

Получение неочищенных ферментных препаратов

- Влажность ПК 35-58%, низкостабильный продукт --- сушить до 10-12%, предварительно измельчив
- Сушилки : ленточные, тоннельные, шахтные, **барабанные**, шкафные и вибрационные
- 80-85 С, длительность пребывания в сушилке 3-7 мин., скорость подачи 2-3 м/с, 60-65С, температура высушенного материала 40С
Потеря активности 3-10%
- Паровая конвейерная сушилка – герметичный ленточный конвейер – потери активности до 10-20%
- Время пребывания 5-8 мин. и Т на выходе не выше 42 С
- Сухую культуру – в мешки по 25-40 кг.

Получение неочищенных ферментных препаратов

- При очистке КЖ биомассу отделяют на барабанных вакуум-фильтрах или бактофугах
- Для улучшения процесса фильтрования нужна дополнительная обработка :
- Подщелачивание до рН 8,0-8,5
- Введение 0,1 % хлорида кальция
- Использование кизельгуров, диатомита
- Биошрот стерилизуют, высушивают и используют в корм, а фильтрат отправляют на дальнейшую обработку

Экстракция ферментов

- Экстракция из влажной культуры после разрушения
- Важные факторы -Т, рН, длительность процесса, природа извлекаемого фермента, конструктивные особенности экстракционных аппаратов
- Температура 22-25 С,
- Возможно применение антисептиков – формалин, бензол, толуол, хлороформ
- рН 5-7
- Применение диффузионных батарей для получения экстрактов с СВ 7-14%, дробная подача воды снизу 22-28 С с перерывами 30-60 мин.
- Тенденция к использованию пресс-диффузии

Экстрактор (серийная продукция)

Экстрактор
периодического
действия с мешалкой

Экстрактор с
ректификационной
колонной и
дефлегматором.

Разработка и изготовление

Экстрактор
периодического действия



Линия (установка)
гидродинамической
экстракции
из растительного сырья

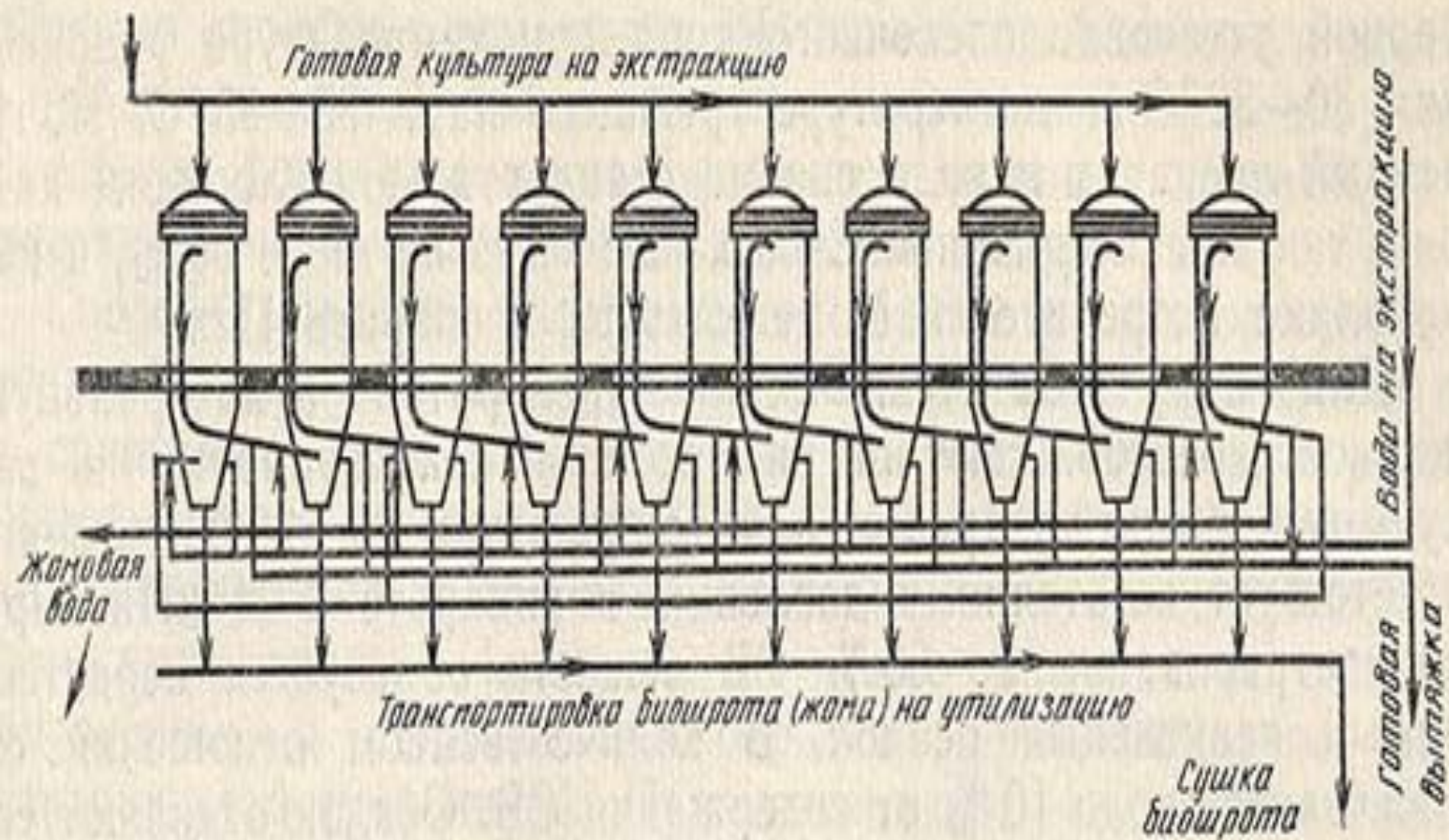
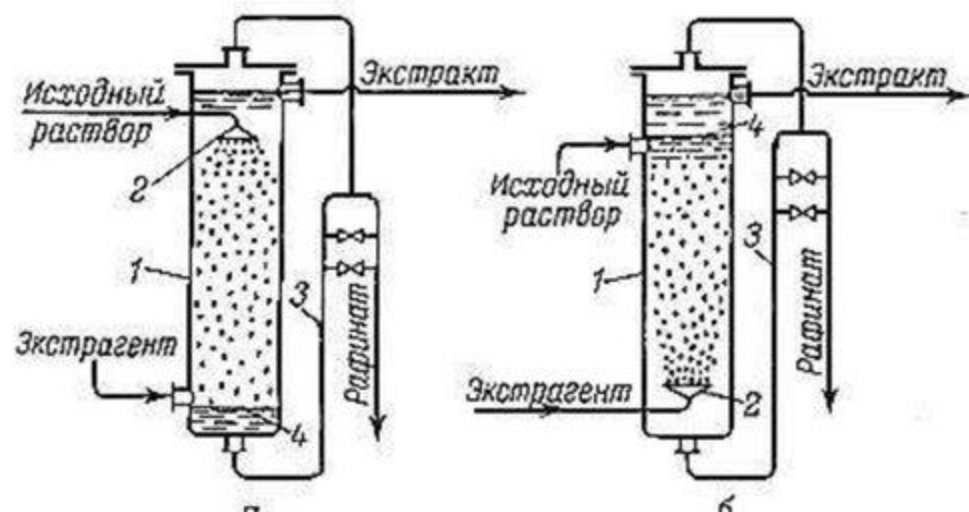


