

# **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 этиленimina 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  **$\alpha$ -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.

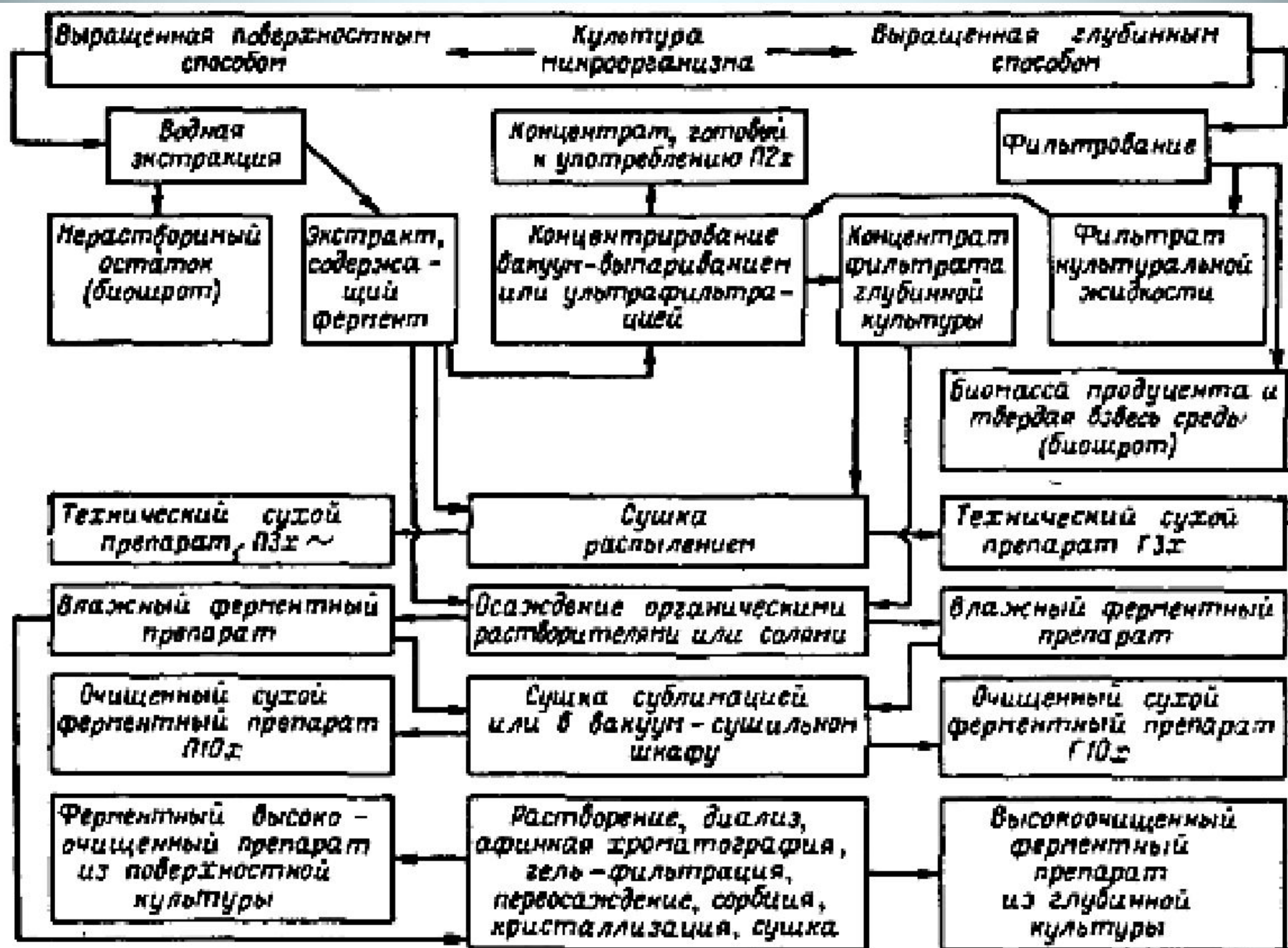
**Из поверхностных культур** труднее получить высокоочищенные препараты из-за большого количества балластных веществ.

