

**УНИВЕРСИТЕТ ПО ХРАНИТЕЛНИ ТЕХНОЛОГИИ -
ПЛОВДИВ**

**UNIVERSITY OF FOOD TECHNOLOGIES -
PLOVDIV**



**SCIENTIFIC WORKS
Volume LIV, Issue 1
Plovdiv, October 19-20, 2007**

НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНО УЧАСТИЕ

**“ХРАНИТЕЛНА НАУКА, ТЕХНИКА И
ТЕХНОЛОГИИ 2007”**

**‘FOOD SCIENCE, ENGINEERING AND
TECHNOLOGIES 2007’**

НАУЧНИ ТРУДОВЕ

Том LIV, Свитък 1

Пловдив, 19 - 20 октомври 2007



Использование ферментов в пищевых технологиях

Л. В. Капрельянц

Изброява основни етапи на развитие на зymology, представя данни за приложение на ензими в хранителни технологии на времето, и описва съвременни тенденции при проучвания, които разширяват възможностите за приложението на ензимите.

L. V. Kaprelyants

The lists main stages of development of zymology, represents data about application of enzymes in food technologies at the present time, and describes modern trends of investigations widening the possibilities of application of enzymes.

Существование живых организмов обеспечивается обменом веществ - совокупностью биохимических реакций, катализируемых природными веществами белковой природы, называемыми ферментами. Ферменты могут сохранять свою активность и вне организма, что позволяет использовать их в промышленности, медицине, научных исследованиях.

Человечество использует ферменты для приготовления продуктов питания с незапамятных времен. Эмпирическим путем люди выяснили, что существуют некие природные субстраты, которые, при внесении их в тот или иной вид сырья, вызывают в нем желательные изменения. Такими субстратами были соки растений и ткани животных, содержащие ферменты, а также самопроизвольно сбродившие в результате попадания в них микроорганизмов виноградный сок, молоко, тесто.

В девятнадцатом столетии были осуществлены первые работы по получению чистых форм ферментов. В 1897г. Бернард получил чистый препарат лакказы из живицы растений. Бюхнер показал, что спиртовое брожение можно вызвать внесением экстракта дрожжей в отсутствие их клеток. Кунне предложил термин "энзим" (от греческого *enzymos* - связанный с брожением теста).

Началось изучение механизма действия ферментов. Было высказано предположение, о том, что ферменты образуют комплексы с субстратами. Для объяснения пространственного взаимодействия между ферментом и субстратом Э. Фишер предложил модель "ключ к замку".

Наибольший вклад в развитие энзимологии был сделан в 20 столетии. В 1902г. Brown разработал теорию фермент-субстратного комплекса. В 1903г. Henri опубликовал первую математическую модель, описывающую ферментативную кинетику. В 1913 г. Михаэлис и Ментен, основываясь на работах Henri, предложили уравнение, описывающее скорость ферментативных реакций.

Однако вопрос о том, как же ферменты ускоряют химические реакции, оставался не выясненным до возникновения теории переходного состояния. В 1948 Л. Полинг предположил, что каталитическое действие ферментов достигается стабилизацией переходного состояния химических реакций путем взаимодействия с активным центром фермента, что было в дальнейшем подтверждено экспериментально.

В 50-60-х годах 20 столетия был пересмотрен вопрос субстратной специфичности ферментов в свете теории стабилизации переходного состояния активным центром фермента. Согласно гипотезе "индуцированного соответствия" (модель Кошланда) ферментная активность может регулироваться небольшими молекулами, отличными от молекул субстрата или продуктов реакции. Было показано существование

аллостеричных ферментов, разработаны методы регуляции активности ферментов. (Monod, Wyman, Changeun, 1965).

Было установлено, что катализ тесно связан с молекулярными взаимодействиями между молекулами субстрата и компонентами молекул фермента, а природа и последовательность этих взаимодействий определяются механизмом реакции.

Начало изучения структуры ферментов было положено работой Д. Самнера, опубликовавшего в 1926г. результаты исследования процесса кристаллизации фермента уреазы методом рентгеноструктурного анализа. Д. Самнер показал, что кристаллы уреазы состоят из белка, а раствор этих кристаллов обладает ферментативной активностью. Д. Самнером впервые была установлена белковая природа ферментов. За 20 лет, прошедшие после его открытия, были описаны более 130 кристаллических ферментов.

