

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

1 часть



Амилазы

- Амилолитические ферменты гидролизуют крахмал и другие полисахариды, состоящие из амилозы и амилопектина, мономерные глюкозные единицы которых соединены α -1,4- и α -1,6-гликозидными связями.
- Могут быть получены из растительного, животного сырья, бактерий, реже грибов и дрожжей.
- Подразделяются на экзо- и эндогидролазы. α -амилазы относятся к эндогидролазам, поскольку неупорядоченно гидролизуют гликозидные связи с образованием линейных и разветвленных олигосахаридов. Продукцент – бактерии рода *Bacillus*
- Остальные ферменты – экзодействующие, то есть они атакуют субстрат с нередуцированного конца с образованием моно- и олигосахаридов.
- β -амилазы распространены в основном у высших растений. Продукцент – представители рода *Clostridium*.



Амилазы

- К амилолитическим ферментам в целом принадлежат 85 ферментов, которые гидролизуют гликозидные связи как в полисахаридах, так и в гликоконъюгатах.
- Существуют полюланазы и изоамилазы, которые способны расщеплять α -D-1,6-гликозидные связи. У микроорганизмов эти ферменты внеклеточные, они выделяются в среду мезофильными бактериями семейств *Vacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* и термофильными бактериями семейств *Thermococcus*, *Pirococcus*.
- Применение: при производстве сахара и спирта, в обработке сточных вод, пивоварении и виноделии, при производстве детергентов для моющих средств, для получения мальтозных сиропов (для шоколада), при изготовлении бумаги и тканей (расшлифовка волокон).



Получение амилолитических ферментов поверхностным методом

Пшеничные отруби,
солодовые ростки

0,1 н раствор HCl

Приготовление
питательной среды

Культура *A. oryzae*

Выращивание посевного
материала в виде
мицелия на
сыпучей питательной
среде

Выращивание
культуры-продуцента
в кюветах

Культура
с влажностью
36-50%



Получение амилолитических ферментов поверхностным методом

Выращивание культуры-продуцента

Амилоризин Пх

Вода

Экстрагирование амилолитических ферментов

Раствор CaCl_2

Концентрирование экстракта из поверхностной культуры

Этиловый спирт до концентрации 69-72%

Осаждение амилаз

Высушивание осадка

Амилоризин Пх



Технология получения амилолических ферментов поверхностным способом

- В случае использования поверхностного культивирования продуцентами могут быть: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*
- Питательная среда: пшеничные отруби с солодовыми ростками, смоченные 0,1 н раствором серной или соляной кислоты.
- Культивирование осуществляется при 36-37 °С, влажность готовой культуры – 36-50%.
- Процесс очистки начинается с экстрагирования фермента водой при температуре 20-25 °С. Для уменьшения обсеменения микроорганизмами экстракт обрабатывают растворами электролитов.
- Ферменты из экстракта осаждают органическими растворителями: этанолом (концентрация в растворе 69-72 %), ацетоном (60-62 %), изопропанолом (54-55 %). При этом амилазы выпадают в осадок практически полностью (93-96 %). Далее все эти препараты являются исходным материалом для получения кристаллической глюкоамилазы.



Технология получения кристаллической α -амилазы

- Препарат со степенью очистки 3х растворяют в воде очищенной.
- Суспензию после растворения оставляют при температуре 3-5 °С на несколько минут и центрифугируют.
- Полученный раствор направляют на стадию освобождения от посторонних ферментов. Используют оксалаты, фосфаты, сульфат кальция, бария, ацетат свинца. Образованный окрашенный осадок удаляют, а осветленный раствор поступает на стадию осаждения целевого фермента сульфатом аммония.
- α -амилаза – металлоэнзим, который хорошо стабилизируется ионами кальция. Перед стабилизацией в раствор добавляют 0,25 н ацетат кальция и 0,25н раствор NaOH для доведения рН до 7. Добавление сульфата аммония происходит постепенно для предупреждения резкого локального повышения концентрации соли.
- Образуется рыхлый осадок, содержащий в основном целевой фермент. Для освобождения от соли осадок растворяют, осуществляют диализ или ультрафильтрацию.



