

**Лекция на тему:**  
**«Особенности новейших технологий  
производства ферментных  
препаратов: амилаз, протеаз, липаз,  
лактаз, глюкоксидаз»**  
**2 часть**

# Липазы

- Липолитические ферменты принимают участие в процессах накопления и мобилизации жира, в функционировании биологических мембран.
- Липазы – гидролазы эфиров жирных кислот с длинной цепью, то есть насыщенные или ненасыщенные алифатические кислоты, содержащие не менее 12 атомов углерода.
- Классификация ферментов липолитического комплекса (Международный биохимический союз):
  - Гидролазы эфиров глицерина – собственно «липазы» или ацилгидролазы высших триглицеридов.
  - Холестерол-эстераза гидролаза стироловых эфиров.
  - Фосфолипаза-2-фосфатид-2-ацилгидролаза (лецитиназа или фосфолипаза А).
  - Лизофосфолипазы лизолецитин-ацилгидролаза.
  - Фосфогидролаза.

# Липазы

## *Субстратная специфичность липазы:*

- Позиционная специфичность, то есть способность гидролизовать в триглицеридах только первичные или первичные и вторичные эфирные связи.
- Стереоспецифичность, то есть способность гидролизовать сложноэфирную связь только в положениях 1 или 3 триглицерида.
- Склонность к гидролизу сложноэфирных связей, образованных жирными кислотами с более длинной или короткой цепью, насыщенными или ненасыщенными, и в целом зависимость скорости реакции от структуры субстрата.

# Липазы

## *Применение ферментов липолитического комплекса:*

*Микробная липаза в комплексе с амилазой используется как ЛП, стимулирующий пищеварение.*

*Препараты из культуральной жидкости *Aspergillus oryzae*, явл-ся комплексами с протеазой и амилазой, используются в фармацевтической и косметической промышленности.*

*Липаза содержится во многих синтетических моющих средствах как активная биологическая примесь.*

*Липаза *A. awamori* используется для обжиривания и очистки гризеофульвина, полученного после культивирования *P. nigricans*.*

# Липазы

## Получение

Могут быть получены из животных тканей, семян некоторых растений и микроорганизмов. Источником животной липазы является поджелудочная железа.

Продуценты: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinobacter*, *Propionibacterium*, *Chromobacterium*, *Alcaligenes*, *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Oospora*, *Aspergillus*, *Streptomyces*.

Бактерии накапливают внутриклеточную липазу, актиномицеты, грибы и дрожжи – преимущественно внеклеточную.

Источники углерода: крахмал, декстрины, моно- или олигосахариды. В состав питательных сред вводят компоненты липидной природы (соевую муку), поскольку липазы являются индуцибельными ферментами.

# Липазы

## Получение

Препараты липаз получают и очищают из фильтратов культуральной жидкости.

Биомассу продуцента и твердые примеси удаляют центрифугированием или фильтрованием. Жидкая фаза стабилизируется добавлением солей и концентрируется ультрафильтрацией или вакуум-выпариванием.

Полученный концентрат может быть высушен для производства препаратов липазы.

Дальнейшая очистка предполагает их осаждение органическими растворителями или неорганическими солями. Однако липазы чувствительны к влиянию органических растворителей, под их влиянием часто наблюдается частичная денатурация белка, которая приводит к нарушению структуры активного центра и потери активности. Поэтому чаще используют высаливание сульфатом аммония.

Для получения высокоочищенных препаратов липазы используются все методы хроматографии, электрофорез, гель-фильтрация, изофокусирование.

# Лактаза ( $\beta$ -галактозидаза)

Дефицит лактазы в организме человека приводит к невозможности использования в рационе молока и молочных продуктов.