**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.**



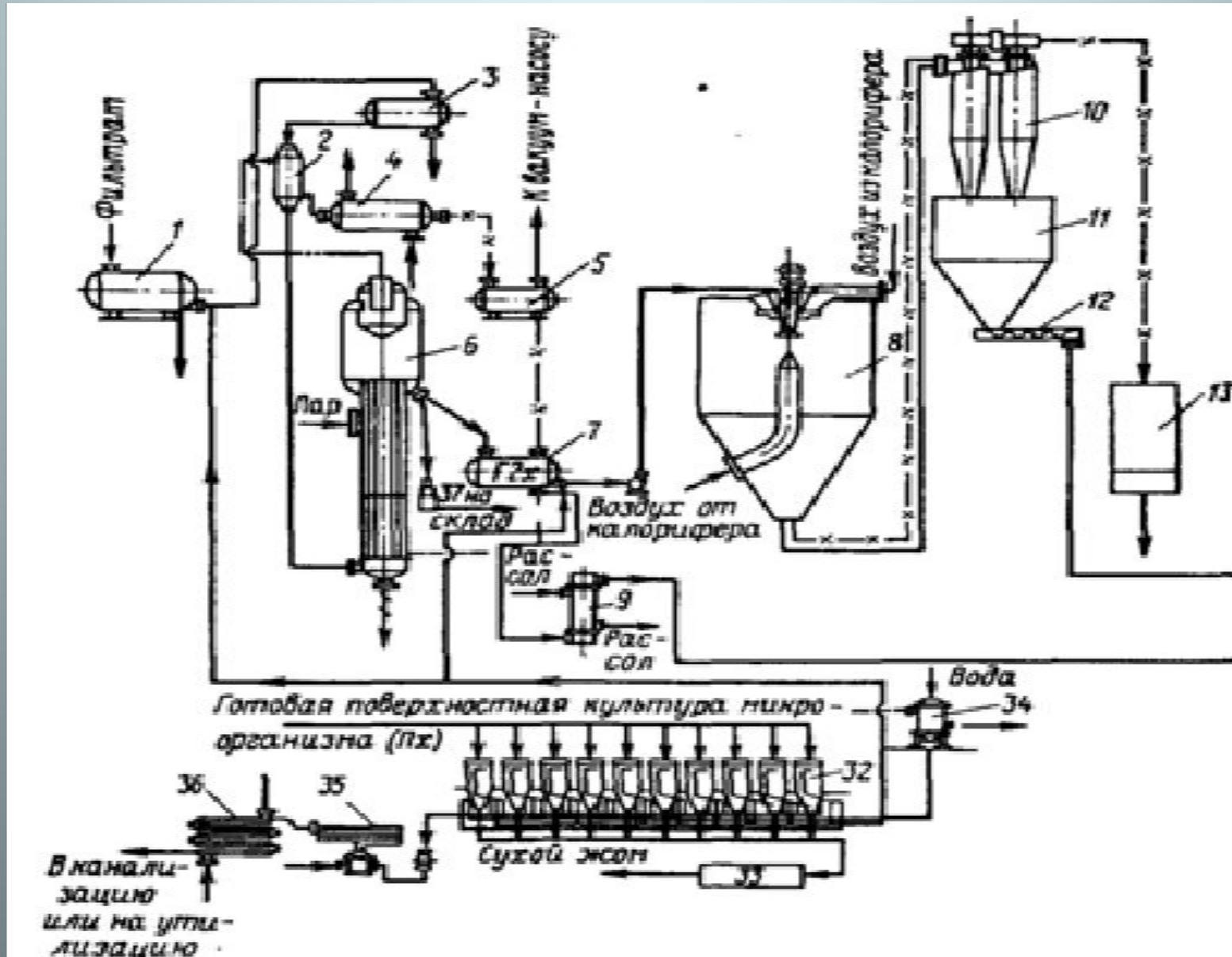
## Технологическая схема получения очищенных ферментных препаратов