Рис. 8.3. Диффузионная батарея

Экстракция

Экстракция осуществляется в колонных и других аппаратах с насадкой.

Если плотность экстрагента меньше плотности воды, его подают в аппарат снизу, в противном случае - сверху. После насыщения извлекаемой примесью экстрагент направляют в отстойники, где происходит разделение жидкостей, а воду - на дальнейшую обработку.



Надосадочную жидкость направляют на регенерацию, а осадок – на промывку спиртом и повторное сепарирование.

Промытый осадок высушивают в вакууме, измельчают, взвешивают, смешивают с наполнителем и направляют на фасование и упаковывание.

- При получении ферментных препаратов из культур, выращенных поверхностным способом, процесс очистки начинается с экстракции ферментов водой.

Нерастворимый осадок высушивают и в виде сухого биошрота утилизируют на корм скоту.

•Экстракт с содержанием сухого вещества 7 – 14 % при получении из него сухих препаратов не нуждается в дополнительном концентрировании и поэтому может быть сразу направлен на распылительную сушку с целью получения технического препарата, или же экстракт направляется в охладитель, а затем на осаждение органическими растворителями или солевыми растворами.

ВАКУУМ-АППАРАТЫ



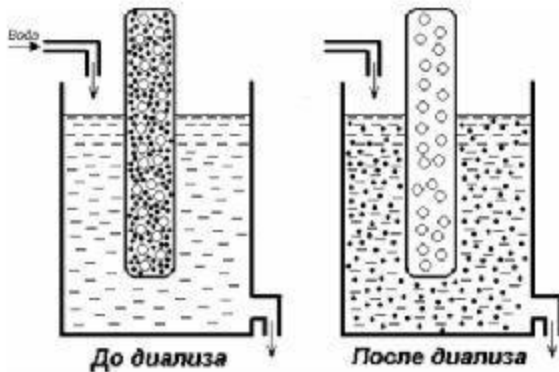
Вакуум- выпаривание

- Необходима стабилизация ферментов КЖ
- Нужно учитывать изменение минерального состава – при сгущении КЖ до 10% СВ количество Са снижается на 5%, а Си – на 75%
- Т кипения 25-30С, Т носителя 120 С - потери активности - 12%
- Т кипения 35-40С, Т носителя 90-100С - потери активности не превышают 10%

Мембранные методы очистки и концентрирования ферментных растворов

- Диффузионные – **диализ**- для очистки от низкомолекулярных примесей
- Электромембранные – **электродиализ** – для обессоливания в интенсивных условиях
- Баромембранные – обратный осмос
- Ультрафильтрация- для грубой очистки от примесей с одновременным концентрированием
- Микрофильтрация