В середине 20 столетия структуру ферментов начали изучать с помощью рентгеновской кристаллографии. В 1957г. Kenddrew с помощью этого метода установил трехмерную структуру миоглобина. В дальнейшем методы рентгеновской кристаллографии и ядерно-магнитного резонанса были использованы для изучения каталитических свойств ферментов и особенностей фермент-субстратных взаимодействий. В конце 20 столетия благодаря использованию достижений биологии появилась возможность открывать и создавать новые ферменты, ранее не существовавшие в природе, а также получать микроорганизмы-продуценты ферментов с необходимыми для человека свойствами. Методы молекулярной биологии позволили идентифицировать ранее неизвестные ферменты, изучать их и модифицировать - изменять аминокислотную последовательность первичной структуры ферментов, а также модифицировать химические группы ферментов, участвующие в образовании фермент-субстратного комплекса.

Благодаря достижениям современной энзимологии значительно расширились возможности применения ферментов в различных областях деятельности человека, и в первую очередь в медицине и пищевой промышленности. В настоящее время ферменты используются практически во всех отраслях пищевой промышленности.

Широкое использование ферментов в пищевой промышленности обусловлено рядом их преимуществ по сравнению с химическими катализаторами. К преимуществам ферментов относятся избирательность и стереоспецифичность их действия, возможность достижения высоких скоростей превращения субстратов при относительно мягких условиях технологий, безвредность ферментов для окружающей среды и человека.

Ферменты не являются чужеродными для организма человека веществами. В пищевых технологиях используются в основном ферменты, присутствующие в пищевом сырье, которые поступают в организм человека при потреблении свежих фруктов и овощей, орехов, молока, сброженных и консервированных продуктов. В пищевых продуктах ферментов содержится мало - миллиграммы на килограмм продукта. При кулинарной и технологической обработке пищевых продуктов ферменты, как правило, инактивируются.

Продолжается поиск новых возможностей использования ферментов в пищевой промышленности. Основными направлениями исследования являются: модификация свойств индивидуальных ферментов с целью повышения их активности и удешевления целевых продуктов; скрининг новых микроорганизмов-продуцентов ферментов; получение новых рекомбинантных ферментов с заданными свойствами; применение ферментативных реакций для получения ценных пищевых ингредиентов и биологически активных веществ; разработка пищевых нанотехнологий с использованием ферментов.

Современные методы модификации ферментов позволяют увеличивать стойкость ферментов к действию различных химических реагентов и ингибиторов, pH, температурному воздействию; изменять pH оптимума ферментов, их субстратную специфичность и связывающие свойства; регулировать предпочтения определенных металлов-кофакторов и каталитические свойства ферментов.

Химическая модификация является наиболее широко и давно применяемым видом модификации ферментов [7]. Методы химической модификации ферментов должны отвечать следующим требованиям: используемые химические реагенты должны быть безвредными (особенно в случаях дальнейшего использования ферментов в пищевых технологиях); условия модификации не должны быть жесткими, приводящими к ухудшению свойств ферментов; модифицированные ферменты должны отделяться от реакционной среды относительно простыми и недорогими способами; применение модифицированных ферментов должно быть экономически выгодным.

Примером химической модификации является модификация ферментов в условиях неполярной (не водной) среды. Происходящее при этом снижение активности воды в реакционной системе существенно изменяет свойства ферментов: реакция сдвигается в сторону синтеза; образуются оптически активные продукты; повышается термостабильность фермента и стабильность при хранении; фермент приобретает способность катализировать новые реакции, не протекающие в водной среде (синтез пептидов, алифатических амидов и др.); ферменты проявляют активность в органических растворителях при температуре выше 100°C.

Данный способ химической модификации использован при модификации таких ферментов как липазы [20], химотрипсин [21], трипсин [18], субтилизин [22], термолизин [9], полифенолоксидазы [8], глюкоамилазы [11], папаин [19], химозин [1].

С помощью физико-химических методов модификации изменяют силы электростатического взаимодействия, водородные связи и гидрофобные взаимодействия в молекулах белков. Например, широко используемый для изомеризации глюкозы в фруктозу фермент ксилоизомераза модифицируется в направлении увеличения его термостабильности, снижения значения pH оптимума, изменения предпочтения активирующего катиона металла, изменения субстратной специфичности от ксилозы к глюкозе [13].

