

Производство ферментных препаратов

Биотехнология ферментативных препаратов

Производство ферментных препаратов

занимает одно из ведущих мест в современной биотехнологии и относится к отраслям, объём продукции которых постоянно растёт, а сфера применения неуклонно расширяется.

Быстрое развитие связано с тем, что:

- ферменты являются высокоактивными, нетоксичными биокатализаторами белкового происхождения,
- широко распространены в природе,
- без них невозможно осуществление многих биохимических процессов.

Источники получения ферментных препаратов

1. Растительное сырье

1. Источником ферментов может быть **проращенное зерно различных злаков** (солод):

- может либо использоваться непосредственно как **технический ферментный препарат**,

- **служить исходным материалом** для получения очищенных ферментных препаратов.

2. В тропических и субтропических странах в качестве сырья для промышленного производства **протеиназ** используют **латекс дынного дерева**, **латекс фикусовых растений** (например, листья, побеги **инжира**, сок зеленой массы **ананаса** и др.)

Источники получения ферментных препаратов

2. Органы, и ткани животных.

На всех мясоперерабатывающих комбинатах собирают сырье, содержащее ферменты, консервируют его и используют для получения ферментных препаратов.

Таким сырьем являются:

- ***поджелудочная железа*** (содержит химотрипсин, коллагеназу, эластазу, трипсин, амилазу, липазу и др),
- ***слизистые оболочки желудков и тонких кишок свиней*** (пепсин и липаза),
- ***сычуги крупного рогатого скота*** (пепсин и липаза),
- ***сычужки молочных телят и ягнят*** (реннин (сычужный фермент)),
- семенники половозрелых животных (содержат фермент гиалуронидазу).

3. Микроорганизмы

Микроорганизмы могут синтезировать одновременно целый комплекс ферментов, но есть и такие, особенно среди мутантных штаммов, которые являются моноферментными и образуют в больших количествах только один фермент.

Преимущества микроорганизмов:

- *неприхотливы к составу питательной среды,*
- *легко переключаются с синтеза одного фермента на другой,*
- *имеют сравнительно короткий цикл роста (16-100 ч).*

Для промышленного получения ферментных препаратов используют как природные штаммы микроорганизмов, выделенные из естественных объектов, так и мутантные штаммы.

Продуцентами ферментов могут быть: бактерии,
грибы, дрожжи, актиномицеты.

Область применения ферментов

Сейчас идентифицировано около 2000 ферментов.

Промышленно выпускается около 250 наименований.

Наибольший удельный вес среди выпускаемых препаратов занимают протеиназы и амилазы (составляют 60 % общего объема выпуска ферментных препаратов).

Крупными отраслями – потребителями являются:

- *фармацевтика* 15 %;
- *производство вин и соков* 10 %;
- *производство спирта* 8 %;
- *сыроделие* 5 %;
- *хлебопечение* 5 %;
- *пивоварение* 6 %;
- *аналитические цели и научные исследования* – около 1%
- *прочие отрасли* 6 %.

- В РБ, кроме того, ферменты внедряются в *кормопроизводство*

Выбор штамма и условий культивирования

Целесообразность применения микроорганизмов обусловлена:

- 1) генетическими манипуляциями удаётся в тысячу и более раз увеличить уровень катаболитных и в несколько сот раз уровень биосинтетических ферментов;
- 2) энергетически оправдано выращивание микробных клеток в больших масштабах в связи с применением недорогих сред и быстрого роста микроорганизмов;
- 3) огромное разнообразие реакций, к которым способны микроорганизмы (особенно касается вторичного метаболизма);
- 4) микроорганизмы служат источником и ряда уникальных ферментов, нигде более не обнаруженных (**целлюлоза, танназа, гидрогеназа, кератиназы, нитрогеназа, пенициллиназа и др.**). Есть виды, развивающиеся при экстремально высоких температурах (87 °C), в связи с чем потенциально возможно создание термостабильных штаммов;
- 5) способность адаптироваться к различным условиям, что позволяет переносить культуру на производство

Промышленное производство и применение ферментов основано на двух важных факторах:

- во-первых, ферменты образуются в живых клетках;
- во-вторых, ферменты могут проявлять свое действие в среде независимо от живых клеток.

Требования к продуценту:

- 1) желательно образование **внеклеточных ферментов**, так как их легче выделить;
- 2) **высокий выход фермента** за короткое время;
- 3) **очистка фермента** от культуральной жидкости **должна быть легкой**;
- 4) **штаммы не должны продуцировать антибиотики**, токсичные вещества и не должны быть родственниками штаммов, образующих токсины.

Технология культивирования продуцентов

- Технологический процесс можно разбить на три стадии:
 - 1) *получение посевного материала;*
 - 2) *получение производственной культуры методами поверхностного или глубинного культивирования;*
 - 3) *выделение из готовой производственной культуры технических или очищенных ферментных препаратов.*

Поверхностный метод состоит в культивировании микроорганизмов на поверхности увлажненных стерилизованных отрубей, размещенных в кюветах (инкубацию ведут в специальном термостатируемом цехе при постоянном контроле в нем температуры, влажности и подачи воздуха).

Глубинный метод более экономичен. Для его реализации применяются ферментеры из нержавеющей стали, снабженные устройствами для перемешивания и подачи в жидкую питательную среду стерильного воздуха.

Получение активных продуцентов.

1. Активные штаммы, выявленные из естественных источников, подвергают действию мутагенов несколько раз, т. е. осуществляют ступенчатую селекцию. Часто эффективно комбинированное воздействие мутагенов химической и физической природы.

Так, применение этиленимина и ультрафиолетового излучения в сочетании со ступенчатым отбором позволило получить очень активные штаммы *Asp. awamori*, используемые как продуценты амилолитического, протеолитического и других ферментных комплексов. Селекция производственно ценных штаммов ведется и в условиях производства.

