



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 032 743** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 9/04// (C 12 N 9/04, C 12 R 1:72)**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 4880040/13, 05.11.1990

(46) Опубликовано: 10.04.1995

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: 1. M.Giuseppin, H.Eijk, C.Verduyn "Production of catalase - free alcohol by *Hansenula polymorpha*" Appl.Microbiol. Biotechnol., 1988. v.28, p.14-19.2. C.Verduyn, j.P.van Dijken, A.Scheffers "Colorimetric alcohol assays with alcohol oxidase." j.Microbiol.Methods, 1984, v.2, p.15-25.

(71) Заявитель(и):

Арцукевич Ирина Михайловна[BY],
Черникович Иван Петрович[BY],
Островский Юрий Михайлович[BY]

(72) Автор(ы):

Арцукевич Ирина Михайловна[BY],
Черникович Иван Петрович[BY],
Островский Юрий Михайлович[BY]

(73) Патентообладатель(ли):

Арцукевич Ирина Михайловна (BY)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ

(57) Реферат:

Использование: биотехнология и может быть использовано в микробиологической промышленности для получения алкогольоксидазы /АО/, применяемой при ферментативном определении концентрации алкоголя в крови и других биологических жидкостях человека и животных. Сущность изобретения: способ включает культивирование дрожжей - продуцента АО на минеральной среде. Собранные клетки из выращенной биомассы суспендируют, суспензию дезинтегрируют, клеточный гомогенат центрифугируют, а надосадочную жидкость, включающую АО и каталазу, очищают. Для этого бесклеточный центрифугат собирают на ДЭАЭ-

Тойоперл 650 М, уравновешеном 0,01 - 0,04 М трис-НCl буфером в присутствии 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотейтола при pH 7,6 - 8,2, с последующей элюцией белка линейным градиентом NaCl 0,1 - 0,5 М в 0,01 - 0,04 М трис-НCl буфере, pH 7,6 - 8,2 с 0,1 мМ ЭДТА и 0,01 мМ дитиотрейтолом, со скоростью 8 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. На данной стадии очистки получают ферментный препарат АО, полностью свободный от примеси каталазы. Метод сульфоаммонийного фракционирования осуществляют стабилизацию АО. Выход алкогольоксидазы, свободной от примеси каталазы, составляет 43,4% с удельной активностью 12,5 Е. 6 ил., 3 табл.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 032 743** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 9/04// (C 12 N 9/04, C 12 R 1:72)**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **4880040/13, 05.11.1990**

(46) Date of publication: **10.04.1995**

(71) Applicant(s):

**Artsukevich Irina Mikhajlovna[BY],
Chernikevich Ivan Petrovich[BY],
Ostrovskij Jurij Mikhajlovich[BY]**

(72) Inventor(s):

**Artsukevich Irina Mikhajlovna[BY],
Chernikevich Ivan Petrovich[BY],
Ostrovskij Jurij Mikhajlovich[BY]**

(73) Proprietor(s):

Artsukevich Irina Mikhajlovna (BY)

(54) **METHOD FOR PRODUCING OF YEAST ALCOHOL OXIDASE**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology. SUBSTANCE: method involves cultivation of yeast as producer of alcohol oxidase (AO). Collected cells of cultivated biomass are suspended. Thus prepared suspension is disintegrated, cellular homogenate is centrifuged, supernatant liquid which contains AO and catalase being purified. Said purification is carried out by sorption of cellular-free centrifugate, 0.01-0.04 M tric-HCl buffer together with 0.05 M NaCl, 0.1 mM EDTA and 0.1 mM dithioiteitole being used. Said process takes

place at pH 7.6-8.2, it is followed by eluation of protein with the help of 0.1-0.5 M NaCl, mentioned above buffer being used. The latter process is carried out at pH7.6-8.2 in the presence of 0.1 mM EDTA and 0.01 mM dithioiteitole. Fractions by 4 ml are collected at rate 8 ml/h. Thus ferment preparation of AO having no catalase impurities is prepared. Desired product yield is 43.4 % , its specific activity is 12.5 units. EFFECT: improves efficiency of the method. 6 dwg, 3 tbl

Изобретение относится к способам получения ферментных препаратов, а именно алкогольоксидазы (АО), и может быть использовано в биотехнологии для получения АО, применяемой при ферментативном определении концентрации алкоголя в крови и других биологических жидкостях человека и животных.