К активно развивающимся областям энзимологии относится разработка биологических методов модификации ферментов. Особенно многообещающим является направление, получившее название "белковая инженерия". Методы белковой инженерии, основанные на знании зависимости между аминокислотной последовательностью, трехмерной структурой и каталитической активностью ферментов, позволяют успешно модифицировать ферменты для улучшения их технологических свойств [12].

Широко используется способ замены определенных аминокислот в структурах молекул ферментов. Показано, что замена в молекуле фосфолипазы A₂ Asn89 на Asp и Glu92 на Lys вблизи N-терминального конца спирали 5 увеличивает стабильность фермента до 1,0 ккал/моль [15], а замена Asp56 на Ser, Ser60 на Gly и Asn67 на Tyr значительно увеличивает активность и сродство фосфолипазы A₂ к фосфолипидным мицеллам [14]. Путем замены аминокислот в структурах молекул ферментов изменяют также их субстратную специфичность [10].

Изменение соотношения активности к растворимому и нерастворимому субстратам у целлобиогидролаз достигается путем замены внешних остатков ароматических аминокислот, которые захватывают конец молекулы полисахарида и направляют ее внутрь активного центра.

Увеличение стабильности ферментов к температуре и экстремальным значениям pH достигается путем таких замен среди сближенных в его третичной структуре аминокислотных остатков, которые приводят к образованию дополнительных не ковалентных гидрофобных связей, солевых мостиков или ковалентных S-S-связей, повышающих общую стабильность глобулы молекулы фермента. Во многих случаях замены осуществляются на основе сопоставления совершенствуемых структур со соответствующими структурами аналогов из экстремофильных родственных организмов (термо-, ацидо- и алкалофильных). Иногда повышение стабильности ферментов

достигается введением в его структуру специального термостабилизирующего модуля, обнаруженного у некоторых бактерий.

Повышение стабильности ферментов к протеолизу осуществляется либо путем удаления сайтов узнавания протеаз из структуры доменов, либо путем увеличения степени гликозилирования через введение в них аминокислот, служащих сайтами O- или N-гликозилирования.

Модификация ферментов осуществляется также с помощью изменения их модульной структуры путем включения или удаления субстратсвязывающего домена. Например, в результате введения в молекулы гликозилтрансфераз целлюлозосвязывающего домена они приобретают способность "сшивать" оборванные концы молекул в аморфных участках на поверхности целлюлозного волокна. Удаление "ненужных" модулей уменьшает массу молекулы, в результате чего повышается эффективность диффузии фермента в субстрат.

Изменение характера действия и субстратной специфичности ферментов достигается, например, делецией петель, перекрывающих активный центр экзогидролаз, что превращает их в родственные эндогидролазы. [26].

Одним из видов биологической модификации является эзиматическая модификация ферментов. Ферменты используют для модификации протеинов уже более 20 лет. В пищевых технологиях ферменты используются для регулирования функционально-технологических и нутритивных свойств белков [23,24], а также для регулирования функционально-физиологических свойств пищевых белков [25].

В 90-х годах XX столетия ферменты начали использовать также для модификации других ферментов. Сложность осуществления таких реакций обусловлена стерическими факторами, затрудняющими взаимодействие молекул ферментов. Одним из немногочисленных примеров подобной модификации является модификация фосфолипазы A₂ тканевой транслутаминазой [4].

Все более широко используются в качестве продуцентов ферментов генетически измененные микроорганизмы. Модификация их генома производится с целью увеличения гиперпродукции продуцируемых этими микроорганизмами ферментов или создания возможности синтеза нехарактерных для данного микроорганизма ферментов.

С целью увеличения гиперпродукции ферментов микроорганизмы подвергают воздействию различных мутагенов (ультрафиолетовых и рентгеновских лучей, химических агентов), вызывающих как гибельную мутацию у большей части микробной популяции, так и мутации, способствующие увеличению продукции ферментов. Для каждого мутагена и микроорганизмы подбирают условия мутагенной обработки, позволяющие увеличить количество выживших мутировавших клеток. Оставшиеся жизнеспособными микробные клетки подвергают скринингу по геномным вариантам, отбирая наиболее активных продуцентов определенных ферментов.