2. Мероприятия по сохранению продуцентов.

Существует ряд методов хранения производственно ценных штаммов, обеспечивающих их высокую биохимическую активность. В музеях живых культур при заводских лабораториях культуры периодически пересеваются и после развития культуры на плотной среде ее заливают стерильным вазелиновым маслом. Во многих случаях лучшим способом хранения является лиофилизация культур.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов.

По назначению разделяются на группы:

1. Среда для поддержания штаммов-продуцентов в лаборатории и в музее (подбирается исходя из физиологических потребностей микроорганизмов).
2. Среда для получения посевного материала.
3. Среда, употребляемые в больших объемах в основном процессе производства.

Состав сред, обеспечивающих накопление того или иного фермента, может значительно отличаться от состава сред, применяемых для выделения и поддержания культуры продуцентов.

Некоторые ферменты микроорганизмов требуют для своего синтеза присутствия в среде индуктора. Так, например, если для синтеза **липазы** *Aps. niger* благоприятно присутствие в среде растительного масла, а для синтеза **рибонуклеазы** - нуклеиновых кислот, то для повышенного синтеза **α -амилазы** *Vac. polymyxa* необходимо добавление гидролизата казеина.

Технологические особенности процессов ферментации

По технологическому оформлению различают процессы:

- аэробное культивирование,
- анаэробное культивирование;
- твердофазное культивирование,
- поверхностное культивирование,
- глубинное культивирование;
- периодическое культивирование,
- непрерывное культивирование.

Аэробное культивирование — аэрация среды — неперенное условие в микробиологических процессах, в которых используются аэробные микроорганизмы-продуценты.

При интенсивном потреблении субстрата независимо от

При давлении 0,1 МПа и температуре 30°C в 1 л дистиллированной воды максимальное количество растворенного кислорода составляет 7,5 мг. В реальной питательной среде максимальная растворимость кислорода колеблется в интервале 2–5 мг/л. Запасы кислорода в среде обеспечивают жизнедеятельность аэробного продуцента в течение 0,5–2 мин.

Критическая концентрация кислорода, при которой наблюдается лимитация дыхания клеток.

Для большинства аэробных микроорганизмов, растущих в сахаросодержащих субстратах, критическая концентрация кислорода 0,05–0,10 мг/л, что соответствует 3–8 % от полного насыщения среды кислородом.

Оптимальной для роста биомассы считается концентрация кислорода 50–60 % от полного насыщения, для биосинтеза целевых метаболитов — 10–20 %.

Анаэробные процессы биологического окисления у микроорганизмов, делят на три группы:

- дыхание (акцептор — кислород);
- брожение (акцептор — органическое вещество);
- анаэробное дыхание (акцептор — неорганическое вещество: нитраты, сульфаты и др.).

У облигатных анаэробов брожение является единственно возможным способом получения энергии.

У факультативных анаэробов оно составляет первую стадию катаболизма глюкозы, за которой может следовать аэробное окисление образовавшихся продуктов.

Обособленной промежуточной группой являются аэротолерантные микроорганизмы, получающие необходимую для жизнедеятельности энергию в анаэробном процессе, т. е. на уровне субстратного фосфорилирования, и одновременно имеющие дыхательную цепь для поглощения кислорода среды и создания благоприятных анаэробных условий. Данный эффект носит название «эффекта дыхательной защиты».

Твердофазную ферментацию обычно реализуют в твердой, сыпучей или пастообразной среде, влажность которой составляет 30–80 %.

Различают **три типа твердофазных процессов**:

- **поверхностные процессы**: слой субстрата, например соломы, не превышает 3–7 см («тонкий слой»); роль биореактора выполняют большие, площадью до нескольких квадратных метров, подносы из алюминия или культивационные камеры);
- **глубинные твердофазные процессы в неперемешиваемом слое** («высокий слой»): биореакторы представляют собой глубокие открытые сосуды. Для аэробных процессов разработаны приспособления, обеспечивающие диффузионный и конъюнктивный газообмен;
- **твердофазные процессы в перемешиваемой и аэрируемой массе субстрата**, которая может быть

Недостатки твердофазной ферментации:

1. *Обеспечение микроорганизмов кислородом затрудняется с увеличением слоя субстрата.*
2. *Перемешивание слоя не допускается, если культивируются мицелиальные микроорганизмы, например микромицеты, и из-за отсутствия перемешивания рост микроорганизмов происходит по принципу колонизации, поэтому часто возникает локальная нехватка питательных веществ.*
3. *Отвод теплоты и поддержание постоянной температуры во всей ферментационной среде сильно затруднен.*

Преимущества твердофазной ферментации:

- требуют меньших затрат на лабораторное оборудование и эксплуатацию;
- характер субстрата облегчает отделение и очистку продукта;
- низкое содержание воды в субстрате препятствует заражению культуры продуцента посторонней микрофлорой;
- твердофазные процессы не связаны со сбросом в окружающую среду большого количества сточных вод.

Управляемый процесс твёрдофазной ферментации в промышленных условиях осуществлен при производстве ферментов с использованием микромицетов.

Сыпучий субстрат с культурой инкубируют в тонком слое (3–7 см) в кюветах, размещенных в камерах, где поддерживают оптимальные температуру и влажность воздуха,

обеспечивают принудительную циркуляцию газовой фазы вдоль поверхности ферментируемого субстрата (воздух в данном случае является и аэрирующим, и теплоотводящим агентом).

Более толстый слой гранулированного крахмалсодержащего субстрата используют для протеинизации (до 20 %) корма при помощи *Asp. niger*. В данном случае применяют неинтенсивное перемешивание среды.

Поверхностная ферментация на жидких субстратах реализуется в кюветах со средой, помещенных в вентилируемые воздухом камеры.