Известен способ получения алкогольоксидазы путем культивирования в питательной среде метилотрофных каталазо-дефицитных дрожжей на смесях формиат-глюкоза или формальдегид глюкоза, при этом глюкоза служит источником углерода, а формиат и формальдегид энергетические субстраты. Используемые для получения АО метилотрофные дрожжи с дефицитным по каталазе штаммом не способны синтезировать каталазу, поэтому содержащуюся в них АО можно применять для количественного и качественного определения этанола [1]

Однако применение мутантного каталазо-дефицитного штамма ведет к удорожанию целевого продукта. Кроме того, известный способ характеризуется пониженным синтезом фермента АО, что делает способ экономически невыгодным.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому положительному эффекту (прототипом) является способ получения АО из метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*, включающий выращивание биомассы дрожжей на минеральной среде, выделение клеток из среды культивирования центрифугированием, трехкратное разрушение клеток в прессе высокого давления, осаждение белка в области 30-60% насыщения сульфатом аммония с последующим диализом (для удаления каталазы) белкового раствора против 20-кратного по объему буфера, содержащего 10 мМ ингибитор каталазы-3-амино-1,2,4 триазол и 0,05% H_2O_2 методом химической модификации [2]

Выделенный по известному способу препарат (из 100 г дрожжей получают 6 г белка) имел удельную активность 10-12 Е/мг белка и хранился без потери активности в течение года при $-40^{\circ}C$. Этого количества фермента было достаточно для 12000 колориметрических анализов при определении этанола.

Известный способ позволил добиться удаления значительного количества (около 90%) каталазы, однако довести процесс до конца, т.е. получить препарат АО, полностью лишенный примеси каталазы, известным способом не удалось, так как продолжение диализа приведет к тому, что оставшееся небольшое количество каталазы (около 10%) не окажет защитного эффекта на АО от H_2O_2 и АО частично или полностью инактивируется. Наличие примеси каталазы в препарате АО вызывает необходимость при колориметрическом определении первичных алкоголей брать в инкубационную смесь большое количество фермента 500 мкг на одну пробу. Следовательно, учитывая высокие цены на ферментные препараты, использование полученной АО по известному способу для определения концентрации алкоголя в крови и других биологических жидкостях человека и животных делает этот анализ достаточно дорогим.

Целью изобретения является повышение чистоты ферментного препарата.

Изобретение заключается в том, что очистку белков ведут на ионообменнике ДЭАЭ-Тойоперл 650 М, уравновешенном 0,01-0,04 М трис-НСI буфером в присутствии 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтола при pH 7,6-8,2.

На фиг. 1 для примера 1 приведена хроматография белкового раствора на ДЭАЭ Тойоперл 650 М; на фиг.2 для примера 2; на фиг.3 для примера 3; на фиг. 4,5 соответственно примерам 4 и 5; на фиг.6 зависимость скорости реакции от времени, где содержание этанола: 1-10 мг/л; 2-20 мг/л, 3-40 мг/л.

Способ осуществляют следующим образом.

Культуру дрожжей *boidinii* выращивают на минеральной среде. Количество выращенной биомассы определяют спектрофотометрически, а чистоту культуры контролируют микроскопированием. Клетки собирают в логарифмической фазе роста. Собранные клетки суспендируют, суспензию дезинтегрируют в гомогенизаторе в присутствии кварцевого песка. Клеточный гомогенат центрифугируют с последующим удалением неразрушенных клеток. Надосадочную жидкость, включающую АО и каталазу, используют для последующей очистки.

