

РЕФЕРАТ

Отчет 16 с., 2 рис., 4 табл., 5 источн.

ФЕРМЕНТНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ОБСЕМЕНЕННОСТЬ, КОНСЕРВАНТ, СТЕРИЛИЗАЦИЯ, ГЛУБИННЫЙ ПОСЕВ, ПРОТЕАЗЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Объектами исследования являлись образцы ферментных препаратов для моющих средств производства ООО «Фермент».

Цель работы – количественно оценить зависимость уровня обсемененности ферментных препаратов от количества и типа консерванта, применяемого при производстве моющих средств, выбрать оптимальную концентрацию консерванта для ферментного препарата.

В ходе выполнения исследования оценен уровень обсемененности 11-ти образцов ферментных препаратов. Подобран оптимальный метод стерилизации ферментного препарата.

ВВЕДЕНИЕ

Коммерческий интерес к микробным ферментам, и в частности к протеиназам бацилл, объясняется недостаточной способностью известных и хорошо изученных протеолитических ферментов животных и растений полностью удовлетворять жизненные потребности населения планеты. Микроорганизмы представляют прекрасный источник ферментов благодаря их широкому разнообразию, простоте культивирования, безопасности в работе, способности к генетическим преобразованиям.

В настоящее время в крупномасштабном производстве применяются более 500 ферментных препаратов, используемых в различных областях промышленности: пищевой, кожевенной, текстильной, производстве детергентов и фармацевтических препаратов. Большую группу протеаз (65 %) представляют технические ферменты, используемые в производстве детергентов, крахмала, текстиля, кожи, бумаги и продуктов гигиены. Вторая группа (25 %) – это ферменты, используемые в пищевой промышленности: молочной, мясной, пивной, винной, соковой индустрии, производстве жиров и масел, хлебопекарном производстве. Третью группу (10 %) составляют ферменты, используемые для производства кормов для скота [1].

В последние годы успешно развивается биотехнологическое производство бактериальных ферментов, используемых в промышленности, медицине, научных исследованиях, при этом предпочтение отдается протеолитическим ферментам, наиболее активным и стабильным при щелочных и нейтральных значениях pH: сериновым протеиназам (КФ 3.4.21) и металлопротеиназам (КФ 3.4.24). Кроме того, широко используются бактериальные кератинолитические ферменты, относящиеся к сериновым протеиназам (КФ 3.4.21.11) и металлопротеиназам (КФ 3.4.24.11), которые деградируют фибриллярные структуры кератиновых белков [2].

Ферменты добавляются в моющие средства уже более 50 лет, чтобы облегчить высвобождение белковых веществ из пятен. Фермент удаляет не только очевидные пятна, но и белки из пищевых продуктов, таких как молоко, яйца, мясо и рыба. Пригодность ферментного препарата для использования в моющих средствах зависит от его совместимости с моющими средствами при высокой температуре. Идеальный фермент моющего средства должен быть стабильным и активным в растворе моющего средства и иметь достаточную температурную устойчивость, чтобы быть эффективным в широком диапазоне температур.

Протеазы являются одним из стандартных ингредиентов всех видов моющих средств, от тех, которые используются для бытовой стирки, до реагентов, используемых для чистки контактных линз или зубных протезов.

Приготовление первого ферментативного моющего средства Brunus датируется 1913 годом и состояло из карбоната натрия и сырого экстракта поджелудочной железы. Первое моющее средство, содержащее бактериальный фермент, было представлено в 1956 году под торговым названием

Био-40. В 1960 году датская компания Novo Industry представила алкалазу, производимую *Bacillus licheniformis*, под коммерческим названием Biotex. За этим последовало моющее средство Maxatase от Gist-Brocades. Моющие средства содержат протеолитические ферменты, большинство из которых продуцируются представителями рода *Bacillus*. В 1995 году высокая стоимость производства и растущее давление со стороны производителей по снижению стоимости сырья привели к рационализации производства моющих ферментов. Все основные субтилизины для детергентов производятся бактериями рода *Bacillus*, поскольку эти виды способны секретировать большое количество внеклеточных ферментов [3].