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

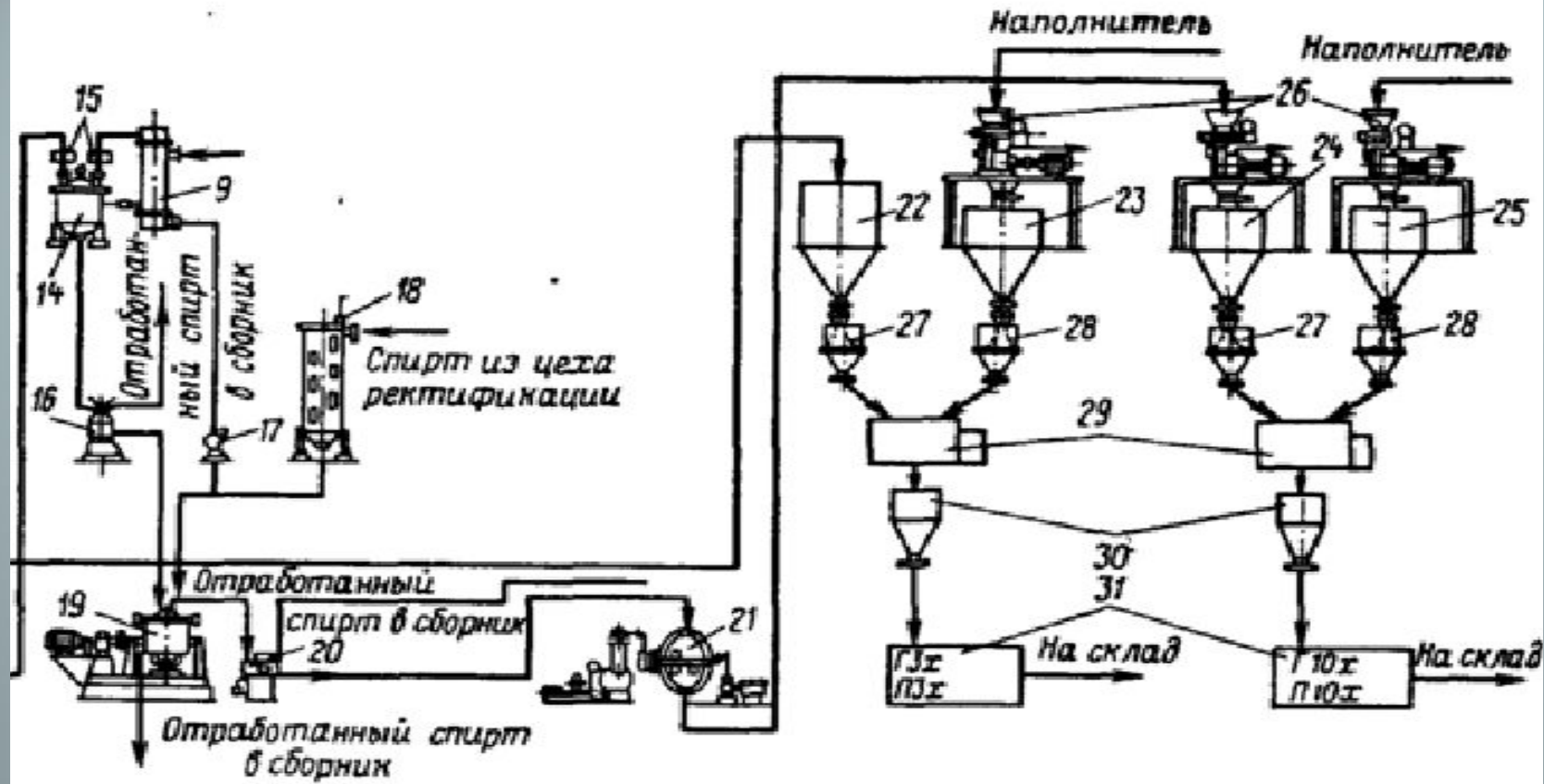
В качестве примера рассмотрим технологическую схему получения препаратов из поверхностной и глубинной культур в виде жидких концентратов, сухих технических препаратов, получаемых сушкой распылением, и препаратов, осажденных органическими растворителями.