Полученный бесклеточный центрифугат сорбируют на ДЭАЭ-Тойоперл 650М с последующим элюированием белка, получая на данной стадии очистки ферментный препарат АО, полностью свободный от примеси каталазы. Затем методом

5 В предлагаемом способе получения АО на этапе отработки оптимальных его параметров установлено, что наилучший эффект регистрировался при разделении экстрагируемых белков на ионообменнике ДЭАЭ-Тойоперл 650М, уравновешенном 0,01-0,04 М трис-НСl буфером в присутствии 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтола при 7,6-8,2. Снижение молярности трис-НСl буфера ниже 0,01 М ведет к потере

10 стабильности препарата АО вследствие его диссоциации на субъединицы, а увеличение молярности выше 0,04М приводит к снижению степени сорбции белкового препарата. Снижение pH буфера ниже 7,6 дестабилизирует структуру АО, в то время как использование pH выше 8,2 ухудшает разделение каталазы и АО. Увеличение концентрации ЭДТА и дитиотрейтола, стабилизирующих структуру АО, не ведет к усилению

15 эффекта по сравнению с применяемыми концентрациями. Используемая молярность NaCl 0,05 М подобрана экспериментально и является оптимальной для достижения начального прочного связывания белка с носителем ДЭАЭ-Тойоперл 650 М. При выборе ионообменника установлено, что ни ДЭАЭ-сефадекс, ни ДЭАЭ-целлюлоза не обеспечивали полного разделения алкогольоксидазы и каталазы. Экспериментально подтверждено, что

20 лишь ДЭАЭ-Тойоперл 650 М обладает необходимой разрешающей способностью, позволяющей разделить эти два фермента.

П р и м е р 1. Культивирование дрожжей *C.boidinii* осуществляют при 29°C на минеральной среде следующего состава (г/л воды): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5; KH_2PO_4 1; MgSO_4 0,5; NaCl 0,1. В качестве источника углерода добавляют метанол в концентрации 0,5% по

25 общему объему. Количество выращенной биомассы находят спектрофотометрически при 623 нм. Чистоту культуры контролируют микроскопированием. Клетки собирают в логарифмической фазе роста центрифугированием при 5000g в течение 10 мин с последующей промывкой 0,02 М Na-фосфатным буфером, pH 7,6 при 6°C. Культуру поддерживают на скошенном агаре следующего состава (г/л воды): глюкоза 20,0; пептон

30 20,0; дрожжевой автолизат 10,0; агар 20,0. Клетки хранят при -15°C в течение года.

Берут 10 г собранных клеток (размороженных) и суспендируют в 30 мл 0,02 М трис-НСl, буфера, pH 8,0 содержащего 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтол. Полученную суспензию дезинтегрируют в гомогенизаторе в присутствии 18 г кварцевого

35 песка в течение 15 мин при 1000g. Клеточный гомогенат центрифугируют (30 мин, 20000g) с последующим удалением клеточного дебриса. Надосадочную жидкость, включающую смесь алкогольоксидазы и каталазы, используют для последующей очистки. Для этого берут 27 мл (810 мг) полученного бесклеточного центрифугата и наносят на колонку (2x20 см) с ДЭАЭ-Тойоперлом 650 М. Гель уравнивают 0,02 М трис-НСl буфером, pH

40 8,0 в присутствии 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтола. После адсорбции белкового препарата колонку промывают 300 мл 0,02 М трис-НСl буфера, pH 8,0 содержащего 0,08 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтол, с последующей элюцией белка линейным градиентом NaCl 0,1-0,5 М в 0,02 М трис-НСl буфере, pH 8,0 с 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтолом со скоростью 8 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Объем

