топтарға бөлінеді. Табиғи полимерлерге – ақуызды, полисахаридті және липидті таратушылар, ал синтетикалыққа – полиметиленді, полиамидті және полиэфирлі таратушылар деп бөлінеді.

- ▶ Табиғи таратушылардың артықшылығына, олардың қол жетімділігі, полифункционалдылығы және гидрофильділігі жатады, ал кемшілігіне – биодеградирлігі және қымбат болуы жатады.
- ▶ Иммуобилизациялау үшін полисахаридтерден көбінесе целлюлозаны, декстранды, агарозаны және олардың қосындыларын көп қолданады.
- ▶ Табиғи аминосахаридтерден иммуобилизациялау үшін таратушы ретінде хитинді қолданады. Ол химиялық жағынан тұрақты және құрылымы жағынан өте борпылдақ.
- ▶ Ал ақуыздардың ішінен кең қолданысқа ие болғандары – құрылымды протеиндер, яғни кератин, фиброин, коллаген және коллагеннен алынған – желатин. Бұл ақуыздар табиғатта өте көп және сол үшін көп мөлшерде кездеседі. Ақуыздар биодеградацияға қабілетті, ол медициналық мақсатта ферменттердің иммуобилизациясын құрастырғанда өте қажет. Оның кемшілігіне тек иммуногенділігін жатқызуға болады.


- ▶ Қазіргі кезде иммобилизация жүргізудің көптеген тәсілдері бар, олардың көбісі ферменттердің иммобилизациясына ұқсас. Иммобилизация әдістерін бірнеше топқа бөледі: жабыстыру, ендіру, қосу және агрегациялау.
- ▶ Иммобилизациялау тәсілдерін ажырата білу керек, сонын салдарынан біреулерінде клеткалар сай келетін орталарда (поверхности) кәдімгі өсу кезінде қозғалмайтын күйге келеді және басқаларында өсірілген клеткалық популяция иммобилиздену үшін «белсенді» өнделеді. «Белсенді» әдістер кең қолданысқа ие және әр түрлі физиологиялық жағдайдағы клеткалар үшін қолданылуы мүмкін. «Қарапайым» әдістер қол жетімді және арзан, сол үшін ешқандай шығынды қажет етпейді. Төртке бөлінген топтарды ашық қарастырайық.

Жабыстыру.

- ▶ Бұл топқа иммобилизациялаудың барлық формаларын жатқызады, сонда клеткалар әр түрлі тәсілдермен тегіс бетке немесе тығыз таратушыға жабысады. Жабысу қарапайым адгезия немесе химиялық түрде индуцирлену арқылы жүзеге асады. Клеткалардың қарапайым адгезиясы – кең қолданысқа ие болған құбылыс, ол көптеген зерттеулерге әкелген, бірақ оның механизмі толыққанды анық емес. Осы иммобилизацияның екі қарапайым әдісі өндірістік процестерде қолданылады: әсіресе: сіркенің өндірілуінде және ағынды сулардың тазартылуында.

Қазіргі кезде пайда болған жүйелерде ұсақ дисперсті қатты таратушыларға көп көңіл бөлінген, мысал ретінде құмды келтіруге болады.

Клеткалар қарапайым түрде тегіс бетке белсенді қабақша түзе отырып жабысады. Қабықшаның қалыңдығы бір клетка қабатындай болады. Қарапайым жабысуға қабілетті емес клеткалар химиялық заттармен жабыстырылуы мүмкін. Мысалы глутар альдегиді. Бұл жағдайда жабысудың беріктігі қарапайым адгезияныкіндей болады.

- 
- ▶ Жабыстырылған клеткалар қоршаған ортамен міндетті түрде жанасады, сондықтан үйкеліс күшіне ие болады. Соның салдарынан клеткалар сұйық фазаға өтіп кетуі әбден мүмкін, сол үшін осы тәсілді көп қолданбайды. Және осы тәсілде биоқабықшаның қалыңдығын басқару оңайға соқтырмайды, бұл оның тағы бір кемшілі болып табылады.
 - ▶ Клеткаларды иммобилизациялау үшін жабыстыру әдісін қолданған кезде өндісті жағдайға жарамды таратушының дұрыс таңдалуына және оны керекті микроорганизмдермен орналастыруына көңіл аудару керек.