Препараты, содержащие лактазу:

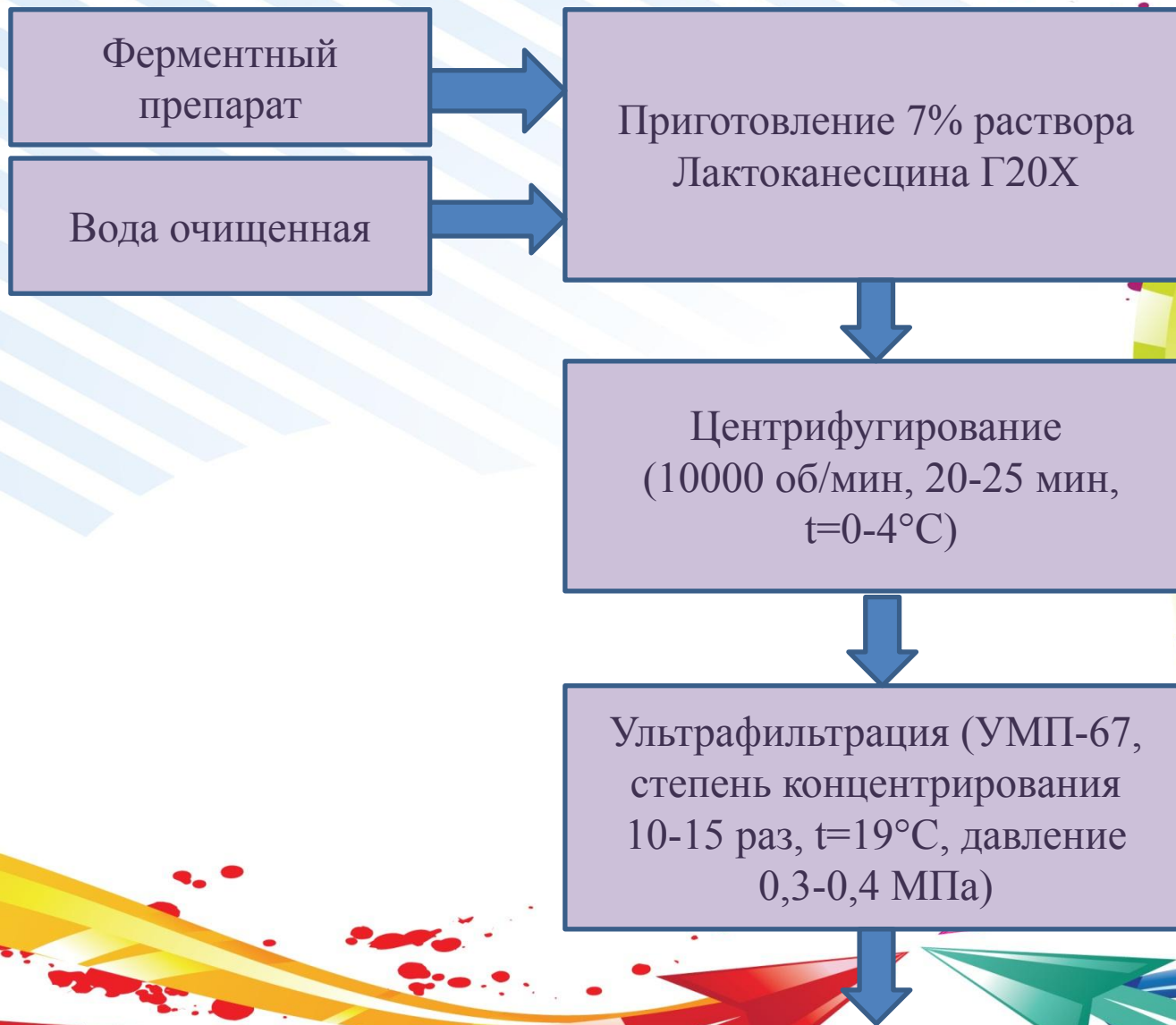
*Lact-Aid* (США) – дрожжевая лактаза из *Kluyveromyces lactis*,  
*Lactrasa/ Lactrasa-N* (США) – грибная лактаза из *Aspergillus oryzae* и *Aspergillus niger* соответственно.