Основной характеристикой для выбора протеазы в качестве детергента является изоточка, так как протеазы более активны при рН раствора детергента, близком к изоточке фермента. Коммерческие препараты субтилизиноподобных протеиназ из *B. licheniformis* и из *Bacillus sp.* имеют высокую изоточку, что позволяет им сохранять активность в высокощелочных условиях (рН 8.0–12.0) [4]. Не менее важны и другие параметры, с помощью которых можно оценить действие протеазы: хорошая активность при стирке при соответствующих рН и температуре, устойчивость к действию различных хелатирующих и окислительных агентов, широкая специфичность для облегчения удаления разнообразных пятен от пищи, крови и других секретов, стабильность при высокой силе детергента, а также длительный период полужизни [5].

Несмотря на очевидную эффективность, использование ферментных препаратов сопряжено с рядом трудностей, основными из которых являются поддержание стабильной активности фермента и продление его срока годности.

Факторы, влияющие на стабильность фермента:

1. Большинство ферментов можно использовать и хранить при низких температурах (0–4 °С). Однако некоторые ферменты обладают структурной стабильностью, связанной с гидрофобными связями, например глутаматдегидрогеназа *Streptococcus faecalis*. Многие ферменты, такие как микрококковая нуклеаза, сывороточная щелочная фосфатаза и т. д., можно хранить замороженными в жидком азоте или при температуре –80 °С, особенно при добавлении от 25 % до 50 % глицерина или полиола.

2. рН и буфер. Большинство ферментов стабильны только в определенном диапазоне рН, и за пределами этого диапазона стабильность снижается. Однако небольшое количество низкомолекулярных лизоцимов, рибонуклеаз и т.п. вполне стабильны в условиях кислого рН. Тип буфера иногда влияет на стабильность фермента. Например, буфер Tris-HCl может ингибировать активность некоторых ферментов при рН ниже 7,5. Кроме того, некоторые ферменты, замерзающие в фосфатном буфере, также могут вызывать инактивацию.

3. Концентрация ферментов. Хотя стабильность фермента варьируется в зависимости от природы и чистоты, в целом белок-фермент стабилен при

высокой концентрации, а при низкой концентрации легко диссоциирует и адсорбируется и даже склонен к поверхностной дегенерации.

4. Некоторые ферменты представляют собой сульфгидрильные ферменты, которые могут постепенно инактивироваться на воздухе из-за окисления сульфгидрила. В этом случае добавление 1 ммоль/л ЭДТА может помочь повысить его стабильность.

Твердые ферментные препараты, как правило, более стабильны, характеризуются очень низким содержанием воды, а некоторые из них могут храниться в темных местах месяцами и даже более года без потери активности фермента. Термочувствительные ферменты часто подвергаются лиофилизации, например, ферменты для инъекций. Имобилизованные ферменты также являются еще одним хорошим способом улучшить стабильность ферментов.

Еще одним фактором, влияющим на стабильность ферментных препаратов, является микробная обсемененность. Для борьбы с посторонней микробиотой часто применяют разного рода консерванты, а также разные методы стерилизации. В технологии промышленного производства в настоящее время используют 3 группы методов стерилизации: механические, химические, физические.

Механические методы стерилизации представлены в первую очередь стерилизующей фильтрацией. Микробные клетки и споры можно рассматривать как нерастворимые образования с очень малым (1–2 мкм) размером частиц. Подобно другим включениям, они могут быть отделены от жидкости механическим путем – фильтрованием сквозь мелкопористые фильтры.

Стерилизующая фильтрация имеет преимущества по сравнению с методами термической стерилизации. Для многих растворов термолабильных веществ (ферментных препаратов) он является единственно доступным методом стерилизации.