45 резервуара и смесителя по 150 мл в каждом сосуде. Катализа элюируется в области 0,22-0,27 М NaCl, а АО несколько позже, в области 0,30-0,34 М (см. фиг.1). В результате на данной стадии очистки получила ферментный препарат АО с максимальной удельной активностью 15 Е (среднее значение 12,5 Е), полностью свободный от примеси каталазы (фиг.1). Стабилизацию АО осуществляют методом сульфаммонийного фракционирования. С этой целью наиболее активные фракции АО объединяют и к ферментному элюату с

50 концентрацией белка 6,1 мг/мл добавляют при постоянном перемешивании мелкодисперсный сульфат аммония до конечного насыщения 70% После 2-часового выдерживания при 4°C смесь центрифугируют 20 мин при 20000g. Осадок АО хранят в виде пасты при -20°C. Конечный выход белка составляет 43,4% Существенной потери

активности в течение года не наблюдалось. Все операции по выделению и очистке АО проводят при 6°C. Результаты суммированы в табл.1.

Пример 2. Культивирование дрожжей *S.boidinii* и получение клеточного гомогената проводят способом, идентичным способу, описанному в примере 1.

27 мл (810 мг) бесклеточного центрифугата, полученного после разрушения клеток в гомогенизаторе, наносят на колонку (2x20 см) с ДЭАЭ-Тойоперлом 650 М. Гель уравнивают 0,01М трис-НСI буфером pH 7,6, содержащим 0,05М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтол. После связывания белка с ионообменником колонку промывают 300 мл 0,01М трис-НСI буфера, pH 7,6 содержащего 0,08 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтол, с последующей элюцией белка линейным градиентом NaCl 0,1-0,5 М в 0,01 М трис-НСI буфере, pH 7,6 с 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтолом, со скоростью 8 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Объем резервуара и смесителя по 150 мл в каждом сосуде. Каталаза элюируется в области 0,21-0,26 М NaCl, а АО несколько позже, в области 0,28-0,33 М (см. фиг. 2). В результате на данной стадии очистки получили ферментный препарат АО с максимальной удельной активностью 12 Е (среднее значение 9Е), полностью свободный от примеси каталазы (фиг.2). Стабилизацию АО осуществляли способом, идентичным способу, описанному в примере 1. Конечный выход белка составляет 40,4% Существенной потери активности в течение года не наблюдалось. Результаты суммированы в табл.1.

Пример 3. Культивирование дрожжей *S.boidinii* и получение клеточного гомогената проводят способом идентичным способу, описанному в примере 1.

27 мл (810 мг) бесклеточного центрифугата, полученного после разрушения клеток в гомогенизаторе, наносят на колонку (2x20 см) с ДЭАЭ-Тойоперлом 650М. Гель уравнивают 0,04 М трис-НСI буфером, pH 8,2 содержащим 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтол. После связывания белка с ионообменником колонку промывают 300 мл 0,04 мМ трис-НСI буфера, содержащего 0,08М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтол, с последующей элюцией белка линейным градиентом NaCl 0,1-0,5 М в 0,04 М трис-НСI буфере, pH 8,2 с 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтолом со скоростью 8 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Объем резервуара и смесителя по 150 мл в каждом сосуде. Каталаза элюируется в области 0,24-0,29 М NaCl, а АО несколько позже, в области 0,33-0,37М (см. фиг. 3). В результате на данной стадии очистки получили ферментный препарат АО с максимальной удельной активностью 12,5 Е (среднее значение 10,5 Е), полностью свободный от примеси каталазы (фиг.3). Стабилизацию АО осуществляли способом, идентичным способу, описанному в примере 1. Конечный выход белка составляет 41,2% Значительной потери активности в течение года не наблюдалось. Результаты суммированы в табл.1.

Пример 4. Культивирование дрожжей *Hansenula polymorpha* осуществляют при 29°C на минеральной среде следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5; KH_2PO_4 1; MgSO_4 0,5; NaCl 0,1. Минеральная среда рассчитана на 1 л воды. В качестве источника углерода добавляют метанол в концентрации 0,5% по общему объему. Количество выращенной биомассы находят спектрофотометрически при 623 нм. Чистоту культуры контролируют микроскопированием. Клетки собирают в логарифмической фазе роста центрифугированием при 5000g в течение 10 мин с последующей промывкой 0,02М Na-фосфатным буфером, pH 7,6 при 6°C. Культуру поддерживают на твердой питательной среде следующего состава (г/л): глюкоза 20,0; пептон 20,0; дрожжевой автолизат 10,0; агар 20,0. Клетки хранят при -15°C.