# 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.

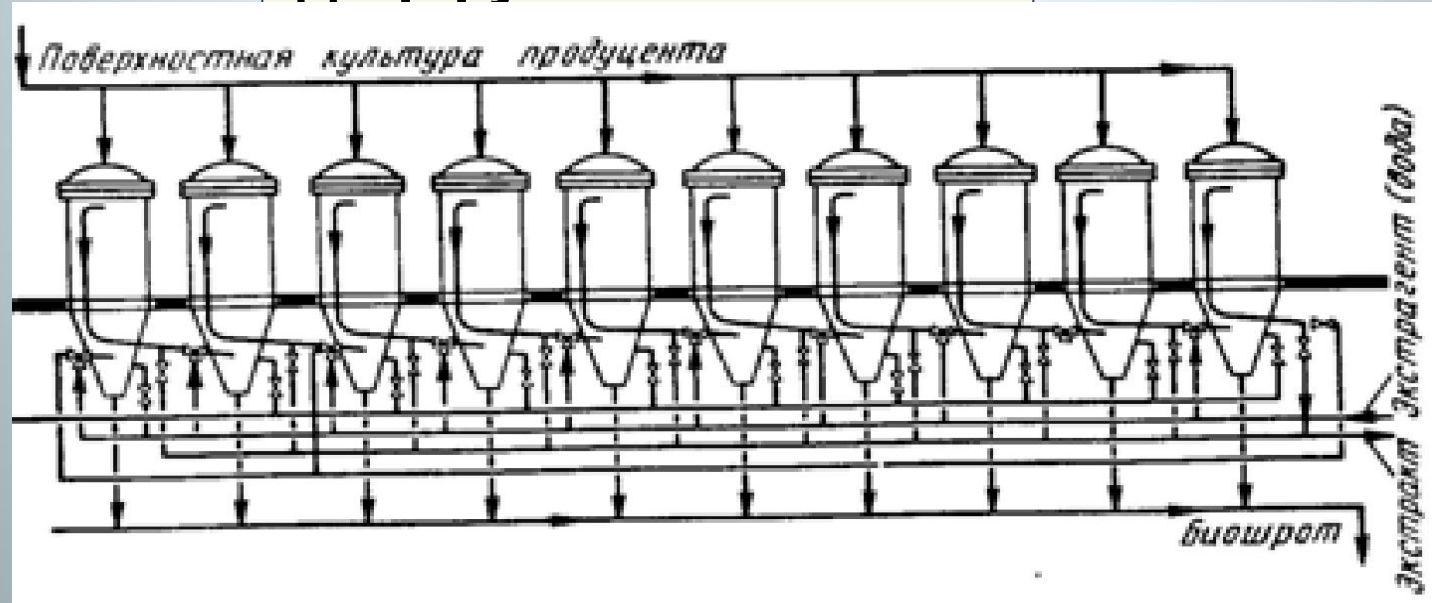
**На полноту экстрагирования ферментов** из культур оказывают влияние многие факторы:

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

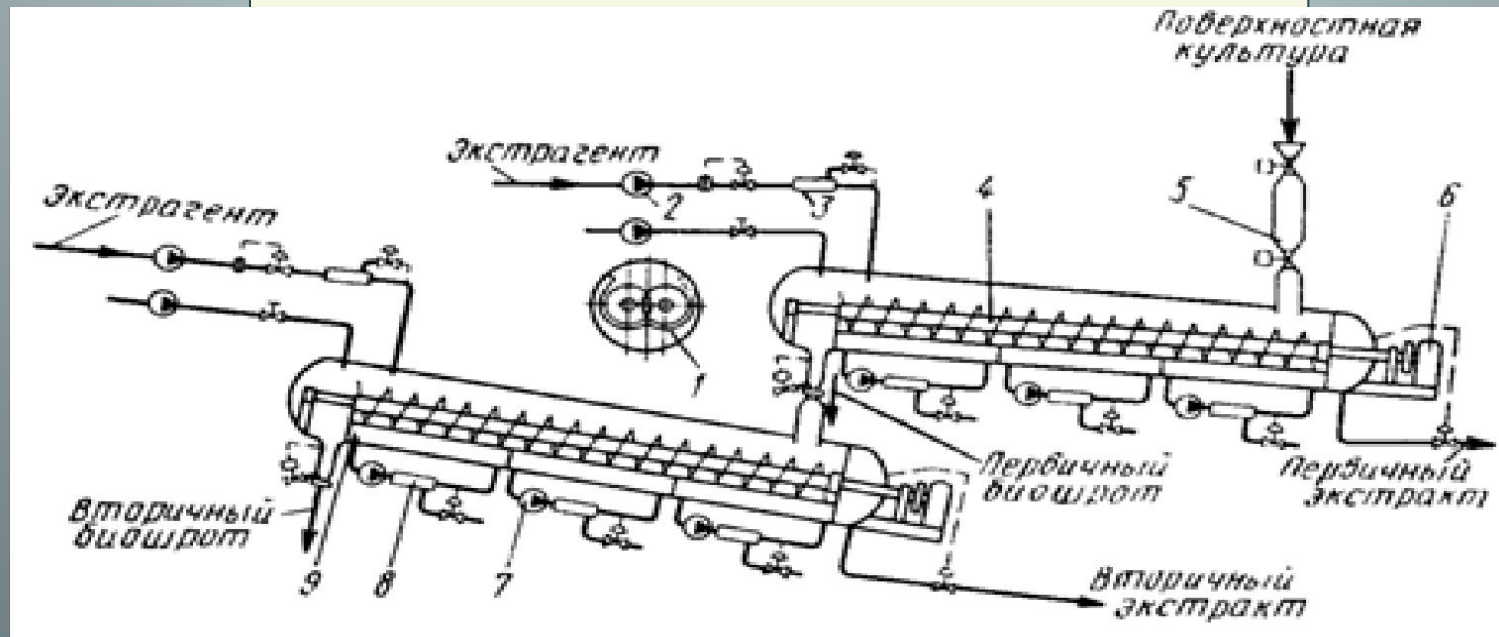
**Для получения концентрированных экстрактов** при небольших потерях ферментов с биошротом необходимо применять **специальные экстракционные установки**. Ранее широко использовались **диффузионные батареи** (в них можно получить экстракт с содержанием сухого вещества от 7 до 14 % в зависимости от вида 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.