Диализ



1.4 Manipulation of Protein Solutions

19

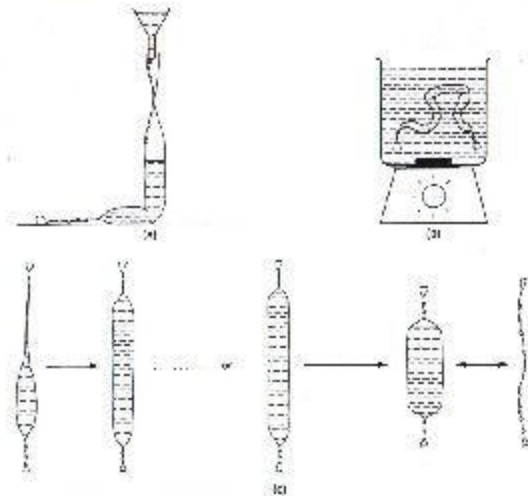


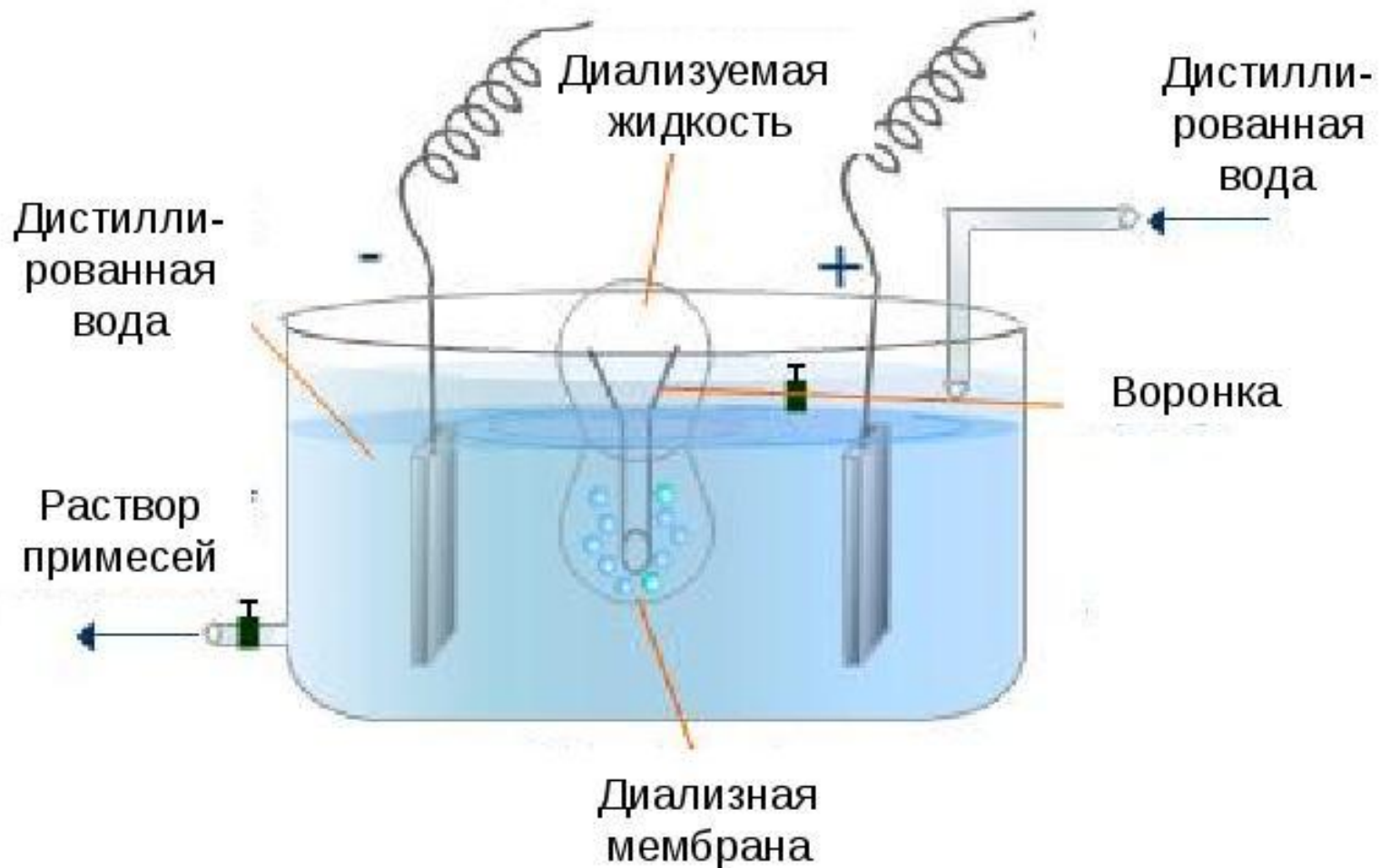
Figure 1.12 Use of the dialysis bag. (a) Filling with sample. (b) Agitation during dialysis. (c) Results of swelling due to osmotic forces.