Культура микроорганизмов при этом образует биомассу в виде пленки или твердого слоя на поверхности жидкой среды.

Культура потребляет кислород непосредственно из газовой фазы — воздуха.

Массообмен в таких условиях малоинтенсивный.

Глубинное культивирование микроорганизмов

происходит во всем объеме жидкой питательной среды, содержащей растворенный субстрат.

Ферментер **должен обеспечивать:**

- рост и развитие популяций микроорганизмов в объеме жидкой фазы,
- подвод питательных веществ к клеткам микроорганизмов,
- отвод от микробных клеток продуктов их обмена веществ (метаболизма),
- отвод из среды выделяемого клетками тепла.

Глубинное культивирование можно осуществлять:
периодическим и **непрерывным способами.**

1. Периодическое культивирование.

При периодическом способе культивирования в ферментер загружают сразу весь объем питательной среды и вносят посевной материал.

Выращивание микроорганизмов проводят в оптимальных условиях в течение определенного времени, после чего процесс останавливают, сливают содержимое ферментера и выделяют целевой продукт.

Этап роста культуры включает:

- лаг-фазу, - экспоненциальную фазу, - фазу замедления роста,
- стационарную фазу, - фазу отмирания.

2. Широко применяют периодическое культивирование с подпиткой.

3. Существует также объемно-доливочное культивирование, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды (полунепрерывное культивирование).

Непрерывные процессы.

При непрерывном способе питательная среда непрерывно подается в ферментер (биореактор), в котором создают оптимальные условия для роста микроорганизмов, а из ферментера (биореактора) также непрерывно вытекает культуральная жидкость вместе с микроорганизмами.

В непрерывных процессах биообъект поддерживается в экспоненциальной фазе роста.

При этом существует равновесие между приростом биомассы за счет деления клеток и их убылью в результате разбавления свежей средой.

Из непрерывных процессов лучше всего изучен **метод глубинной ферментации.**

Процесс может быть:

- гомогенно-непрерывным (аппарате, где идет интенсивное перемешивание, все параметры постоянны во времени),
- гетерогенно-непрерывным (несколько ферментеров соединены вместе).

Питательная среда поступает в первый аппарат, готовая культуральная жидкость вытекает из последнего.

При непрерывном культивировании микроорганизмов необходимо предотвратить вымывание культуры из системы, т. е. обеспечить постоянную концентрацию клеток.

В стерильных условиях непрерывный, проточный метод обеспечивает сохранение культуры в физиологически активном состоянии длительное время.

В зависимости от метода, благодаря которому культура поддерживается в состоянии динамического равновесия, различают:

- **турбидостатный** принцип (скорость притока среды такова, что концентрация биомассы в системе постоянна),

- **хеMOSTATный** принцип (в системе ограничивают рост культуры одним элементом питания (углерода, кислорода, соответствующего витамина и др.) при нелимитируемых количествах остальных),

- Известны также методы управления ростом проточной культуры **по рН** (рН-стат), **по кислороду** (оксистат).

Стадии технологического процесса

Производство ферментных препаратов глубинным способом на жидких питательных средах можно разделить на следующие стадии:

- приготовление, стерилизация и охлаждение питательной среды;
- приготовление посевного материала и выращивание производственной культуры;
- отделение и сушка биомассы;
- фасовка отходов и отделение фильтрата;
- концентрирование и сушка концентрата;
- осаждение, сушка и стандартизация препарата;
- фасование препарата.

Характеристика комплексов оборудования.

1. Линия начинается с комплекса оборудования, в состав которого входят:

- циклон-разгрузитель,
- экстракторы,
- стекатель,
- шнек-пресс,
- ленточный вакуум-фильтр,
- смеситель,
- нагревательная колонка,
- выдерживатель,
- теплообменники.

2. В состав линии входит комплекс оборудования, состоящий из инокулятора и ферментатора.

3. Следующий комплекс оборудования представляют камерный фильтр-пресс и барабанная сушилка.

4. Далее следует комплекс оборудования для фасования и упаковывания ферментных препаратов, а также сепараторы.

5. Ведущим является комплекс оборудования, включающий вакуум-выпарные аппараты и распылительные (сублимационные) сушилки.

6. Завершающий комплекс оборудования линии состоит из установки непрерывного осаждения, аппарата обсушки препарата, центрифуги, барабанной вакуум-сушилки, установки для измельчения и смешивания.

7. Финишным комплексом оборудования являются фасовочные машины.

Основное требование к ферментатору – возможность проведения процесса культивирования продуцента в асептических условиях при интенсивном аэрировании среды.

В процессе культивирования приходится иметь дело со сложной трехфазной системой :

жидкость – твердая взвесь – газ.

В такой системе затруднены массообменные процессы, и поэтому усложняется аппаратное оформление всей стадии выращивания.

Ферментаторы по способу подвода энергии на аэрирование и перемешивание делят на:

- аппараты с механическим перемешиванием и барботажем (**комбинированные**);
- с **эжекционной системой** аэрирования (подвод энергии к жидкой фазе);
- **барботажные** (подвод энергии к газовой фазе).

Устройство и принцип действия линии.

Для получения питательной среды используют свекловичный жом, который через циклон-разгрузитель 1 и циклон чистки воздуха 2 направляется на весы 3 и далее в экстрактор 4 свекловичного жома.

Полученный экстракт насосом перекачивается в стекатель 5, шнек-пресс для отжима 6 и далее в смеситель 20, куда подводят питание соли и остальные компоненты.

Солодовые ростки из бункера 8 взвешиваются на весах 10 и винтовым гибким подъемником 9 направляются в экстрактор 11 и далее в ленточный вакуум-фильтр 12, откуда промывные воды отводятся в ресивер 13, а осадок спускается в бункер 14.