Технология получения кристаллической α -амилазы

- Фракционирование риванолом (соль молочной кислоты) осуществляют двумя этапами:
 - Вносят 50% расчетного количества риванола. Выпадает темно-зеленый осадок (балластные вещества), который удаляют.
 - К оставшемуся веществу добавляют остальные 50% риванола – выпадает желтый осадок α -амилазы.
- Осадок растворяют в ацетатном буфере и раствор поступает на следующую стадию.
- Сорбция на бентоните (сорбируются примеси). После этого раствор, содержащий фермент поступает на стадию осаждения ацетоном.
- Охлажденный ацетон (-2°C) добавляют в количестве 1:1,3. Выпадает осадок фермента, который отделяют центрифугированием.
- Добавляют раствор ацетата кальция для стабилизации раствора, та ацетон (температура -10°C). С добавлением 20-30 % ацетона образуется легкий осадок. Процесс прекращают и оставляют на 2-3 суток. Постепенно образуются кристаллы α -амилазы разной формы. Более 80% активности в растворе теряется.



ПРОТЕАЗЫ

- Субстратами для протеолитических ферментов являются пептиды и белки (протеины и протеиды).
- Все протеазы делятся на 2 группы: КФ 3.4.11-15 – пептидазы и КФ 3.4.21-24 – протеиназы.
- Использование. Наибольшая необходимость в использовании в составе синтетических моющих средств. Медицина: лекарственные препараты для регулирования процессов свертываемости крови, восполнение недостатка ферментов.
- Источники получения – животные ткани (поджелудочная железа, слизистая желудка), растения (плоды дынного дерева, листья инжира, отходы переработки ананасов) и микроорганизмы (бактерии, микроскопические грибы, актиномицеты).



ПРОТЕАЗЫ

Ацидин-пепсин

Таблетки, содержащие пепсин:ацидин (бетаин гидрохлорид)=1:4.
Назначают для лечения гипо- и анацидных гастритов

Вобензим

Комбинированный препарат: панкреатин, папин, бромелаин (из ананаса) и рутозид (группа вит. Р). Используется для лечения панкреатина, язвенного колита, аутоиммунных заболеваний, т.д.

Дигестал

Содержит панкреатин, экстракт желчи КРС и гемицеллюлазу.

Мезим-форте

Дражке с кишечнорастворимым покрытием. Для лечения кратковременных и незначительных дисфункций поджелудочной железы

Ораза

Кислотостойкий комплекс протеолитических и амилолитических ферментов (из культуры гриба *Aspergillus oryzae*): амилаза, мальтаза, протеаза, липаза. Гранулы.

ТЕХНОЛОГИЯ

- Микроорганизмы – главные источники протеолитических ферментов.
- В промышленности чаще получают комплекс протеолитических ферментов, преимущества которого определяются с учетом дальнейшего применения.
- Суммарная протеолитическая активность определяется на соответствующем субстрате: гемоглобине, желатине, растительном белке, эластине, коллагене и т.д.
- Технологические схемы отличаются, в первую очередь, первой стадией получения микробной культуры продуцента.
- Существуют поверхностный и глубинный способы культивирования продуцента.



ТЕХНОЛОГИЯ

поверхностный способ культивирования

- Продуценты - *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terricola*.
- Питательная среда – увлажненные до 56-65 % пшеничные отруби + белковый отстой, солодовые ростки, соевая мука и т.д. рН среды 5,6-6,2. Для улучшения условий аэрации культуры целесообразно вносить до 10-20 % опилок.
- Готовая культура или высушивается (получают препарат Пх), или поступает для дальнейшей очистки. Водный экстракт может быть сконцентрирован (препарат П2х) или использован для осаждения ферментов.
- В случае осаждения этанолом выход препарата от исходной культуры составляет 5 % с переходом в осадок до 70-73 % фермента, изопропиловым спиртом – 2,2-2,5 % с переходом в осадок до 85-90 % протеиназ.