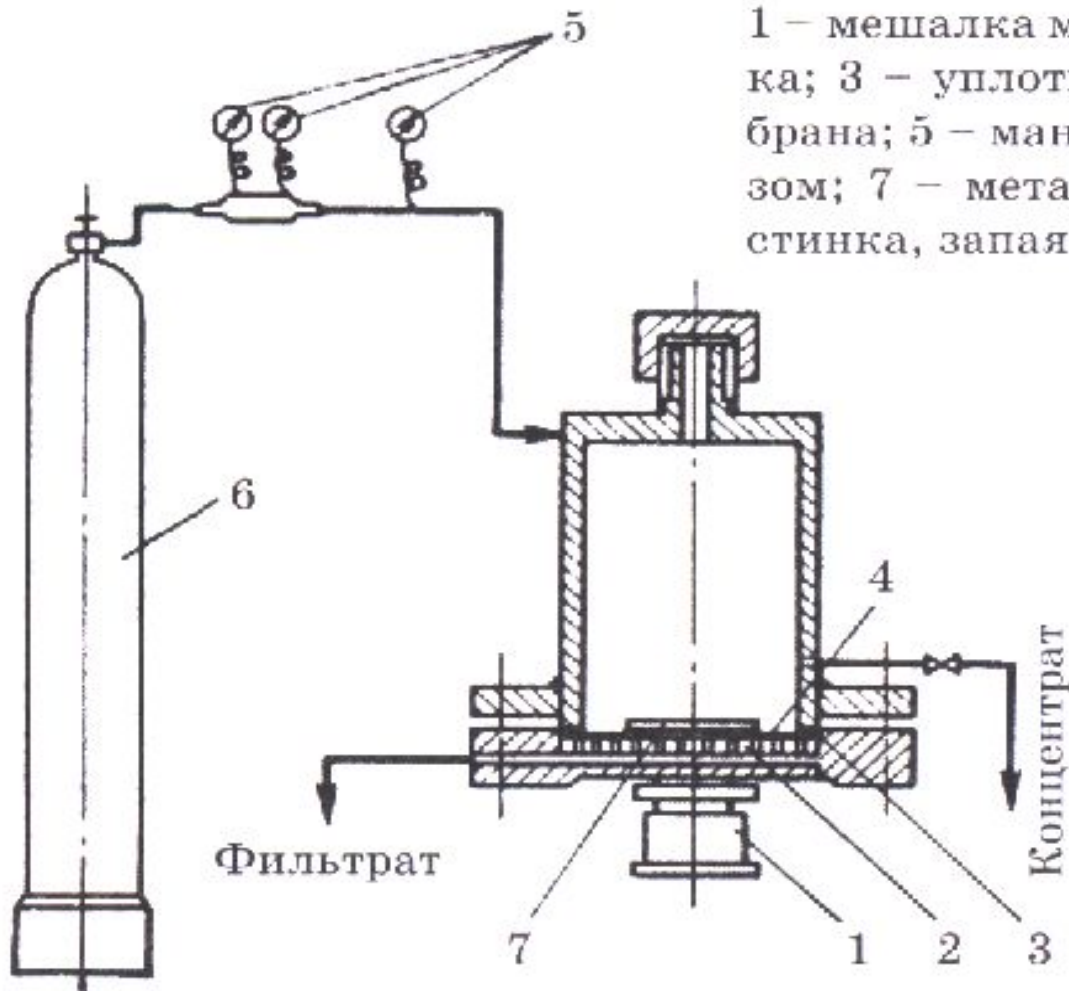
Следует учитывать, что чем чище раствор, чем меньше он содержит сопутствующих веществ, тем ферменты более чувствительны к воздействию высоких температур .



# Концентрирование ферментов

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

## Схема ультрафильтрационной ячейки:



1 – мешалка магнитная; 2 – дренажная прослойка; 3 – уплотнение; 4 – полупроницаемая мембрана; 5 – манометры; 6 – баллон с инертным газом; 7 – металлическая перемешивающая пластинка, запаянная в стекло.