Берут 10 г собранных клеток (размороженных) и суспендируют в 30 мл 0,02 М трис-НСI буфере, pH 8,0, содержащего 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтола. Полученную суспензию дезинтегрируют в гомогенизаторе в присутствии 18 г кварцевого песка в течение 15 мин при 1000g. Клеточный гомогенат центрифугируют (30 мин, 20000g) с последующим удалением клеточного дебриса. Надосадочную жидкость, включающую смесь алкогольоксидазы и каталазы, используют для последующей очистки. Для этого берут 26 мл (594 мг) полученного бесклеточного центрифугата и наносят на колонку

(2x20 см) с ДЭАЭ-Тойперлом 650 М. Гель уравнивают 0,02 М трис-НСl буфером, pH 8,0, в присутствии 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, 0,01 мМ дитиотрейтола. После сорбции белкового препарата колонку промывают 300 мл 0,02 М трис-НСl буфера, pH 8,0 содержащего 0,08 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтола, с последующей элюцией белка линейным градиентом NaCl 0,1-0,5 М в 0,02 М трис-НСl буфере, pH 8,0 с 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтолом со скоростью 8 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Объем резервуара и смесителя по 150 мл в каждом сосуде. Каталаза элюируется в области 0,29-0,34 М NaCl, а АО несколько позже в области 0,4-0,44 М (см. фиг. 1). В результате на данной стадии очистки получили ферментный препарат АО с максимальной удельной активностью 17 Е (среднее значение 14Е), полностью свободной от примеси каталазы (фиг.4). Стабилизацию АО осуществляют методом сульфоаммонийного фракционирования. С этой целью наиболее активные фракции АО объединяют и к ферментному элюату с концентрацией белка 4,5 мг/мл добавляют при постоянном перемешивании мелкодисперсный сульфат аммония до конечного насыщения 70% После 2-часового выдерживания при 4°C смесь центрифугируют 20 мин при 20000g. Осадок АО хранят в виде пасты при -20°C. Конечный выход белка составляет 58,5% Все операции по выделению и очистке АО проводят при 6°C. Результаты суммированы в табл.2.

Пример 5. Культивирование дрожжей *Pichia pastoris* и получение клеточного гомогената проводят способом, идентичным способу, описанному в примере 4.

25 мл (524 мг) бесклеточного центрифугата, полученного после разрушения клеток в гомогенизаторе, наносят на колонку (2x20 см) с ДЭАЭ-Тойперлом 650 М. Гель уравнивают 0,02 М трис-НСl буфером, pH 8,0, содержащим 0,05 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтола. После связывания белка с ионообменником колонку промывают 300 мл 0,02 М трис-НСl буфера, pH 8,0, содержащего 0,08 М NaCl, 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтол, с последующей элюцией белка линейным градиентом NaCl 0,1-0,5 М в 0,02 М трис-НСl буфере, pH 8,0, с 0,1 мМ ЭДТА и 0,1 мМ дитиотрейтолом со скоростью 8 мл/ч, собирая фракции по 4 мл. Объем резервуара и смесителя по 150 мл в каждом сосуде. Каталаза элюируется в области 0,25-0,31 М NaCl, а АО несколько позже в области 0,37-0,41 М (см. фиг. 5). В результате на данной стадии очистки получили ферментный препарат АО с максимальной удельной активностью 13,5 Е (среднее значение 12 Е), полностью свободный от примеси каталазы (фиг.5). Стабилизацию АО осуществляли способом, идентичным способу, описанному в примере 4. Конечный выход белка составил 48,0% Результаты суммированы в табл.3.