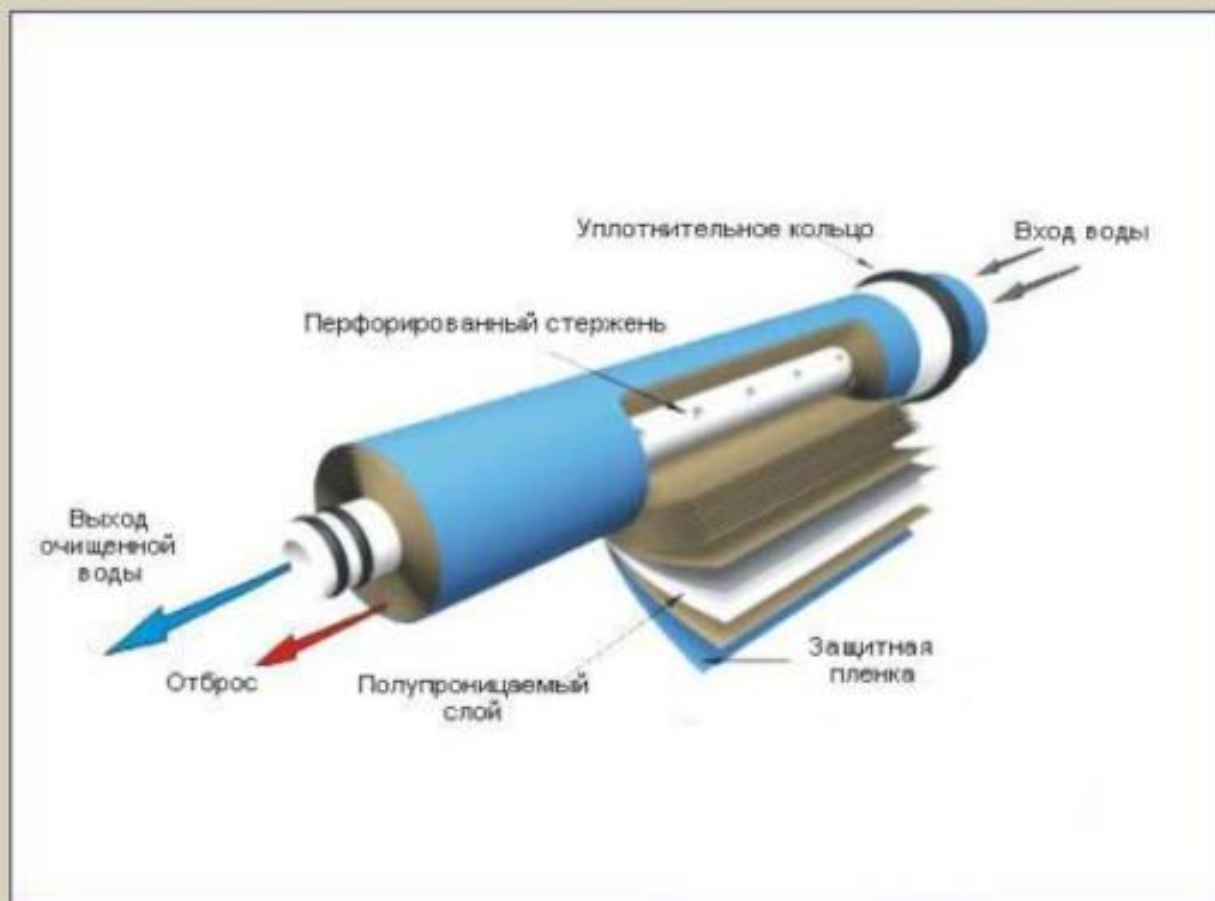


Диализ применяют для очистки растворов высокомолекулярных веществ от низкомолекулярных (например обессоливание) или для замены одних низкомолекулярных веществ на другие (перebuфepивание).

Электродиализ

Для ускорения процесса применяют *электродиализ*.





Обратноосмотические мембраны

имеют поры диаметром менее 10 нанометров (менее 0,01 мкм), работают при давлениях до 100 бар и позволяют осуществлять глубокое обессоливание, или деминерализацию. Обратный осмос применяют для получения сверхчистой воды для производственных нужд, а также для опреснения морской и солоноватых подземных вод, причем степень обессоливания (селективность) составляет обычно не менее 92-97%.

Мембранный процесс должен удовлетворять следующим требованиям:

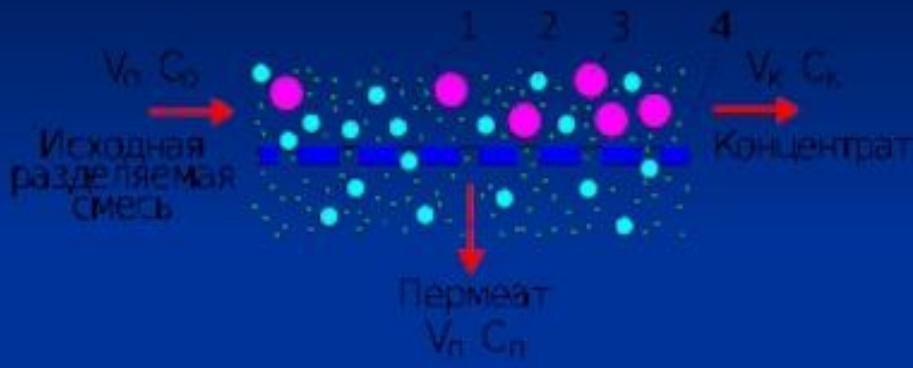
- Высокая удельная производительность, компактность
- Высокая разделяющая способность
- Химическая стойкость мембраны по отношению к КЖ, моющему, консервирующему и стерилизующему растворам
- Тепловая стойкость мембраны
- Отсутствие физической адсорбции на мембране
- Микробная стойкость мембраны
- Отсутствие инактивирующего воздействия мембраны на ферментные комплексы

Селективность мембраны

- Селективность обратного осмоса, или задерживающая способность мембраны - важнейший показатель работы фильтрующего элемента. Это коэффициент задерживания примесей и выражается в процентах. Математическое выражение селективности $R = \frac{C_0 - C_{\Phi}}{C_0} * 100\%$ как отношение концентрации C_0 в растворе к концентрации примесей в фильтрате, где C_0 и C_{Φ} - концентрация растворенного вещества в исходном и очищенном растворе соответственно.



ОСНОВНЫЕ СЕПАРАЦИОННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ РАЗДЕЛЕНИЯ



Удельная производительность $[м^3/(м^2 \times ч)]$ мембраны является количественной оценкой проницаемости мембраны и характеризуется количеством пермеата, проходящего через единицу площади поверхности мембраны за единицу времени.

$$G = \frac{V_p}{F \tau}$$

где V_p - объем пермеата, $м^3$; F - площадь рабочей поверхности мембраны, $м^2$; τ - продолжительность процесса разделения, ч.



HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872

HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872

HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872

HiTech - TFC
MEMBRANES
BW30-400
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
BW30-400
20121619872

HiTech - TFC
MEMBRANES
CP-8040
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
CP-8040
20121619872

HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
H1812-58
20121619872

HiTech - TFC
MEMBRANES
TW30-3513-400
H 354402
HiTech - TFC
MEMBRANES
TW30-3513-400
H 354402

HiTech - TFC
MEMBRANES
BW30-400
20121619872
HiTech - TFC
MEMBRANES
BW30-400
20121619872

Широко используются следующие методы очистки:

- **Высаливание** - осаждение различными концентрациями солей щелочных металлов (Na_2SO_4),
- **Высаливание** с органическими растворителями (ацетоном, этанолом),
- **Дифференциальная денатурация** при нагревании или изменении pH,
- **Дифференциальным центрифугирование** - разделение ферментов по массе,
- **Гель-фильтрация** - разделение белков по размерам
- **Электрофорез** - разделение белков по массе и заряду.
- **Избирательная адсорбция и элюция** с ионообменников (ДЭАЭ или КМ целлюлозы и др.) применяется для их быстрой очистки

Поскольку все эти методы мало избирательными (если они не сочетаются) для выделения индивидуального фермента из

Высаливание

Сорбционная очистка

Сушка

Стандартизация ферментных препаратов

СПОСОБЫ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Способы осаждения нативного белка