Данный метод, называемый методом классической мутации, впервые был описан в конце 30-х годов XX века и активно использовался в период с 1950 по 1970 годы. Ему на смену пришли методы модификации генома микроорганизмов, основанные на достижениях генной инженерии. В частности рекомбинантная ДНК технология, позволяющая внедрять в геном микроорганизма гены, ответственные за синтез необходимых ферментов.

В настоящее время налажено промышленное производство микроорганизмов-продуцентов рекомбинантных ферментов. Например, ген, ответственный за выработку фермента химозина, выделенный из эукариотического организма, внедряют в геном микроорганизмов - *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactic ulu* *Aspergillus awamori*, которые становятся продуцентами данного фермента [5]. Бактерии *Bacillus subtilis* используют как продуценты рекомбинантного фермента ацетолактатдекарбоксилазы [2]. Использование микроорганизмов-продуцентов рекомбинантных ферментов имеет ряд преимуществ.

Один и тот же микроорганизм может использоваться как продуцент различных ферментных препаратов, что унифицирует технологию их получения. Выход ферментов значительно увеличивается, например выход глюкоамилазы и эндоксиланазы, продуцируемых рекомбинантными штаммами *Aspergillus*, превышает выход этих ферментов из традиционных штаммов в 10-30. Рекомбинантные ферменты отличаются высокой чистотой, что имеет особое значение в пищевых технологиях. Например, использование свободных от протеазной активности амилаз в хлебопечении позволяет улучшить реологические свойства теста, поскольку не происходит разрушения структуры белков клейковины. Рекомбинантные ферменты широко применяются в пищевых технологиях. Однако в то время как в непищевых отраслях промышленности рекомбинантные ферменты применяются без ограничений, пищевые продукты, полученные с использованием рекомбинантных ферментов, должны быть соответственно маркированы для предупреждения потребителя об их использовании.

Помимо использования различных природных источников ферментов, ферменты могут быть получены путем их искусственного синтеза. Перспективным является синтез ферментов, не имеющих полипептидных структур, но содержащих аналоги активных центров существующих ферментов. Созданы ферменты, содержащие синтетические полимеры циклодекстринов и металлопроизводных стероидов, являющиеся матриксом, в котором дополнительные реакционные группы ориентированы как активные центры ферментов [6].

Циклодекстрины широко используются для создания синтетических ферментов, поскольку способны к гидрофобному связыванию в центральной полости активных соединений. На основе β -циклодекстрина получены различные синтетические гидролитические ферменты [6], ферменты с химотрипсиновой [16], трансамилазной и рибонуклеазной активностью [25]. Синтетический химотрипсин был получен путем включения в молекулу β -циклодекстрина каталитических групп -имидозолилбензойной кислоты или других имидазольных соединений.

Поскольку синтетические ферменты не содержат аминокислотных остатков, они менее подвержены действию таких факторов как температура, pH, ионная сила, чем природные ферменты, для конформационной стабильности и биологических функций которых данные факторы являются лимитирующими [17]. Эти свойства синтетических ферментов расширяют возможности ферментативных технологий, в том числе и в пищевой промышленности.

Список литературы

1. Aldel Malak C. A. Calf cytosine as a catalyst of peptide synthesis // Biochem. J. -1992.- Vol.288.- P.941-943.
2. Alder-Nissen J. Newer uses of microbial enzymes in food processing // TIB-TECH.-1987.- Vol.5.-P. 170-174.
3. Breslow R., Canary J. W., Varney M., Waddell S. T., Yang D. Artificial transaminases linking pyridoxamine to binding cavities: Controlling the geometry.- J. Am. Chem. Soc.-1990.-Vol. 112. P. 5212-5219.
4. Cordella-Miele E., Miele L., Beninati S., Mukherjee A. B. Transglutaminase-catalyzed incorporation of polyamines into phospholipase A₂ // J. Biochem.-1993.- Vol.113.-P.164-173.
5. Dornenburg H., Lang-Hinrichs C. Genetic engineering in food biotechnology // Chem&Industry.-1994.-Vol.13.-P.506-510.
6. Dugas H. Bioorganic Chemistry. A Chemical Approach to Enzyme Action. -2nd ed.- New York: Springer-Verlag,1989.
7. Feeney R. E., Whitaker J. R. Modification of Proteins: Food, Nutritional and Pharmaceutical Aspects // Adv. Chem. Ser. 198.- Washington D. C: American Chemical Society, 1982.