Химические методы стерилизации. Эти методы основаны на высокой специфической (избирательной) чувствительности микроорганизмов к различным химическим веществам, что обуславливается физико-химической структурой их клеточной оболочки и протоплазмы. Механизм антимикробного действия многих таких веществ еще недостаточно изучен. Считают, что некоторые вещества вызывают коагуляцию протоплазмы клетки, другие – действуют как окислители, ряд веществ влияет на осмотические свойства клетки, многие химические факторы вызывают гибель микробиологической клетки благодаря разрушению ферментной системы. Основой любого варианта химической стерилизации является взаимодействие бактерицидного вещества с компонентами микробной клетки или споры.

Химическая стерилизация подразделяется на стерилизацию растворами (веществами) и стерилизацию газами (газовая стерилизация). Добавление консервантов условно можно отнести к методам химической стерилизации. Введение консервантов в растворы проводится в тех случаях, когда нельзя

гарантировать сохранение стерильности. При этом возможно снижение температуры стерилизации или сокращение времени ее проведения.

Механизмы воздействия консервантов на микроорганизмы очень различны и определяются их химическим строением. Основным результатом при этом является нарушение жизненных функций клетки, в частности, инактивация белковой части клеточных ферментов. В зависимости от степени инактивации наступает либо гибель клетки, либо замедление ее жизненных функций.

Физические методы стерилизации

Тепловая (термическая) стерилизация. В зависимости от температурного режима тепловая стерилизация подразделяется на: паром под давлением (автоклавирование), текучим паром, тиндализацию, воздушную.

Радиационная стерилизация. Лучистая энергия губительно действует на клетки живого организма, в том числе и на различные микроорганизмы. Принцип стерилизующего эффекта этих излучений основан на способности вызывать в живых клетках при определенных дозах поглощенной энергии такие изменения, которые неизбежно приводят их к гибели за счет нарушения метаболических процессов и коагуляции белка.

Ультразвуковая стерилизация. Прохождение ультразвука (УЗ) в жидкой среде сопровождается чередующимися сжатиями, разрежениями и большими переменными ускорениями. В жидкости образуются разрывы, называемые кавитационными полостями. В момент сжатия эти полости захлопываются. Избыточное давление, создаваемое УЗ-волной, накладывается на постоянное гидростатическое и суммарно может составлять в пузырьках несколько атмосфер. В качестве «зародышей» кавитационных полостей могут быть пузырьки газа, пара в жидкости, твердые частицы и места неровностей твердой поверхности. Большие импульсные давления кавитаций приводят к разрушению целостности клеточной мембраны микроорганизмов, спорных образований и других частиц.

И, хотя метод очень эффективен, он не нашел широкого применения из-за сложности аппаратного оснащения и возможных сложных химических превращений компонентов растворов. Вопросы стабильности компонентов при УЗ-стерилизации имеют много общего с аналогичными проблемами радиационной стерилизации.

Стерилизация токами высокой и сверхвысокой частоты. К настоящему времени нет единой точки зрения на механизм инактивации микроорганизмов при ВЧ- и СВЧ-облучении. Существует мнение об исключительно тепловом механизме действия токов высокой частоты на биологические объекты. Принцип действия высокочастотного поля заключается в его активном воздействии на ориентацию молекул вещества. Изменение направленности поля вызывает изменение ориентации молекул и поглощение части энергии поля веществом. В результате происходит быстрый нагрев вещества во всех точках его массы.

Стерилизация ультрафиолетовым излучением. Из-за возможности образования ядовитых продуктов и возможности разложения биологически активных компонентов под действием УФ-излучения, метод не нашел своего применения для стерилизации ферментных препаратов.

Стерилизация ИК- и лазерным излучением. Электронная стерилизация. Эти перспективные виды стерилизации практически не находят сегодня применения, хотя возможности для этого имеются.

В связи с широким спектром способов стерилизации, основной целью НИР ХД 24-381 стал количественный анализ зависимости уровня обсемененности ферментных препаратов от подобранных способов стерилизации, применяемых при производстве моющих средств.