Способы осаждения денатурированного белка

Высаливание

Водоотнимающие средства

NaCl,

Na₂SO₄,

(NH₄)₂SO₄,

CaCl₂

ацетон,

этанол

высокая температура

кислоты и щелочи

алкалоидные агенты

соли тяжелых металлов

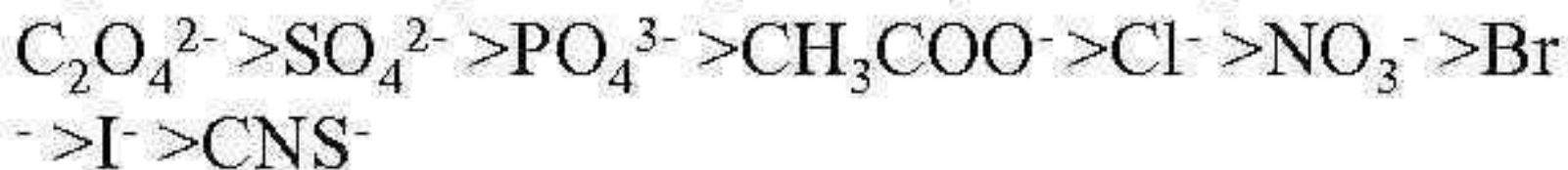
мочевина

Обратимое осаждение (высаливание)

- Обратимое осаждение можно вызвать **ацетоном, спиртом или растворами нейтральных солей** ($NaCl$, $MgSO_4$, KCl , $(NH_4)_2SO_4$, Na_2SO_4 и др.) **щелочных и щелочноземельных металлов.**
- **При высаливании (обратимое осаждение белков растворами нейтральных солей),** как при любом виде обратимого осаждения, белок не теряет своих биологических свойств.
- **После удаления солей путем диализа или гель фильтрацией, белки вновь растворяясь, проявляют типичные им биологические свойства.**
- Обратимое осаждение можно использовать для выделения белков с сохраненными биологическими свойствами.
- **Обратимое осаждение белков имеет место и в клетке, где это явление лежит в основе механизма регуляции активности и временного выключения функции какой-либо белковой молекулы.**

Высаливание – осаждение белков при введении в раствор больших количеств нейтральных электролитов.

Прямой лиотропный ряд Гофмейстера



Полнота высаливания зависит от молекулярной массы белков: чем больше молекулярная масса, тем полнее и быстрее происходит осаждение.

При высаливании можно добиться осаждения не только всего комплекса ферментов, но и его фракционирования.

- Растворимость белков в солевых растворах подчиняется эмпирическому уравнению Кона $\lg S = \lg S_0 - k_s \mu$, где S и S_0 - растворимость белка в растворе и чистой воде; K_s - константа высаливания; μ - ионная сила раствора.
- K_s зависит от природы соли, но не зависит от концентрации водородных ионов и изменяется в широких пределах

По силе высаливающего действия

- катионы $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ (\text{NH}_4^+)$.
- Чаще используют $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, реже - NaCl .
- K_s зависит от природы соли, но не зависит от концентрации водородных ионов и изменяется в широких пределах:
- для цитрата натрия 1,29, сульфата аммония 0,84, сульфата магния 0,62 и в условиях эксперимента является постоянной величиной.
- Реально усилить эффект высаливания можно, увеличив ионную силу раствора.

Внесение соли и способ ее растворения

- самая сложная стадия процесса высаливания
- соль измельчают и медленно добавляют небольшими порциями при постоянном перемешивании, чтобы избежать локальных зон.
- Может наблюдаться вспенивание раствора, что крайне нежелательно, т.к. при попадании фермента в пузырьки пены он может денатурироваться в результате воздействия поверхностного натяжения.
- После введения последней порции соли перемешивание продолжают еще 20-40 мин. для достижения равновесия между растворенными и агрегированными белками.
- Процесс формирования осадка может длиться от 20 мин. до нескольких часов, это зависит от рН, температуры, объема обрабатываемой жидкости.
- Повышение температуры способствует быстрому агрегированию молекул, поэтому процесс ведут при 20-30°С.

Факторы, влияющие на осаждение

- Размер молекулы белка
- Наличие в растворе некоторых ионов
- Температура ферментного раствора и растворителя
- рН среды
- Концентрация СВ в исходном растворе
- Длительность контакта с растворителем

Из полимеров для осаждения и выделения используются декстраны и полиэтиленгликоль различной степени полимеризации

- Для осаждения обычно используют полиэтиленгликоль (ПЭГ) двух типов с ММ 6 000 и 20 000.
- Осаждение белков в растворах ПЭГ сходно с их осаждением в органических растворителях.
- Растворимость ферментов в растворах ПЭГ возрастает по мере отклонения рН от их изоэлектрической точки.
- Для проведения осаждения требуются низкие концентрации ПЭГ.
- Полиэтиленгликоль можно добавлять в виде конц. (50%) водного раствора до содержания его в смеси 6-12%.
- Процесс можно вести при комнатной температуре, так как ПЭГ оказывает на белок стабилизирующее воздействие.
- Реактив сравнительно дешев и используется в ряде стран для осаждения ферментов в промышленных масштабах.
- ПЭГ труднее удалить из ферментной фракции, чем соль или органический растворитель, но поскольку он не оказывает отрицательного воздействия на белок при его дальнейшем выделении (высаливание, ионообменная хроматография, адсорбция и т. д.), его часто не удаляют совсем

- **Осадителями ферментов могут быть соли каприловой кислоты, риванол** и многие другие соединения, имеющие как гидрофобные, так и полярные свойства, но пока способы осаждения этими реагентами очень мало изучены.
- **Для осаждения** некоторых белков можно использовать **ионы металлов**, с которыми белки образуют соли, имеющие пониженную растворимость.
- Для выделения р-галактозидазы из разрушенных клеток *E. coli* успешно используются ионы Mn^{2+} . После удаления ионов Mn^{2+} происходят полное восстановление белка и его одновременная очистка от 30-40 % сопутствующих нуклеиновых кислот. Но этот метод осаждения не получил широкого распространения из-за того, что выделение белков из образующихся солей металлов затруднено и сопровождается инактивацией и денатурацией белка.