Над вакуум-фильтром 12 размещены барометрический конденсатор 16 и ловушка 17, а ниже установлен барометрический ящик 18.

Полученный экстракт солодовых ростков из ресивера для фильтрата 15 насосом через приемник 19 закачивается в смеситель 20.

Приготовленные смеси поступают в сборник питательной среды 21, а далее в стерилизатор 23, выдерживатель 24 нагрева питательной среды до 130 °С и на охлаждение среды в теплообменники 25 и 26, откуда охлажденная питательная среда поступает в ферментатор 33, заполняя его на 70-75%

Для начала ферментации в среду вводят посевной материал.

Приготовление посевного материала осуществляется в аппарате 22, откуда он направляется в ферментатор 33 с форсуночным разбрызгивателем 32.

Здесь же установлены фильтры 27, 28 и 29 для очистки воздуха, а также стерилизатор пеногасителя 30 с мерником 31. Забираемый из атмосферы воздух

- Готовую культуральную жидкость, содержащую биомассу продуцента, твердую взвесь среды и всю сумму веществ насосом подают через теплообменник 34 для охлаждения и далее в сборник 35.
- После окончания ферментации отделение биомассы от культуральной жидкости происходит в камерном фильтр-прессе 36, откуда биомасса через бункер 37 направляется на сушку и фасовку, а отделенная в сборнике 38 культуральная жидкость — на сепараторы 39, 50 и 55.
- После сепаратора концентрат поступает в теплообменник 51 для охлаждения.
- Перед выпариванием культуральная жидкость подогревается до температуры 95... 100 °С и далее поступает в вакуум-выпарной аппарат 42, а конденсат из конденсатора 41 отводится в сборник 43.
- После выпаривания культуральная жидкость с содержанием сухих веществ около 40 % представляет собой жидкий концентрат, который перекачивается в сборник 44.

- Концентрат культуральной жидкости может быть высушен в распылительной или сублимационной сушилке 45 и через циклон 46 и рукавный фильтр 47 направлен в бункер 48 высушенного препарата.
- Шнековым транспортером 49 ферментный препарат транспортируется в установку непрерывного осаждения 52 этанолом, куда из мерника 53 через теплообменник для охлаждения спирта 54 подается спирт.
- Осажденный препарат поступает в аппарат для отсушки ферментного осадка 56, откуда после центрифугирования на центрифуге 57 препарат направляется на барабанную вакуум-сушилку 58.
- Высушенный препарат собирают в бункере 59, измельчают на измельчителе 60 и направляют в бункер 61, добавляют наполнитель из бункера 61, взвешивают на весах 63 и направляют в смеситель 64.
- Фасование ферментных препаратов производят в фасовочных машинах 65 и 66 порциями по 17 кг или по 0,5

Выделение и очистка ферментов

Культуральная жидкость после глубинного культивирования содержат большое количество балластных веществ.

В медицине можно использовать **только очищенные препараты ферментов**, частично или полностью освобожденные от балластных веществ.

Исходным материалом для получения очищенных ферментных препаратов может служить:

- фильтрат культуральной жидкости,
- биомасса продуцента,
- водный экстракт из поверхностной культуры продуцента.

Ферментные препараты могут быть получены в виде порошков или жидких концентратов.

В процессе выделения происходит повышение доли активного белка в общей массе препарата, т. е. увеличивается его удельная активность (в таблице 1 показаны стадии очистки от

Таблица 1									
Стадии очистки	Объём, мл	Общее количество белка, мг	Глюкоамилазная активность				Амилолитическая активность		Трансглюкоэидазная активность*
			общая, ед.	удельная, ед./мг белка	выход, %	степень очистки	общая, ед.	выход, %	
Исходная культуральная жидкость	1 200	13 600	28 500	2,1	100,0	1,0	9 500	100	Глюкоза, изомальтоза,
Отделение биомассы, концентрирование, отделение	560	11 100	25 600	2,3	90,0	1,1	8 500	89,00	То же
Осаждение ацетоном, растворение в воде	350	2 040	19 800	9,7	69,5	4,6	1 050	11,30	»
Ультрафильтрация	55	1 610	18 200	11,3	64,0	5,4	860	9,10	»
Хроматография на ДЭАЭ-целлюлозе	555	298	15 000	50,4	52,5	24,5	30,0	0,35	Нет
Ультрафильтрация	16	250	13 450	54,0	47,2	25,7	27,5	0,29	»
Гельфильтрация через акрилекс П-100	100	140	11 400	76,5	40,35	36,5	22,8	0,24	»
Обессоливание, лиофилизация	0,1**	92	7 150	77,0	25,0	37,0	14,3	0,15	»
*	Характеризуется хроматографически по наличию изосахаров.								
*	Выражено в г.								

Схема очистки фермента от балластных веществ сводится к освобождению его от нерастворимых веществ и других ферментов.