ТЕХНОЛОГИЯ

глубинный способ культивирования

- Продуценты - в основном род *Bacillus*: *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*. Препараты – протосубтилин и протомезентерин.
- Протеолитические ферменты в основном внеклеточные.
- Питательная среда – состав подбирают индивидуально, исходя из физиологических потребностей культуры. Содержание сухого вещества в питательной среде изменяется от 6 до 20 %.
- На основе культуральной жидкости, содержащей внеклеточные протеиназы, можно получить ферментные препараты разной степени очистки, используя от высушивания распыления и до получения высокоочищенных ферментных препаратов и кристаллических протеиназ.



ТЕХНОЛОГИЯ

получения кристаллических протеиназ

Культуральная
жидкость *Bacillus*
subtilis

Раствор CaCl_2

Очистка культуральной
жидкости хлористым
кальцием (на 1 м³
культуральной
жидкости 65 л 2 М раствора CaCl_2
рН 5,9-6,1 30 хв 15 °С)

Фильтрация для отделения
твёрдой фракции

Твёрдые отходы

Концентрирование раствора
ультрафильтрацией (до 1/20
начального объема 15 °С)

Хроматография на ДЕАЕ-
целлюлозе
(30 мг белка на 1 г целлюлозы)

Пигменты



ТЕХНОЛОГИЯ

получения кристаллических протеиназ

Раствор CaCl_2

Хроматография на
КМ-целлюлозе

Ацетон

Кристаллизация

Центрифугирование

Растворение
кристаллов в растворе
ацетата кальция и
высушивание
методом лиофилизации



ТЕХНОЛОГИЯ

получения кристаллических протеиназ

- Ультрафильтрация. Экспериментально установлено, что лучше использовать мембраны с порами размером $54 \cdot 10^{-10}$ м, на которых с изменением давления от 0,2 до 0,4 Мпа скорость ультрафильтрации увеличивается с 13 до 21 мл/час. Оптимальное рН 7,3 – выход фермента при этом 98 %. Потери фермента при 10-12 °С минимальны.
- Эффективным для очистки ферментов является объединение сорбции на ДЕАЕ- и КМ-целлюлозе. Прочность адсорбции каждого белка на ионообменнике определяется величиной заряда белка, который зависит от рН и его солевой концентрации. Во время элюирования разрываются связи (за счет изменения рН, и повышения его ионной силы (увеличением концентрации буфера или добавлением нейтральных солей)).



ТЕХНОЛОГИЯ

получения кристаллических протеиназ

- Протеолитический комплекс ферментов *B. Subtilis* не сорбируется на ДЕАЕ-целлюлозе и выходит из колонки с фронтом буфера. Выход протеаз составляет 90-100 %. Эта операция дает возможность полностью удалить пигменты. Лучшие результаты получают при использовании 0,002 М фосфатного буфера с рН 7,0-7,5.
- Хроматография на колонке с КМ-целлюлозой. Колонка предварительно уравновешена 0,01 М раствором ацетата кальция, который характеризуется сильной буферизацией и имеет стабилизированное влияние на протеазы. С фронтом буфера выходят остаточные пигменты. Элюацию осуществляют тем самым буфером с хлоридом натрия. При концентрации NaCl 0,25-0,3 М элюируются нейтральные протеазы, при 0,4-0,45 М – щелочная протеаза. Хроматография осуществляется на колонке с КМ-целлюлозой 27x250 мм, скорость потока – 30 мл/час.



ТЕХНОЛОГИЯ

получения кристаллических протеиназ

- Для получения кристаллов протеазы к элюату добавляют ацетон осторожным анслаиванием. Процесс прекращают, если добавление новой порции ацетона не приводит к помутнению на границе раздела фаз.
- Полученные кристаллы отделяют центрифугированием, суспендируют в малом объеме 0,01 М раствора ацетата кальция и лиофилизируют. Выход по активности нейтральной протеазы – не меньше чем 30 %, щелочной – 40%.