Осаждение путем избирательной денатурации

- Только для стабильных ферментов - *Глюкозоизомераза* выдерживает температуру до 90-95°C. Помещая такие ферменты в смеси с сопутствующими белками в экстремальные условия, можно вызвать денатурацию ненужных белков, которые затем можно осадить и удалить, а в растворе останется целевой фермент.
- Для избирательной денатурации используют три фактора - *температуру, pH и воздействие органическими растворителями*, которые можно применять по отдельности или комбинировать их.
- *Термическая денатурация* используется чаще в лаборатории, проводят в присутствии высоких концентраций $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ для предотвращения протеолиза, процесс требует строжайшего соблюдения условий процесса.

Избирательная денатурация под воздействием рН

- применяется чаще - в экстремальных значениях рН происходит денатурация нецелевых белков.
- Режимы для каждой смеси белков устанавливаются экспериментально, следует избегать сильных кислот и щелочей.
- Для установления рН в диапазоне от 5 до 8,5 используют трис-буфер и CH_3COOH , рН до 4 доводят $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ молочной кислотой, до 10,5 - Na_2CO_3 .
- После рН -денатурации значение рН доводят до нейтрального, и денатурированные белки осаждаются, потом центрифугирование.

Денатурация органическими растворителями

- перспективна, но требует высокой культуры производства и четкого соблюдения режимов денатурации,
- используется только в лабораториях, для выделения ограниченного числа ферментов.
- По возрастающей силе денатурирующего воздействия водорастворимые спирты располагаются так: - *метанол, этанол, пропан-1-ол*. Действие ацетона аналогично действию этанола.
- Спирты с разветвленной цепью обладают значительно меньшим денатурирующим воздействием на белок.

Разделение и очистка ферментов методами адсорбции

- Адсорбционные методы, особенно **колоночная хроматография**, позволяют получить ферменты с наивысшей степенью очистки с большим выходом готового продукта.
- Важнейшими адсорбентами являются различные ионообменники - гели $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, гели $\text{Al}(\text{OH})_3$ и разнообразные афинные адсорбенты, которые создаются для определенного вида ферментов.
- Независимо от того, на чем основывается разделение белков, техника разделения одинакова и основывается на том, что разделяемая смесь белков, содержащая целевой фермент, растворяется в подходящем растворителе - буфере - и наносится на колонку, предварительно уравновешенную тем же растворителем.
- Затем через колонку пропускают буфер определенного состава или извлекают белок ступенчато растворами элюэнта в возрастающей концентрации.
- Элюат, выходящий с колонки, собирают по фракциям, которые служат исходным материалом для получения соответствующего фермента.

При ионообменной хроматографии

- белки связываются с помощью электростатических сил. Типичные ионообменники - ДЭАЭ- диэтиламиноэтил и КМ-целлюлоза в набухшем состоянии имеют степень модификации до 0,5 ммоль на куб. см, что соответствует 0,5 М концентрации заряженных групп.
- Эти заряды в колонке нейтрализуются ионами противоположного знака (ионы металлов, ионы хлора). Суммарный заряд белка имеет тот же знак, что и противоионы, и белок при прохождении через колонку должен вытеснить именно эти противоионы.
- Количество белка, которое может связывать ионообменник в расчете на единицу объема, может быть очень большим. Оно зависит от размера молекулы белка и его концентрации. При адсорбции на КМ-целлюлозе лизоцим м.масса 14300, емкость 130 мг на куб.см; альдолаза 160 тыс. и 22 мг на куб. см.

Используют также

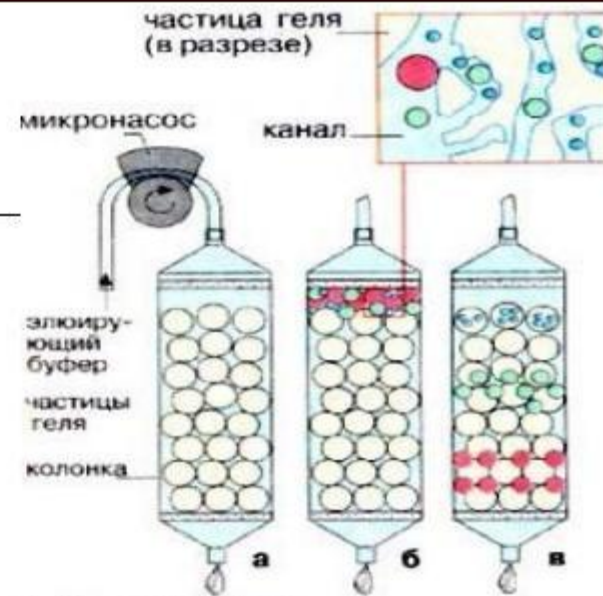
- *аффинную адсорбционную хроматографию или биоспецифическую хроматографию*
- *лигандообменную хроматографию белков и ферментов- (ЛОХ)*
- *МХАХ - металлохелат аффинная хроматография.*
- *хроматографию на окрашенных адсорбентах и иммуноадсорбентах*
- *Иммуноадсорбцию*

Разделение и очистка ферментов в растворе -

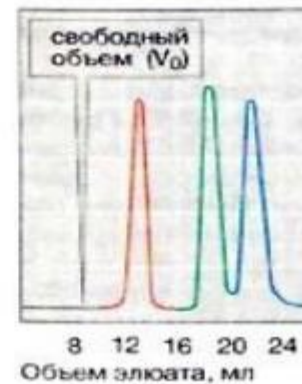
- наибольшее практическое значение получила *гель-фильтрация*. Гели получают на основе поперечно-сшитого декстрана (сефадексы и сефакрилы), полиакриламидные био-гели, агарозные гели с вкраплениями в них акриламидного полимера (ультра-гели).
- Этот метод эффективен на заключительной стадии очистки белков.
- Гель состоит из открытой поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде гранул для удобства заполнения колонок.
- Гранулы имеют поры, недоступные для крупных молекул, но более мелкие молекулы проникают во все поры. Гранулы носителя превышают линейные размеры молекул в 1000-10 000 раз. Гранулы геля имеют ворсистую поверхность.
- Гель играет роль молекулярного сита. Сначала выходят высокомолекулярные вещества, а затем в порядке убывания молекулярных масс.
- Методом гель-фильтрации на мелких гранулах гелей при наложении высоких давлений осуществляют разделение смеси различных веществ, этот способ дает возможность получить высокую степень разделения за очень короткое время .