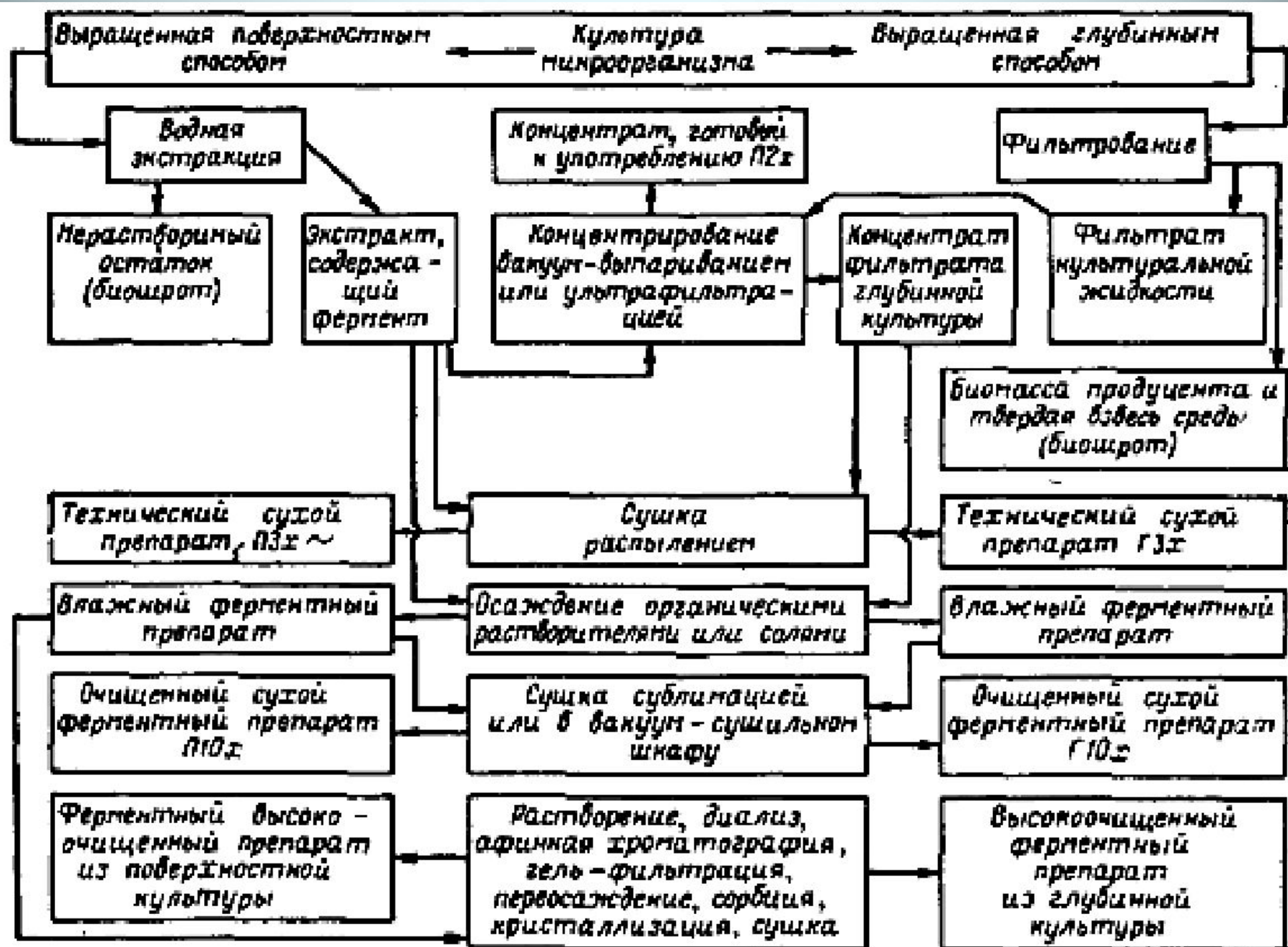
Из поверхностных культур труднее получить высокоочищенные препараты из-за большого количества балластных веществ.

Из глубинных культур получить очищенные препараты легче, но при этом приходится вести выделение из разбавленных растворов, если выделение ферментов проводится из жидкой части культуры. Выделение осложняется, если фермент внутриклеточный, и тогда необходимо разрушать клетки микроорганизмов.

Экстракт из поверхностной культуры **или фильтрат** культуральной жидкости является исходным материалом для получения препаратов ферментов различной степени очистки.

- **На первом этапе** выделения отходом процесса является нерастворимая часть культуры – **биошрот**, содержащий нерастворимые включения среды и биомассу продуцента.

- **Далее в зависимости от свойств выделяемого фермента и сопутствующего ему балласта** схема очистки и получения ферментного препарата может включать различные приемы и методы, такие, **как концентрирование, диализ, осаждение органическими растворителями, солями, гель-фильтрование, афинная хроматография, иммобилизация, сушка термолабильных материалов** и т. д.