Продуценты: *Kluyveromyces fragilis*, *Curvularia inaequalis*,  
*Alternaria tenuis*.

Лактаза – индуцибельный фермент.

Основной источник углерода – лактоза (2-20 %) – отходы молочной промышленности. Источник азота – соли аммония.

# Схема производства Галактозима





# Схема производства Галактозима



# Схема производства Галактозима



# Глюкозооксидаза

*Принадлежит к классу оксидоредуктаз.*

*Субстратом этого фермента является глюкоза, преобразование ее в глюконовую кислоту с образованием перекиси водорода. На этом основывается применение глюкозооксидазы как антисептического средства.*

*«Микроцид» - прозрачная стерильная жидкость со слабым зеленовато-желтым оттенком, рН 3,0-4,5. Содержит не менее как 40 ед/мл. Действует на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы. Применяют для лечения инфицированных ран, язв, ожогов.*

*Используется как реактив для определения микродоз глюкозы.*

# Глюкозооксидаза

## *Получение препарата «Микроцид»*

Культуральная  
жидкость *P.vitale*

Адсорбция фермента при pH 7,0 на  
безводный оксид алюминия (1-2 час)

Элюирование фермента аммонийным  
буфером

Отделение элюата при помощи лейки

Повторное элюирование тем же  
раствором, разведенным вдвое

# Глюкозооксидаза

## *Получение препарата «Микроцид»*



# Глюкозооксидаза

## Технологические особенности получения

Используют поверхностный и глубинный способы культивирования. Продуценты: *Penicillium vitale* Pidoplitschko et Bilaj из класса *Ascomycetes* семейства *Aspergillaceae* рода *Penicillium*.

В процессе культивирования в зависимости от соотношения в среде количества глюкозы и нитрата калия, образуется либо глюкозооксидаза или каталаза. При большом содержании глюкозы и низком – нитрата калия в среде синтезируется глюкозооксидаза. Но при любом соотношении этих двух компонентов всегда образуется 2 фермента: и каталаза, и глюкозооксидаза.

Для получения очищенного препарата используют сорбцию на оксиде алюминия. Сорбированный фермент вынимается и проводится десорбция.

Дальнейшее выделение осуществляется с использованием органических растворителей. Осаждают фермент ацетоном при низких температурах и используют центрифугирование для удаления осадка.

Этот метод дает возможность получить препарат исключительной специфичности без примесей каталазы.

Для медицинских целей получают кристаллические препараты этого фермента.

# Глюкозооксидаза

## Технологические особенности получения кристаллических препаратов

Можно получить из водных растворов очищенной глюкозооксидазы с помощью сернокислого аммония с добавлением его к конечной концентрации в растворе 52-55% насыщения.

Для этого к 2,5-3,0% водного раствора глюкозооксидазы медленно добавляют, перемешивая, тонко растертый порошок сернокислого аммония до указанного насыщения. С достижением такого насыщения образуется небольшая стойкая муть.

Кристаллизация происходит легче при комнатной температуре, чем во время охлаждения, через 3-5 час после насыщения сульфатом аммония.

# Глюкозооксидаза

## Технологические особенности получения кристаллических препаратов

Кристаллы в виде тонких иголок. С целью перекристаллизации через 2-3 дня кристаллы отделяют от маточного раствора центрифугированием (10 мин, 7000-8000 об/мин), растворяют в воде. Раствор центрифугируют и фильтруют для выделения нерастворимых фракций и снова добавляют сульфат аммония до появления стойкой мути.

Вторая кристаллизация через 10 мин после доведения насыщения раствора белка сульфатом аммония до определенной концентрации. Третья (перекристаллизация) осуществляется как вторая.

Препараты глюкозооксидазы очень специфичны, оптимальное рН – 5,6, достаточно устойчивы, температура действия - 55°C.