Гель-фильтрация

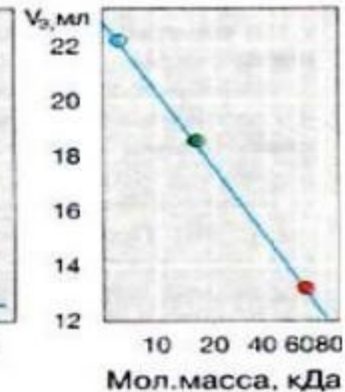
позволяет разделять **белки по величине и форме молекул**. Разделение проводят в хроматографических колонках, заполненных сферическими частицами набухшего **геля** (размером 10-500 мкм) из **полимерных материалов** (1а). Частицы геля проницаемы благодаря внутренним каналам, которые характеризуются определенным средним диаметром. Смесь **белков** (1б) вносят в колонку с **гелем** и элюируют **буферным раствором**. Белковые молекулы, не способные проникать в гранулы **геля** (помечены красным цветом), будут перемещаться с высокой скоростью. Средние (зеленого цвета) и небольшие **белки** (синего цвета) будут в той или иной степени удерживаться гранулами **геля** (1в). На выходе колонки элюат собирают в виде отдельных фракций (2). Объем выхода того или иного **белка** зависит в основном от его **молекулярной массы** (3)



1. Основы метода



2. График элюирования



3. Определение мол. массы

В. Гель-фильтрация

При сушке ферментов и ферментосодержащих материалов возникает ряд трудностей, связанных с большой термолабильностью ферментов

- **Вакуум-высушивание** в вакуум-сушильных шкафах в тонком слое - не более 0,5 см- при 30 °С и остаточном давлении не более 136 Па. Длительность зависит от остаточного давления в камере, толщины слоя, структуры осадка и температуры теплоносителя.
- Сначала материал нагревается до температуры сушки, при которой удаляется вся поверхностная влага. Во втором периоде сушки удаляется влага из глубинных слоев материала. Подогрев от воды с температурой на входе 80-85°С на первой стадии и 40-50°С на второй. Потери активности обычно не превышают 6-10 %, длительность высушивания 8-16 час. в зависимости от осадка, лабильности фермента и режима сушки. Пасту сушат на листах целлофана, затем его мнут, высушенный препарат легко отделяется от гладкой поверхности и далее измельчается.
- На предприятиях с небольшой производительностью используют одно- и двух вальцовые *атмосферные или вакуумные сушилки*, но возможна инактивация фермента, т.к. на вальцы подается пар 150°С, и даже малая длительность контакта дает потери 12-15 %. Слой пасты на вальцах 0,1-1 мм, осадок высыхает за один оборот барабана (размер барабана 600,800,1000 и 2000 мм), снимается с поверхности барабана ножами. Производительность 10-50 кг с кв.м в час. В настоящее время создалась устойчивая тенденция использовать сублимационные сушилки.

Сублимационная сушка - при глубоком вакууме

- Материал на начальных стадиях отдает часть влаги, охлаждается и самозамораживается. Затем в сушилку подается тепло, и лед возгоняется, минуя состояние жидкости. Влага перемещается в продукте в виде пара, не захватывая с собой частицы экстрактивных веществ.
- Скорость замораживания до $-20-30^{\circ}\text{C}$. Эвтектическая точка, при которой возможно равновесие льда, жидкой части и пара, определяется экспериментально; обычно остаточное давление бывает $13,3-133,3$ Па. Когда влажность продукта снижается до минимальной, температура высушиваемого материала поднимается до $+30+40^{\circ}\text{C}$. Из-за незначительного содержания кислорода в газовой среде окислительные процессы минимальны, что создает благоприятные условия для сохранения ферментом активности.
- Сушилки бывают периодического и непрерывного действия 20 кг/час, длительность $40-110$ мин., максимальная температура препарата в конце сушки 27°C , после измельчения степень дисперсности препарата $50-100$ мкм.
- При измельчении препарата нельзя допускать перегрева препарата, это может вызвать инактивацию до $30-35\%$ фермента, а при недостаточной герметичности измельчающего устройства с пылью теряется до 7% препарата. Пыль легко воспламеняется и повышает пожароопасность.

Распылительная сушка

- позволяет быстро обрабатывать большие массы ферментных растворов и получать сразу сухой измельченный препарат,
- можно сушить сразу и кж, экстракт из поверхностной культуры или концентраты экстрактов.
- Осадки, полученные при осаждении органическими растворителями или солями, перед высушиванием растворяют до 18-22 % СВ.
- Время пребывания препарата в сушильной башне 5-8 с, влага испаряется почти мгновенно, частицы охлаждаются и поэтому, несмотря на высокие температуры, препарат не нагревается выше 35-40° С.
- Потери активности сравнительно малы - 7-10 %.

Сохранение активности фермента в процессе сушки

- в большей степени зависит от источника получения ферментного препарата.
- Максимальной термостабильностью обладают препараты бактериального происхождения, полученные из кж *B.mesentericus*, наибольшие потери при высушивании экстрактов из *A.awamori*.
- Активность препаратов, получаемых при высушивании глубинных культур, сохранялась почти полностью при температуре теплоносителя на входе 100°C и на выходе 50°C;
- бактериальные препараты выдерживают 140-160°C на входе и 70-80°C на выходе с сохранением 90-95 % активности.
- Протеолитические ферменты чувствительны к рН и полностью сохраняют свою активность , если высушивание ведется при рН выше 6,5, а молокосвертывающая протеаза даже активируется при кислых значениях рН.