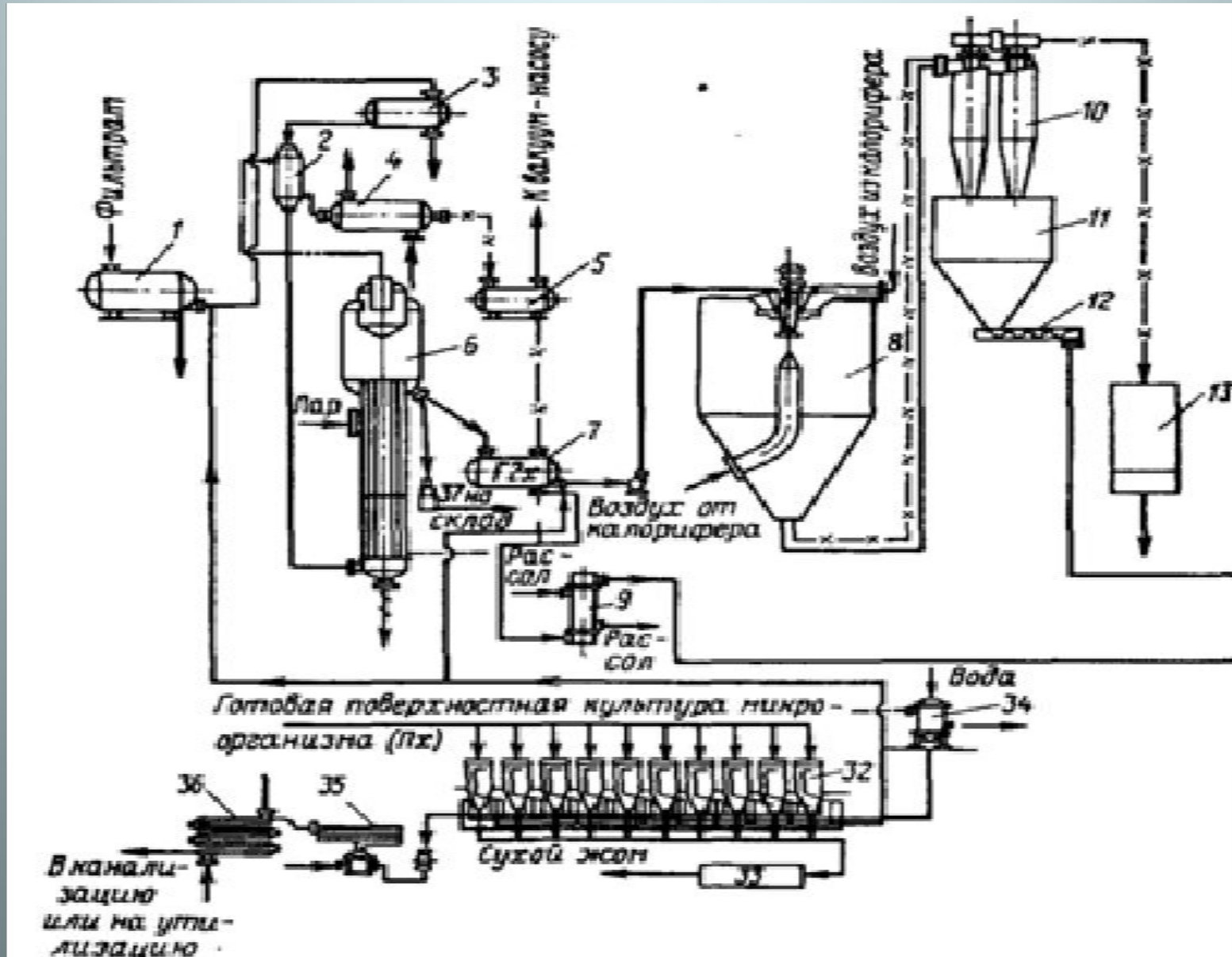


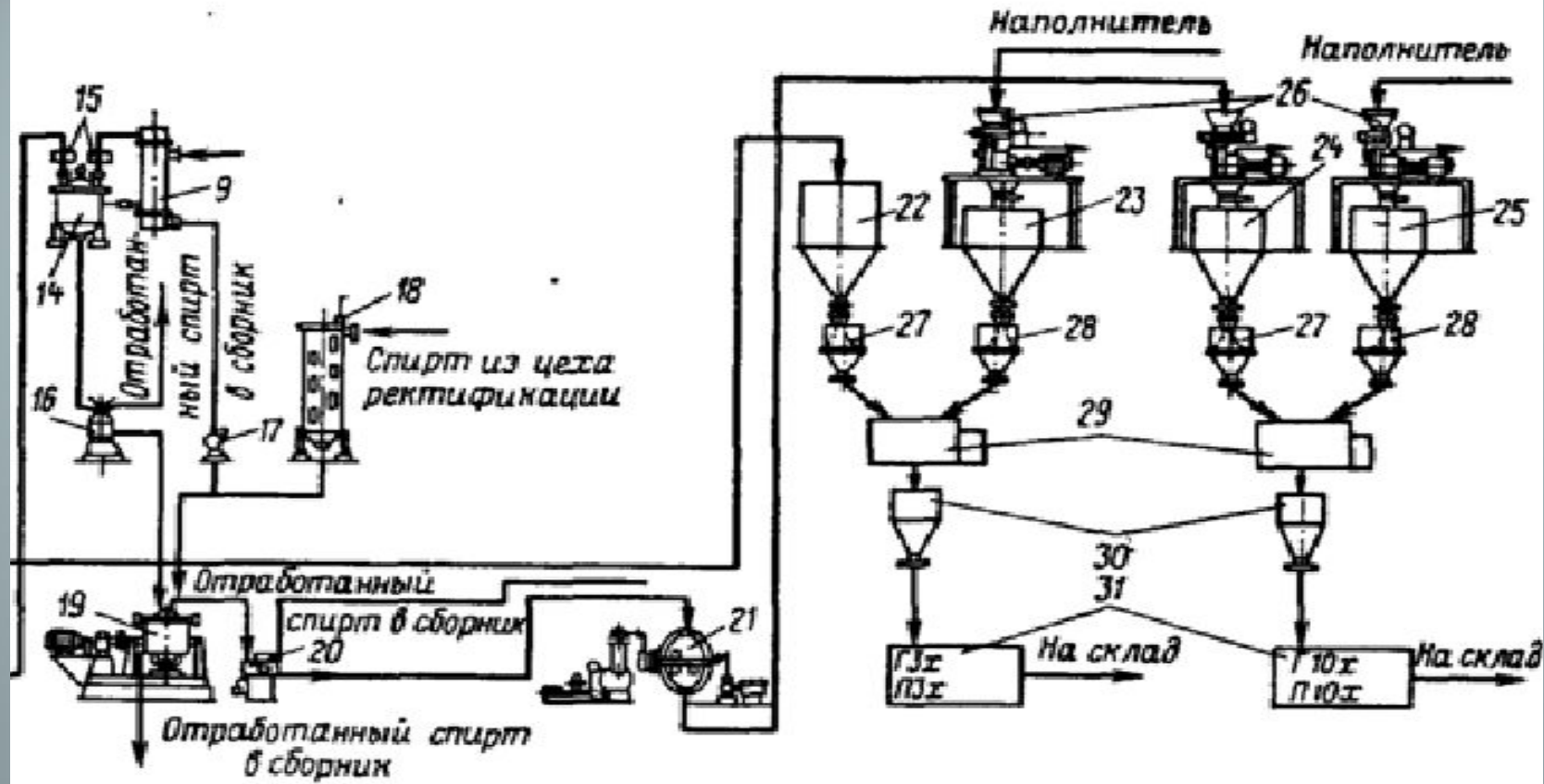
Технологическая схема получения очищенных ферментных препаратов

Схемы получения ферментных препаратов *зависят от свойств выделяемого фермента и методов очистки, примененных для получения препарата нужной степени чистоты.*

В качестве примера рассмотрим технологическую схему получения препаратов из поверхностной и глубинной культур в виде жидких концентратов, сухих технических препаратов, получаемых сушкой распылением, и препаратов, осажденных органическими растворителями.