8. Kazandjian R.Z., Klivanov A. M. Regioselective oxidation of phenols catalized by polyphenol oxidase in chloroform // J. Am. Chem. Soc.-1985.- Vol. 107.-P. 5448-5450.
9. Kitaguchi H., Klivanov A. M. Enzymatic peptide synthesis via segment condensation in the presence of water mimics // J. Am. Chem. Soc.- 1989.- Vol. 111.-P. 9272-9273.
10. Kumagai I., Sudana F., Takeda S., Miura K.I. Redesign of the substrate-binding site of hen egg white lysozyme based on the molecular evolution of C-type lysozyme//J. Biol.Chem.- 1992.-Vol.267.-P 249-254.
11. Laroute V., Willemot R. M. Glucose condensation by glucoamilase in organic solvents // Biotechnology Letters.-1989.-Vol.11.-P.249-254.
12. Law B. A. Manipulation of enzymes for industrial application: Protein and environmental engineering // Industrial Enzymology.- 2nd edn.-Basingstoke: Macmillan Press and New York: Stockton Press, 1996.-P. 385-393.
13. Mrabet N. T., Van den Broeck A., Van den Brande I. et al. Arginine residues as stabilizing elements in proteins // Biochemistry- 1992.-Vol. 31.-P.2239-2253.
14. Noel J. P., Bingman C. A., Deng T., Dupureur C. M. et al. Phospholipase A₂ engineering. X-ray structural and functional evidence for the interaction of lysine-56 with substrates//Biochemistry.-1991.-Vol.30.-P. 11801-11811.
15. Pickersgill R. W., Summer I. G., Collins M. E. et al. Modification of the stability of phospholipase A₂ by Charge engineering // FEBS Lett.-1991.- Vol.281.-P.219-222.
16. Rao K. R., Srinivasan T. N., Bhanumathi N., Sattur P. B. Artificial enzymes: Synthesis of imidazole substituted at C(2) of β -cyclodextrin as an efficient enzyme model of chymotrypsin. J. Chem. Soc. Chem. Comm. -1990.- P.10-11.
17. Robertson D. E., Farid R. S., Moser C. C et al. Design and synthesis of multi-haem proteins.- Nature.-1994.- Vol. 368.- P. 425-432.
18. Sakural T., Margolin A. L., Russel A.J., Klivanov A. M. Control of enzyme enantioselectivity by the reaction medium // J. Am. Chem. Soc.-1988.-Vol 110.- P. 7236-7237.
19. Stehle P., Bahssita H. P., Monter B., Furst P. Papain-catalyzed synthesis of dipeptides: A novel approach using free amino acids as nucleophiles // Enzyme Microb. Technol.-1990.- Vol.12.-P. 56-60.
20. Wong C. H., Chen S. T., Pederson R. L. et al. Enzymatic catalysis in organic synthesis // Meth. Enzymol.-1991.-Vol. 202.-P. 591-620.
21. Zaks A., Klivanov A. M. Substrate specificity of enzymes in organic solvents // J. Am. Chem. Soc.-1986.- Vol. 108.-P. 2767-2768.
22. Zhong Z., Liu J. L.C., Dinterman L. M. et al. Engineering subtilisin for reaction in dimethylformamide// J. Am. Chem. Soc.-1991.-Vol. 113.-P. 683-684.
23. Капрельянц Л. В., Міський О. М. Ензиматична модифікація соєвого борошна // Наукові праці ОДАХТ.- 2003.-Вип. 26.-С. 123-127.
24. Капрельянц Л. В., Міський О. М. Регулювання функціональних властивостей соєпродуктів шляхом ідукованого автолізу // Наукові праці ОДАХТ.- 2002.-Вип. 25.-С. 106-109.
25. Капрельянц Л. В., Іорачова К. Г. Функціональні продукти.-Одеса: Друк, 2003.-С. 162-189.
26. Рабинович М. Л., Мельник М. С, Болобова А. В. Целлюлазы микроорганизмов // Прикл. биохим. и молек. биол.- 2002.-№ 4.-С.355-373.

Л.В. Капрельянц, доктор технических наук, профессор,
 заслуженный деятель науки и техники Украины.
 зав. Кафедрой биохимии микробиологии и физиологии питания
 Одесской национальной академии пищевых технологий
 E-mail: Kaprelyants@paco.net