Таким образом, как видно из графиков фиг.4 и 5, предлагаемый способ обеспечивает возможность достижения поставленной цели в случае использования в качестве источника алкогольоксидазы культуры дрожжей *Hansenula polymorpha* (прототип), а также и других видов метилотрофных дрожжей, например *Pichia pastoris*.

Способ предусматривает использование культур, хранящихся в каталоге культур Всесоюзной коллекции непатогенных микроорганизмов. Штаммы дрожжей, являющиеся продуцентами целевого продукта (алкогольоксидаза, АО), имеют следующие номера в официальной коллекции микроорганизмов: *Candida boidinii* 34 *Hansenula polymorpha* 1397 *Pichia polymorpha* 1392 *Pichia pastoris* 1379 *Pichia angusta* 2599 *Pichia pinus* 1616

Выделенный по способу ферментный препарат, при котором из 10 г дрожжевых клеток получили 62 мг белка, имеет среднюю удельную активность 12,5 Е (пример 1). Этого количества АО (62 мг) достаточно для 20000 колориметрических анализов при определении концентраций этанола, т.е. на один анализ используется 3 мкг фермента при длительности анализа 3 мин (см. фиг.6), отражающую зависимость скорости алкогольоксидазной реакции от времени при содержании этанола 10 мг/л 1; 20 мг/л 2; 40 мг/л 3. Инкубационная среда в 1 мл содержала: 0,06 мл 0,07% 2,6-дихлорфенолиндофенола, 30 мкг в 0,03 мл пероксидазы хрена, 3 мкг АО и 0,9 мл 0,02 М фосфатного буфера pH 7,6.

Следовательно, учитывая высокую стоимость ферментных препаратов, определение концентрации этанола с использованием полученной по данному способу АО, не

содержащей примеси каталазы, значительно ускоряет время анализа и удешевляет его конечную стоимость по сравнению с прототипом.

Формула изобретения

5 СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ, предусматривающий культивирование продуцирующего микроорганизма, выделение клеточной биомассы, разрушение клеток с получением бесклеточного экстракта, очистку от каталазы, отличающийся тем, что, с целью повышения чистоты ферментного препарата, очистку бесклеточного экстракта ведут ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-Тойоперл 650М, 10 уравновешенном 0,01 0,04 М трис-HCl-буфером, в присутствии 0,05 М хлористого натрия, 0,1 ммоль ЭДТА и 0,1 ммоль дитиотрейтола при pH 7,6 8,2.

15

20

25

30

35

40

45

50

Таблица 1

Очистка АО из *S. boidinii* при различных экспериментальных условиях

Фракция, мл	Общее количество белка, мг	Уд. активность, мкмоль/мин на 1 мг белка	Общая активность, мкмоль/мин	Выход, %
Бесклеточный экстракт, 27	810	2,2	1782	—
Ионообменная хроматография (пример 1), 11	62	12,5	775	43,4
Ионообменная хроматография (пример 2), 11	80	9	720	40,4
Ионообменная хроматография (пример 3), 11	70	10,5	735	41,2

Таблица 2

Очистка АО из *Hansenula polymorpha* при оптимальных экспериментальных условиях

Фракция, мл	Общее количество белка, мг	Уд. активность, мкмоль/мин на 1 мг белка	Общая активность, мкмоль/мин	Выход, %
Бесклеточный экстракт, 26	594	2,7	1603,8	—
Ионообменная хроматография (пример 4), 15	67,5	14	945	58,3

Таблица 3

Очистка АО из *Pichia pastoris* при оптимальных экспериментальных условиях

Фракция, мл	Общее количество белка, мг	Уд. активность, мкмоль/мин на 1 мг белка	Общая активность, мкмоль/мин	Выход, %
Бесклеточный экстракт, 25	52,4	2,3	1230	—
Ионообменная хроматография (пример 5), 11,8	49,2	12	590,4	48,0