Принципиальная технологическая схема получения очищенных препаратов из культур микроорганизмов, выращенных глубинным и поверхностным способами





1 – сборник фильтрата культуральной жидкости; 2 – подогреватель вакуум-выпарной установки; 3 – сборник экстракта поверхностной культуры; 4 – конденсатор; 5 – сборник конденсата; 6 – вакуум-выпарной аппарат; 7 – сборник концентрата; 8 – распылительная сушилка; 9 – теплообменники; 10 – циклон; 11 – бункер для высушенного препарата; 12 – шнек; 13 – фильтр рукавный; 14 – осадитель; 15 – дозаторы; 16 – сепаратор; 17 – насос для спирта; 18 – мерник для спирта; 19 – смеситель промывки осадка спиртом; 20 – центрифуга; 21 – вакуум-сушилка роторная; 22 – бункер для высушенного осадка; 23, 25 – бункера для наполнителей; 24 – бункер для сухого препарата; 26 – установки дисмембраторов; 27, 28 – весы; 29 – смесители непрерывного действия; 30 – бункера для стандартизированного препарата; 31 – установки для фасования и упаковывания препаратов; 32 – установка для экстракции ферментов; 33 – сушилка для биошрота; 34 – резервуар для воды; 35 – стерилизационная установка для сточных вод; 36 – охлаждающий теплообменник; 37 – фасование и упаковывание жидкого препарата Г2х или П2х.

Фильтрат охлажденной культуральной жидкости собирается в основном сборнике и по мере надобности передается в сборник небольшой вместимости перед поступлением в подогреватель вакуум-выпарной установки пленочного типа.

Концентрат культуральной жидкости с содержанием сухого вещества 6 – 10 % поступает в сборник концентрата.

Для получения сухого технического препарата концентрат направляют в башню распылительной сушилки 8. Сухой препарат через циклон 10, бункер 11 и шнек 12 попадает на стадию стандартизации, фасования и упаковывания.

Для получения более очищенного препарата концентрат из сборника подается на осаждение органическим растворителем. Предварительно концентрат охлаждают в теплообменнике до температуры 2 – 3 °С и подают через дозатор в осадитель.

Одновременно в осадитель дозируется охлажденный растворитель. Образовавшийся осадок отделяют на

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.

Из экстракта можно получать ***стабильный жидкий концентрат с содержанием сухого вещества 50%***, для чего экстракт направляют в сборник, затем в подогреватель и на вакуум-выпарную установку.

Готовый жидкий концентрат фасуют в специальные емкости и направляют на склад готовой продукции.

Из глубинной культуры можно также получать жидкие концентраты, например, методом ультрафильтрации.

Экстрагирование ферментов

Все ферменты являются водорастворимыми белками, поэтому наилучшим экстрагентом для них является вода.

Для извлечения ферментов из дрожжей или бактерий необходимо подвергнуть механическому или автолитическому разрушению их клеточные стенки.

Оболочки мицелиальных нитей имеют меньшее диффузионное сопротивление, чем оболочки бактериальных и дрожжевых клеток, поэтому дезинтеграции культуры грибов не требуется.

Извлечение ферментов проводят как из влажных, так и из сухих поверхностных культур грибов.

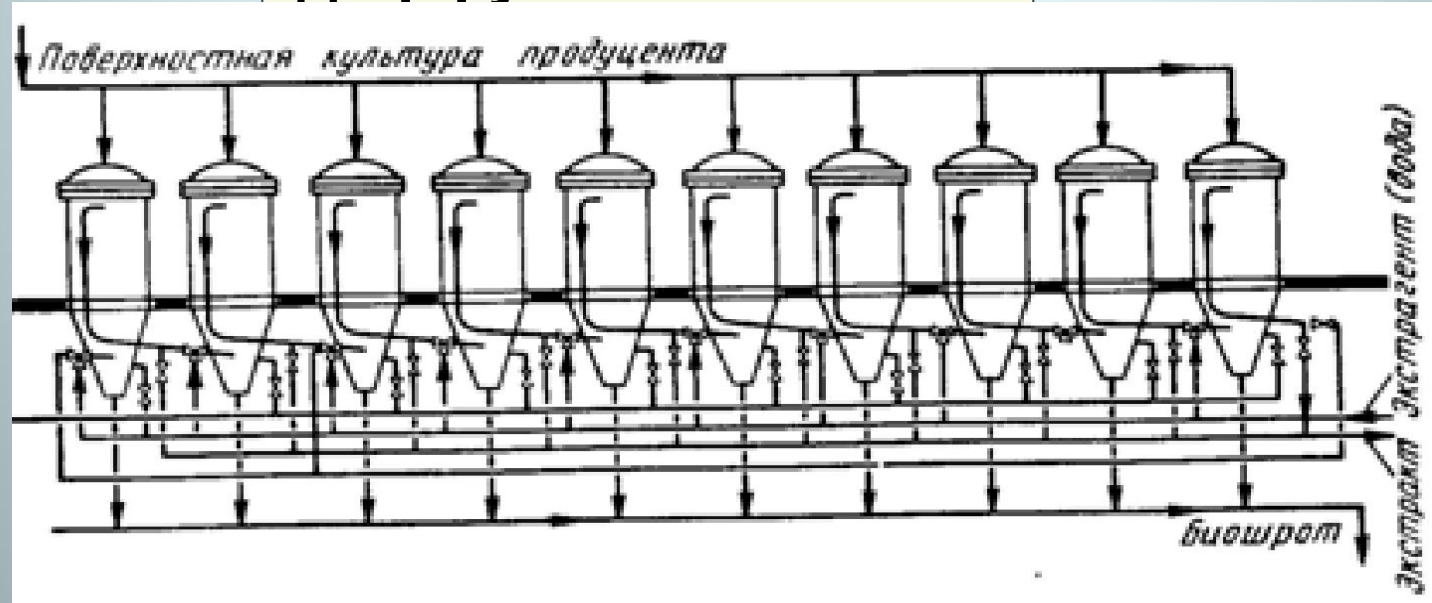
Сухая культура может храниться длительное время без потери активности ферментов, и из нее получают более концентрированные экстракты. **Но** при подсушивании культуры имеют место потери активности.