Важно:

- Чем выше исходная концентрация сухого вещества в высушиваемой жидкости, тем меньше термостабильность ферментов при сушке.
- Максимальная активность 90-95 % от исходной наблюдается при сушке 10 %-ных концентратов.
- Препараты, осажденные спиртом, лучше переносят сушку распылением и даже при температуре воздуха на входе 160°C и на выходе 80°C полностью сохраняют активность.
- Для уменьшения потерь используют *стабилизаторы или наполнители*, обладающие защитным действием. Помехой являются сахара, концентраты с высоким содержанием сухих веществ сложно сушить.
- **Стабилизаторы** могут быть - CaCl_2 0,1% к объему концентрата, MnSO_4 0,03%, MgCl_2 0,15%, или сочетание хлоридов магния и кальция.

Измельчение

- характеризуется **степенью измельчения**
- $i = d_{нач} / d_{кон}$, размер частиц до и после измельчения, который определяется размером отверстий сит.
- *Меш*- специальная единица, соответствующая числу отверстий в сите на отрезке в 1 дюйм (25,4 мм), в России не применяется.

В зависимости от размеров частиц различают следующие виды измельчения

- крупное 1500-200/250-25 мм
- среднее 150-25/25-5
- мелкое 25-10/5-1
- тонкое 5-1/1-0.075
- сверхтонкое 0,2-0,1/ до 10 в -4 степени.

Измельчение можно производить

- Раздавливанием
- ударом,
- раскалыванием
- истиранием.
- Используют молотковые дробилки (мельницы), ударные мельницы - дезинтеграторы и дисмембраторы, шаровые и стержневые мельницы, коллоидные, бисерные и газоструйные мельницы.

Важно:

- нельзя допускать повышения температуры;
- измельчение должно обеспечивать размеры частиц, необходимые для данного препарата;
- конструкция измельчающего устройства должна быть такой, чтобы препарат не *«обогащался»* посторонними компонентами, ухудшающими качественные показатели готовых ферментных препаратов.

Микрокапсулирование

- имеет целью не только защиту фермента, но и создание возможности его многократного использования, а также вывода его из процесса, устраняет контакт работающих с ферментами, что важно для безопасности людей.
- Полупроницаемая оболочка должна иметь небольшой размер пор, чтобы фермент не вымывался, а субстрат в этом случае должен быть низкомолекулярным. Это основной недостаток микрокапсулирования.
- Микрокапсулы - мелкие частицы, покрытые полимерной оболочкой, внутри которых находится фермент чаще всего в виде раствора. Размер капсул - от нескольких нанометров до мм.
- Для микрокапсулирования применяют полимеры животного происхождения - казеин, желатин, альбумин, а также КМЦ, метилцеллюлоза, ацетатцеллюлоза, нитроцеллюлоза, поливинилацетат, ПАГ, поливиниловый спирт и т.д.

Два способа микрокапсулирования:

- *химический* - образование пленки на границе раздела фаз при реакциях полимеризации и поликонденсации ; наиболее часто используется.
- Растворитель, содержащий растворенный полимер, смешивают с ферментным препаратом и интенсивно диспергируют эту смесь в среде насыщенного водного раствора хлорида, сульфата, нитрата или фосфата натрия, калия , аммония или кальция до получения частиц размером от 20 нм до 5 мкм. Затем под вакуумом удаляют органический растворитель, а ферментный препарат оказывается заключенным в полунепроницаемые оболочки. Процесс дорогой, используют только тогда, когда обойтись без него невозможно.
- *физический* - вакуум-напыление, микрокапсулирование в псевдооживленном слое, при взаимодействии аэрозолей, имеющих различный электрический заряд.

Гранулирование

- чаще для препаратов, используемых в синтетических моющих средствах. Гранулы должны быть по размеру близки к величине гранул других компонентов СМС, быть прочными в сухом виде и не измельчаться, но при соприкосновении с водой должны легко, быстро и полностью растворяться в реакционной среде.
- Гранулы получают окатыванием, прессованием, таблетированием, в виброкипящем слое. Совмещается несколько процессов - увлажнение, смешивание, гранулирование и сушка.
- Для СМС щелочную *протеиназу -протосубтилин Г10х* гранулируют методом экструзии с последующим окатыванием до гранул сферической формы. Предварительно ферментный препарат смешивают с расплавленным ПАВ и направляют в ситовой корпус двухшнекового экструдера, где смесь подпрессовывается и продавливается через отверстия нужных размеров. Окатывание до сферической формы осуществляют в центробежном аппарате, причем смесь должна содержать не менее 37-40% наполнителей в виде алилоамида и синтатала. Если подобных наполнителей не добавлять, то из экструдера выходит неокатываемая порошкообразная масса.

Стандартизация ферментных препаратов

- для каждого выпускаемого препарата устанавливается средний уровень активности с запасом 20-30 %, определяется в единицах ФА на 1 г.
- Желательно, чтобы наполнитель выполнял роль и стабилизатора, а не просто инертного вещества. Крахмал препятствует увлажнению, а хлориды калия и натрия способствуют, нужно думать о герметичной упаковке.
- Наполнитель добавляют перед концентрированием, если продукт выпускается в жидком виде, или перед сушкой распылением или уже в готовый сухой препарат. Препарат и наполнитель должны иметь одну и ту же степень измельчения и влажность не более 10-12 %. При перемешивании в шаровой мельнице за 30-40 мин. получают вполне однородные ферментные препараты.
- Количество наполнителя рассчитывают по формуле $S = ab/c - b$, где S - количество наполнителя в кг; a - активность исходного препарата ед.ФА на 1 г; b - количество исходного препарата в кг; c - стандартная активность препарата, ед.ФА на 1 г.

Важно:

- Хорошим стандартизатором и стабилизатором
- для амилалитических ферментов является крахмал,
- Для пектолитических - крахмал или хлористый натрий.
- Стандартизовать пектолитические препараты можно диатомитом, желатиной, бентонитом.
- Выбор наполнителя и стабилизатора, дозировку, условия хранения и длительность его осуществляют экспериментально.