На полноту экстрагирования ферментов из культур оказывают влияние многие факторы:

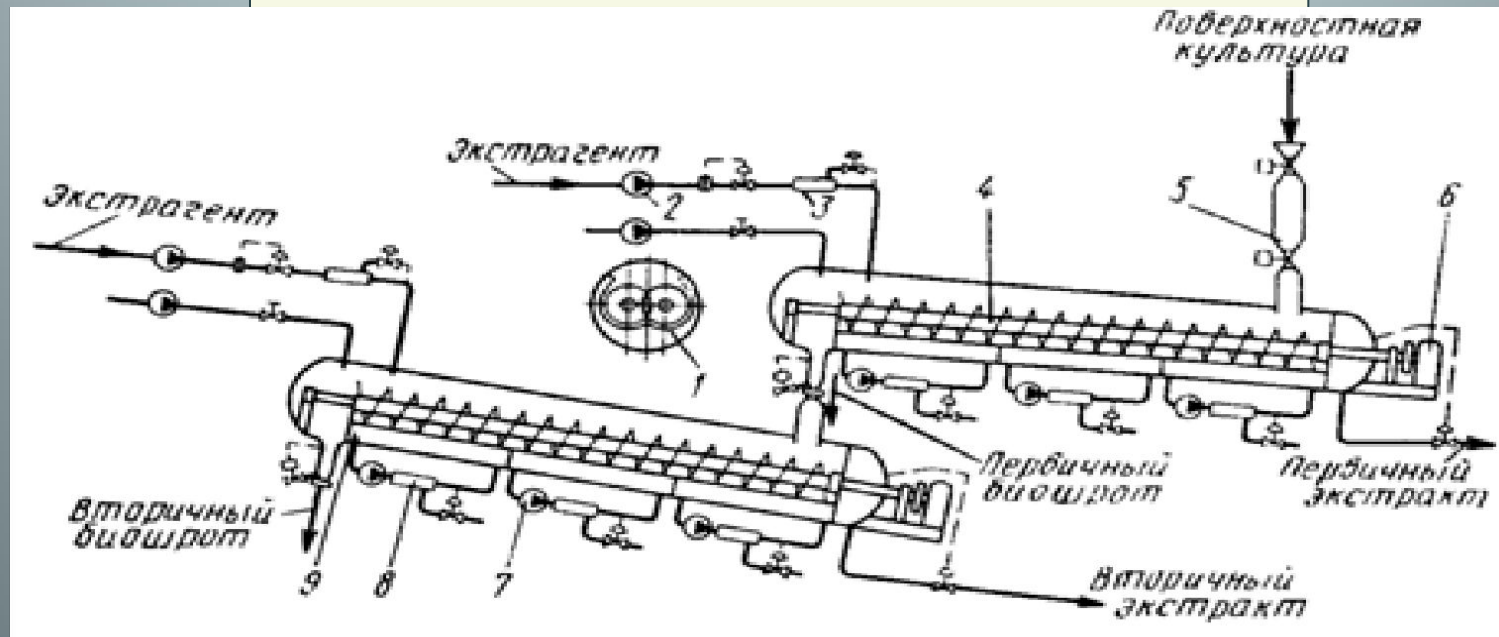
- температура,
- рН,
- длительность процесса,
- конструктивные особенности экстракционных аппаратов,
- природа извлекаемого фермента,
- количество отобранного экстракта с единицы массы загруженной в аппарат культуры и т. д. .

Для получения концентрированных экстрактов при небольших потерях ферментов с биошротом необходимо применять **специальные экстракционные установки**. Ранее широко использовались **диффузионные батареи** (в них можно получить экстракт с содержанием сухого вещества от 7 до 14 % в зависимости от вида культуры, среды и величины отбора экстракта). Более перспективным является **экстрактор непрерывного действия**

диффузионные



экстрактор непрерывного



Концентрирование ферментных растворов методом вакуум-выпаривания

Экстракты из поверхностных культур микроорганизмов и фильтраты глубинной культуры являются нестабильными при хранении.

Вакуум-выпаривание применяется как один из этапов получения сухих очищенных ферментных препаратов.

Ферменты очень чувствительны к температуре выпаривания, поэтому **основным условием** концентрирования ферментных растворов **является кратковременное ведение процесса при низких температурах кипения**, чтобы выпариваемая жидкость не перегрелась, а ферменты не инактивировались.

Следует учитывать, что чем чище раствор, чем меньше он содержит сопутствующих веществ, тем ферменты более чувствительны к воздействию высоких температур.

Концентрирование ферментов

1. Концентрирование с изменением фазового состояния
2. Концентрирование без изменения фазового состояния

Схема ультрафильтрационной ячейки:

