Ep.6.7
598

ISSN 0136-3549
0320-3395

TALLINNA
POLÜTEHNILISE INSTITUUDI
TOIMETISED
598

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО
ИНСТИТУТА

TPI
'85

МОДИФИКАЦИЯ И КИНЕТИКА ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Гр. 6.

598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

TPI '85

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.152.002.237

МОДИФИКАЦИЯ И КИНЕТИКА ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Инженерная энзимология У

Под общей редакцией А.И. Кёстнера

©

Таллин 1985

Teaduslik Raamatukogu
ENSV TA
TALLINN
АН ЭССР
Научная библиотека

ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
Труды ТПИ № 598

МОДИФИКАЦИЯ И КИНЕТИКА ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ
Инженерная энзимология У
На русском языке
Отв. ред. М. Миккал. Техн. ред. В. Ранник
Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 12.02.85
Подписано к печати 19.09.85
МВ-08633
Формат 60x90/16
Печ. л. 9,25 + 0,75 приложение
Уч.-изд. л. 8,0
Тираж 300
Зак. № 570
Цена 1 руб. 20 коп.
Таллинский политехнический институт,
200026 Таллин, Эхитаяте тее, 5
Ротапринт ТПИ, 200006, Таллин, ул. Коскла 2/9

© Таллинский политехнический институт, 1985

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.004.15

А.И. Кёстнер, И. Роос

ПРОГРАММЫ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ. I. ОПТИМИЗАЦИЯ СИМПЛЕКСНЫМ МЕТОДОМ

Наш анализ математических моделей биокаталитических процессов показал, что для оптимизации соответствующих технологических процессов требуется применение комбинированных кинетико-экономических целевых функций, которые зависят от многих переменных и параметров [1]. Решение задач оптимизации на основе сложных многопараметровых целевых функций невозможно без применения электронно-вычислительной техники. Подобная задача нами ранее решена на конкретном примере технологического процесса гидролиза лактозы [2]. Представленные результаты задач оптимизации в виде таблиц не очень наглядны. Составление наглядных графиков на основе полученных табличных данных требует ручного труда. С развитием электронно-вычислительной техники появляется возможность графического изображения результатов вычисления в виде трехмерных диаграмм.

В настоящей статье нами разрабатывается комплекс программ для решения и графического изображения полученных результатов задач оптимизации биокаталитических процессов. В нижеследующем первом сообщении по данным проблемам будут изложены общие подходы к созданию необходимого комплекса программ, одной составляющей которого является программа для оптимизации симплексным методом.

Теоретическая часть

За основу оптимизации применяется целевая функция в виде кинетико-экономического уравнения

$$E_0 = \frac{P}{C_T}, \qquad (1)$$

где экономическая эффективность E_0 определяется соотношением продуктивности P к суммарным расходам C_T в течение одного цикла применения катализатора. Производительность P выражается как произведение ряда подсобных функций. Среди них применена обобщенная функция для определения относительной скорости ферментативной реакции по Сиймеру [3]. Суммарные расходы определяются как сумма трех основных статей - расходы на субстрат, катализатор и эксплуатацию. Структура этой модели более подробно описана в наших предыдущих публикациях.

Основными независимыми переменными при оптимизации являются температура T, время эксплуатации катализатора τ, начальная концентрация S_0 и конечная степень конверсии субстрата X. В случае решения задачи в комплексе со стадией приготовления иммобилизованного катализатора в качестве дополнительной переменной вводится также количество исходного (нативного) биоактивного материала A_S. В качестве основных подсобных функций в модели используются зависимости скорости реакции от T, S_0, X, а также от A_S, кроме того зависимость продуктивности от T и τ. В уравнении применяются экономические характеристики процесса. В общей сложности в целевую функцию входит около 20 эмпирических параметров.

При количественном анализе такой довольно сложной системы можно сформулировать ряд частных задач:

1) Расчет оптимальных значений всех переменных в случае заданных значений параметров, т.е. решение одной конкретной задачи.

2) Графическое изображение значений полной и частной целевой функции в зависимости от двух переменных или параметров.

3) Расчет массива оптимальных значений при варьировании двух характерных или критических параметров.

4) Представление рассчитанного по п. 3 массива в виде $n+1$ трехмерных графиков зависимостей показателя эффективности и всех n переменных от двух выбранных параметров.

Основными узлами разрабатываемого комплекса являются программы для оптимизации симплексным методом (задачи I и 3) и для графического изображения полученных результатов (задачи 2 и 4).

Симплексный метод относится к методам линейного планирования нахождения экстремального значения [4]. Для этого в n-мерном пространстве конструируется выпуклый многогранник с $n+1$ вершинами. Здес n равняется числу независимых переменных. В ходе процедуры находится путь из граней и вершин к увеличению целевой функции. При движении к экстремуму из многогранника исключается самая худшая вершина и конструируется новая вершина в предполагаемом направлении к экстремуму. Около экстремума продвижение многогранника в n-мерном пространстве превращается в циклическое или многогранник начинает осциллировать. Для дальнейшего продвижения необходимо вокруг лучшей вершины сконструировать новый уменьшенный многогранник и возобновить процедуру. Экстремум будет достигнут, когда различие между результатами двух последующих значений меньше заданной величины. Симплексный метод особенно удобен для применения при поиске экстремума аналитически представленной целевой функции, в случае которой отпадают проблемы, связанные с погрешностью экспериментальных данных.

Первый многогранник конструируется вокруг выбранной рабочей точки (C_{i0}) с учетом значений интервала варьирования каждой переменной λ_i. Координаты новой точки x_i определяются уравнением

$$x_i(m+1)=\frac{2}{n}\left(\sum_{m-n}^{m} x_i - x_{il}\right)-x_{il},$$

где m - индекс последней точки;

x_{il} - координата худшей точки последнего многогранника.

Реальные координаты вычисляются уравнением

$$C_i = C_{i0}+\lambda_i \cdot x_i .$$

Результатом процедуры будет точка (C_{iE}) и соответствующее ей значение цифровой функции.

Реализация программы и примеры

Программа реализована на языке Бейсик для операционной системы CP/M. В данном варианте программы реализованы

с помощью микропроцессоров Z80 с оперативной памятью 64 кбайт. В качестве периферийных устройств кроме дисплея применяются дискетты, матричный принтер 4, графопостроитель фирмы "Ватанабе" с размером графического поля 260 х х 360 мм и разрешающей способностью 0,1 мм.

Программа предусматривает процедуру оптимизации в 6-мерном пространстве (6 независимых переменных). В целевой функции применяются до 20 параметров, любая пара из них может быть выбрана в качестве варьируемых. Число степеней варьирования NK1 и NK2 произвольное для обоих параметров. Следовательно, программа работает с NK1х NK2 макроциклами. В каждом из этих макроциклов решается задача оптимизации путем последующих процедур оптимизации. После каждой процедуры интервал варьирования уменьшается. Оптимум считается достигнутым, если соотношение значений целевой функции двух последовательных процедур не превышает 1,05.

В начале работы программы на дискетте создается файл, в который записывают общие характеристики решаемой задачи и исходные данные. После каждого цикла оптимизации в тот же файл записываются результаты - значения целевой функции и всех переменных в той же точке. После завершения всех циклов в файл записываются также максимальные значения всех переменных.

Полученный таким путем файл используется отдельной программой для конструирования и постройки характерных графиков.

Литература

1. Кёстнер А.И. Биохимические реакторы. - Труды ВНИИ Прикладной энзимологии. Вып. 6. Получение и применение биокатализаторов для химической технологии. Вильнюс, 1982, с. 114-129.

2. Кёстнер А.И., Паппель К.Э. Расчет эффективности процессов инженерной энзимологии. II. Расчет эффективности процесса гидролиза лактозы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1981, № 510, с. 25-35.

3. S i i m e r E. Generalized rate equation for one--substrate enzymatic reactions. - Biotechnol. Bioeng., 1978, vol. 20, N 12, p. 1853-1864.

4. Г р а ч е в Ю.П. Математические методы планирования экспериментов. М., Пищевая промышленность, 1979. 199 с.

A. Köstner, I. Roos

Program for the Optimization of Biocatalytic Processor I

Optimization Using Simplex Method

Summary

For the optimization of biocatalytic processes, which are conducted using immobilized enzymes, a combined kinetic-economic equation has been used as objective function of more than 20 parameters and 5 independent arguments. The extremum points are found using simplex method, the results are presented using computer graphics. Appropriate algorithms and programs in Basic have been compiled.

№ 598
TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА
УДК 577.I5.022:577.I5.I54

А.А. Менерт, Э.Х. Сиймер

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ. СООБЩЕНИЕ УП.

ХАРАКТЕРИСТИКА КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА "КОНТИФЛО"

Для процессов инженерной энзимологии нужна количественная характеристика полных кинетических кривых. Это связано, в первую очередь, с развитием техники иммобилизации биокатализаторов, открывающим широкие возможности их практического применения.

Исследование реакции глубокого гидролиза лактозы представляет большой теоретический (сильное ингибирование продуктами) и практический интерес (рациональное использование отходов молочной промышленности) [I].

В настоящее время недостаточно разработаны методы адекватного описания кинетики реакции, которые охватывали бы превращение субстрата до глубокой степени конверсии включительно. Во многих кинетических исследованиях определены только кинетические константы K_m, V, K_i [2, 5, 6, 7]. В наших предыдущих сообщениях разработано обобщенное кинетическое уравнение для односубстратных ферментативных реакций [3]. Соответственно этому уравнению в широком диапазоне исходных концентраций субстрата $[S]_0$ и степени конверсии X скорость реакции v выражается:

$$v = \frac{V(1-X)}{1 + \frac{K_m}{[S]_0} + d[S]_0 + eX + f[S]_0X + g[S]_0X^2}, \qquad (I)$$

где V – максимальная скорость реакции, М/мин;

K_m – константа Михаэлиса-Ментен, М;

d – обратная величина константы ингибирования субстратом K'_s, M^{-1};

e, $f[M^{-1}]$, $g[M^{-1}]$ – кинетические коэффициенты.

В настоящем сообщении уравнение (I) используют в интегрированном виде (ур. (I4)). Для таких одиночных интегрированных кривых при $[S]_0 = const$ необходимы экспериментальные данные, описывающие зависимость степени конверсии X от продолжительности реакции τ.

Для получения этих данных нужно было бы обычными химическими методами сделать трудоемкую работу. Поэтому и в кинетических исследованиях широко распространены физико-химические методы, одним из которых является применение автоматических анализаторов. При помощи автоматического анализатора, регистрирующим прибором которого являлся спектрофотометр, измерена максимальная скорость V для реакции гидролиза о-нитрофенил-β-галактозидазы β-галактозидазой $V = 9{,}09$ /$\Delta A_{4I2-500}$/мин/ (при концентрации фермента I,2 мкг/мл) и определено $K_m = 0{,}037 \cdot I0^{-3}$ М [2].

Выпускаемый фирмой "Лабор МИМ" (ВНР) автоматический анализатор "Контифло" предназначен для различных массовых анализов, в том числе для определения содержания редуцирующих сахаров (в частности, глюкозы) с помощью соответствующего модуля до 60 проб в час [4].

Целью настоящей работы являлось:

I) разработать методику применения анализатора "Контифло" для исследования реакций гидролиза дисахаридов;

2) исследовать реакцию ферментативного гидролиза лактозы и дать ее количественную характеристику.

Материалы и методы

В качестве субстрата использовалась D-(+)-лактоза $C_{II}H_{22}O_{II} \cdot H_2O$ "ч" Шосткинского завода химреактивов. Гидролиз проводили препаратом β-галактозидазы Lactozym I500L (Novo Industrias AS, Denmark), активностью 440 Е/мл.

Все растворы приготовили в 0,I М фосфатном буфере (pH 7,0), в качестве активатора применялся $I0^{-4}$ М $MgCI_2$. К I00мл исходного раствора субстрата после достижения заданной температуры (40 °С) прибавляли нужное количество (I-2 мл) разбавленного раствора фермента.

Исследовался гидролиз 0,I-0,4 М растворов лактозы в термостатированном реакторе с перемешиванием. Взятые из ре-

акционной смеси пробы немедленно разбавлялись 10^{-4} М соляной кислотой для инактивации остатков фермента. Разбавление провели с расчетом получения 0,002 М растворов (в отношении субстрата), т.е. в 50–200 раз, так как оптимальные пределы измерения редуцирующих сахаров на "Контифло" 0,02 – 0,05 %.

Пробы анализировались на автоматическом анализаторе "Контифло", применяя разработанную нами методику и модуль глюкозы. Принцип модуля глюкозы в том, что содержащуюся в пробе глюкозу в щелочной среде окисляют нагревом с неокупроином двухвалентной меди (при 92 °С). Восстановившиеся до одновалентной меди медные ионы образуют с неокупроином цветной бискомплекс неокупроина одновалентной меди, поглощение которого измеряют при 455–460 нм на колориметре [4].

Методы расчета

I. Обработка данных "Контифло"

Для восстанавливающих сахаров модуль глюкозы имеет различную чувствительность. Поэтому, чтобы следить за конверсией, надо приготовить стандартные растворы из дисахарида (лактозы) и обеих моносахаридов (глюкозы и фруктозы).

Учитывали, что существует линейная зависимость высоты пика от концентрации вещества. Высота пика h при степени конверсии X равна:

$$h = \frac{c^{\circ}_{дс}}{L}(1 - X)h^{ст}_{дс} + \frac{c^{\circ}_{дс}}{L} X \cdot h^{ст}_{мс1} + \frac{c^{\circ}_{дс}}{L} X \cdot h^{ст}_{мс2}, \qquad (2)$$

где $c^{\circ}_{дс}$ – исходная концентрация дисахарида в реакционной смеси, мМ;

L – разбавление, раз;

$h^{ст}_{дс}$, $h^{ст}_{мс1}$, $h^{ст}_{мс2}$ – высоты пиков стандартных растворов дисахарида, первого и второго моносахарида соответственно, концентрацией I мМ, мм.

После преобразования уравнения (2) степень конверсии X выражается следующим образом

$$X = \frac{h - h^{\circ}_{дс}}{(h^{ст}_{мс1} + h^{ст}_{мс2} - h^{ст}_{дс}) \cdot \frac{c^{\circ}_{дс}}{L}}, \qquad (3)$$

где $h^{\circ}_{дс} = \frac{C^{\circ}_{дс}}{L} \cdot h^{ст}_{дс}$ - высота пика исходного раствора.

Нахождение степени конверсии субстрата по ур. (3) требует калибровочных данных. Проще приготовить раствор из двух моносахаридов, концентрация обеих которых равна концентрации исходной смеси $\frac{C^{\circ}_{дс}}{L}$ (мМ), но который по своему составу фактически соответствует реакционной смеси (после разбавления), в которой завершен полный гидролиз дисахарида. Знаменатель в ур. (3) выглядит тогда:

$$(h^{ст}_{мс1} + h^{ст}_{мс2} - h^{ст}_{дс}) \cdot \frac{C^{\circ}_{дс}}{L} = h^{\infty}_{мс1} + h^{\infty}_{мс2} - h^{\circ}_{дс} = h^{\infty}_{мс} - h^{\circ}_{дс}, \quad (4)$$

где $h^{\infty}_{мс1}, h^{\infty}_{мс2}, h^{\infty}_{мс}$ - высоты пиков первого, второго моносахарида и их суммы соответственно, соответствующей полному гидролизу субстрата.

Выражение для степени конверсии приобретает вид:

$$X = \frac{h - h^{\circ}_{дс}}{h^{\infty}_{мс} - h^{\circ}_{дс}}. \quad (5)$$

Следовательно, для вычисления степени конверсии гидролиза дисахарида X по высотам пиков h, полученных с ленты самописца "Контифло", надо иметь значения $h^{\circ}_{дс}$ (высота пика исходного раствора) и $h^{\infty}_{мс}$ (высота пика конечного раствора или стандартного раствора, состав которого соответствует полному гидролизу субстрата).

2. Расчет кинетических коэффициентов

Для вычисления кинетических коэффициентов использовали форму ур. (I) при $[S]_0 = const$ в интегрированном виде. Обозначая в ур. (I)

$$a = 1 + \frac{K_m}{[S]_0} + d[S]_0 \quad (6)$$

$$b = e + f[S]_0 \quad (7)$$

$$c = g[S]_0 \quad (8)$$

получаем

$$V = \frac{V(1-X)}{a + bX + cX^2}. \quad (9)$$

Принимая, что

$$\frac{V}{a} = V_0, \quad (10)$$

где V_0 - начальная скорость реакции, М/мин.

и обозначая $\frac{b}{a} = m_1$ (II) и $\frac{c}{a} = m_2$ (I2), ур. (9) приобретает вид

$$v = \frac{[S]_0 dX}{d\tau} = \frac{v_0(1-X)}{1 + m_1 X + m_2 X^2}. \qquad (I3)$$

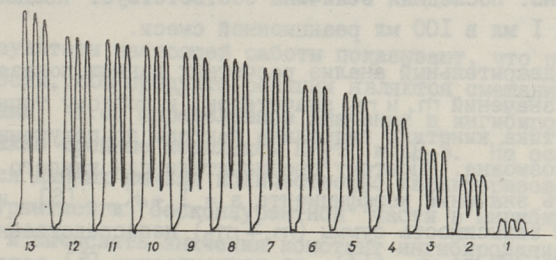
Интегрируя это уравнение в пределах от 0 до X и от 0 до τ, обозначая $\ln(I-X) = Y$ и разделяя полученное интегрированное уравнение на эту же величину, получаем

$$v_0 \frac{\Delta\tau}{[S]_0 y} + (m_1 + m_2)\left(1 + \frac{X}{y}\right) + \frac{m_2}{2} \cdot \frac{X^2}{y} = -1. \qquad (I4)$$

Уравнение (I4) нами использовано для вычисления значений величины начальной скорости v_0 и коэффициентов m_1 и m_2 по экспериментальным данным одиночных кинетических кривых. Расчеты проводились по специальной программе на ЭВМ методом наименьших квадратов.

Результаты и обсуждение

Типичные результаты анализа в виде пиков на ленте самописца "Контифло" приведены на фиг. I. Из каждой пробы анализатор проводит три параллельных измерения.



Фиг. 1. Анализ реакционных смесей на автоматическом анализаторе "Контифло". Исходная концентрация лактозы $[S]_0 = 0{,}2$ М, содержание препарата β-галактозидазы в реакционной смеси 0,01 мл/мл, pH 7,0, 40 °С. Чувствительность прибора 10/1.

Раствор фермента содержит в качестве стабилизатора сахара, которые дают повышение пиков на постоянную величину h_ϕ. Эту поправку находят анализом раствора фермента, концентрация которого равна концентрации фермента в реакционной смеси (пики I) и вычитают потом из высоты каждого пика.

Пики I3 ($h^{\infty}_{мс}$) соответствуют искусственному стандартному раствору, содержащему глюкозу и галактозу, причем концентрация обоих моносахаридов равна исходной концентрации лактозы. Этот раствор по составу соответствует реакционной смеси полного гидролиза, но не содержит фермента.

Пики 2 – исходной концентрации 0,2 М раствора лактозы без фермента ($h^{0}_{дс}$).

Пробы из реакционной смеси взяты в первую минуту (пики 3), в десятую минуту и далее через каждые I0 мин.

По высотам пиков в пределах исходных концентраций субстрата $[S]_0$ = 0,I–0,4 М находили зависимость степени конверсии X от продолжительности реакции τ, редуцированную на концентрацию фермента I мл в I00 мл реакционной смеси. При помощи функции $X = f(\tau)$ для каждой исходной концентрации субстрата, используя ур. (I4), высчитывали значения начальной скорости v_0, коэффициентов m_1 и m_2.

На основе зависимости начальных скоростей от исходной концентрации субстрата найдено, что ингибирование субстратом отсутствует ($d = 0, K'_S = \infty$), и значения K_m и V равны 0,050 М (которое близко к данным [5]) и 2,9 мМ/мин соответственно. Последняя величина соответствует концентрации фермента I мл в I00 мл реакционной смеси.

Предварительный анализ расчетных данных показал, что разброс значений m_1 и m_2 значителен, и поэтому точная характеристика кинетики гидролиза лактозы по полученным данным невозможна. Поэтому предпочитали для каждого опыта вычислять значение коэффициента $a = I + K_m / [S]_0$ и анализировать зависимость суммы $(m_1 + m_2)$, непосредственно определенной на ЭВМ по ур. (I4), от концентрации $[S]_0$ согласно уравнению

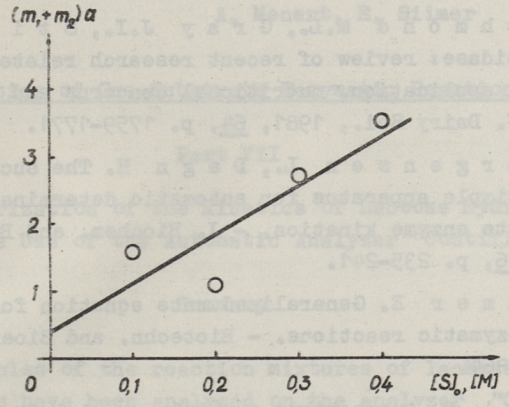
$$(m_1 + m_2) \cdot a = e + (f + g) \cdot [S]_0, \qquad (II)$$

вытекающему из ур. (7), (8), (II) и (I2).

Путем линейной регрессии (см. фиг. 2) найдены следующие значения при коэффициенте корреляции 0,87:

$$e = 0{,}39$$
$$f + g = 7{,}4\ М^{-1}.$$

Как показано в сообщении IX настоящего сборника [8], величина e определяется конкурентной частью ингибирования



Фиг. 2. Расчет кинетических коэффициентов e и $(f+g)$ (M^{-1}); экспериментальные точки, расчетная прямая при $r = 0,87$.

продуктами, т.е. образованием комплексов EP_I и EP_2 (в данном случае комплексы β-галактозидазы с галактозой и глюкозой). Положительное значение коэффициента e доказывает, что существует сильное конкурентное ингибирование продуктами. Ранее показано, что конкурентным ингибитором является галактоза и найдены значения константы ингибирования [6, 7].

Результаты настоящей работы показывают, что по всей вероятности, оба продукта реакции являются смешанными ингибиторами, т.е. определенное значение в ингибировании имеют также тройные комплексы EP_IS и EP_2S. На основе имеющихся данных нельзя количественно характеризовать долю конкурентной и "бесконкурентной" части в ингибировании в целом и вычислять значения констант ингибирования. Однако, важный вывод вытекает из положительного значения суммы коэффициентов $(f+g)$. Как вытекает из выражений для коэффициентов f и g (см. [3] и [8]), их сумма при отсутствии ингибирования субстратом равна соотношению величины K_m к константе диссоциации тройного комплекса EP_IP_2. Следовательно, доказано образование комплекса EP_IP_2, значение которого в сильном торможении реакции гидролиза лактозы надо считать существенным.

Литература

1. Richmond M.L., Gray J.I., Stine C.M. Beta-galactosidase: review of recent research related to technological application, nutritional concerns and immobilization. - J. Dairy Sci., 1981, 64, p. 1759-1771.

2. Joergensen L., Degn H. The sucked-flow analyzer: a simple apparatus for automatic determinations of steady-state enzyme kinetics. - J. Biochem. and Biophys. Meth., 1982, 6, p. 235-241.

3. Siimer E. Generalized rate equation for one--substrate enzymatic reactions. - Biotechn. and Bioeng., 1978, 20, p. 1853-1864.

4. Örsi F. Automatikus analizis az élelmiszeriparban. Budapest, Mezögazdasági Kiadó, 1981. 176 o.

5. Peter J., Prenosil J.E., Bourne J.R. Comparison of various methods to determine kinetic constants for β-galactosidase in soluble and immobilized states. - J. Chem. Tech. Biotechnol., 1981, 31, p. 705-709.

6. Forsman E.S., Heikonen M., Kiviniemi L., Kreula M., Linko P. Kinetic investigations of the hydrolysis of milk lactose with soluble Kluyveromyces lactis β-galactosidase. - Milchwissenschaft, 1979, 34, N 10, S. 618-621.

7. Shukla T.P. Beta-galactosidase technology: a solution to the lactose problem. - CRC Cret. Rev. Food Technol., 1975, 5, p. 325.

8. Дагис Р.И., Паулюконис А.Б., Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение IX. Исследование кинетики гидролиза L-лизинамида по данным полных кинетических кривых. См. наст. сб., с. 31.

A. Menert, E. Siimer

Kinetics of One-Substrate Enzymatic Reactions

Part VII

Characterization of the Kinetics of Lactose Hydrolysis by the Use of the Automatic Analyzer "Contiflow"

Summary

Samples of the reaction mixtures of lactose enzymatic hydrolysis have been analyzed on the analyzer "Contiflow" using the glucose modul to determine reducing sugars. The method for calculation of substrate conversion degree has been elaborated. From the data of progressive curves the numeric values of characteristic kinetic coefficients have been calculated. It has been shown that both products (galactose and glucose) are strong inhibitors and the formation of the complex of enzyme with both products (EP_1P_2) takes place.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.022:536.54

Э.Х. Сиймер, М.А. Курвитс

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ.

СООБЩЕНИЕ VIII.

ПРИМЕНЕНИЕ КАЛОРИМЕТРОВ ТИПА КАЛЬВЕ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

Термохимические методы находят все более широкое применение в биохимии [1, 2]. Калориметры могут быть успешно применены для определения активности ферментов [3]. Современные микрокалориметры обладают значительной точностью и большой чувствительностью, а константы времени калориметров (как мера термической инертности) доведены до 100-300 с. Это позволяет, в принципе, использовать термохимические методы не только для исследования начальных скоростей, но и для получения полных кинетических кривых. Так как протекание любой химической реакции связано с изменением энтальпии, термохимический метод является в какой-то мере универсальным средством для исследования кинетики ферментативных реакций.

Вопросы применения термохимического метода в названных целях затронуты в нашем раннем сообщении [4], где рассматривалось применение калориметров с изотермической оболочкой. В настоящем сообщении обсуждаются возможности применения для комплексного исследования кинетики (анализ начальных скоростей, анализ полных кинетических кривых)теплопроводящих калориметров типа Кальве, обращая главное внимание на методические вопросы, на выбор оптимальных условий проведения экспериментов.

Сущность термохимического метода

Принимая $\Delta H=-Q$ за суммарное изменение энтальпии (тепловой эффект), выраженное на один моль превращения субстра-

та (в единицах кДж/моль), стехиометрическое уравнение ферментативной реакции можно записать в виде:

$$ES \xrightarrow{K_{кат}} E + \sum_{i=1}^{n} P_i + \Delta H \qquad (I)$$

ΔH в уравнении (I) складывается:

- из суммы отдельных изменений энтальпии при ступенчатом образовании суммы продуктов $\sum_{i=1}^{n} P_i$ из фермент-субстратного комплекса ES;
- из изменений энтальпии за счет изменения взаимодействия субстрата и продуктов с растворителем (эффекты сольватации);
- из изменений энтальпии в результате изменения концентрации комплексов фермента и фермент-субстратного комплекса с ингибиторами (которыми могут быть также продукты реакции и субстрат).

Так как обычно, в частности, при снятии полных кинетических кривых, концентрация субстрата намного выше концентрации фермента, то, очевидно, последние изменения энтальпии ничтожны по сравнению с изменением энтальпии в самом химическом процессе.

Эффекты сольватации могут быть значительными. Однако весьма вероятно, что изменение энтальпии за счет этих эффектов, выраженное на единицу массы превращенного субстрата, практически не изменяется в ходе реакции. В сомнительных случаях эту гипотезу надо проверить экспериментально.

Следовательно, можно предположить, что изменение энтальпии в ходе ферментативной реакции пропорционально количеству прореагировавшего субстрата и степени конверсии субстрата.

$$d(\Delta H) = -Q_{общ} \cdot dX \ кДж/моль, \qquad (2)$$

где dX - изменение степени конверсии субстрата;
$Q_{общ}$ - общий тепловой эффект при полном завершении реакции, кДж/моль.

Конечно, ферментативная реакция может сопровождаться дополнительными явлениями, связанными с тепловыми эффектами (инактивация катализатора, мутаротация оптически активных веществ, осаждение белка и пр.). Такие побочные эффек-

ты при возможности надо устранять или учитывать при интерпретации результатов измерений.

Применение теплопроводящих калориметров типа Кальве для исследования кинетики ферментативных реакций.

В калориметрах типа Кальве измерению подвергается тепловой поток, возникающий между измерительной системой и оболочкой в условиях интенсивного теплообмена. Металлическая оболочка имеет большую теплоемкость и поэтому калориметр работает практически в изотермических условиях. Однако теплопроводящие калориметры нельзя отнести к изотермическим, так как измерение теплового потока основывается именно на разности температур (которая в современных калориметрах может быть лишь порядка 10^{-6} град.). Таким образом, выходной сигнал E, пропорциональный тепловому потоку, характеризует интенсивность процесса, скорость реакции и измеряется в единицах мощности.

Количество выделенного (поглощаемого) тепла может быть найдено интегрированием функции зависимости выходного сигнала от времени $E = f(\tau)$:

$$Q = a \cdot \int E \, d\tau. \qquad (3)$$

Значение коэффициента a определяется из калибровочных данных.

Теплопроводящие калориметры можно применять как для получения полных кинетических кривых, так и для исследования начальных скоростей ферментативных реакций. В некоторых случаях оба варианта могут реализоваться на одном и том же приборе (например, микрокалориметре ЛКБ 2277).

При снятии полных кинетических кривых общий тепловой эффект от начала реакции ($\tau = 0$) до конца ($\tau \to \infty$) определяется интегралом

$$Q_{общ} = a \cdot \int_0^{\infty} E \, d\tau \qquad (4)$$

и может быть определен, например, по площади между кривой $E = f(\tau)$ и нулевой линией.

К любому моменту времени τ_i количество тепла, выделенное с начала реакции, равно

$$Q_{\tau_i} = a \cdot \int_0^{\tau_i} E \, d\tau. \qquad (5)$$

Считая выполненным условие (2), согласно которому изменение энтальпии пропорционально количеству прореагировавшего субстрата, получаем выражение для расчета степени конверсии субстрата в момент τ_i.

$$X_i = \frac{Q_{\tau_i}}{Q_{общ}} = \frac{\int_0^{\tau_i} E\,d\tau}{\int_0^{\infty} E\,d\tau}. \qquad (6)$$

Следовательно, степень конверсии субстрата пропорциональна площади между кривой и нулевой линией, соответствующей промежутку времени от нуля до момента τ_i.

Интегрирование функции $E=f(\tau)$ по участкам позволяет из первичной зависимости скорость реакции – время получить функции степень конверсии – время и скорость реакции – степень конверсии, которые удобно применять для кинетического анализа.

По сравнению с калориметрами с изотермической оболочкой, теплопроводящие калориметры имеют то преимущество, что в измеряемые величины не надо вносить поправок на теплообмен. Кроме того, измеряемые величины относятся к строго зафиксированной температуре, так как калориметры работают практически в изотермических условиях.

Однако при работе с калориметрами типа Кальве надо учитывать тепловую инертность измерительной системы, которая особенно сильно искажает результаты в начале измерения, а также влияет на результаты в течение всего калориметрического опыта.

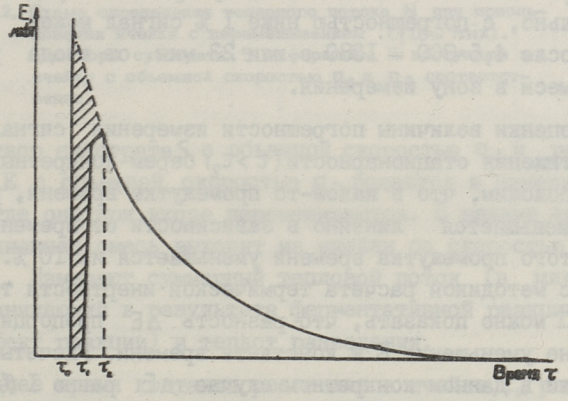
Дополнительные трудности при интерпретации результатов могут возникать в случае, если полные кинетические кривые снимают для реакционных смесей в закрытых ампулах. В этом случае фермент вводят в раствор субстрата вне калориметра, а к измерению теплового потока приступают только через некоторое время после тщательного термостатирования реакционной смеси.

На фиг. I показана типичная кривая $E=f(\tau)$ ферментативной реакции, снятая на микрокалориметре ЛКБ 2277.

В момент τ_0, который фиксируется, готовят реакционную смесь при температуре, близкой к температуре калориметра, и вводят в ампулу. Пару закрытых ампул (одна с реакционной смесью, другая с контрольным раствором, измерения проводят-

ся по дифференциальной схеме) вводят в прецизионный водяной термостат микрокалориметра. Для термостатирования требуется время 20–40 мин. В момент τ_1 ампулы переводят в зону измерительной ячейки. Из-за термической инертности измерительной системы достоверные результаты можно получить начиная с момента τ_2. Промежуток времени от τ_0 до τ_2 равен для данного калориметра 40–60 мин. и не может быть сокращен.

Следовательно, не измеряется значение функции $E=f(\tau)$ от начала реакции до момента τ_2. Эту часть кривой необходимо найти путем экстраполирования, после этого возможно измерять количество тепла, не подлежащего прямому измерению и соответствующее на фигуре I заштрихованной площади.



Фиг. 1. Кривая зависимости выходного сигнала от времени при использовании микрокалориметра ЛКБ–2277. τ_0 соответствует моменту начала реакции (перемешивание компонентов). В момент τ_1 приступают к измерению теплового потока, к моменту τ_2 достигнуто стационарное состояние.

Из вышеприведенного и практических опытов вытекает, что для получения полных кинетических кривых на микрокалориметре ЛКБ 2277 надо выбирать такую концентрацию фермента в реакционной смеси, чтобы общая продолжительность опыта была порядка 10 часов. В этом случае экстраполяцию кривой $E=f(\tau)$ можно проводить с достаточной точностью.

Проведем оценку термической инертности системы. Оценим а) величину промежутка $\tau_2-\tau_1$:

б) величину погрешности измерения E после достижения стационарности ($\tau > \tau_2$).

По закону охлаждения Ньютона разница между истинным значением сигнала E и измеряемым сигналом пропорциональна величине $e^{-\frac{\Delta\tau}{K}}$, где K - константа охлаждения измерительной системы (величину 1/K называют константой времени калориметра), $\Delta\tau$ - время начала измерения, в данном случае $\tau-\tau_1$. Для упрощения принимаем, что скорость реакции (величина E) в этот период не изменяется.

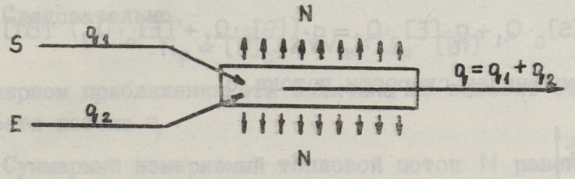
Если, например, $\Delta\tau$ равна 4,6/ K (т.е. в 4,6 раз больше константы времени), разница в измеряемом сигнале равна 0,0I от первоначальной разности, т.е. измеряемый сигнал составляет 99 % от истинного. Ампульная система микрокалориметра ЛКБ-2277 имеет константу времени порядка 300 с. Следовательно, с погрешностью ниже I % сигнал может быть измерен после 4,6·300 = I380 с или 23 мин. от ввода реакционной смеси в зону измерения.

Для оценки величины погрешности измерения сигнала E после достижения стационарности ($\tau > \tau_2$) берем конкретный пример. Предположим, что в каком-то промежутке времени, равном I0/K, E уменьшается линейно в зависимости от времени и в течение этого промежутка времени уменьшается на I0 %. По аналогии с методикой расчета термической инертности термометров [5] можно показать, что разность ΔE пропорциональна величине уменьшения E и константе времени. Расчеты показывают, что в данном конкретном случае ΔE равно I % от среднего значения сигнала E, т.е. измеряемый сигнал в любой момент на I % превышает соответствующий истинному значению теплового потока сигнал. Следовательно, при допустимой погрешности I % надо выбирать такие условия опыта, при которых скорость реакции в течение времени 10/K не изменялась бы больше I0 %, или конкретно для ЛКБ 2277 не изменялась бы больше I2 % в час. Практически это требует также проведения опытов с минимальной общей продолжительностью I0 часов.

Последнее лимитирование не является критическим, так как переход к относительным величинам (путем трансформации экспериментальной кривой в зависимость степень конверсии - время) значительно уменьшает погрешность результатов, обусловленную термической инертностью измерительной системы.

В настоящем сборнике в сообщении IX приведены результаты исследования кинетики ферментативного гидролиза L-лизинамида с помощью полных кинетических кривых, полученных на микрокалориметре ЛКБ 2277 [6].

Измерение начальных скоростей осуществляется в ячейках перемешивания (система flow-mix) калориметра. Схема системы дана на фиг. 2.



Фиг. 2. Схема определения теплового потока N при использовании ячейки с перемешиванием (flow mix). Растворы субстрата S и фермента E поступают в ячейку с объемной скоростью q_1 и q_2 соответственно.

Раствор субстрата S с объемной скоростью q_1 и раствор фермента E с объемной скоростью q_2 подаются в измерительную ячейку, где они при входе перемешиваются. В режиме вытеснения реакционная смесь выходит из ячейки со скоростью $q = q_1 + q_2$ [мл/с]. Измеряют суммарный тепловой поток (в микроваттах), возникающий в результате ферментативной реакции (тепловой эффект реакции) и теплот разведения.

Среднее время контакта реагентов в ячейке $\tau_к$ равно

$$\tau_к = \frac{V_{яч}}{q} \text{ [с]}, \qquad (7)$$

где $V_{яч}$ - объем ячейки, мл.

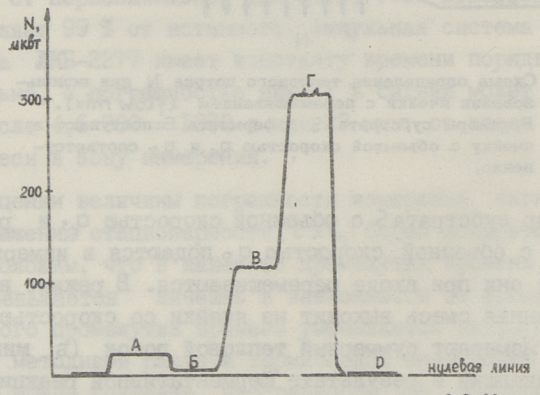
Величины q_1 и q_2 практически равны и поэтому начальные растворы разбавляются в два раза. После смешивания в ячейке исходные концентрации субстрата и фермента равны $[S]_0$ [М] и $[E]_0$ [мг/мл] соответственно.

После начала эксперимента система измерения через некоторое время переходит в стационарный режим. Система "флоу-микс" микрокалориметра ЛКБ 2277 имеет константу времени около 125 с и состояние, близкое к стационарному, достигается через 10-20 мин.

Если тепловой эффект разведения субстрата в выбранных условиях равен Q_1 [кДж/моль] или [Дж/ммоль], тот же эффект для фермента Q_2 [Дж/мг], то можем найти значение теплового потока, отвечающее этим двум эффектам. Количества субстрата и фермента в секунду, перемешиваемые в ячейке, равны $q_v \cdot [S]_0$ ммоль и $q_v \cdot [E]_0$ мг соответственно. Следовательно, тепловой поток $N_{разб}$, возникающий в результате разведения двух компонентов, равен

$$N_{разб} = q_v \cdot [S]_0 \cdot Q_1 + q_v \cdot [E]_0 \cdot Q_2 = q_v \cdot ([S]_0 \cdot Q_1 + [E]_0 \cdot Q_2) \quad [Вт] \qquad (8)$$

и он пропорционален скорости потока q_v.



Фиг. 3. Измерение начальной скорости гидролиза 0,2 М раствора лактозы грибной β-галактозидазой при pH = 4,0 и t = 30 °С в проточной системе с перемешиванием. А – фермент+буфер, Б – буфер+буфер, В – субстрат+буфер, Г – фермент+субстрат, Д – буфер+буфер. q_v = 25 мл/ч, $[E]_0$ = 2,48 мг/мл.

Величины $q_v[S]_0Q_1$ и $q_v[E]_0Q_2$ определяют в отдельных опытах, в которых растворы субстрата и фермента с заданной концентрацией разбавляют с растворителем (буфером) в той же системе измерения при постоянных величинах q_{v1} и q_{v2}. Так как концентрация фермента относительно мала, тепловой поток, возникающий за счет разведения фермента, обычно имеет малое значение и поэтому величина $N_{разб}$ относительно мало зависит от концентрации фермента.

Для выяснения величины теплового потока, возникающего за счет ферментативной реакции, в первом приближении принимаем, что при определении начальных скоростей скорость реакции в течение времени контакта $\tau_к$ не изменяется. Если теп-

ловой эффект реакции равен Q_p [кДж/моль] или [Дж/ммоль], начальная скорость реакции равна v_0 [ммоль/мл·с] и объем ячейки равен $V_{яч}$ [мл], то тепловой поток N_p равен

$$N_p = v_0 \cdot V_{яч} \cdot Q_p \ [Вт]. \qquad (9)$$

Начальная скорость, в свою очередь, равна произведению концентрации фермента $[E]_0$ [мг/мл] и выявляемой активности фермента A [мкат/мг]:

$$v_0 = [E]_0 \cdot A \ [мкат/мл]. \qquad (10)$$

Следовательно,

$$N_p = [E]_0 \cdot A \cdot V_{яч} \cdot Q_p \ [Вт] \qquad (11)$$

и в первом приближении эта величина не зависит от объемной скорости потока q_v.

Суммарный измеряемый тепловой поток N равен сумме $N_p + N_{разв}$:

$$N = [E]_0 \cdot A \cdot V_{яч} \cdot Q_p + q_v([S]_0 \cdot Q_1 + [E]_0 \cdot Q_2) \ [Вт]. \qquad (12)$$

Величину теплового потока, отвечающего теплоте реакции, находят вычитанием из общего (измеряемого) эффекта величины, отвечающей теплотам разведения.

Как видно из уравнения (12), доля теплового потока, возникающего за счет ферментативной реакции, увеличивается при малых проточных скоростях.

При экспериментальной работе надо оптимизировать значения двух величин: проточной скорости q_v и концентрации фермента $[E]_0$.

По практическим опытам и рекомендациям фирмы ЛКБ, оптимальной скоростью для прибора ЛКБ 2277 надо считать $(3-7)\cdot10^{-3}$ мл/с (10–25 мл/ч). В этом случае эффекты разбавления не слишком большие, а растворы из сосудов через перистальтический насос и систему термостатирования поступают в ячейку в течение 7–20 мин.

Ключевым вопросом является выбор такой концентрации фермента, при которой действительно измерялась бы скорость реакции, близкая к начальной скорости.

В объеме ячейки ($V_{яч}$ равен около 0,7 мл) в единицу времени прореагирует $v_0 \cdot V_{яч}$ [ммоль/с] субстрата, а общее количество субстрата, поступающего в ячейку, равно $q_v \cdot [S]_0$ [ммоль/с].

Очевидно, степень конверсии субстрата X равна

$$X = \frac{V_0 \cdot V_{яч}}{q \cdot [S]_0} = \frac{[E]_0 \cdot A \cdot V_{яч}}{q \cdot [S]_0} . \qquad (I3)$$

Если задавать максимально допустимое значение степени конверсии $X_{доп}$, а величина q фиксирована (оптимизирована), можно на основании уравнения (I3) записать условие, которое должно быть соблюдено при проведении опытов:

$$[E]_0 \leq \frac{X_{доп} \cdot q \cdot [S]_0}{A \cdot V_{яч}} \ [мг/мл]. \qquad (I4)$$

Величина $X_{доп}$ зависит от механизма реакции. Если, например, продукты являются сильными ингибиторами, максимальное значение $X_{доп}$ может быть ниже 0,0I (I % превращение).

Можно использовать также другой путь: на основе уравнения (I3) вычисляют величину степени конверсии и введут поправку в величину измеренной начальной скорости. Это может быть неизбежным, если изучаемая реакция имеет очень малый тепловой эффект.

Таким образом, для каждого эксперимента по измерению начальных скоростей должны быть выбраны оптимальные значения проточной скорости и концентрации фермента, что может быть осуществлено вышеописанными методами.

Литература

1. Edit. Jones M.N. Biochemical thermodynamics. New York, Elsevier Scientific Publishing Company, 1979.184 p.

2. Edit. Brown H.D. Biochemical microcalorimetry. New York - London, Academic Press, 1969. 317 p.

3. Monk P., Wadsö I. Flow microcalorimetry as an analytical tool in biochemistry and related areas. - Acta Chem. Scand., 1969, 23, N 1, p. 29-36.

4. Менерт А.А., Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций.Сообщение Ш.Термохимический метод исследования стационарной кинетики ферментативных реакций. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, I980, № 499, с. 23-32.

5. Скуратов С.М., Колесов В.П., Воробьев А.Ф. Термохимия. М., Изд-во МГУ, I964. 232 с.

6. Дагис Р.И., Паулюконис А.Б., Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение IX. Исследование кинетики гидролиза L-лизинамида по данным полных кинетических кривых. См. наст. сб., с.31.

E. Siimer, M. Kurvits

Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions

Part VIII

Use of Calvet Heat Conduction-type Calorimeters for the Investigation of Steady State Kinetics

Summary

Calvet heat conduction-type calorimeters can be successfully used for the investigation of steady state kinetics of enzymatic reactions. In batch systems the integral curves substrate conversion-time can be obtained from the curves output signal (as rate of reaction) vs time. It has been shown that for ampoule systems of microcalorimeter LKB 2277 the duration of reaction must be not less than 10 hours to minimize the influence of thermal inertia. The flow-mix systems are suitable for the direct measuring of initial rates. Two parameters - flow rate and enzyme concentration - must be optimized to get the real values of initial rates and decrease the part of solvatation effects in the total heat flow values.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.I5.022

Р.И. Дагис, А.Б. Паулюконис,
Э.Х. Сиймер

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ.

СООБЩЕНИЕ IX.

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ГИДРОЛИЗА L-ЛИЗИНАМИДА ПО ДАННЫМ ПОЛНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ КРИВЫХ

В настоящее время изучение кинетики действия ферментов приобретает все более прикладной характер. Внедрение биокаталитических процессов в практику требует точного описания хода процесса. Для определения кинетических и равновесных параметров недостаточно пользоваться различными методами линеаризации данных зависимостей начальной скорости (v_0) от начальной концентрации субстрата ($[S]_0$), взяв вместо значения соотношение $\Delta P/\Delta t$, где ΔP - количество образовавшегося продукта через отрезок времени Δt при низких значениях конверсии субстрата (X). Такой подход, несмотря на различные модификации [I], приводит к значительным ошибкам, которые зависят от степени конверсии субстрата [2], наличия ингибирования продуктами, инактивации фермента [3]. Наиболее достоверную информацию о механизме энзиматической реакции можно получить из зависимостей накопления продукта во времени, т.е. по данным полных кинетических кривых [4]. Для наиболее точного определения кинетических и равновесных параметров реакции необходимо пользоваться математическим методом, позволяющим охватить как можно более обширную схему энзиматической реакции. В настоящей работе исследована возможность применения для описания кинетики гидролиза L-лизинамида обобщенных кинетических уравнений, разработанных одним из авторов ранее [5]. Экспериментальная часть проведена термохимическим методом на микрокалориметре согласно методике, описанной в настоящем сборнике [6]. В качестве катализатора применялся частично очищенный препа-

рат L-лизинамидазы, выделенный из штама Cryptococcus species. Изучение кинетики гидролиза лизинамида весьма актуально в связи с возможностью разработки нового химико-энзиматического способа получения L-лизина.

Материалы и методы

Субстрат L-лизинамид синтезировали из L-лизина фирмы "Реанал" согласно методике [7]. Чистота L-лизинамида проверялась методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Силуфол".

Растворы субстрата и лиофилизированного препарата L-лизинамидазы (Cryptococcus species) изготовлялись в 0,05 М ТРИС·HCl буфере фирмы "Флука" (puriss. p.a.).

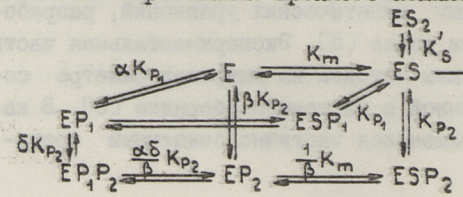
Полные кинетические кривые получили в виде зависимости выходного сигнала в микроваттах от времени на микрокалориметре ЛКБ 2277 при 25 °С, pH 7,64. Для измерений взяли 2 мл реакционной смеси, продолжительность опытов 5-15 часов. Полученные кривые трансформировали в зависимость степень конверсии субстрата - время по методике [6]. Математическая обработка результатов проводилась по разработанной нами программе "Комплект" на ЭВМ согласно опубликованной ранее методике [8] в модифицированном виде.

Математическая модель

Фермент L-лизинамидаза гидролизует L-лизинамид согласно схеме:

$$\text{L-лизинамид} + H_2O \xrightarrow{\text{фермент}} \text{L-лизин} + NH_4^+. \qquad (I)$$

Данную реакцию, как типичную гидролитическую реакцию, можно рассматривать как односубстратную (большой молярный избыток воды). Предположим, что оба продукта могут быть смешанными ингибиторами, а также субстрат может быть полным ингибитором. В этом случае модель реакции с учетом возможного образования тройного комплекса EP_1P_2 следующая:



(2)

Согласно приведенной схеме (2), константы ингибирования обозначены по-следующему:

αK_{P_1} и βK_{P_2} – константы конкурентной части ингибирования продуктами P_1 и P_2 соответственно;

K_{P_1} и K_{P_2} – константы "бесконкурентной" части ингибирования продуктами P_1 и P_2 соответственно;

K'_S – константа ингибирования субстратом.

Программа "Комплект" для ЭВМ позволяет по данным набора полных кинетических кривых (проведенных при различных концентрациях субстратов) методом наименьших квадратов найти значения предельной скорости V_m и пяти коэффициентов, характеризующих изменение скорости в реакции в ходе гидролиза – K_m (константы Михаэлиса), K'_S (константы ингибирования субстратом) и коэффициентов e , f /M^{-1}/ и g /M^{-1}/. Из них величина e является функцией констант K_m, αK_{P_1} и βK_{P_2} и, таким образом, характеризует конкурентную часть ингибирования. Величины f и g определяются влиянием образования тройных комплексов ESP_1, ESP_2, ES_2 и EP_1P_2 на скорость ферментативных реакций.

Результаты и их обсуждение

Полные кинетические кривые в форме зависимости степени конверсии субстрата (концентрации продукта) от времени сняты при следующих исходных концентрациях субстрата $[S]_0$: 0,00975 М, 0,0375 М, 0,095 М, 0,195 М, 0,39 М, 0,448 М и 0,78 М.

Найдены следующие значения кинетических коэффициентов и области их достоверности (с вероятностью 95 %):

$V_m = 18{,}5 \cdot 10^{-6} \pm 0{,}18 \cdot 10^{-6}$ мкат (при концентрации белка 1 мг/мл)

$K_m = 0{,}0168 \pm 0{,}0028$ М

$K'_S = 1{,}14 \pm 1{,}53$ М

$e = -1{,}21 \pm 0{,}12$

$f = -1{,}4 \pm 2{,}6$ M^{-1}

$g = 2{,}1 \pm 2{,}6$ M^{-1}

Среднее отклонение вычисленной продолжительности времени от наблюдаемой составляло 8,1 % и увеличивалось при высоких значениях степени конверсии. Такая погрешность может

быть удовлетворительной для эмпирического описания процесса гидролиза L-лизинамида в технологических целях в широком диапазоне концентрации субстрата.

С другой стороны, на основе проведенных экспериментов нельзя дать полную характеристику о видах ингибирования продуктами и субстратом. По всей вероятности, рассматриваемая реакция характеризуется сложной кинетикой. Возможно, что выбранная базисная модель (2) неадекватно описывает механизм протекающих реакций. С другой стороны, несмотря на использование буферных растворов, в ходе гидролиза L-лизинамида может изменяться pH растворов за счет образовавшегося иона аммония. Дополнительные исследования, в том числе комплексное исследование начальных скоростей реакции в присутствии продуктов и полных кинетических кривых, должны существенно уточнить механизм и кинетику реакции гидролиза L-лизинамида как процесса большого прикладного характера.

Литература

1. Lee H.J., Willson I.B. - Biochim. Biophys. Acta, 1971, 242, p. 519-522.

2. Karanth N.G., Srivastava A.K. - Biochim. et Biophysica Acta, 1980, p. 279-282.

3. Cornish-Bowden A. - Biochem. J.,1975, 199, p. 305-312.

4. Reprinted from: Kinetic data analysis (1981), Edit. Laszlo Endrenyi, Plenum Publishing Corporation, New York, Progress curves in enzyme kinetics: design and analysis of experiments.

5. Siimer E. Generalized rate equation for one--substrate enzymatic reactions. - Biotechnol. Bioeng., 1978, v. 20, N 12, p. 1853-1864.

6. Сиймер Э.Х., Курвитс М.А. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение УШ. Применение калориметров типа Кальве для исследования стационарной кинетики. См. наст. сб.,с. I9.

7. Общий практикум по органической химии. М., Мир, I965. 395 с.

8. С и й м е р Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение II. Определение коэффициентов обобщенного кинетического уравнения. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 15–21.

R. Dagis, A. Pauliukonis, E. Siimer

Kinetics of One-Substrate Enzymatic Reactions

Part IX

Investigation of Kinetics of L-Lysinamide Hydrolysis by the Use of Progressive Curves

Summary

Hydrolysis of L-lysinamide at 25 °C, pH 7.64 by L-lysinamidase from Cruptococcus species has been investigated by thermochemical method in ampoule cylinders of microcalorimeter LKB 2277. From the data of progressive curves obtained in large diapason of substrate concentration (0.01–0.8 M) the numeric values of characteristic kinetic coefficients have been calculated. It has been shown that the proposed model (2) is not sufficient for exact description of the mechanism and the kinetics of L-lysinamide hydrolysis.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 66.097.64

Л.М. Пикков, Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус

СКОРОСТЬ МАССОПЕРЕДАЧИ И ИНТЕНСИВНОСТЬ ЦИРКУЛЯЦИИ В ПНЕВМАТИЧЕСКИ ПЕРЕМЕШИВАЕМЫХ СУСПЕНЗИЯХ

В настоящее время расширяется изучение и внедрение биохимических реакций, протекающих на твердых катализаторах с иммобилизованными ферментами или живыми клетками. Особенности таких процессов, как сложность механизма реакции, наличие у частиц катализатора внутреннего и внешнего диффузионного сопротивления, и низкая механическая устойчивость создают специфические проблемы конструирования, моделирования и расчета реакторов. Одним из перспективных аппаратов биокаталитической технологии является реактор с барботажным перемешиванием, отличающийся высокой интенсивностью и минимальным механическим воздействием на частицы катализатора. Основной задачей барботируемого газа является создание крупномасштабных циркуляций жидкости для витания твердых частиц и ускорение внешней диффузии. В настоящей работе представлены результаты теоретического и экспериментального изучения этих двух показателей барботажного реактора.

Согласно наблюдениям, в барботажном слое образуются циркуляционные контуры или их системы, преимущественно имеющие радиус R_0, равный высоте h_0. При моделировании макроциркуляции исходят из неравномерного распределения газосодержания как источника движения [1] или из баланса энергии жидкости и газа [2]. На циркуляции масштаба аппарата наложены циркуляции меньших порядков, рассматриваемые как турбулентные пульсации, тормозящие движение более крупного масштаба. Скорость передачи энергии движения по иерархической структуре таких циркуляций до диссипации ее в теплоту является мерой турбулентности. Как показано в ряде работ [3, 4, 5], со скоростью диссипации энергии можно коррелировать внешнее диффузионное сопротивление суспендиро-

ванных частиц. Однако нередко за диссипацию упрощенно принимают расход энергии в аппарате.

Теоретический анализ процессов циркуляции в барботажном слое

Возникновение циркуляций можно рассматривать исходя из условия термодинамической стационарности [6], согласно которому процессы в неравновесных системах стремятся к состоянию с минимальным производством энтропии. Применительно к барботажному слою, условие стационарности сводится к минимуму суммарной диссипации механической энергии ϵ

$$\epsilon = \frac{P_1 + P_2}{V}, \qquad (I)$$

где P_1 – работа, совершаемая пузырьками газа при всплывании;

P_2 – работа циркулирующей жидкости против сил вязкости;

V – объем жидкости в реакторе.

Работы P_1 и P_2 выражаются

$$P_1 = Gg\rho\int_0^{\tau} U d\tau = Gg\rho\int_0^{y}\frac{U_0}{U_0+U_y}dy; \quad P_2 = 2\mu E^2, \qquad (2)$$

где G – объемный расход газа;

ρ – плотность жидкости;

U_0 – скорость всплывания пузырьков в неподвижной жидкости;

μ – эффективная вязкость жидкости;

E – тензор скоростей относительной деформации среды;

U_y – вертикальная скорость среды.

В цилиндрическом реакторе циркуляционный контур принимает вид кольца с центральным расположением восходящего потока. Поскольку сечение вихревого кольца не круглое, а деформировано стенками реактора и горизонтальной поверхностью в прямоугольную форму, на чисто вращательное движение жидкости наложены деформации, которые и определяют работу P_2. Для кольцевого вихря тензор E определяется его радиальными и вертикальными компонентами, распределения которых вытекают из этого же условия термодинамической стационарности. При заданной характерной максимальной скоро-

сти деформации ε_0, минимуму P_2 соответствует линейное распределение скоростей деформации и параболическое распределение компонентов линейной скорости.

$$\varepsilon_R = \varepsilon_0\left(1 - \frac{3}{2}\frac{R}{R_0}\right) \qquad \varepsilon_y = \varepsilon_0\left(1 - 2\frac{y}{y_0}\right) \tag{3}$$

$$U_R = \frac{\varepsilon_0}{2}\left(R - \frac{R^2}{R_0}\right) \qquad U_y = \varepsilon_0\left(y - \frac{y^2}{y_0}\right),$$

где R – радиальная координата;

R_0 – радиус реактора;

y – координата по высоте слоя;

y_0 – высота слоя.

С учетом этих распределений

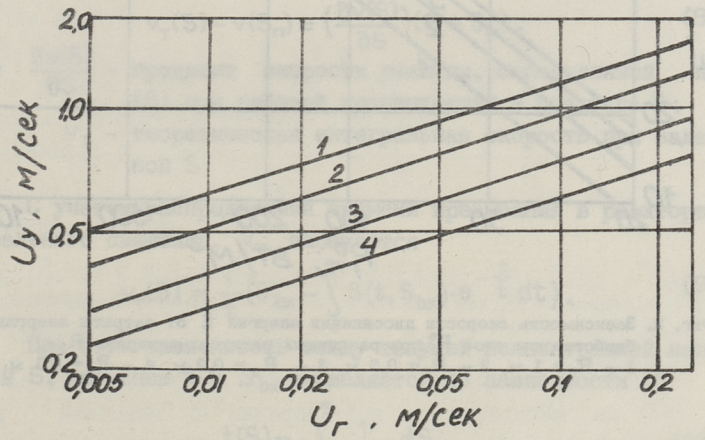
$$P_1 = G g \rho U_0\left(-\frac{2}{A}\ln\frac{A-\varepsilon_0}{A+\varepsilon_0}\right), \tag{4}$$

где

$$A = \left(\frac{4\varepsilon_0 U_0}{y_0} + \varepsilon_0^2\right)^{1/2}$$

и

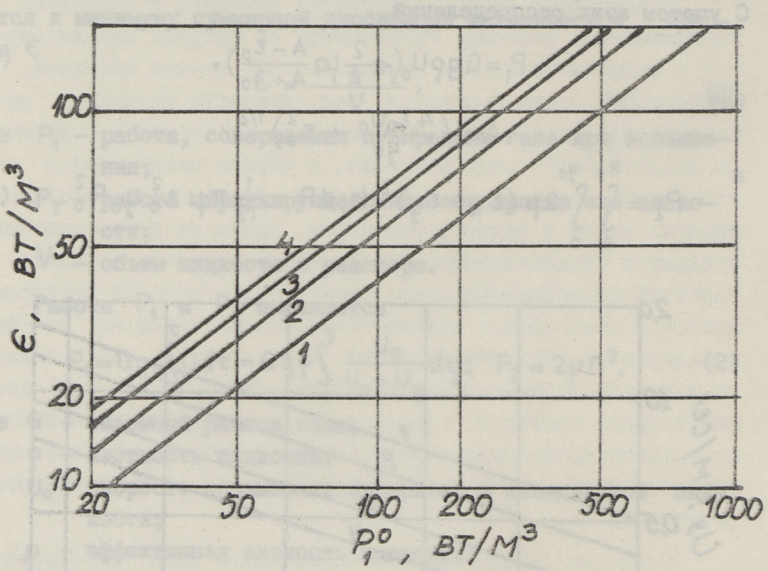
$$P_2 = \int_0^{R_0}\int_0^{y_0} 2\mu\left(\varepsilon_R + \varepsilon_y\right)^2 dy\, dR = \frac{1}{12}\pi\mu\varepsilon_0^2 y_0 R_0^2. \tag{5}$$



Фиг. 1. Зависимость максимального значения вертикальной скорости циркуляции U_y от приведенной скорости газа в барботажном слое при различных радиусах аппарата R_0. 1 – R_0 = 1 м, 2 – R_0 = 0,5 м, 3 – – R_0 = 0,2 м, 4 – R_0 = 0,1 м.

Минимум ϵ по (I) достигается при оптимальном значении ε_0, который определяет и скорость циркуляции. На фиг. I

представлены результаты расчета максимальной вертикальной скорости циркулирующей жидкости в зависимости от расхода газа при условии $y_0 = R_0$. На фиг. 2 показана зависимость стационарной скорости диссипации энергии ϵ от полной потери энергии барботируемого газа $P_1^0 = G\rho_g h_0$. Следует отметить, что доля ϵ от полной потери составляет 30–50 %. Результаты анализа по скорости диссипации были учтены при корреляции экспериментально найденных значений коэффициентов внешней массоотдачи β_L частиц катализатора в барботажном реакторе.



Фиг. 2. Зависимость скорости диссипации энергии ϵ от затраты энергии в барботажном слое P_1^0 при различных радиусах аппарата R_0.
1 – R_0 = 1 м, 2 – R_0 = 0,5 м, 3 – R_0 = 0,2 м, 4 – R_0 = 0,1 м.

Экспериментальное исследование внешней массоотдачи у частиц катализатора

Внешняя массоотдача изучалась экспериментально в барботажном реакторе непрерывного действия объемом 3 л при гидролизе лактозы в глюкозу и галактозу ферментом β-галактозидазой, иммобилизованной на зернах силохрома диаметром

0,4-0,65 мм. Скорость данной реакции была изучена ранее [7] и обобщена в виде зависимости

$$v = v(v_0, S_0, S), \qquad (6)$$

где v_0 - начальная скорость, зависящая от начальной концентрации лактозы S_0, от массы и активности катализатора;

S - текущее значение концентрации лактозы.

При определении объемного коэффициента внешней массоотдачи β_a исходили из равенства в стационарном режиме производительности реактора по лактозе, диффузионного потока к поверхности катализатора и скорости реакции.

$$\beta_a(S - S_n) = v(S_n) = \frac{1}{\bar{t}}(S_{bx} - S), \qquad (7)$$

где $\bar{t}$ - среднее время пребывания в реакторе;

S_{bx}, S, S_n - концентрации лактозы на входе в реактор, в реакторе и на поверхности катализатора соответственно.

Скачок концентрации от диффузионного сопротивления у поверхности катализатора можно определить из соотношения:

$$v_T(S) - v(S_n) = \left(\frac{\partial v(S)}{\partial S}\right)(S - S_n), \qquad (8)$$

где $\frac{\partial v(S)}{\partial S}$ - градиент скорости реакции, определенный из (6) при рабочей концентрации в реакторе S;

v_T - теоретическая интегральная скорость при заданной S.

С учетом распределения времени пребывания в реакторе идеального смешения, v_T выражается

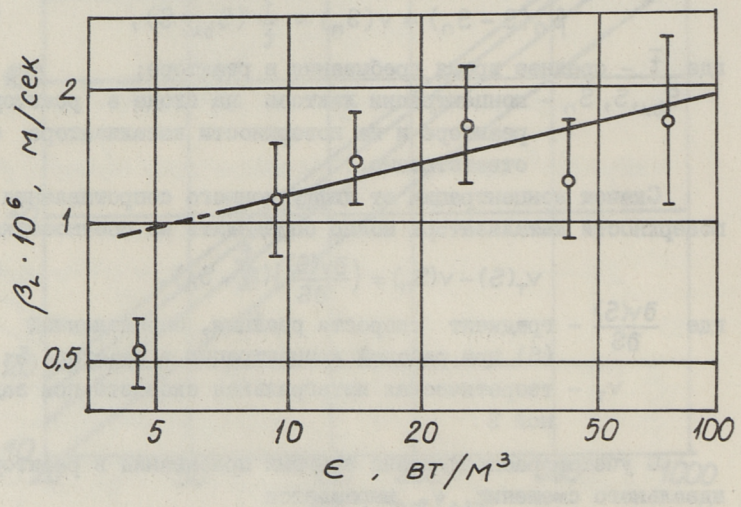
$$v_T(S) = \frac{1}{\bar{t}}\left(S_{bx} - \int_0^{\infty} S(t, S_{bx}) \cdot e^{-\frac{t}{\bar{t}}} dt\right). \qquad (9)$$

При этом зависимость между текущей концентрацией лактозы S, временем t и S_{bx} вычисляется по зависимости (6)

$$t(S) = -\int_{S_{bx}}^{S} \frac{1}{v(S)} dS. \qquad (10)$$

Экспериментальные данные для определения $v(S_n)$ по соотношению (7) и для последующего расчета скачка концентрации по (7)-(10) были получены при непрерывном режиме работы реактора с подачей раствора лактозы концентрацией от 1,38 до 4,0 % и различной степенью конверсии. При средних временах

пребывания раствора в реакторе от 6 до 10 мин. была достигнута степень конверсии от 16 до 38 %. Для перемешивания раствора применялся воздух, подаваемый в реактор со скоростью от $1 \cdot 10^{-4}$ до $2 \cdot 10^{-2}$ м/с, отнесенной на полное сечение раствора. Объемные коэффициенты внешней массопередачи β_a в таких условиях находились в пределах от 0,014 до 0,248 $мин^{-1}$, а поверхностные коэффициенты массопередачи β_L, вычисленные с учетом массы и удельной поверхности катализатора, от $0{,}5 \cdot 10^{-6}$ до $1{,}6 \cdot 10^{-6}$ м/с. Соответствующие плотности диссипации вычислялись по методике, представленной в настоящей работе.



Фиг. 3. Зависимость коэффициента внешней массоотдачи β_L от скорости диссипации энергии в аппарате ϵ. Сплошная линия – аппроксимация по уравнению (11).

Согласно анализу зависимости, представленной на фиг. 3, она не находится в противоречии с выводами работ, принимающих β_L пропорциональным плотности диссипации в степени 0,25. Исключение составляет режим со скоростью газа ниже $3{,}0 \cdot 10^{-4}$ м/с, что, однако, можно объяснить неполным витанием катализатора. При плотностях диссипации, начинающихся с 10 Вт/м³, для определения β_L можно предложить зависимость

$$\beta_L = 0{,}64 \cdot 10^{-6} \epsilon^{0{,}25}. \qquad (11)$$

При всех испытанных режимах реактора скорость газа $2 \cdot 10^{-2}$ м/с была достаточна для обеспечения производительности реактора, составляющей не менее 90 % от теоретической производительности.

Литература

I. Меньшиков В.А., Аэров М.А. Профиль газосодержания и циркуляции в барботажном слое. – Теор. основы хим. технол., 1970, т. 4, № 6, с. 875.

2. Шульц Э.З., Дильман В.В. Оценка скорости циркуляционного движения и турбулентной вязкости жидкости в барботажном слое.-Теор. основы хим. технол., 1974, т. 8, № 5, с. 790.

3. Calderbank P.H., Mao-Young M.B. The continuous phase heat and mass transfer properties of dispersion. - Chem. Eng. Sci., 1961, vol. 16, N 1-2, p. 39.

4. Sänger P., Decker W.D. Liquid-solid mass transfer in aerated suspensions. - Chem. Eng. J., 1981, vol. 22, N 3, p. 179.

5. Ермакова А., Кузьмин В.А., Скоморохов В.Б., Умбетов А.С. Исследование локального массопереноса от частицы к жидкости. - Hungarian Journal of Industrial Chemistry, 1981, v. 9, N 1, p. 99.

6. Де Гроот С., Мазур П. Неравновесная термодинамика. М., Мир, 1964, с. 49.

7. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х. и др. Гидролиз лактозы иммобилизованной β-галактозидазой.-Прикл. биохимия и микробиология, 1976, т. 12, вып. 2, с. 217.

L. Pikkov, E. Tearo, E. Uus

Mass Transfer Rate and Intensity of Circulation in Gas Mixed Suspensions

Summary

A method for calculation of outer mass transfer on the surface of catalyst granules in enzyme reactions has been elaborated.

It follows that between the mass transfer coefficients and dissipation of mechanical energy in barbotaged slayer reactor exists a certain correlation. On the basis of nonequilibrium thermodynamics a method for calculation of dissipation intensity is proposed.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 532.72:537.213:577.152

Г.Г. Калбин

ЭЛЕКТРОДИФФУЗИОННЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ В ГЕТЕРОГЕННЫХ ФЕРМЕНТАТИВНО АКТИВНЫХ СИСТЕМАХ. СООБЩЕНИЕ I. АМИДАЗЫ В МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ

Диффузионная кинетика гетерогенных ферментных систем исследована многими авторами [1]. Однако в известных подходах рассматривается лишь диффузия субстратов и продуктов и практически не обращается внимания на возможность возникновения электродиффузионных потенциалов. Последнее явление может играть существенную роль в кинетике иммобилизованных ферментов и макроскопических ферментных систем, где значительно влияние массопередачи. По теоретическим соображениям можно предположить, что диффузионные потенциалы возникают в любом случае, когда продуктом энзиматической реакции является ионогенное вещество и наблюдается диффузионное сопротивление внутри матрицы иммобилизованного фермента или на поверхности раздела между фазами. Частным случаем возникновения диффузионных потенциалов могут быть мембранные системы, в которых мембрана разделяет растворы фермента и субстрата.

Принцип возникновения электродиффузионных потенциалов в электрохимии общеизвестен. В случае диффузии электролитов средняя скорость движения любого компонента определяется молекулярной массой частицы, т.е. малые ионы движутся быстрее более массивных. С другой стороны, для сохранения условий электронейтральности поток разнозаряженных ионов должен быть сбалансирован. Это достигается за счет возникновения электродиффузионных потенциалов, которые имеют такое направление и напряженность, которые задерживают движение более легких ионов и ускоряют диффузию тяжелых ионов до достижения равновесного потока противоположно заряженных ионов. В частности, явления элек-

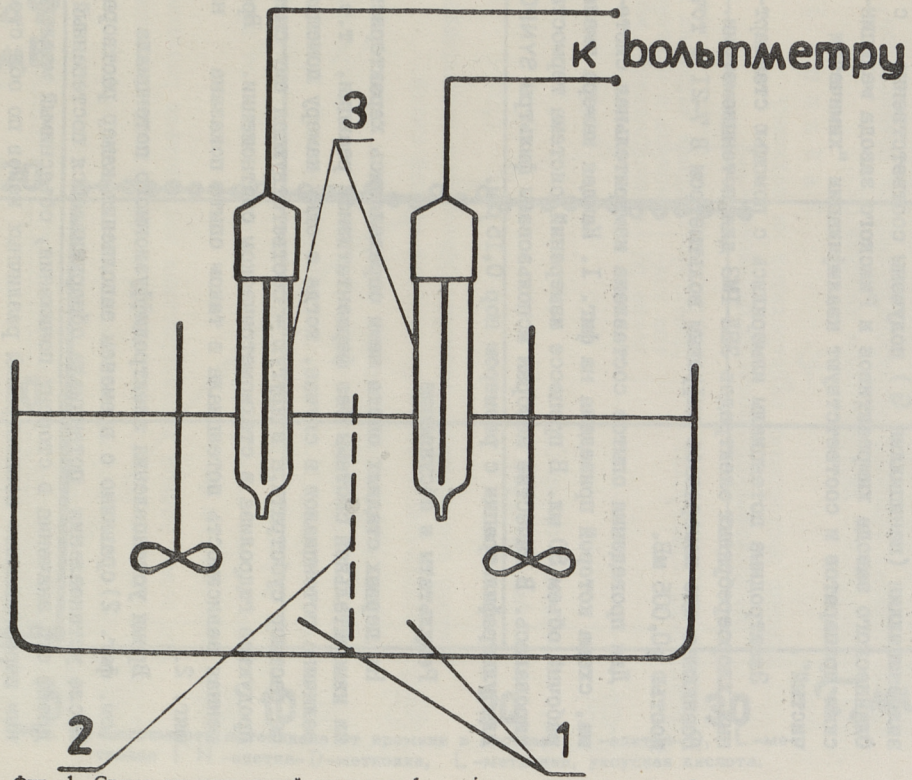
тродиффузии должны быть наиболее заметными при наличии в системе органических кислот. Диссоциация кислоты приводит к образованию сравнительно массивного органического аниона и иона водорода, имеющего аномально высокую подвижность.

В прикладной энзимологии ацидогенные ферменты имеют большое значение. Первый реализованный в мире процесс с применением иммобилизованного фермента осуществлен на основе иммобилизованной аминоацилазы, которая гидролизует N-ацильные производные аминокислот. В нашей стране с большим экономическим эффектом внедрен процесс гидролиза пенициллина под действием пенициллинамидазы. Поэтому, безусловно, изучение диффузионных потенциалов, которые возникают при действии амидаз (аминогидролаз), представляет значительный интерес.

Создана математическая модель описания диффузионной кинетики ферментов с учетом электродиффузионных потенциалов. Однако ввиду сложности основной системы дифференциальных уравнений до сих пор количественные результаты при решении данной системы не достигнуты. В рамках практической работы мы ставили своей целью экспериментальное измерение электродиффузионных потенциалов, которые могут возникнуть в ходе действия амидогидролаз. В предварительных наших опытах мы исследовали системы с пленками иммобилизованных ферментов. Однако из-за экспериментальных трудностей не было получено однозначных результатов. Поэтому на настоящем этапе мы обратили основное внимание на макроскопические системы, т.е. изучили поведение лабораторных ферментных мембранных реакторов, в которых две камеры разделены непроницаемой для ферментов мембраной. Мы предполагаем, что проведение такой экспериментальной работы поможет нам на последующих этапах охарактеризовать системы с иммобилизованными ферментами, количественно изучить условия массопередачи в таких системах, а полученные результаты могут быть применены при создании аналитических систем на основе иммобилизованных ферментов.

Материалы и методы

Аминоацилаза (N-апиламинокислота-амидогидролаза КФ 3.5.I.I4) получена с Олайнеского завода химических реактивов. Препарат имел активность 40 Е/мг.



Фиг. 1. Схема измерительной системы: 1 – камеры для растворов; 2 – мембрана; 3 – электроды.

Пенициллин-амидаза (пенициллин-амидогидролаза КФ 3.5.I.II) получена с Рижского завода медпрепаратов. Препарат, подученный из культуры E.coli, использовался в виде 25%-ного раствора с активностью 2700 Е/мл.

Препараты субстратов: N-ацетил-D, L-метионин и бензилпенициллин (пенициллин G) получены соответственно с Олайнеского завода химреактивов и Рижского завода медицинских препаратов и соответствуют квалификации "химически чистый".

Электродные потенциалы измерялись с помощью стандартных хлорсеребряных электродов ЭВЛ-1М3 для потенциометрии. Возникшая эдс измерялась цифровым вольтметром В 7-21 с точностью ±0,005 мВ.

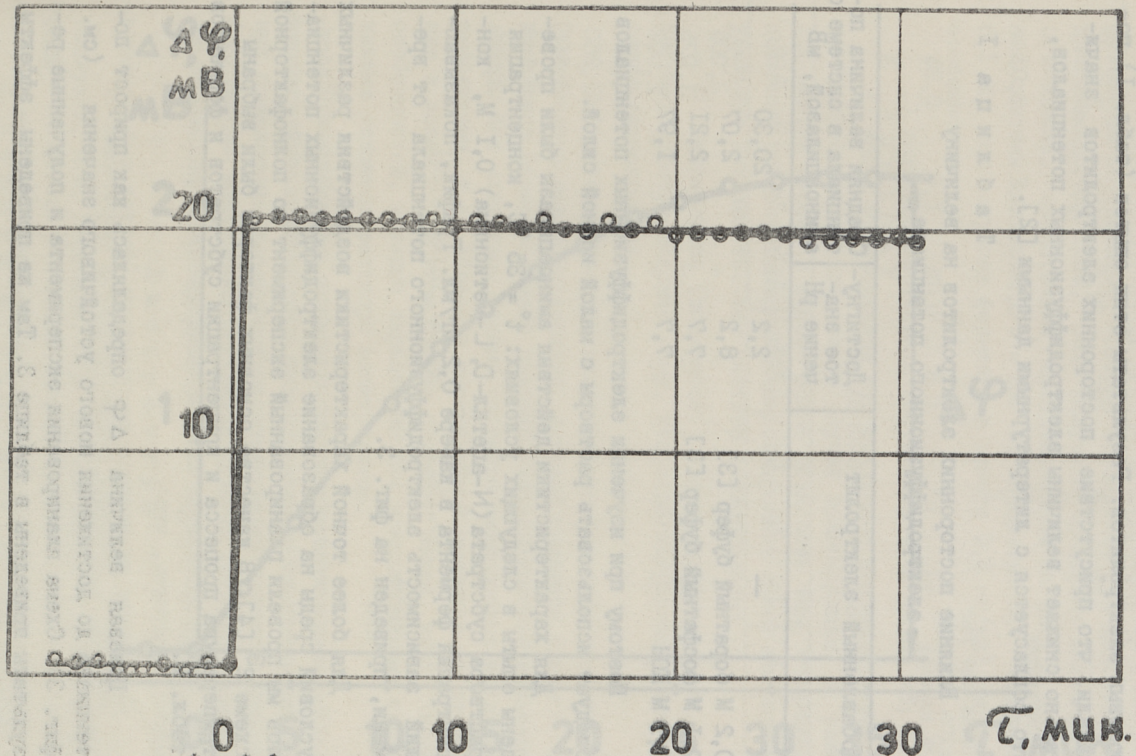
Для проведения опытов составлена измерительная система, схема которой приведена на фиг. I. Каждая камера имела рабочий объем 50 мл. В процессе измерений система термостатировалась. В качестве мембран использованы фильтры SYNPOR для ультрафильтрации с размером пор 0,15 μм.

Результаты и обсуждение

На первых стадиях опыта нами определялись характеристики измерительной системы без ферментативной реакции, т.е. величина потенциалов в случае, когда в одну камеру помещается раствор субстрата, а в другую - соответствующая ему смесь продуктов гидролиза в стехиометрическом соотношении. Временная зависимость потенциала в таком опыте показана на фиг. 2.

Время установления электродиффузионного потенциала (см. фиг. 2) сравнимо с временем заполнения камер растворами. После установления потенциала обнаруживается постепенный дрейф его значения в сторону понижения, объяснимый медленным выравниванием концентраций различных ионов по обе стороны мембран. Следовательно, в исследуемой нами системе можно ожидать образование электродиффузионных потенциалов порядка нескольких милливольт; воспроизводимость измерения составляет 0,3 мВ, дрейф - 0,5 милливольта в час.

На этой основе можно считать, что собранная нами камерная мембранная система может быть пригодной для изуче-



Фиг. 2. Зависимость потенциала от времени в системе N-ацетил-D, L-метионин | N-ацетил-D-метионин, L-метионин, уксусная кислота.

ния электродиффузионных явлений. На следующем этапе мы определяли электродиффузионные потенциалы при разных концентрациях диффундирующего вещества и при наличии различных фоновых электролитов. Результаты этих опытов (табл. I) показали, что присутствие посторонних электролитов значительно снижает величины электродиффузионных потенциалов, что согласуется с литературными данными [2].

Таблица I

Влияние посторонних электролитов на величину электродиффузионного потенциала

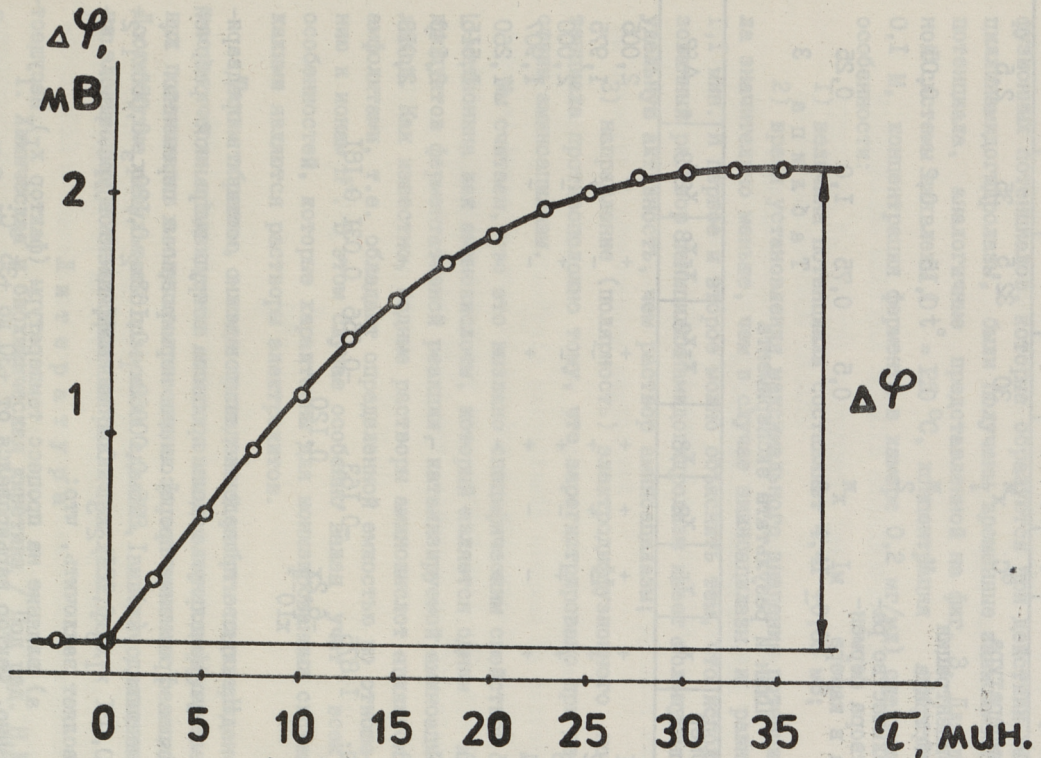
Добавленный электролит	Достигнутое значение pH	Средняя величина потенциала в системе с аминоацилазой, мВ
—	2,2	20,30
0,2 М боратный буфер [3]	8,2	2,07
0,I М фосфатный буфер [3]	7,7	2,2I
0,I М КОН	7,7	I,97

Поэтому при изучении электродиффузионных потенциалов следует использовать растворы с малой ионной силой.

Для характеристики действия аминоацилазы были проведены опыты в следующих условиях: $t^\circ = 35\ ^\circ C$, концентрация раствора субстрата (N-ацетил-D, L-метионина) 0,I М, концентрация фермента в камере 0,2 мг/мл. График, показывающий зависимость электродиффузионного потенциала от времени, приведен на фиг. 3.

Для более точной характеристики воздействия различных условий среды на образование электродиффузионных потенциалов мы провели планированный эксперимент по полнофакторной схеме 2^3 [4]. В качестве основных факторов были выбраны температура процесса и концентрации субстратов и ферментов; табл. 2.

Целевая величина $\Delta\varphi$ определялась как прирост потенциала до достижения нового устойчивого значения (см. фиг. 3). Схема планирования эксперимента и полученные результаты приведены в таблице 3. Там же приведены эффекты отдельных факторов на процесс.



Фиг. 3. Рост потенциала в системе с ферментом.

Таблица 2

Факторы и интервалы их варьирования

Факторы	Ед. изм.	Обозначение	-I	0	+I	Ед. варьирования
Температура	°С	x_1^*	30	32,5	35	2,5
Концентрация субстрата	М	x_2^*	0,I	0,I5	0,2	0,05
Количество раствора фермента в камере	мI	x_3^*	0,5	0,75	I,0	0,25

Таблица 3

План и результаты эксперимента

Номер опыта	x_0	x_1	x_2	x_3	x_1x_2	x_1x_3	x_2x_3	$\Delta\varphi$
I	+	+	+	+	+	+	+	2,005
2	+	-	+	+	-	-	+	I,975
3	+	+	-	+	-	+	-	2,000
4	+	-	-	+	+	-	-	I,907
5	+	+	+	-	+	-	-	I,260
6	+	-	+	-	-	+	-	I,5I5
7	+	+	-	-	-	-	+	2,I40
8	+	-	-	-	+	+	+	2,0I3

a_i I,875 -6,2x xI0^{-4} -0,I63 0,I20 -0,056 0,03I 0,I8I

На основе проведенных опытов можно составить предварительную локальную модель процесса вокруг выбранной рабочей точки. Уравнение процесса для нормированных переменных x_i имеет вид $y(x) = I,875-0,00062x_1-0,I63x_2+0,I20x_3-0,056x_1x_2+0,03I\,x_1x_3+0,I8Ix_2x_3$. Оценка коэффициентов уравнения позволяет заключить, что:

а) влияние на процесс температуры (фактор x_1) несущественно. Фактор варьировался от +30 до +35 °С;

б) фактор x_2 - концентрация исходного субстрата - имеет отрицательный коэффициент. Такое направление влияния можно объяснить увеличением ионной силы раствора;

в) увеличение концентрации фермента (фактор x_3) с 0,I мг/мл до 0,2 мг/мл увеличивает электродиффузионный потенциал. Очевидно, что взаимодействие x_2x_3 оказывает существенное влияние на целевую величину. При изучении электродиффузионных потенциалов, которые образуются при действии пенициллинамидогидролазы, были получены временные зависимости потенциала, аналогичные представленной на фиг. 3. Для данной системы выявлены (t° = 25 °С, концентрация субстрата 0,I М, концентрация фермента в камере 0,2 мг/мл) следующие особенности:

I) величина потенциала составляет 4,4I ±0,03 мВ;

2) время установления максимального значения потенциала значительно меньше, чем в случае аминоацилазы, и равно I,I мин. И первое и второе можно объяснить тем, что использованный раствор пенициллинамидогидролазы имеет большую удельную активность, чем раствор аминоацилазы;

3) направление (полярность) электродиффузионного потенциала противоположно тому, что зарегистрировано при действии аминоацилазы.

Мы считаем, что это вызвано специфическим свойством L-метионина как аминокислоты, который является одним из продуктов ферментативной реакции, катализируемой аминоацилазой. Как известно, водные растворы аминокислот являются амфолитами, т.е. обладают определенной емкостью по отношению к ионам H^+. В этом случае особенно важен учет всех особенностей, которые характерны для ионизированных систем, какими являются растворы электролитов.

Таким образом, в ходе проведенной работы подтверждено теоретически предвиденное возникновение электродиффузионных потенциалов в случае проведения ферментативных реакций. Достигнутые результаты позволяют сделать выводы о влиянии на электродиффузионные явления различных факторов.

Литература

I. Химическая и биохимическая кинетика / Под ред. Н.М. Эмануэля, И.В. Березина, С.Д. Варфоломеева. М., Изд-во МГУ, I983.

2. Корыта И., Дворжак И., Багачкова В. Электрохимия. М., Мир, I977.

3. Data for biochemical research. Oxford, Clarendon Press, 1959.

4. Планирование эксперимента в исследовании технологических процессов / Пер. с нем. под ред. Э.К. Лецкого. М., Мир, 1977.

G. Kalbin

Electrodiffuse Potentials in Heterogeneous Enzymatic Active Systems I

Amidases in Membraneous Systems

Summary

The mathematical model, which describes the diffuse kinetics of enzymes considering electrodiffuse potentials, is given. Electrodiffuse potentials were measured in model systems. The link between the enzymatic activity and electrodiffuse phenomena was found out.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

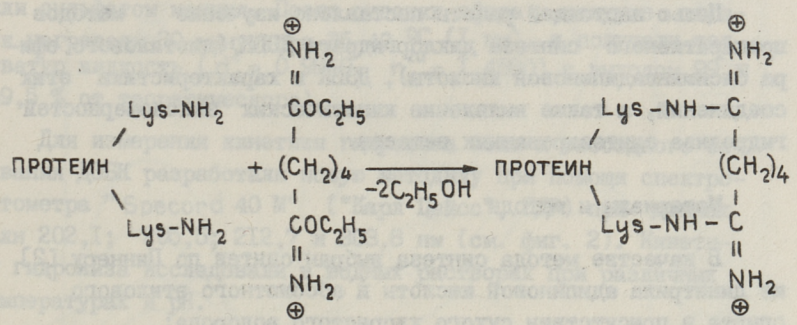
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 547.298.2:547.96

А.Я. Кяэрд

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИМИНОЭФИРАМИ.I. ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ДИЭТИЛОВОГО ЭФИРА БИСИМИНОАДИПИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Среди многих химических модификаторов белков в последнее время значительное внимание уделяется сложным эфирам иминокислот (иминоэфирам). Реакция этих соединений с первичными аминогруппами, в частности, с ε-аминогруппами лизина приводит к образованию амидинов.



Фиг. 1. Реакция диминоэфира с ε -аминогруппами лизина.

Кислотность образующихся амидинных групп (pK_A=II-I2) мало отличается от кислотности исходных ε-аминогрупп (pK_A= =I0,5) [5] и следовательно, не должна оказывать нежелательное влияние на заряд белковой глобулы. Образующиеся связи стабильны и в принципе позволяют получить стойкие внутри- и межмолекулярные конъюгаты белков. На этой основе бифункциональные иминоэфиры следует считать весьма интересными реагентами для стабилизации или иммобилизации биоактивных белков, в частности, ферментов. С этой точки зрения зна-

чительный интерес представляет бисиминоэфир адипиновой кислоты. Это вещество менее доступно в форме свободного основания.

Известно, что целевая реакция присоединения иминоэфиров к белкам осложнена возможными побочными реакциями, из которых основная побочная реакция - гидролиз [3]:

$$R^1C(=NH_2Cl)OR^2 + H_2O \xrightarrow{pH>7} R^1COOR^2 + NH_4Cl$$

$$R^1C(=NH_2Cl)OR^2 + H_2O \xrightarrow{pH<7} R^1\overset{O}{\overset{\|}{C}}-NH_2 + R^2OH + HCl$$

$$R^1C(=NH)OR^2 + 2H_2O \longrightarrow R^1COONH_4 + R^2OH$$

Для подбора и оптимизации условий модификации белковых веществ иминоэфирами необходимо дать количественную кинетическую характеристику возможным параллельным реакциям [6]. Для проведения соответствующей экспериментальной работы требуются препараты дихлоргидрата ДЭБК и ДЭБК, которые в Советском Союзе не производятся.

Целью настоящей работы поставлено изучение методов препаративного синтеза дихлоргидрата ДЭБК (диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты), ДЭБК и характеристика этих соединений, а также выявление кинетических закономерностей гидролиза синтезированных веществ.

Материалы и методы

В качестве метода синтеза выбран синтез по Пиннеру [2] из динитрила адипиновой кислоты и абсолютного этилового спирта в присутствии сухого хлористого водорода:

$$N\equiv C-(CH_2)_4-C\equiv N \xrightarrow{+2C_2H_5OH;+2HCl} Cl^{\ominus}\ \overset{\oplus}{H_2N}=\underset{H_5C_2O}{\overset{/}{C}}-(CH_2)_4-\underset{OC_2H_5}{\overset{\backslash}{C}}=\overset{\oplus}{NH_2}\ Cl^{\ominus}$$

Этот метод, с высоким выходом, выгодно отличается от других известных методов синтеза: присоединение спиртов к нитрилам, катализируемое основаниями, присоединение спиртов к кетениминам и к изоцианидам [4].

Для проведения синтеза дихлоргидрата ДЭБК (диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты) использовали специальную аппаратуру при строгой изоляции от влаги. Динитрил ади-

пиновой кислоты (I0,80 г) и этиловый спирт в соотношении I:I смешивали с диоксаном (растворитель), после чего через полученный раствор при температуре 0 °С пропускали сухой хлористый водород до образования белого кристаллического осадка. Осадок фильтровали и промывали смесью абсолютного этанола и абсолютного диэтилового эфира (I:2). Для очистки осадок переосаждали абсолютным эфиром из ледяной уксусной кислоты. Выход дихлоргидрата ДЭБК ($C_{10}H_{22}Cl_2N_2O_2$) 26,49 г (96–98 % от теоретического).

Выбран следующий метод [I] для получения свободного основания ($C_{10}H_{20}N_2O_2$): 200 мл 40% водного раствора углекислого калия и I50 мл эфира помещали в делительную воронку и при ~0 °С добавляли 68,69 г (0,25 г.-мол.) дихлоргидрата ДЭБК. Смесь встряхивали несколько минут при 2–3 °С, водный слой отделяли и выливали в I00 мл охлажденного до 0 °С эфира, а эфирный слой сливали в колбу, содержащую углекислый калий. Водный слой экстрагировали эфиром при 2 – 3 °С еще 3 раза, объединенные вытяжки промывали водой и сушили сульфатом магния. После отгонки эфира в вакууме остаток нагревали 30 минут при 35–40 °С (I мм), и получали желтоватую жидкость (d_4^{20} = 0.9869, n_D^{20} = I.4580) с выходом 99 г (49,5 % от теоретического).

Для измерения кинетики гидролиза соли и свободного основания ДЭБК разработали новую методику при помощи спектрофотометра "Specord 40 M" ("Карл Цейсс", ГДР) при длинах волн 202,I; 205,5; 2I2,7 и 303,8 нм (см. фиг. 2). Кинетику гидролиза исследовали в водных растворах при различных температурах и pH.

Состав соли и свободного основания ДЭБК подтверждали данными элементарного анализа, который проводили в Институте химии АН ЭССР на приборе "Carlo Erba" (Италия).

$C_{I0}H_{22}Cl_2N_2O_2$

найдено %: C 44.03, H 8.06, Cl 25.77, N I0.I2,

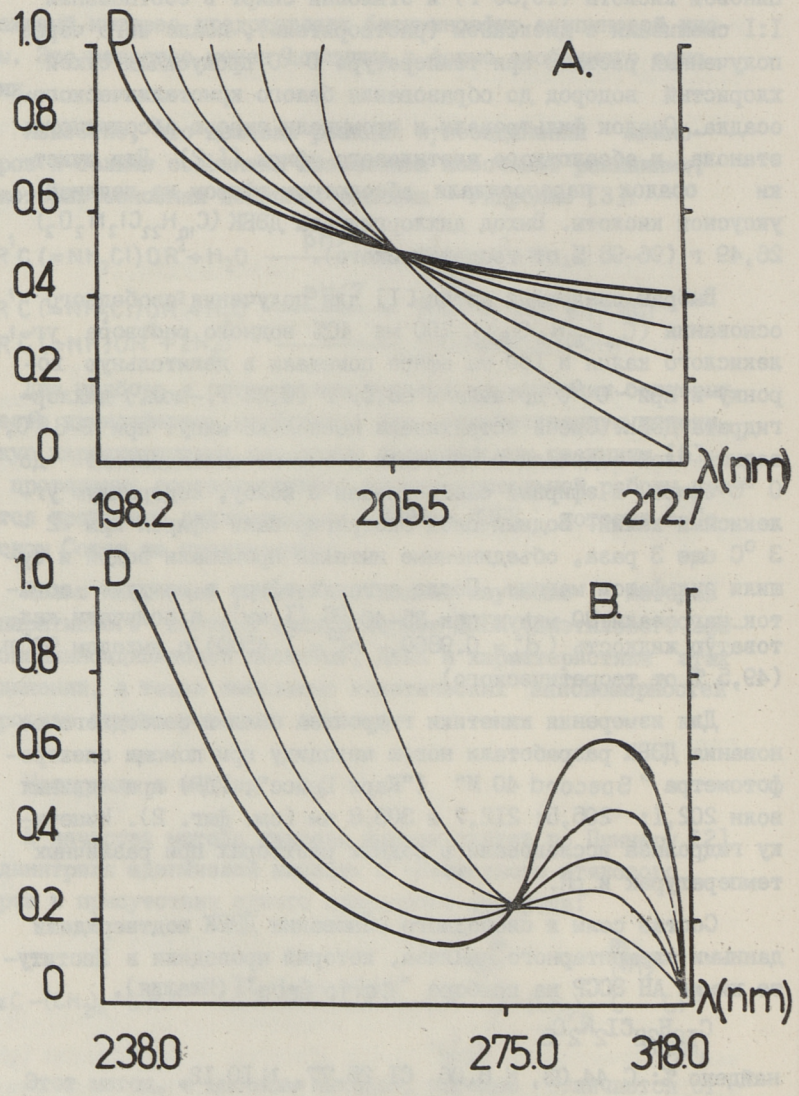
вычислено %: C 43.96, H 8.I2, Cl 25.96, N I0.26.

$C_{10}H_{20}N_2O_2$

найдено %: C 59.66, H 9.9I, N I3.68,

вычислено %: C 59.69, H I0.07, N I3.99.

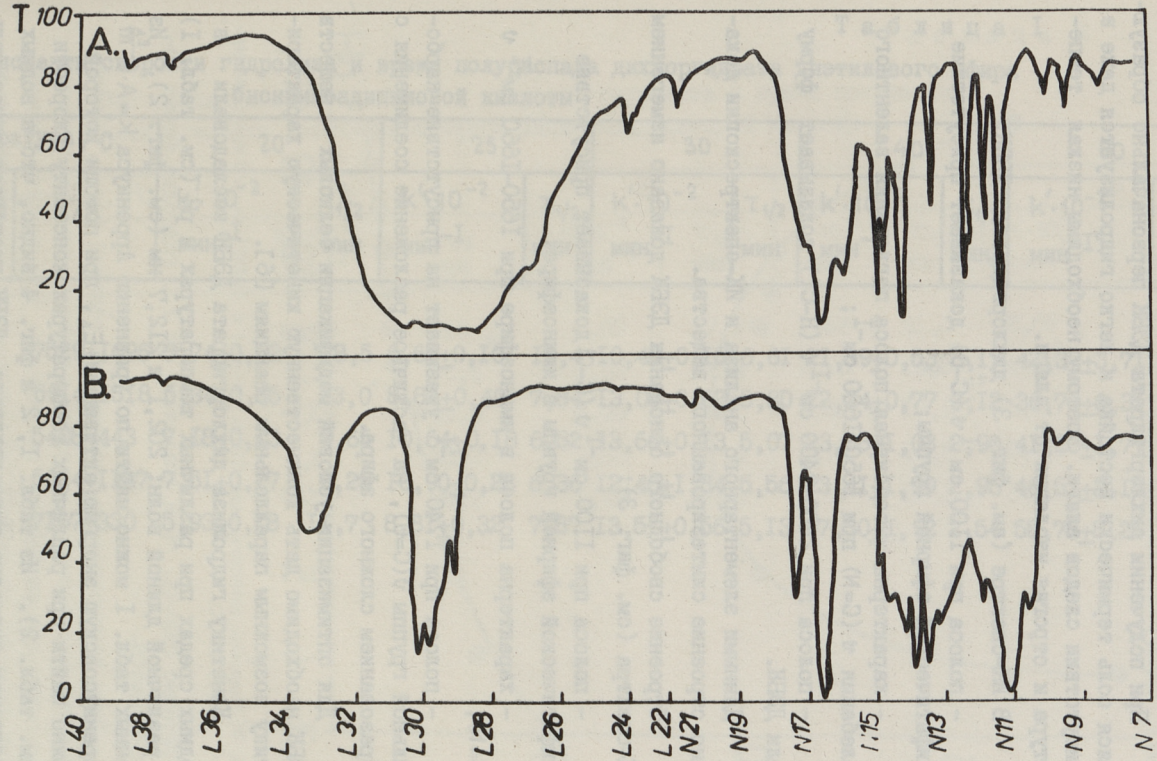
Строение дихлоргидрата ДЭБК и ДЭБК подтверждали измерением ИК-спектров (см. фиг. 3). ИК-спектры снимали в



Фиг. 2. УФ-спектры А – дихлоргидрата ДЭБК и В – ДЭБК в водных растворах.

проблемной лаборатории сланцехимического синтеза на приборе UR 20 ("Карл Цейсс", ГДР).

Кинетические данные опытов обрабатывались на микро-ЭВМ, используя формулу $\ln|\mathfrak{D}_\infty - \mathfrak{D}| = -k \cdot t + B$ и метод наименьших квадратов. Пределы достоверности рассчитаны с вероятностью 0,95.



Фиг. 3. ИК-спектры А - дихлоргидрата ДЭБК и В - ДЭБК в пленке.

Результаты и обсуждение

При получении дихлоргидрата ДЭБК первоначально образующаяся соль термически нестойка и легко гидролизуется даже в присутствии следов влаги. Поэтому необходимы низкая температура и строгая изоляция от влаги.

В ИК-спектре (см. фиг. 3) дихлоргидрата ДЭБК:

- полоса при 1100 $см^{-1}$ ν (C-O) доказывает присутствие алифатической эфирной группы;

- характерна интенсивная полоса поглощения валентного колебания ν (C=N) при 1650-1660 $см^{-1}$;

- полоса при 2400-3400 $см^{-1}$ ν (H-Cl) доказывает форму соли ДЭБК.

Данными элементарного анализа и ИК-спектроскопии доказано строение синтезированного вещества.

Строение свободного основания ДЭБК доказано измерением ИК-спектра (см. фиг. 3):

- полоса при 1100 $см^{-1}$ ν (C-O) доказывает присутствие алифатической эфирной группы в иминоэфире;

- характерна полоса в иминоэфире при 1650-1660 $см^{-1}$ ν (C=N);

- полоса при 1740 $см^{-1}$ указывает на присутствие карбонильной группы ν(C=O), на частичное разложение соединения с образованием сложного эфира.

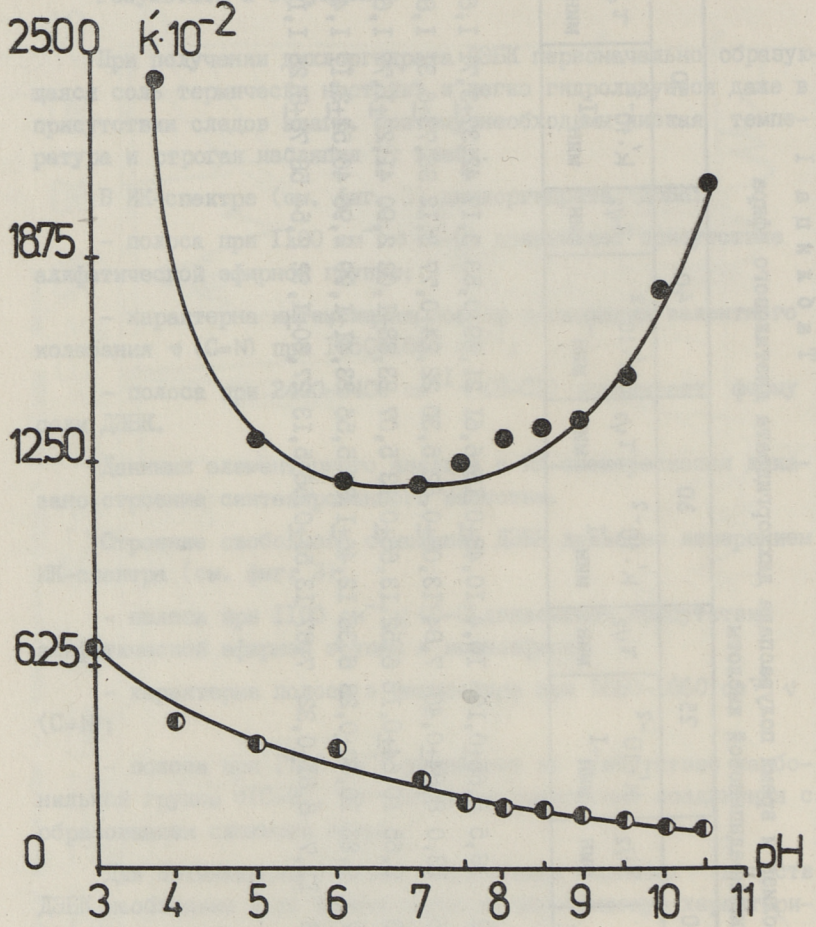
Для оптимизации условий модификации белковых веществ ДЭБК необходимо дать количественную кинетическую характеристику возможным параллельным реакциям [6].

Кинетику гидролиза дихлоргидрата ДЭБК исследовали в водных средах при различных температурах и pH (см. табл. 1) с различной длиной волн: 202,1 и 212,7 нм (см. фиг. 2). Из данных табл. 1 можно найти по уравнению Аррениуса $k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$ аррениусовскую энергию активации E_A, при помощи которой можно найти при различных температурах константу скорости (см. табл. 2). Из табл. 1, 2 и фиг. 4 видно, что в водных растворах гидролиз дихлоргидрата ДЭБК протекает относительно быстро. Температурная зависимость гидролиза формы соли

Таблица I

Константы скорости гидролиза и время полураспада дихлоргидрата диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты

Температура, °С		20		25		30		40		50	
pH	E/R	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-1}$	$\tau_{1/2}$ мин	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-1}$	$\tau_{1/2}$ мин	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-1}$	$\tau_{1/2}$ мин	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-1}$	$\tau_{1/2}$ мин	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-1}$	$\tau_{1/2}$ мин
7,0	7529±1096	3,74±0,02	18,5	6,65±0,10	10,4	10,48±0,15	6,61	21,89±0,53	3,17	42,37±3,71	1,64
7,5	5914±1318	5,34±0,05	13,0	8,84±0,40	7,84	13,08±0,62	5,30	22,24±0,77	3,12	36,73±6,31	1,89
8,0	5408±443	7,18±0,13	9,65	10,64±0,18	6,52	13,66±0,13	5,07	23,88±1,03	2,90	41,23±1,77	1,68
8,5	5624±1147	7,51±0,17	9,23	10,90±0,28	6,36	12,46±1,34	5,56	23,41±1,99	2,96	46,51±2,17	1,49
9,0	7167±330	5,93±0,18	11,7	8,81±0,32	7,87	13,51±0,56	5,13	27,30±1,92	2,54	58,78±8,25	1,18



Фиг. 4. Гидролиз дихлоргидрата ДЭБК (-●—●-) и ДЭБК (-○—○-) при температуре 30 °С.

достаточно сильна. При значении pH 7,0 гидролиз формы соли минимален.

Зная температурную зависимость солевой формы, можем полагать, что примерно такая же температурная зависимость характерна для свободного основания: при высоких температурах скорость гидролиза увеличивается, при низких температурах - уменьшается. Поэтому исследовали только pH-зависимость гидролиза у свободного основания. Кинетику гидроли-

Таблица 2

Экстраполированные константы скорости гидролиза и время полураспада дихлоргидрата диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты

Температура, °С	0		5		I0		I5	
pH	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-I}$	$\tau_{1/2}$ мин	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-I}$	$\tau_{1/2}$ мин	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-I}$	$\tau_{1/2}$ мин	$k' \cdot 10^{-2}$ мин$^{-I}$	$\tau_{1/2}$ мин
7,0	0,63	II0	I,03	67,3	I,67	4I,5	2,65	26,2
7,5	I,37	50,6	2,03	34,2	2,95	23,5	4,24	I6,4
8,0	I,93	35,9	2,75	25,2	3,88	I7,9	5,40	I2,8
8,5	I,8I	38,3	2,53	27,4	3,75	I8,5	5,26	I3,2
9,0	0,96	72,2	I,48	46,8	2,45	28,3	3,77	I8,4

за ДЭБК исследовали в водных средах при различных pH на длинах волн 258,0 и 303,8 нм (см. фиг. 4). Из полученных данных видно, что при повышении pH гидролиз ДЭБК уменьшается.

Выводы

При модификации белковых веществ иминоэфирами возможные параллельные реакции минимальны при низких температурах (низкий предел температуры 0 °С). У дихлоргидрата ДЭБК гидролиз минимален при значении pH 7,0, а у ДЭБК уменьшается с повышением pH. При таких условиях рекомендуется проводить модификацию белковых веществ данными препаратами.

Автор выражает искреннюю благодарность Р. Соосалу за помощь при выполнении элементарного анализа и Х. Липпма за помощь при снятии ИК-спектров.

Работа выполнена под руководством А.И. Кёстнера.

Литература

1. Зайцева Е.Л., Якубович А.Я., Браз Г.И., Базов В.Т. Об эфирах бисиминоадипиновой и -терефталевой кислот. - Журнал общей химии, 1964, т. 34, № II, с. 3709-3713.

2. Pinner A. Die Imidoäther und ihre Derivate. Robert Oppenheim (Gustav Schmidt), Berlin, 1892. 308 S.

3. Irman J.K., Perham R.N., DuBois G.C., Appelda E. Amidination. - Methods in Enzymology, 1983, vol. 91, p. 559-570.

4. Общая органическая химия. III / Под ред. акад. Н.К. Кочеткова. М., Химия, 1982, с. 601-607.

5. Makoff A.J., Malcolm A.D.B. Properties of methyl acetimidate and its use as a protein-modifying reagent. - Biochem. J., 1981, vol. 193, p. 245-249.

6. Кяэрд А.Я., Таммерайд И.И. Модификация белковых веществ иминоэфирами II. Математическая модель кинетики процесса. См. наст. сб., с. 67.

A. Kaard

Modification of Proteins with Iminoethers I

Production and Properties of Diethyl Ether of Bis-Imino-Adipic Acid

Summary

Diethyl ether of bis-imino-adipic acid has been synthesized from adipic nitrile as salt and free base.

Kinetics hydrolysis of diethyl ether of bis-imino-adipic acid in water has been studied by means of the spectrophotometric method.

The dependence between kinetic characteristics and conditions of hydrolysis has been established.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 547.298:547.96.001

А.Я. Кяэрд, И.И. Таммерайд

МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИМИНОЭФИРАМИ. II. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КИНЕТИКИ ПРОЦЕССА

Значение иминоэфиров в качестве модификаторов ферментов обсуждено в нашем предыдущем сообщении [1]. Там же показано, что иминоэфиры сравнительно быстро гидролизуются и следовательно, теряют способность модифицировать первичные аминогруппы в белках.

Возможность применения разлагающего модификатора зависит от отношения скоростей целевой реакции и непродуктивного процесса разложения модификатора. То же условие важно учитывать при использовании в качестве модификатора ангидридов и галогенангидридов кислот и многих других химических модификаторов. С целью количественного описания процесса взаимодействия гидролизуемого модификатора в водной среде необходимо разработать соответствующую математическую модель и создать алгоритмы и программы для достоверного расчета характерных кинетических констант. В нижеследующем нами предложен общий теоретический подход для решения подобных задач. Для проверки созданной общей модели и выявления целесообразности применения диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты (ДЭБК) в солевой форме для модификации белковых веществ в водной среде нами выбрана в качестве модельного объекта модификации аминокислота L-β-аланин. Мы полагаем, что применение однородного субстрата более целесообразно, чем изучение кинетики модификации белковых макромолекул, которые содержат множество разных центров модификации.

Теоретическая часть

Рассмотрим систему из двух параллельных реакций. Обозначим концентрацию одной реагирующей группы модификатора

(ДЭБК) через C_1, концентрацию аминогрупп через C_2. Принимаем, что значения C_2 могут быть определены экспериментально в любой момент времени, значения C_1 непосредственно нельзя определить и нам доступно только исходное значение C_{10} при $t = 0$.

В общей форме система будет описана дифференциальными уравнениями.

$$\begin{cases} -\frac{dC_1}{dt} = f_1(C_1) + f_2(C_1, C_2) \\ -\frac{dC_2}{dt} = f_2(C_1, C_2) \end{cases} \qquad (I)$$

$f_1(C_1)$ - представляет собой скорость реакции гидролиза, которая принимается независимой от концентрации, C_2;

$f_2(C_1 C_2)$ - описывает скорость модификации.

Наиболее естественно принять, что скорость гидролиза описывается уравнением первого порядка, т.е.

$$f_1(C_1) \equiv k_1 \cdot C_1. \qquad (2)$$

Однако некоторые наши опыты показали отклонения от этого простейшего уравнения. Поэтому в качестве более общего выражения выбрано уравнение

$$f_1(C_1) \equiv k_1 \cdot C_1^{\alpha}, \qquad (3)$$

которое содержит произвольный показатель α. Это уравнение носит в некотором смысле формальный характер и показателю α трудно дать однозначное физическое описание.

Для описания реакции модификации принимается естественное уравнение второго порядка.

$$f_2(C_1, C_2) \equiv k_2 \cdot C_1 \cdot C_2. \qquad (4)$$

Из системы (I), учитывая (3) и (4), получаем

$$\frac{dC_2}{dC_1} = \frac{k_2 \cdot C_1 \cdot C_2}{k_1 \cdot C_1^{\alpha} + k_2 \cdot C_1 \cdot C_2}. \qquad (5)$$

В условиях гидролиза $k_1 > 0$ и из (5) получается

$$\frac{dC_2}{dC_1} = \frac{\beta \cdot C_1 \cdot C_2}{C_1^{\alpha} + \beta \cdot C_1 \cdot C_2}, \qquad (6)$$

где β представляет собой отношение $\frac{k_2}{k_1}$ с размерностью обратной концентрации.

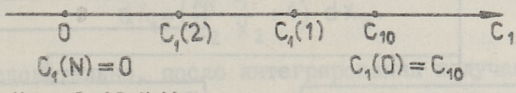
Уравнение (6) надо решить при начальном условии

$$C_2\Big|_{C_1=C_{10}} = C_{20}. \qquad (7)$$

Взяв от общих сторон уравнения (6) производную по C_1 (C_2 рассматривается как функция от C_1), получаем

$$\frac{d^2C_2}{dC_1^2} = \frac{\beta\cdot C^{\alpha}}{(C_1^{\alpha}+\beta\cdot C_1\cdot C_2)^2}\cdot\left[C_1\cdot\frac{dC_2}{dC_1}+(1-\alpha)\cdot C_2\right]. \qquad (8)$$

Делим отрезок $[0, C_{10}]$ на N равных частей (можно произвести и неравномерное деление). От конца C_{10} отрезка $[0, C_{10}]$ двигаемая в сторону начала отрезка с отрицательным шагом $h=(0-C_{10})/N$. Выбираем на оси C_1 следующее обозначение узлов



и пусть $C_2(k)=C_2(C_1(k))$,

$$\frac{dC_2}{dC_1}(k)=\frac{dC_2}{dC_1}\Big|_{\substack{C_1=C_1(k)\\C_2=C_2(k)}} \quad \text{и} \quad \frac{d^2C_2}{dC_1^2}(k)=\frac{d^2C_2}{dC_1^2}\Big|_{\substack{C_1=C_1(k)\\C_2=C_2(k)}}$$

Используем для расчета величины $C_2(k+1)$ многочлен Тейлора второго порядка

$$C_2(k+1)\approx C_2(k)+h\frac{dC_2}{dC_1}(k)+\frac{h^2}{2}\frac{d^2C_2}{dC_1^2}(k)$$

с погрешностью

$$\frac{h^3}{6}\cdot\frac{d^3C_2}{dC_1^3}(C_1(k)+\Theta(C_1(k+1)-C_1(k))).$$

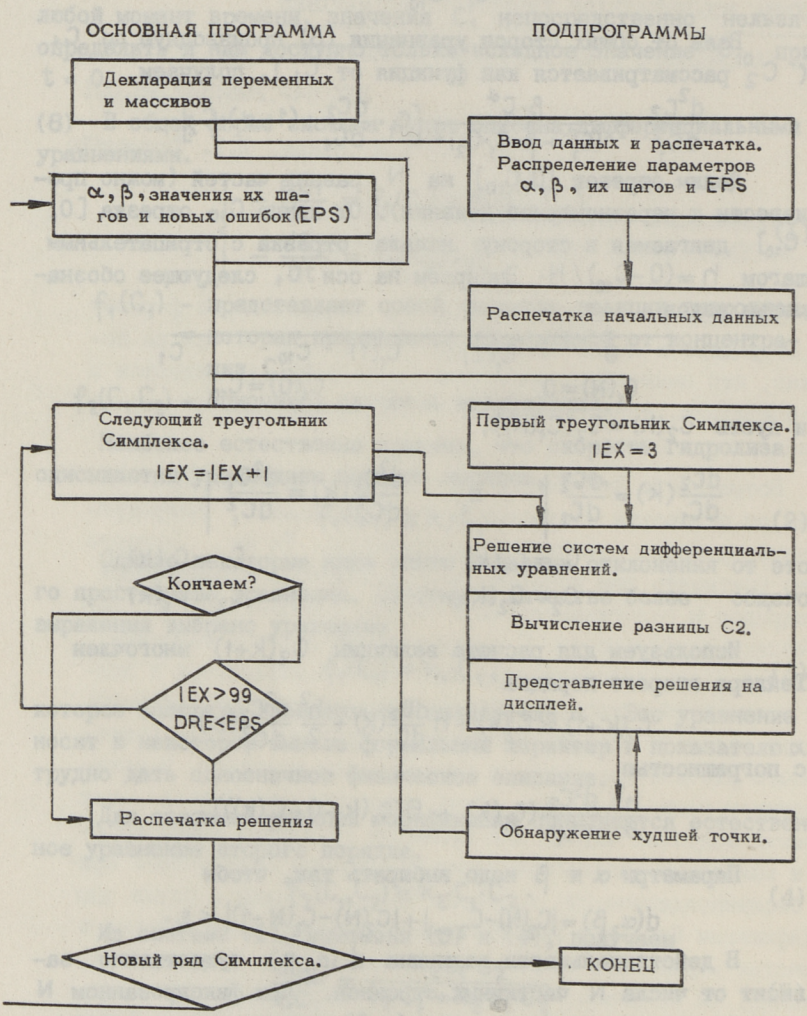
Параметры α и β надо выбирать так, чтобы

$$d(\alpha,\beta)=|C_2(N)-C_{2\infty}|+|C_2(N)-C_2(N-1)|<\varepsilon.$$

В действительности величина $d(\alpha,\beta)$ существенно зависит от числа N частичных отрезков. При фиксированном N надо при помощи вариации точки (α,β) минимизировать величину $d(\alpha,\beta)$.

Для выработанной математической модели составлена программа для расчета соотношения констант скоростей реакций, блок-схема которой изображена на фиг. I.

Рассмотрим один вариант из общей системы, где реакция разложения модификатора первого порядка и реакция амидиро-



Фиг. 1. Блок-схема программы для расчета кинетики реакции амидирования.

вания второго порядка. Получим, что

$$\begin{cases} -\frac{dX_1}{dt} = k_1 \cdot X_1 + k_2 \cdot X_1 \cdot X_2 \\ -\frac{dX_2}{dt} = k_2 \cdot X_1 \cdot X_2 . \end{cases} \qquad (9)$$

Для решения данной системы при начальных условиях $X_1(t_0) = X_{01}$, $X_2(t_0) = X_{02}$ разделим первое уравнение на второе. Получим, что

$$\frac{dX_1}{dX_2} = \frac{k_1 + k_2 \cdot X_2}{k_2 \cdot X_2} \qquad (10)$$

и

$$dX_1 = \left(\frac{k_1}{k_2} \cdot \frac{1}{X_2} + 1\right) \cdot dX_2 . \qquad (11)$$

Следовательно, после интегрирования получаем, что

$$X_1 = \frac{k_1}{k_2} \cdot \ln X_2 + X_2 + C_1 . \qquad (12)$$

Постоянная C_1 определяется из начального условия. Имеем, что

$$C_1 = X_{01} - X_{02} - \frac{k_1}{k_2} \ln X_{02} . \qquad (13)$$

Подставим полученное выражение для X_1 во второе уравнение системы (9). Имеем, что

$$-\frac{dX_2}{dt} = k_2 X_2 \left(\frac{k_1}{k_2} \ln X_2 + X_2 + C_1\right) . \qquad (14)$$

Подставим выражение (13) величины C_1 в уравнение (14), получаем, что

$$-\frac{dX_2}{dt} = k_2 X_2 \left(\frac{k_1}{k_2} \ln X_2 + X_2 + X_{01} - X_{02} - \frac{k_1}{k_2} \ln X_{02}\right) \qquad (15)$$

и

$$-\frac{dX_2}{dt} = k_2 X_2 \left(\frac{k_1}{k_2} \ln \frac{X_2}{X_{02}} + X_2 + X_{01} - X_{02}\right) .$$

Исследуем систему модифицирования в конечном состоянии (время реакции равно бесконечности), когда скорость реакции равна нулю: $t = \infty$ и $\frac{dX_2}{dt} = 0$.

Зная еще, что $k_2 \cdot X_2 \neq 0$, имеем $\frac{k_1}{k_2} \ln \frac{X_2}{X_{02}} + X_2 + X_{01} - X_{02} = 0$

и

$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{X_{02} - X_{01} - X_2}{\ln \frac{X_2}{X_{02}}} , \qquad (16)$$

где k_1 - константа скорости гидролиза;

k_2 - константа скорости амидирования;

X_{02} - начальная концентрация модифицирующего агента;

X_{01} – начальная концентрация сшивающего агента;
X_2 – конечная концентрация модифицирующего агента (нереагировавший модифицирующий агент).

Материалы и методы

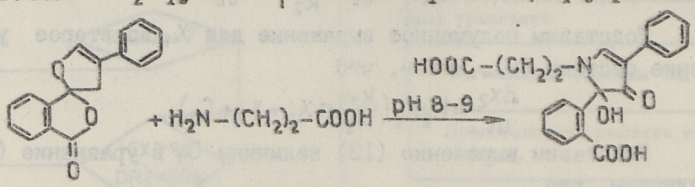
Модельным объектом модификации выбрали L-β-аланин ("Reanal" Венгрия).

Модификацию L-β-аланина проводили дихлоргидратом ДЭБК (диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты), который синтезировали в нашей лаборатории [I].

Флуорескамин получен от Экспериментального завода Института органического синтеза АН Латвийской ССР.

Флуоресценцию измеряли на спектроколориметре "Specol" ("Карл Цейсс", ГДР), снабженном флуориметрической приставкой.

Глубину модифицирования определяли по концентрации остаточных NH_2-групп L-β-аланина при помощи флуорескамина.



Фиг. 2. Реакция флуорескамина с NH_2-группами L-β-аланина.

Флуоресценция измерялась при 405 нм. Для определения NH_2-групп построили калибровочный график по L-β-аланину. К 2,0 мл разведенного раствора L-β-аланина с pH 8.0 (боратный буфер) прибавляли 0,I мл флуорескамина (I,9 мг/мл) в ацетоне.

Модифицирование L-β-аланина с дихлоргидратом ДЭБК проводили в пределах температур 2,5-50 °С и в пределах pH 7,0-9,0 (в боратном буфере). Соль иминоэфира брали в избытке сравнивая с L-β-аланином (разные количества соли иминоэфира до полного реагирования L-β-аланина). При каждом количестве данной соли, взятой для реакции амидирования, определяли остаточную концентрацию NH_2-групп с флуорескамином. Зная еще начальную концентрацию L-β-аланина, определяли отношение констант скоростей.

Кинетические данные опытов обрабатывались на микро-ЭВМ, используя метод наименьших квадратов. Пределы достоверности рассчитывали с вероятностью 0,95.

Результаты и обсуждение

Для выяснения конкретных условий проведения реакции флуорескамина с NH_2-группами нами изучалось влияние длины волны (λ) возбуждения на интенсивность флуоресценции. В качестве модельного вещества использовался L-β-аланин. pH раствора во всех опытах приводили к значению pH = 9,0 (реакция между флуорескамином и NH_2-группами проводится при pH = 8,5-9,5). Предпочтительной длиной волны возбуждения при измерении флуоресценции следует считать $\lambda_{возб}$ =405 нм. При таких условиях опыта наблюдалась прямолинейная зависимость между интенсивностью флуоресценции F и содержанием NH_2-групп в пределах концентрации 0,1-1,4 мкг NH_2/мл. В определениях остаточных NH_2-групп мы вычитали фон, появление которого обусловлено разложением модификатора, после чего полученные данные сравнивали с калибровочной кривой L-β-аланина.

Изученный нами флуоресцентный метод для определения глубины модифицирования на основе непрореагировавших NH_2-групп отличается простотой, быстротой выполнения и точностью результатов. Это делает его особенно пригодным для массовых определений содержания NH_2-групп в пробах.

Для вычисления соотношений между константами скорости реакции амидирования и гидролиза мы определяли остаточную концентрацию L-β-аланина флуоресцентным методом. Зная кроме того начальную концентрацию L-β-аланина и дихлоргидрата ДЭБК, мы вычисляли соответствующие отношения констант скоростей (см. табл. 1) в пределах температур 2,5-50 °С и pH 7,0-9,0. Константы скорости гидролиза дихлоргидрата ДЭБК нами определены предварительно [1]. Зная отношения констант скоростей и констант гидролиза, мы вычисляли константы реакции амидирования (см. табл. 2). Реакция амидирования имеет большую энергию активации и эту реакцию, следовательно, можно провести при повышенных температурах. pH-зависимость гораздо сложнее: при низких температурах (0-30 °С) имеет оптимум в пределах pH 8,0-8,5, а при высоких

Таблица I

Отношения констант скоростей дихлоргидрата диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты [M^{-1}]

Температура, °С	2,5		20		30	
pH	β	$\frac{1}{K}$	β	$\frac{1}{K}$	β	$\frac{1}{K}$
7,0	7,90 ±0,5I	9,0I ±I,I9	I0,26 ±2,05	I2,57 ±3,05	8,92 ±0,83	I0,60 ±I,93
7,5	8,97 ±I,I4	9,I6 ±I,43	6,95 ±0,20	8,53 ±I,60	8,I7 ±0,98	7,80 ±I,I7
8,0	8,75 ±0,99	I0,9I ±2,76	9,40 ±I,5I	II,25 ±2,78	7,27 ±0,57	8,35 ±I,98
8,5	7,03 ±0,07	7,I9 ±0,20	II,70 ±I,9I	I3,62 ±I,90	6,85 ±0,65	7,04 ±0,49
9,0	II,73 ±2,52	I3,49 ±2,98	II,40 ±4,06	I6,I5 ±4,67	20,57 ±5,I0	28,65 ±7,07

Температура, °С	40		50	
pH	β	$\frac{1}{K}$	β	$\frac{1}{K}$
7,0	I0,97 ±2,48	I2,2I ±3,I7	I0,74 ±I,49	I2,75 ±2,8I
7,5	7,02 ±0,02	7,62 ±0,82	8,75 ±0,98	9,97 ±I,76
8,0	6,50 ±0,54	7,60 ±I,70	6,80 ±0,60	7,88 ±2,3I
8,5	9,I9 ±0,84	I0,33 ±0,82	I2,7I ±5,76	I4,49 ±5,95
9,0	I5,45 ±3,00	20,24 ±5,98	I4,38 ±2,47	I8,05 ±4,04

температурах (30 - 50 °С) в этом пределе pH константы скорости амидирования минимальны.

Таблица 2

Константа скорости реакции амидирования дихлоргидрата диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты [$M^{-1} \cdot мин^{-1}$]

Температура, °С	2,5	20	30	40	50
pH	$k_2 \cdot 10^{-2}$	$k_2 \cdot 10^{-2}$	$k_2 \cdot 10^{-2}$	$k_2 \cdot 10^{-2}$	$k_2 \cdot 10^{-2}$
7,0	0,07	0,47	I,II	2,67	5,40
7,5	0,I5	0,46	I,02	I,69	3,66
8,0	0,25	0,8I	I,I4	I,82	3,25
8,5	0,I6	I,02	0,88	2,42	6,74
9,0	0,I6	0,96	3,87	5,53	I0,6I

Для вычисления отношений констант скоростей гидролиза и амидирования мы использовали два подхода. В первом подходе мы проверяли методом симплекса порядок реакции гидролиза, где оба параметра α (порядок реакции) и β (отношение констант скорости) вычисляли по экспериментальным результатам. Второй подход для обработки тех же данных заключался в применении метода симплекса при фиксированном значении $\alpha = I$ (см. табл. I).

Основные результаты, значения β и вычисленные с помощью отдельно определенных значений k_1 константы бимолекулярных реакций k_2 приведены в табл. I и 2. Значения коэффициента варьировались между 0,9-I,I, что несущественно отличается от единицы. Обработка тех же экспериментальных данных при фиксированном $\alpha = I$.

Полученные значения констант k_1 и k_2 позволяют прогнозировать глубину модификации белка при известных pH и температур, при заданных концентрациях модификатора и белка.

На основе полученных результатов можно рекомендовать условия модификации белков. Принимая содержание белка в растворе I-2 %, среднюю молекулярную массу сегмента со свободной аминогруппой 2000, получим приблизительную концентрацию аминогрупп 0,3I мк/моль·мл.

Литература

I. Кяэрд А. Модификация белковых веществ иминоэфирами I. Получение и свойства диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты. См. наст. сб., с. 55.

2. Bayne S., Ottensen M. Properties of lactate dehydrogenase crystals reacted with diimidoesters. - Carlsberg Res. Commun., 1977, vol. 42, p. 465-474.

3. Makoff A.J., Malcolm A.D.B. Properties of methyl acetimidate and its use as a protein-modifying reagent. - Biochem. J., 1981, vol. 193, p. 245-249.

4. Toome V., Wegrzynski B. Application of fluorescamine XIV. Determination of optical purity of a small amount of amino acids by the fluorescamine method. - Analyt. Letters, 1981, vol. 14, N 20, p. 1725-1733.

A. Kääärd, I. Tammeraid

Modification of Proteins with Iminoethers II

Mathematical Model of Process Kinetics

Summary

Mathematical model of modification kinetics for cases where decomposition of the modifier takes place simultaneously has been worked out. A program in Basic language for microcomputers has been elaborated.

Reaction kinetics between β-alanine and diethyl ether of bis-imino-adipic acid in water medium has been investigated. Adequacy of the model has been tested and characteristic kinetic constants have been found.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 579.66+579.222:577.112.384.2

А.Х. Калда, Т.Э. Рандла

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ С АСПАРТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.
СООБЩЕНИЕ У.
ВОЗМОЖНОСТЬ НАПРАВЛЕННОГО ИЗМЕНЕНИЯ СЕЛЕКТИВНОСТИ ПРЕВРАЩЕНИЯ ФУМАРАТА МИКРОБНЫМИ КЛЕТКАМИ

Согласно литературным данным, в реакциях превращения фумарата под действием микробных биокатализаторов одновременно с L-аспарагиновой кислотой образуется, по крайней мере, один побочный продукт [1-2]. Методом ЯМР-спектроскопии нам удалось показать, что продуктами превращения фумарата под действием свободных и иммобилизованных клеток Escherichia coli К-12 Propionibacterium shermanii являются, главным образом, L-аспартат и малат. В дополнение к прямому превращению фумарата в L-аспартат существуют косвенные пути образования L-аспартата через малат [3]. С целью уменьшения скорости нецеленаправленных реакций при синтезе L-аспарагиновой кислоты мы провели опыты по определению зависимости скорости и путей превращения фумарата от температуры и pH среды, а также от концентрации ионов аммония в реакционной среде [4]. Задачей настоящего этапа исследования являлось изучение влияния изменения pH среды на ход реакции и выявление возможности инактивировать фумаразу, ключевой фермент при образовании побочных продуктов.

Материалы и методы

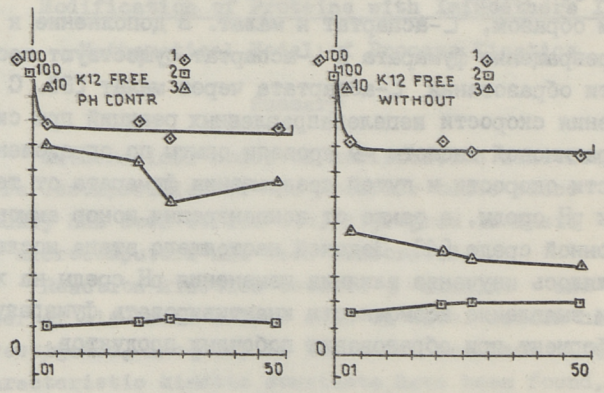
Выращивание биомассы и включение клеток в полиакриламидный гель проводили по ранее описанной методике [1, 5]. Концентрацию фумарата определяли по поглощению при 240 нм [6], а концентрацию L-аспарагиновой кислоты - нингидриновым методом. Содержание малата в реакционной смеси определяли малатдегидрогеназным методом [7]. Содержание кетокислот определяли по образованию окраски в реакции с ди-

нитрофенилгидрозоном [8]. Измерение pH раствора проводили на pH-метре pH-121, автоматическое регулирование pH раствора с помощью титровального блока БАТ-12 ЛМ.

Результаты и обсуждение

I Влияние изменения pH среды на ход реакции

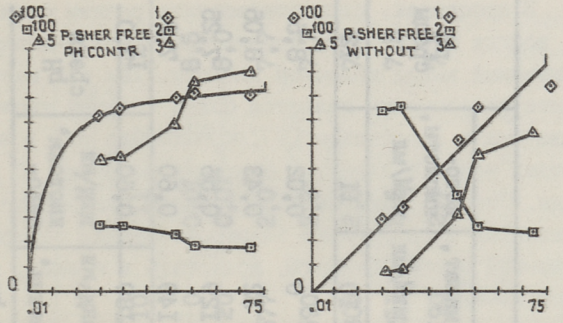
Повышенное образование L-аспарагиновой кислоты свободными и иммобилизованными клетками E.coli К-12 и P. shermanii достигается при значениях pH среды ⩾ 8,5, при увеличении кислотности относительный выход целевого продукта заметно понижается [6]. Из этого вытекает, что возможное уменьшение щелочности реакционной среды ввиду образования продуктов кислотного характера может уменьшить эффективность процесса. Синтез L-аспарагиновой кислоты проводился в течение 2-3 суток в реакторе с перемешиванием свободными и иммобилизованными клетками обоих видов, наблюдая за изменением кислотности среды в ходе реакции. В параллельном опыте pH среды поддерживали на оптимальном для соответственной реакции уровне путем автоматического контроля, титрующим раствором являлся 5 М NaOH.



Фиг. 1. Образование L-аспартата и малата (%) при превращении фумарата свободными клетками E.coli К-12 в зависимости от изменения pH среды.

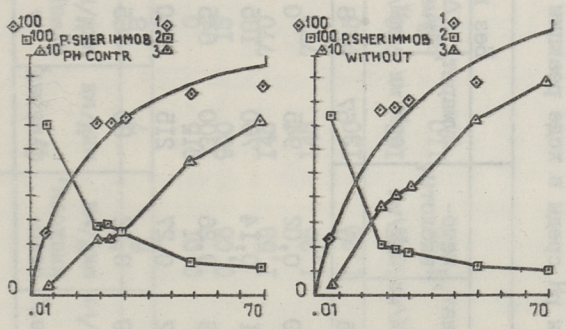
◇ – $K_{L\text{-Acn}}$; □ – $K_{малат}$; △ – $\frac{K_{L\text{-Acn}}}{K_{малат}}$

В таблицах I-2 и на фиг. I-3 представленные данные показывают, что в разных опытах изменение pH среды в течение реакции не происходит в одинаковой мере.



Фиг. 2. Образование L-аспартата и малата (%) при превращении фумарата свободными клетками P. shermanii в зависимости от изменения pH среды.

◇ – $K_{L\text{-Acn}}$; □ – $K_{малат}$; △ – $\frac{K_{L\text{-Acn}}}{K_{малат}}$



Фиг. 3. Образование L-аспартата и малата (%) при превращении фумарата иммобилизованными клетками P. shermanii в зависимости от изменения pH среды.

◇ – $K_{L\text{-Acn}}$; □ – $K_{малат}$; △ – $\frac{K_{L\text{-Acn}}}{K_{малат}}$

Так, понижение значения pH среды в процессе превращения фумарата свободными клетками E.coli K-12 от 8,5 до 7,0 к концу вторых суток приводит к уменьшению скорости суммарной реакции, снижению выхода L-аспартата и усилению нежелательных процессов (см. табл. I и фиг. I). Данное явление четко проявляется и в опыте со свободными клетками P. shermanii при сдвиге pH среды на I,5 единиц к нейтральным значениям (см. табл. 2 и фиг. 2) и отсутствует в процессе превращения фумарата под действием иммобилизованных клеток P. shermanii вследствие незначительного снижения pH среды от 9,5 до 9,0 (см. фиг. 3).

Таблица I

Превращение фумарата под действием свободных клеток E. coli K-I2 в зависимости от изменения pH среды в ходе реакции

Время, часы	Контроль pH при 8,5					Без контроля pH					pH среды
	фумарат, мкМ/мл	Δ фумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	малат, мкМ/мл	кето-кислоты, мкМ/мл	фумарат, мкМ/мл	Δ фумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	малат, мкМ/мл	кето-кислоты, мкМ/мл	
I	2	3	4	5	6	67	8	9	I0	II	I2
0	945	0	70	0	0,02	945	0	68	0	0,02	8,5
3	675	270	307	3I	0,I4	760	I85	2I9	32	0,43	8,05
2I	I35	8I0	790	98	0,26	300	645	595	I29	0,56	7,25
27	70	875	792	I22	0,27	2I5	730	649	I49	0,60	7,2
48	45	900	853	II9	0,32	80	865	745	I89	0,60	7,0

Таблица 2

Превращение фумарата под действием свободных клеток P. shermanii в зависимости от изменения pH среды в ходе реакции

Время, часы	Контроль pH при 8,5					Без контроля pH					
	фумарат, мкМ/мг	Δ фумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	малат, мкМ/мл	кето-кислоты, мкМ/мл	фумарат, мкМ/мл	Δ фумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	малат, мкМ/мл	кето-кислоты, мкМ/мл	pH среды
I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0	II	I2
0	9I5	0	6	0	0,0I	9I5	0	8	0	0,0I	8,5
4,5	8I0	I05	I3	95	0,06	900	I5	8	20	0,07	8,0
23	55	860	634	232	I,53	I45	770	242	577	2,0	7,7
29	60	855	648	229	I,25	I45	770	274	590	2,3	7,7
47	65	850	656	I97	I,30	I30	785	502	305	2,6	7,5
52,5	60	855	700	I6I	I,25	I35	780	592	2II	2,6	7,5
7I	55	860	705	I54	I,25	II0	805	636	I90	2,7	7,5

В процессах, сопровождающихся резким сдвигом pH среды, всегда наблюдается пониженный выход L-аспарагиновой и повышенный выход яблочной кислоты. Так как малат по константе диссоциации является более сильной кислотой по сравнению с аспартатом [9], образование его в заметных количествах может привести к снижению значений pH реакционной среды. Степень изменения pH каждого конкретного процесса определяется в результате взаимоотношения содержаний в реакционной смеси фумарата, аспартата и малата, а также ионов аммония.

Следовательно, несмотря на некоторое изменение ферментативных свойств бактериальных клеток разных партий, максимальное образование L-аспартата не достижимо без контроля pH процесса.

II Тепловая обработка биомассы в слабокислой среде

Японскими исследователями показано, что инкубация клеток E.coli и Pseudomonas dacunhae при pH 5,0 и температуре 30-45 °C в течение I ч устраняет почти полностью имеющиеся у них аланинрацемазную и фумаразную активность [10]. С целью выявления возможности инактивации фумаразы, ключевого фермента при образовании побочных продуктов при синтезе L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония под действием микробных клеток, мы исследовали инкубацию биомассы при pH 5,0 и повышенной температуре.

Обработку биомассы E.coli K-12 проводили в культуральной среде в течение 0,5 и I ч при температуре 40 °C, в то время как биомассу P.shermanii - при температуре 50 °C в течение 0,5, I, I,5 и 2 ч из-за более высокой фумаразной активности и более прочной клеточной оболочки клеток последнего вида.

На основании данных, приведенных в таблицах 3 и 4, можно сказать, что проведенной обработкой клеток E.coli K-12 не удалось получить положительных результатов. Инкубация в течение 0,5 ч не инактивирует фумаразу, а удлинение времени воздействия приводит к уменьшению общей ферментативной активности клеток и понижению выхода аспартата (см. табл. 3). Из таблицы 4 видно, что нагревание клеток P.shermanii при температуре 50 °C в течение 0,5 ч

Таблица 3

Результаты превращения фумарата под действием свободных клеток E.coli K-I2 в зависимости от времени обработки биомассы при pH 5,0 и температуре 40 °С

Время обработки, ч	0,5				I,0			
Время реакции, ч	фумарат, мкМ/мл	Δ фумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	L-Асп / Δфумарат, %	фумарат, мкМ/мл	Δ фумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	L-Асп / Δфумарат, %
I	2	3	4	5	6	7	8	9
0	900	-	I0	-	960	-	I0	-
I	760	I40	I36	90,0	790	I70	I39	75,9
2	600	300	286	92,0	670	290	I85	60,3
5	I80	720	520	70,8	350	6I0	387	6I,8
I7	25	875	706	79,5	20	940	775	8I,4
25	25	875	742	83,7	20	940	785	82,4
42	25	875	8I4	9I,9	20	940	785	82,4

Таблица 4

Результаты превращения фумарата под действием свободных клеток P.shermanii в зависимости от времени обработки биомассы при pH 5,0 и температуре 50 °С

Время обработки, ч	0,5				1,0				1,5				2,0			
Время реакции, ч	фумарат, мкМ/мл	Δфумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	L-Асп / Δфумарат, %	фумарат, мкМ/мл	Δфумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	L-Асп / Δфумарат, %	фумарат, мкМ/мл	Δфумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	L-Асп / Δфумарат, %	фумарат, мкМ/мл	Δфумарат, мкМ/мл	L-Асп, мкМ/мл	L-Асп / Δфумарат, %
0	II20	-	8	-	II20	-	8	-	II00	-	I8	-	II20	-	I8	-
6	I020	I00	44	38,0	970	I50	72	48,0	700	400	338	80,0	900	220	I78	72,7
20	I90	930	429	45,3	I60	960	5I6	52,9	60	I040	I050	99,2	I30	990	603	60,0
23	I00	I020	436	42,8	I00	I020	544	53,3	50	I050	I04I	97,4	II0	I0I0	690	66,5
25	95	I025	504	49,2	90	I030	666	63,8	45	I055	I050	97,8	I00	I020	795	76,2
27	70	I050	630	59,2	70	I050	772	73,5	40	I060	I04I	96,5	95	I025	8I0	77,3
44	30	I090	I080	98,3	35	I085	I030	94,9	39	I06I	I050	97,3	85	I035	I032	97,9
68	-	-	-	-	-	-	-	-	35	I065	I04I	96,0	70	I050	I050	98,3

уже позволяет проводить синтез L-аспарагиновой кислоты с конечным выходом 98 %. С удлинением времени температурного воздействия до I,5 часов скорость суммарной реакции и скорость образования аспартата увеличиваются, вероятно, из-за повышения проницаемости клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Более длительная обработка биомассы уже может привести к общему понижению скорости ферментативных реакций.

Итак, обработка клеток P.shermanii при pH 5,0 и температуре 50 °С в течение I,5 часов не повреждает аспартазу, в то же время значение побочных реакций в значительной мере уменьшается. Следовательно, такая обработка почти полностью инактивирует фумаразу, и прямое превращение субстрата в целевой продукт становится преобладающим. Можно предположить, что несмотря на некоторое повреждение клеточных стенок, температурная обработка клеток P. shermanii в слабокислой среде позволяет получить высокоэффективный микробный биокатализатор для синтеза L-аспарагиновой кислоты.

Литература

I. Зуева Н.Н., Яковлева В.И., Щербакова В.Н. Зависимость скорости аспартат-аммиак-лиазной реакции, катализируемой свободными и иммобилизованными клетками E.coli от температуры и предварительной тепловой обработки клеток. – Биохимия, 1979, т. 44, № 2, с. 364-367.

2. Takamatsu S., Umemura I., Yamamoto K., Sato T., Tosa T., Chibata I. Production of L-alanine from ammoniumfumarate using two-immobilized microorganisms. – Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 1982, vol. 15, N 3, p. 147-152.

3. Калда А.Х. Превращение фумарата под действием свободных и иммобилизованных клеток микроорганизмов, продуцентов аспартазы. – Тезисы докладов IУ Всесоюзного симпозиума "Инженерная энзимология". Киев, 1983.

4. Калда А.Х. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение IУ. Влияние концентрации ионов водорода и аммония на ход превращения фумарата. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1983, № 552, с. 79-88.

5. Березин И.В., Яковлева В.И., Зуева Н.Н. Некоторые кинетические закономерности аспартат-аммиак-лиазной реакции, катализируемой свободными и иммобилизованными клетками Escherichia coli. – Доклады АН СССР, 1978, т. 242, № 4, с. 953-956.

6. Калда А.Х., Воробьева Л.И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение I. Изучение влияния иммобилизации на аспартазную активность и жизнеспособность пропионовокислых бактерий. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 63-74.

7. Lowry C.H., Passonneau J.V. A flexible system of enzymatic analysis. New-York–London, Acad. Press, 1972, p. 202-204.

8. Brodelius P., Nilsson K., Mosbach K. Production of α-keto acids. Part I. Immobilized cells of Trigonopsis variabilis containing D-amino acid oxidase. – Appl. Biochem. Biotechnol., 1981, vol. 6, N 4, p. 293-308.

9. Справочник химика. М., Химия, т. 3, 1965, с. 85-98.

10. Švec F., Vojtišec V., Drobnik J. Immobilization of enzymes and cells with aspartase activity. – Chem. Listy, 1980, vol. 74, N 1, p. 82-90.

A. Kalda, T. Randla

Immobilization of Microbial Cells with Aspartase Activity V

Selective Conversion of Fumarate with the Microbial Cells

Summary

As a result of the conversion of fumarate into malate and keto acids the yield of L-aspartic acid becomes relatively low. Later, a part of formed malate converts into L-aspartate.

pH optimum for the aspartase reaction with free and immobilized E. coli K-12 and P. shermanii cells is $\geqslant 8.5$. It was shown that changing the pH of reaction mixture to the neutral values the relative yield of L-aspartic acid decreases. As all the conversional products of fumarate are acidic, we supposed the decreased alkalinity in the course of the reaction. It was proved that pH shift 1.0–1.5 units to the neutral zone gives rise to the increased conversion into by-products. So, for slowing down the nonproductive processes, the steady pH value of reaction mixture is necessary.

To inactivate the fumarase, the key enzyme in the process of conversion of fumarate into by-products, the cells are incubated in the lightly acidic nutrient medium at elevated temperature. The thermal treating of P. shermanii cells at 50 °C and pH 5.0 within 1.5 hours inactivates the fumarase resulting in the direct conversion of fumarate into L-aspartic acid with the yield of 96–98 %.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15

Р.Б. Лайдсаар

ИММОБИЛИЗАЦИЯ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3,5-ТРИАЗИНА

Одной из возможностей стабилизации нативной структуры ферментов является иммобилизация путем многоточечной фиксации на водонерастворимых носителях. Разработано много различных методов получения устойчивых иммобилизованных препаратов β-галактозидазы из Escherichia coli, Aspergillus niger и Saccharomyces lactis, однако, иммобилизация дрожжевой β-галактозидазы из Kluyveromyces fragilis до сих пор мало изучена [1, 2].

Эффективность иммобилизации можно повысить модификацией белка или носителя функциональными реагентами. В качестве сшивающего агента в случае грибной β-галактозидазы часто применяется глутаровый альдегид. При иммобилизации дрожжевой β-галактодидазы применение глутарового альдегида себя не оправдало, так как глутаровый альдегид инактивирует β-галактозидазу уже в незначительных количествах.

В основе данного метода иммобилизации лежит образование поперечной связи между носителем и ферментом с помощью хлорпроизводных 1,3,5-триазина, ранее успешно примененном при иммобилизации грибной β-галактозидазы [3].

Материалы и методы

В качестве производных 1,3,5-триазина использовали выпускаемый промышленностью активный краситель -"ярко-голубой КХ" (Новочебоксарский хим.завод), представляющий собой монозамещенное производное хлористого цианура. В качестве носителя в этом методе использовались два типа носителей: I) активированный силаном силикагель (СГ), содержащий 150 мкэкв/г аминогрупп, количество которых определяли по реакции с 2,3,4-тринитробензолсульфеновой кислотой [4] и

2) органоминеральный носитель (ОМ), содержащий 180 мкэкв/г аминогрупп. Носители приготовлены в лабораториях кафедры органической и биологической химии ТПИ.

В работе использовали препарат β-галактозидазы Laktozym 750 L (NOVO, Дания) из дрожжей Kluyveromyces fragilis с содержанием белка 21 мг/мл. Коммерческий препарат содержит 50%-ную смесь глюкозы и галактозы, стабилизирующую фермент.

Активированные носители получали обработкой носителей раствором активного красителя. Иммобилизацию дрожжевой β-галактозидазы проводили контактированием активированных носителей с раствором β-галактозидазы. Схема I иллюстрирует реакции между носителем, активным красителем и ферментом. Для получения иммобилизованных препаратов дрожжевой β-галактозидазы 0,2 г активированного ЯГ-КХ носителя контактировали с 0,5 мл раствора дрожжевой β-галактозидазы с содержанием белка 10-84 мг/г носителя, pH 6,5 в течение 2 часов при комнатной температуре. После этого препарат промывали 5 М раствором хлористого натрия и 0,2 М раствором К-фосфатного буфера с pH 6,5.

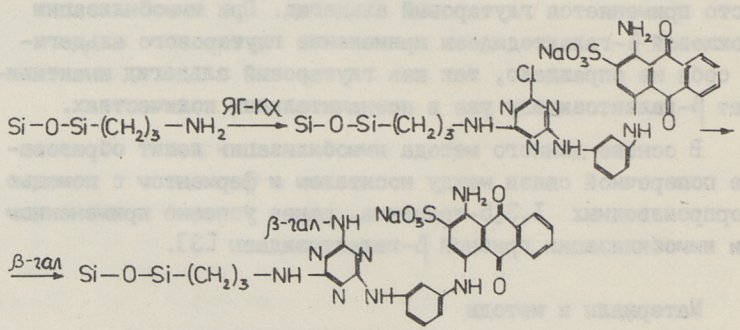
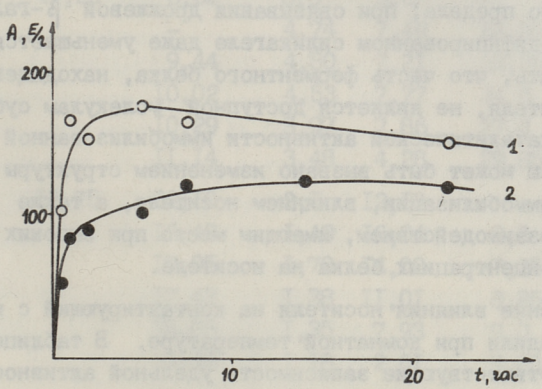


Схема 1.

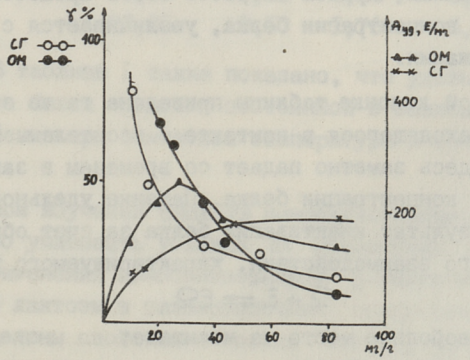
Количество связанного белка определяли по разнице белка в исходном растворе и промывных водах. Активность иммобилизованной β-галактозидазы определялась в термостатированном реакторе с перемешиванием при температуре 30 °С и pH 6,5 по методике, описанной нами раньше [6].

Результаты и их обсуждение

При внедрении иммобилизованных препаратов экономически обосновано применение препаратов с высокими значениями удельной активности и коэффициента выхода активности γ. Для выяснения необходимых для этого условий были проведены опыты при разных концентрациях растворимой дрожжевой β-галактозидазы, с варьированием времени инкубации носителя с раствором фермента. Опыты проводились при комнатной температуре и pH 6,5. Результаты приведены на фигурах I и 2.



Фиг. 1. Активность иммобилизованной на органоминеральном носителе ,модифицированном ЯГ-КХ, дрожжевой β-галактозидазы в зависимости от времени при двух начальных концентрациях белка, мг/г: 1 - 47,3, 2 - 15,75.



Фиг. 2. Иммобилизация дрожжевой β-галактозидазы на органических носителях, модифицированных активированным красителем ЯГ-КХ.

Выяснилось, что реакция присоединения молекул фермента к носителю протекает относительно медленно и завершается практически за 2-3 часа. Исходя из этих результатов, все следующие опыты проводили в течение 2 часов.

Как показано на фиг. 2, коэффициент сохранения активности β-галактозидазы возрастает при увеличении концентрации β-галактозидазы в растворе до 30-40 мг/г носителя. Сохранение активности составляет при той же концентрации фермента 35-40 %. Однако активность не увеличивается выше определенного предела; при связывании дрожжевой β-галактозидазы на модифицированном силикагеле даже уменьшается. Можно предполагать, что часть ферментного белка, находящегося в порах носителя, не является доступной молекулам субстрата. Снижение каталитической активности иммобилизованной β-галактозидазы может быть вызвано изменением структуры фермента после иммобилизации, влиянием носителя, а также белок-белковым взаимодействием, имеющим место при высоких поверхностных концентрациях белка на носителе.

Изучение влияния носителя на контактирующий с ним фермент проводили при комнатной температуре. В таблице I приведены соответствующие зависимости удельной активности от времени контактирования фермента с носителем. По этим результатам наблюдается рост удельной активности ферментного раствора, связанного, как показано нами раньше, по-видимому, с диссоциацией неактивных или менее активных ассоциатов белка на субъединицы, причем скорость этого процесса зависит от начальной концентрации белка, увеличивается с уменьшением его содержания.

Во второй колонке таблицы приведена та же зависимость для белка, находящегося в контакте с носителем. Удельная активность здесь заметно падает со временем в зависимости от начальной концентрации белка. Падение удельной активности есть результат инактивации белка за счет обратимого адсорбционного взаимодействия, характеризуемого уравнением

$$\Omega + E \rightleftharpoons E\Omega,$$

где Ω - свободное место на носителе;

E - молекула белка.

Таблица I

Иммобилизация дрожжевой β-галактозидазы на поверхности органоминерального носителя, модифицированного ЯГ-КХ

Время, час	Исходный ферм. раствор		Контакт. ферм. раствор		Имм. препарат	
	содерж. белка, мг/г	$A_{уд}$, Е/мг	содерж. белка, мг/г	$A_{уд}$, Е/мг	содерж. белка, мг/г	$A_{уд}$, Е/мг
0	47,25	6,62	6,3	6,62	-	-
I		-	4,74	7,49	23,55	7,I
2		9,44	4,80	7,2I	23,25	6,62
5		I0,02	4,53	7,77	24,6	7,II
7,5		I0,29	3,97	7,86	27,4	6,03
22		II,I4	3,48	4,28	29,85	8,34
0	I5,75	I2,I0	2,I	I2,I0	-	-
I		I6,43	I,49	I6,04	8,3	I0,33
2		I7,05	I,70	I4,00	7,25	I2,48
5		I7,43	I,38	II,0I	8,85	II,4I
7,5		I8,86	I,35	7,93	9,0	I3,5I
22		20,43	I,I8	2,6I	9,85	II,8I
0	I0,5	I2,86	I,05	I2,86	-	-
I,5		20,95	0,72	7,I4	5,09	I8,23
3			0,58	4,27	6,I4	I8,0
4,5			0,60	2,77	5,99	23,0
6		I9,43	0,58	2,I3	6,I4	8,9I
7,5		2I,05	0,50	I,76	6,76	I5,52

В таблице I также показано, что удельная активность связанного белка остается постоянной в зависимости от времени хранения при комнатной температуре в течение проведения опыта.

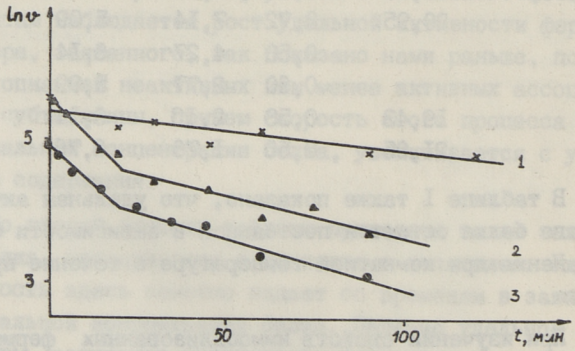
При изучении свойств иммобилизованных ферментов необходимо учитывать условия их применения. Условия в случае применения иммобилизованной β-галактозидазы при гидролизе лактозы в цельномолочных продуктах во многом предопределены свойствами молока (состав, pH и т.п.). Единственным параметром, который можно варьировать в относительно широких диапазонах, является температура субстрата.

Исходя из этого, важнейшей задачей при изучении препаратов иммобилизованной дрожжевой β-галактозидазы является влияние температуры на свойства препарата.

Исследование температурной зависимости активности иммобилизованной на органических носителях β-галактозидазы проводилось в температурном интервале от 30 до 65 °С при концентрации субстрата 0,002 М НФГ в 0,1 М К-фосфатном буферном растворе.

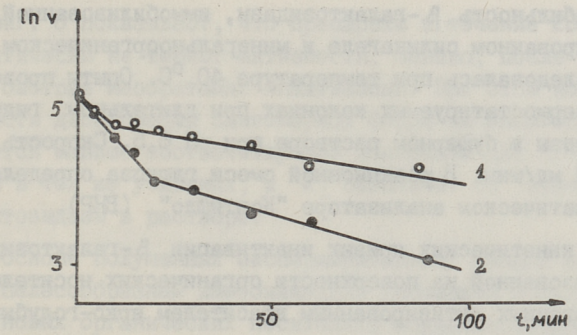
При иммобилизации дрожжевой β-галактозидазы не происходит значительных изменений в температурной зависимости активности фермента. Значение температурного оптимума как для нативной, так и для иммобилизованной β-галактозидазы при гидролизе НФГ находится около температуры 50 °С, однако при температурах 30–45 °С активность иммобилизованных препаратов уменьшается меньше по сравнению с $T_{опт}$, чем при нативном ферменте. Это явление можно объяснить влиянием иммобилизации на структуру белковой молекулы.

С целью выявления термической стабильности иммобилизованной дрожжевой β-галактозидазы исследовали инактивацию препаратов в фосфатном буферном растворе pH 6,5 при температурах 40, 45 и 50 °С.



Фиг. 3. Кинетические кривые термоинактивации иммобилизованной на силикагеле-ЯГ дрожжевой β-галактозидазы при температуре °С: 1 – 40, 2 – 45, 3 – 50.

На фигурах 3 и 4 представлены соответствующие кинетические кривые в полулогарифмических координатах, в таблице 2 суммированы результаты их кинетической обработки. Для



Фиг. 4. Кинетические кривые термоинактивации иммобилизованной на органоминеральном носителе-ЯГ β-галактозидазы при температуре, °С: 1 – 45, 2 – 50.

Таблица 2

Кинетические параметры процесса термоинактивации иммобилизованной β-галактозидазы при температурах 40–50 °С

Имм. препарат	10^4 $с^{-1}$			10^4 $с^{-1}$	
	40 °С	45 °С	50 °С	45 °С	50 °С
β-гал-СГ	0,9	8,3	7,1	2,0	2,4
β-гал-ОМ		5,8	9,3	1,7	2,6

сравнительного анализа использованы эффективные величины k_1 и k_i, определенные как тангенс угла наклона соответствующей части кривой.

Данные фиг. 3 и 4 показывают, что кинетика термоинактивации дрожжевой β-галактозидазы, иммобилизованной на ЯГ, является сложной. Асимптоты к начальному и следующему за ним прямолинейному участку кривых, представленных в полулогарифмических координатах, пересекаются в точке излома (τ). Вид кривых аналогичен соответствующим кривым термоинактивации дрожжевой β-галактозидазы в растворе [6]. При 40 °С за время опыта не наблюдалась необратимая инактивация иммобилизованного препарата.

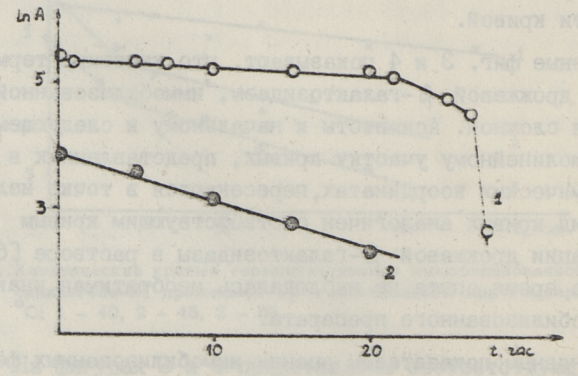
Основным показателем оценки иммобилизованных ферментов является их стабильность в рабочих условиях. Этот показатель обычно является основным критерием отбора препаратов иммобилизованных ферментов для их использования в качестве биокатализаторов в промышленности.

Стабильность β-галактозидазы, иммобилизованной на модифицированном силикагеле и минеральноорганическом носителе исследовалась при температуре 40 °С. Опыты проводились в термостатируемых колонках при длительном гидролизе 5 % лактозы в буферном растворе при pH 6,5. Скорость протока 6,8 мл/мин. В реакционной смеси глюкоза определялась на автоматическом анализаторе "Контифло" (ВНР).

На кинетических кривых инактивации β-галактозидазы, иммобилизованной на поверхности органических носителей, модифицированных активированным красителем ярко-голубым ЯГ-Ж под влиянием 5%-ного раствора лактозы в координатах $\ln A$ от времени t, можно раздельно определить два режима диссоциативной термоинактивации и обозначить точку излома в месте пересечения асимптот к прямолинейным участкам на кинетической кривой. Вид кинетических кривых аналогичен кривым термоинактивации β-галактозидазы в растворе. Следовательно, инактивация иммобилизованного препарата при 40 °С соответствует диссоциативной термоинактивации β-галактозидазы по последовательному механизму согласно схеме

$$[E]_n \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [E]_n^* \xrightarrow{k_i''} n[E]_{ден} \qquad (n \geq 2)$$
$$k_{кат} \qquad k'_{кат}$$

где $k'_{кат} << k_{кат}$



Фиг. 5. Кинетическая кривая термоинактивации иммобилизованной β-галактозидазы на поверхности модифицированного силикагеля в протоке 5 % лактозы при 40 °С.

Данные фиг. 5 показывают, что препараты в течение 20-22 часов практически не теряют активности, однако, после этого следует быстрая необратимая инактивация. При этом константа скорости диссоциации олигомерной формы на мономеры (k_1) оказывается меньше соответствующей константы для β-галактозидазы в тех же условиях, а k_1 совпадает со значениями β-галактозидазы в растворе.

На основе полученных экспериментальных данных можно считать целесообразным иммобилизацию дрожжевой β-галактозидазы на новых органических носителях, модифицированных активным красителем ЯГ-КХ. Полученные препараты обладают достаточной β-галактозидазной активностью для гидролиза лактозы. Изучение кинетики термоинактивации однако показало, что иммобилизация дрожжевой β-галактозидазы на силикагеле, модифицированном активированным красителем ЯГ-КХ, не стабилизирует активную, четвертичную структуру и уменьшение константы скорости диссоциации k_1 связано со стабилизирующим эффектом лактозы.

Литература

1. Ponnuswamy P.K., Muthusamy R., Manavalan P. Aminoacid composition and thermal stability of proteins. – Int. J. Biol. Macromol., 1982, vol. 4, p. 185–190.

2. Thomas G.V., Kalva M.S., Singh A. Immobilization and characterization of Kluyveromyces fragilis β-galactosidase. – Indian J. of Exp. Biol., 1980, vol. 18, p. 1020–1023.

3. Загустина Н.А., Тихомирова А.С., Рафаловская Т.Я., Янгаль Л.М., Грачева А.Ю., Фениксова Р.В. Получение и свойства препарата β-галактозидазы из Alternaria tenuis. – Прикл. биохим. и микробиол., 1975, т. II, № 5, с. 724–729.

4. Дикчювене А.А., Песлякас И.И., Дагене М.И., Паулюконис А.Б. Определение количества белка, иммобилизованного на нерастворимом носителе. – В кн.: Методы в биохимии. Вильнюс, 1975, с. 13–17.

5. Лайдсаар Р.Б., Паппель К.Э., Кёстнер А.И., Полторак О.М., Чухрай Е.С. Кинетика термоинактивации различных форм дрожжевой β-галактозидазы.-Вестник МГУ, Сер. 2, Химия, 1983, т. 24, № 2, с. 131-134.

6. Лайдсаар Р.Б., Паппель К.Э. Изучение стабильности β-галактозидазы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1982, № 526, с. 13-21.

R. Laidsaar

Immobilization of β-galactosidase with the Derivates of 1,3,5-triazine

Summary

The immobilization of yeast β-galactosidase with derivates of 1,3,5-triazine on the organomineralic carriers have been investigated. Modification of immobilized preparations with glyoxal has been studied. The thermostability of immobilized preparates can be described by means of the dissociative kinetic equations thermoinactivity.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.154.25:577.15.02

К.Э. Паппель, Р.Б. Лайдсаар

СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

Применение иммобилизованной β-галактозидазы при гидролизе лактозы, в частности, в молочной сыворотке, считается одним из перспективных способов расширения возможностей целесообразного использования всех компонентов молока. Эффективность использования иммобилизованной β-галактозидазы определяется ее активностью и стабильностью в технологическом процессе. Изменение условий иммобилизации или исходного продуцента фермента отражается также на свойствах полученного биокатализатора, а именно на его кинетических параметрах, зависимости активности от pH, температуры среды и т.д. Заранее нами изучены получение и свойства иммобилизованной на силохроме и в структуре полиакриламидного геля грибной β-галактозидазы из Curvularia inaequalis и дрожжевой β-галактозидазы из Kluyveromyces fragilis [1-3]. Целью настоящей работы являлось изучение свойств иммобилизованной на органоминеральном носителе грибной β-галактозидазы. Исследованы pH- и температурная зависимость активности, температурная и pH-стабильность биокатализатора, кинетика гидролиза лактозы и рабочая стабильность препарата.

Материалы и методы

Работа проводилась с грибной β- галактозидазой из Penicillium canescens с удельной активностью 7,2 Е на мг белка - опытная партия Ладыжинского завода ферментных препаратов.

Активность фермента определялась по начальной скорости гидролиза синтетического субстрата - о-нитрофенил-β-D-галактопиранозида (НФГ) или природного субстрата - лактозы - в стандартных условиях ($t = 30\ ^{o}C$, pH = 4,0, концентрация субстрата соответственно 0,002 М и 0,139 М).

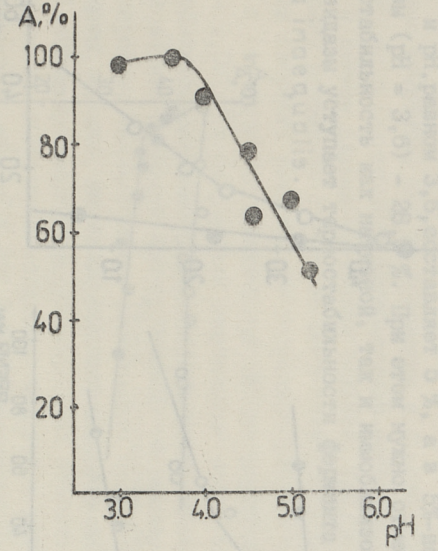
Иммобилизованный препарат β-галактозидазы получен связыванием фермента на органоминеральных носителях с помощью глутарового альдегида. В опытах применялись образцы органоминеральных носителей, приготовленных в нашей лаборатории. Носители представляли собой композицию из кремнезема и фенол-формальдегидной смолы. Удельная поверхность носителя 48 $м^2/г$, содержание аминогрупп от 100 до 200 мк-моль/г. В качестве нативного фермента применялись препараты, имеющие активность от 200 до 300 единиц на г сухого носителя по гидролизу лактозы.

Изучение термоинактивации иммобилизованной β-галактозидазы и кинетики реакции проводилось по методике, описанной нами заранее [4, 1]. Рабочая стабильность препарата определялась при гидролизе 5 %-ного раствора лактозы в реакторе колоночного типа. В ходе исследований определяли концентрацию глюкозы в реакционной смеси глюкозооксидазным методом, объемную скорость субстрата в реакторе и активность биокатализатора через определенное время в стандартных условиях.

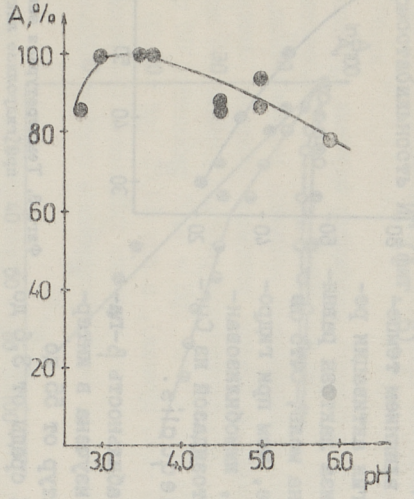
Результаты и их обсуждение

Зависимость активности иммобилизованной β-галактозидазы (ИГ) от pH среды определяли в интервале значений pH от 2,5 до 6,0 как при гидролизе НФГ, так и при гидролизе лактозы. Опыты показали (фиг. 1, 2), что при гидролизе НФГ активность ИГ значительно больше зависит от pH среды, чем при гидролизе лактозы. Так, например, при сдвиге pH среды от 3,5 до 4,5 скорость гидролиза НФГ уменьшается на 25 %, а скорость гидролиза лактозы лишь на 7 %. Оптимальным для гидролиза НФГ и лактозы с помощью исследуемого препарата ИГ следует считать значения pH, равные 3,5 и 3,0 - 4,5 соответственно. По сравнению с препаратами из Curvularia inaequalis значения $pH_{опт}$ сдвинуты приблизительно на 0,7 единиц в кислую область.

Зависимость активности ИГ от температуры определена при гидролизе лактозы в стандартных условиях. Выяснилось (фиг. 3), что при повышении температуры от 30 до 40, 50 и 60 °С скорость реакции увеличивается соответственно в 1,6, 2,2 и 3,4 раза. Максимальная скорость реакции достигается

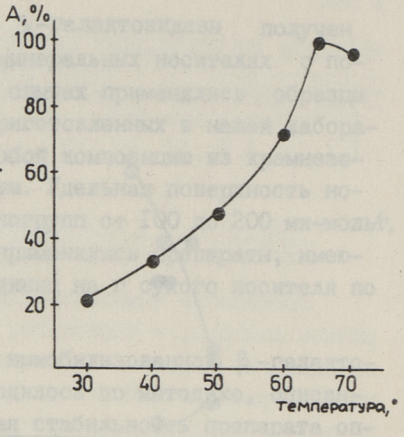


Фиг. 1. pH-зависимость активности ИГ при гидролизе НФГ.



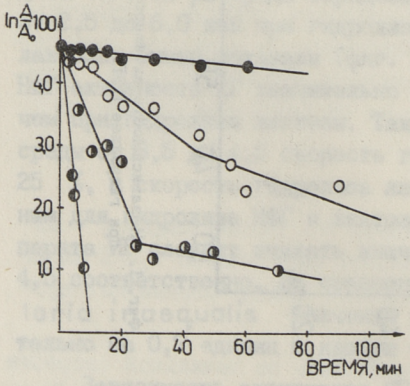
Фиг. 2. pH-зависимость активности ИГ при гидролизе лактозы.

при температуре 65 °С . При дальнейшем повышении температуры преобладает инактивация фермента под влиянием температуры. Энергия активации реакции гидролиза лактозы равняется 69 кДж на моль, что в I,4 раза выше, чем при гидролизе лактозы, иммобилизованной β-галактозидазой из Curvularia inaequalis.

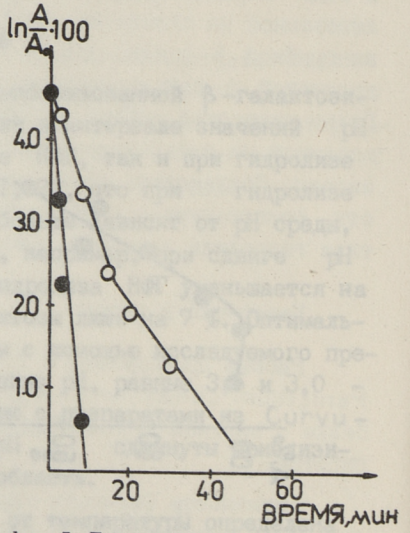


Фиг. 3. Температурная зависимость ИГ при гидролизе лактозы.

Термостабильность β-галактозидазы изучена в интервале температур от 55 до 65 °С при pH среды от 3,6 до 5,0 как в буферных растворах, так и в 5%-ном растворе лактозы. Выяснилось (фиг. 4 и 5), что при температуре 60 °С и выше происходит быстрая ин-

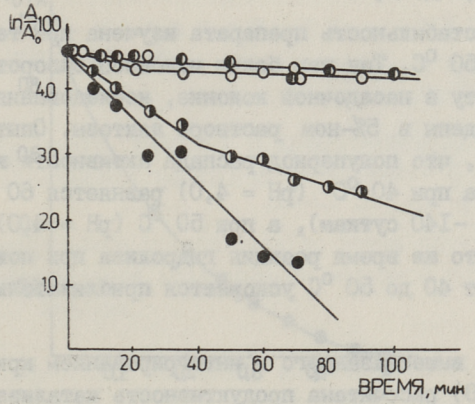


Фиг. 4. Термическая стабильность нативной β-галактозидазы. Условия опыта: 0,2 М ацетатный буфер pH 4,0, температура: ● - 55°, ○ - 57°, ◑ - 60°, ◐ - 65°.



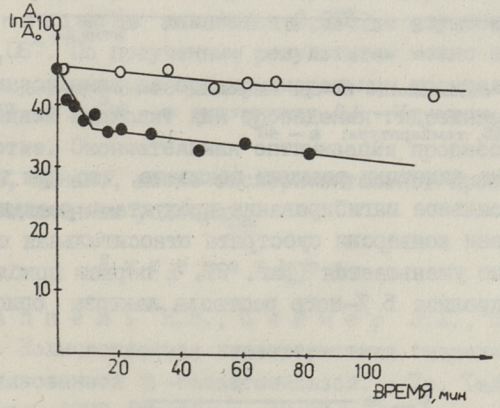
Фиг. 5. Термическая стабильность ИГ при 65°. Условия опыта: 5% раствор лактозы, pH среды: ● pH-3,65, ○ - 4,65.

активация как нативной, так и иммобилизованной β-галактозидазы. Изучение pH среды от 3,6 до 4,6 значительно повышает термостабильность ИГ (фиг. 6).



Фиг. 6. Термическая стабильность ИГ при 57° в 0,2 М ацетатном буфере pH среды: ● – 3,6, ◑ – 4,0, ○ – 4,6, ◐ – 5,0.

Обнаружен стабилизирующий эффект лактозы (фиг. 6 и 7). Так, например, в 0,2 М ацетатном буфере $A_{ост}$ за 60 мин при 57 °С и pH.равном 3,6,составляет 5 %, а в 5%-ном растворе лактозы (pH = 3,6) – 28,5 %. При этом нужно отметить, что термостабильность как нативной, так и иммобилизованной β-галактозидазы уступает термостабильности фермента из Curvularia inaequalis.

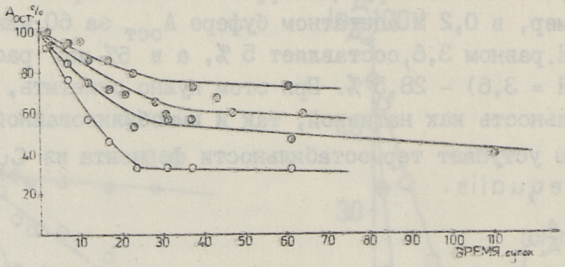


Фиг. 7. Термическая стабильность ИГ при 57° в 5% растворе лактозы pH среды: ● – 3,65, ○ – 4,6.

Учитывая данные термостабильности, а также pH-зависимости активности, гидролиз лактозы с помощью исследуемого препарата ИГ следует проводить при значениях pH среды в пределах от 4,6 до 5,0.

Рабочая стабильность препарата изучена при температурах от 30 до 50 °С. Так как белки молочной сыворотки затрудняют работу в насадочной колонке, исследования, в основном, проведены в 5%-ном растворе лактозы. Опыты показали (фиг. 8), что полупериод распада активности исследуемого препарата при 40 °С (pH = 4,0) равняется 60 суткам (при pH = 4,6 – 140 суткам), а при 50 °С (pH = 4,0) только 15 суткам. В то же время реакция гидролиза при повышении температуры от 40 до 50 °С ускоряется приблизительно в 1,5 раза.

С учетом вышесказанного и интегрированием кривых $A = f(t)$ (фиг. 8) рассчитана продуктивность катализатора при разных температурах, оказавшаяся приблизительно равной для работы реактора при 40 и 50 °С.

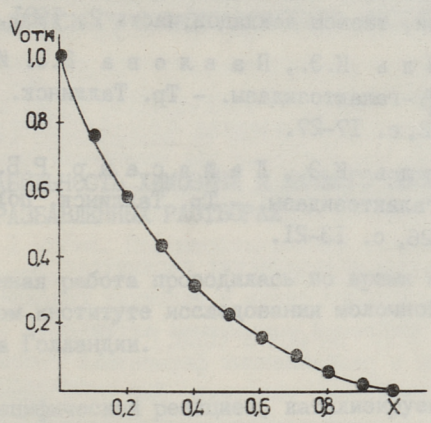


Фиг. 8. Рабочая стабильность ИГ при гидролизе 5%-ного раствора лактозы. Условия опыта: pH = 4,0, температура: ⊙ – 30°, ● – 40°, ○ – 50°; pH = 4,45, температура: ⊗ – 40°.

Изучение кинетики реакции показало, что при гидролизе происходит сильное ингибирование продуктами реакции. С повышением степени конверсии субстрата относительная скорость реакции резко уменьшается (фиг. 9). В первом приближении скорость гидролиза 5 %-ного раствора лактозы описывается уравнением:

$$V_{отн} = \frac{1 - x}{1 + 1{,}62x + 1{,}17x^2}, \qquad (I)$$

где $V_{отн}$ – относительная скорость реакции;
x – степень конверсии субстрата.



Фиг. 9. Зависимость относительной скорости реакции ($V_{отн}$) от степени конверсии лактозы (X).
—— – $V_{отн}$ вычисленная по уравнению (I), ● – экспериментальные данные.

Нужно отметить, что по сравнению с β-галактозидазой из Curvularia inaequalis ингибирующее действие продуктов реакции в данном случае несколько сильнее. Так, например, при степени конверсии субстрата 80 % (т.е. $x = 0,8$) относительная скорость реакции при гидролизе ферментом из Curvularia inaequalis равняется 0,095, а изученным ферментом – 0,067. По полученным результатам можно заключить, что иммобилизованная на органоминеральном носителе грибная β-галактозидаза подходит для проведения гидролиза в молочной сыворотке. Окончательная оптимизация процесса гидролиза возможна, однако, после экспериментальной проверки процесса в промышленных условиях.

Литература

I. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И. Количественная характеристика гидролиза лактозы иммобилизованной β-галактозидазой. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 19-28.

2. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Мандель М.О. Гидролиз ди- и полисахаридов с помощью иммобилизованных ферментов. - XII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, тезисы докладов, часть 2, 1981, с. 165.

3. Паппель К.Э., Павлова Э.Э. Иммобилизация дрожжевой β-галактозидазы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1983, № 552, с. 17-27.

4. Паппель К.Э., Лайдсаар Р.Б. Изучение стабильности β-галактозидазы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1982, № 526, с. 13-21.

K. Pappel, R. Laidsaar

Properties of the Immobilized β-galactosidase

Summary

The immobilized β-galactosidase preparation has been prepared by covalent coupling of fungal β-galactosidase to organomineralic carriers. The effect of pH and temperature on immobilized β-galactosidase activity has been studied. The thermostability of immobilized preparations has been investigated at different temperatures (55 °C...65 °C) and different pH of solutions using buffer solutions and 5 % lactose solutions. The characterization of the kinetics of the lactose hydrolysis process has been given. The stability of immobilized β-galactosidase preparations (under operating conditions) in the plug flow reactor has been investigated.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

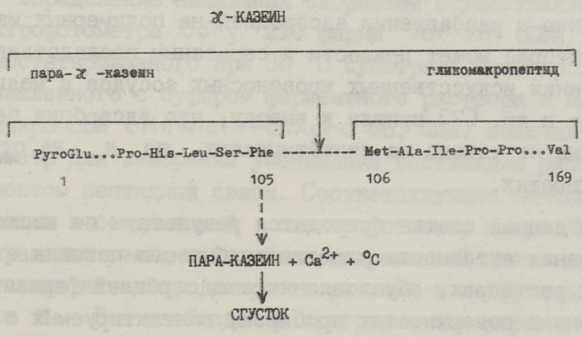
УДК 577.156.5:637.1

М.К. Фриеденталь

СТАБИЛЬНОСТЬ ХИМОЗИНА И БЫЧЬЕГО ПЕПСИНА В РАЗБАВЛЕННЫХ РАСТВОРАХ

Данная работа проводилась во время научной стажировки в Научном институте исследования молочной промышленности (НИЗО) в Голландии.

Специфической реакцией, катализируемой химозином (К.Ф.3.4.23.4), является гидролиз пептидной связи между 105-м остатком фенилаланина и 106-м остатком метионина в молекуле $\varkappa$-казеина, занимающего особое положение при формировании мицелл казеина (фиг. 1). Этот белок действует как защитный коллоид всего казеинового комплекса и обуславливает его растворимость с образованием коллоидного раствора.



Фиг. 1. Механизм свертывания казеина.

Следовательно, все заменители химозина должны быть охарактеризованы по отношению реакции гидролиза единственной в молекуле казеина Phe_{105}-Met_{106} связи. Установление точного места расщепления полипептидной цепи в молекуле бел-

ка, однако, очень затруднительно. Эта проблема решалась выявлением первичной структуры æ-казеина и синтезом коротких пептидов с такой же аминокислотной последовательностью вокруг Phe-Met связи как и в æ-казеине [I-2]. Далее обнаружено, что определяемая скорость реакции может быть повышена заменой метионина на норлейцин [3]. На основе этих исследований гексапептид Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOMe предложен как субстрат для измерения специфической протеолитической активности химозина и его заменителей [4].

При определении кинетических параметров $K_м$ и $K_{кат}$ реакции гидролиза Phe-Nle связи в молекуле гексапептида мы соприкасались с проблемой уменьшения активности химозина и бычьего пепсина в разбавленных ферментных растворах при хранении их в оптимальных условиях. Для продолжения работы необходимо было обратить особое внимание на причины уменьшения активности и принять меры для стабилизации ферментных растворов.

Выяснилось, что обнаруженное явление характерно многим белковым веществам, в частности, и ферментам [5]. Далее Борнзин и др. [6] показали, что при поверхностных концентрациях, не превышающих мономолекулярного слоя, альбумин и фибриноген характеризуются быстрой и необратимой по отношению к разбавлению адсорбцией на полимерных материалах, которая может привести к серьезным последствиям при применении искусственных кровеносных сосудов в медицине. Сультер и др. [7] пришли к выводу, что адсорбция белка характерна не только на синтетических, но и на стеклянных поверхностях.

В данной статье приводятся результаты по исследованию уменьшения активности химозина и бычьего пепсина в разбавленных растворах, обусловленного адсорбцией ферментов на внутренних поверхностях пробирок, контактируемых с раствором фермента и по изучению влияния полиэтиленгликоля на стабильность ферментных растворов.

Материалы и методы

Ферментами использовали высокоочищенные препараты химозина и бычьего пепсина. Очистка химозина проводилась со-

гласно методу Конинга [8], для очистки пепсина был применен метод повторной ионообменной хроматографии [9]. Исходными ферментными препаратами при очистке использовали коммерческие сычужные препараты лаборатории Chr. Hansen (Копенгаген, Дания). После последней ступени очистки ферментные растворы подвергались диализу и лиофилизации, степень очистки проверялась по методу электрофореза.

Ферментные растворы приготовляли в 0,05 М ацетатном буфере с содержанием I М NaCl, pH 5,20, концентрация фермента I мг/мл. При необходимости точную концентрацию химозина и говяжьего пепсина проверяли по определению экстинкции растворов при длинах волны 278 нм (коэффициент экстинкции $E\,\frac{I\ мг/мл}{I\ см}$ = I,530) и 280 нм ($E\,\frac{I\ мг/мл}{I\ см}$ = I,485), соответственно.

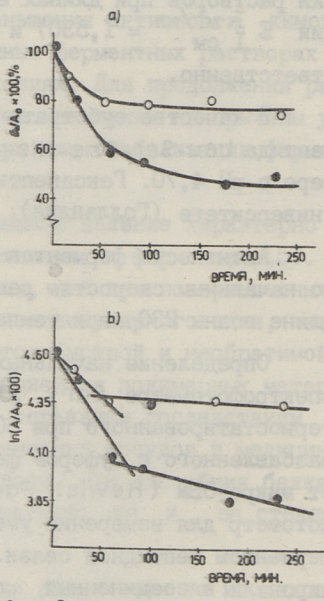
В качестве субстрата использовали I мМ раствор гексапептида Leu-Ser-Phe-Nle-Ala-IleOMe в 0,05 М ацетатном буфере с pH 4,70. Гексапептид был синтезирован в Лейденском университете (Голландия).

Активность ферментов выражали в мкат/кг и вычисляли по начальным скоростям реакции гидролиза Phe-Nle связи при длине волны 230 нм и температуре 30 °С.

Определение начальных скоростей осуществлялось на спектрофотометре Cary 219 фирмы "Varian" (США). В 500 мкл термостатированного при 30 °С субстрата пипетировали I5 мкл разбавленного с буфером ферментного раствора и по команде от микро-ЭВМ (Hewlett Packard 86, США) включали спектрофотометр для измерения уменьшения экстинкции расщепляемой ферментом пептидной связи. Соответствующие значения транслировали в соединенный спектрофотометр микро-ЭВМ. По прекращении реакции (глубина гидролиза X достигала >I0 %) вычисляли начальную скорость реакции и коэффициент корреляции r. Все необходимые программы для управления спектрофотометра и вычислений математических величин разработаны сотрудниками Научного института исследования молочной промышленности Х. Роллема и Я. Бринкхуйзом (Эде, Голландия).

Результаты и обсуждение

Для изучения уменьшения активности химозина в разбавленных ферментых растворах провели следующую серию опытов. Исходный раствор химозина с концентрацией ~I мг/мл разделили на 5 пробирок (стаканы центрифуги из термопласта) по 5 мкл в каждой и разводили до концентрации 3,3 мкг/мл (во второй серии 6,57 мкг/мл). Встряхивали тщательно и ставили на ледяную баню. Затем по I5 мкл ферментного раствора из каждой пробирки пипетировали в кюветы с субстратом и определяли начальную скорость реакции гидролиза Phe-Nle связи в молекуле Leu-Ser-Phe-Nle-JleOMe согласно вышеописанному методу. Через определенные промежутки времени опыты повторялись. По окончании серии вычисляли средние активности ферментов (из 5 параллельных) в растворах. Исходную активность определяли через I минуту после разбавления исходного ферментного раствора с буфером. Результаты представлены на фиг. 2.



Фиг. 2.

Уменьшение активности химозина в разбавленных растворах в зависимости от продолжительности хранения растворов на ледяной бане. Концентрации фермента:
—●—● — 3,29 мкг/мл,
—○—○— 6,57 мкг/мл.

Выяснилось, что несмотря на хранение фермента при оптимальных условиях (состав и pH буфера, пониженная температура) наблюдается постепенное уменьшение активности ферментного раствора. Например, после 6 часов хранения остаточная активность химозина с концентрацией 3,29 мкг/мл составляла всего лишь 50 % от исходной. Интересным оказался факт, что при концентрации химозина в растворе > 20 мкг/мл изменения активности не было обнаружено. Исходя из этого, можно предположить, что уменьшение активности химозина в пределах концентраций до 20 мкг/мл

вызвано адсорбцией химозина на поверхности сосуда, контактируемой с разбавленным ферментным раствором.

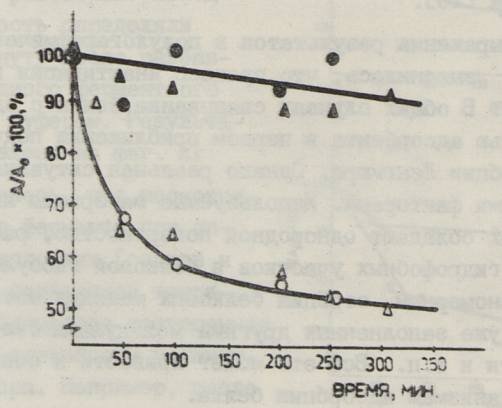
Из литературы известно [6], что удельный вес мономолекулярных слоев фибриногена и альбумина составляет 0,8 и 0,6 мкг/см^2, соответственно. Следовательно, если имеет место мономолекулярная адсорбция фермента, то уменьшение концентрации белка в растворе составляет не более I,0 мкг/см^2. Если учитывать, что уменьшение активности пропорционально количеству адсорбированного белка, то связанный химозин занимает площадь I,65 мкг/2,25 см^2 = 0,73 мкг/см^2. В другом случае, при концентрации раствора 6,57 мкг/мл, связанный химозин занимает I,3I мкг/2,25 см^2 = 0,58 мкг/см^2. Следовательно, не исключено, что уменьшение активности химозина в разбавленных ферментных растворах обусловлено адсорбцией фермента на внутренней поверхности используемого материала. Известно, что среди многочисленных методов иммобилизации адсорбция является первым методом, успешно применяемым еще в начале века [I0].

При выражении результатов в полулогарифмической шкале (фиг. 2,б) выяснилось, что процесс инактивации протекает в две стадии. В общих случаях связывание белка с однородной поверхностью адсорбента в первом приближении подчиняется закону адсорбции Ленгмюра. Однако реальная ситуация осложняется многими факторами. Используемые материалы лишь в редких случаях обладают однородной поверхностью, распределение зарядов и гидрофобных участков в белковой глобуле обычно не бывает равномерным, сорбция белковых молекул может происходить на уже заполненных другими молекулами белка участках поверхности и т.п. Все это может привести к очень осложненным механизмам адсорбции белка.

Более распространенные методы уменьшения адсорбции белка на поверхности раздела вода - твердое тело основываются на обработке поверхности адсорбента различными покрывающими материалами, например, альбумином или модифицирующими реагентами. Недостатками этих методов, однако, следует считать, с одной стороны, неинертность покрывающих материалов, так как во многих случаях применение альбумина недопустимо и, с другой стороны, сложность проведения химической модификации поверхностей (высокие температуры, токсичность реагентов).

Нередко единственным альтернативом оставалась замена используемых сосудов. Например, адсорбция диссоциированного свиного лактата дегидрогеназы на стеклянной поверхности при pH 2,5 приводит к необратимой инактивации фермента [11]. При применении поликарбоната или полипропилена в качестве поверхностного материала адсорбция не наблюдалась.

Выдвинута гипотеза о стабилизирующей роли полиэтиленгликоля (ПЭГ) как конкурентного адсорбата в отношении ферментов [5]. Многие высокомолекулярные соединения характеризуются различной адсорбционной способностью. Следовательно, если удается найти с инертными свойствами адсорбирующее вещество с повышенной аффинностью по отношению к адсорбции белков, можно достичь положения, где активные центры адсорбента связаны с конкурентным для ферментов веществом, препятствующим адсорбции белка. Ограничивающим условием, как уже упоминалось, является отсутствие взаимодействий между конкурентноспособным адсорбатом и молекулами фермента.



Фиг. 3. Влияние добавок полиэтиленгликоля (М 6000, концентрация 0,20 %) на стабильность разбавленных растворов химозина (—●—●— 3,44 мкг/мл) и пепсина (—▲—▲— 2,47 мкг/мл). Нижняя кривая соответствует стабильности растворов без полиэтиленгликоля.

Таким свойствам может соответствовать ПЭГ. Далее нами была проведена серия опытов по изучению стабилизирующего эффекта ПЭГ согласно вышеописанной методике. Концентрация ПЭГ в разбавленном ферментном растворе составляла 0,20 %. Ранее

нами подтверждалось, что ПЭГ в пределах концентрации от 0,05--0,50 % не влияет на активность ферментов.

Анализируя данные, приведенные на фиг. 3, можно сделать вывод, что ПЭГ имеет несомненный положительный эффект по стабилизации ферментных растворов. Во всех опытах, где применялся ПЭГ, остаточная активность химозина или бычьего пепсина после 5 часов от момента разбавления составляла 90-100 %. При этом наше внимание привлекли два момента:

1) разброс данных, наблюдаемых по ходу эксперимента с ПЭГ,

2) тенденция уменьшения активности ферментов в течение 60 мин. после разбавления фермента.

Очевидно, несмотря на повышенную концентрацию ПЭГ по сравнению с ферментом имеет место частичная быстрая адсорбция белка, который в последующем может быть заменен молекулами ПЭГ. Во многих опытах наблюдалась десорбция фермента, которая сопровождалась регенерацией активности в растворе, свидетельствуя об отсутствии необратимых изменений третичной структуры сорбции белка. Это означает, что молекулы белка и ПЭГ могут находиться в динамическом равновесии, регулируемом электростатическими, гидрофобными и дисперсионными взаимодействиями между адсорбентом и адсорбирующим веществом.

Нами были проведены и опыты по изучению стабильности ферментных растворов, находящихся в стеклянных пробирках. Эти растворы тоже имели тенденцию к уменьшению активности, которую можно подавить добавлением ПЭГ.

На основе полученных результатов можно заключить, что при работе с разбавленными ферментными растворами в пределах концентрации до 20 мкг белка/мл необходимо обратить удельное внимание на сохранение активности фермента. При повышенной концентрации фермента в растворе уменьшения активности не наблюдается, так как количество фермента, адсорбированного на поверхности раздела, общей концентрации его в растворе существенно не меняет.

В качестве стабилизирующего реагента рекомендуется добавить в разбавленный ферментный раствор полиэтиленгликоль с молекулярной массой 6000 или 20 000 в количестве 0,1-0,3 %

Этим гарантируется 90-100% активность ферментного раствора в течение многих часов.

От имени коллектива группы инженерной энзимологии ТПИ автор статьи выражает глубокую благодарность д-ру Т. Пайенсу и д-ру С. Виссеру за оказание всемерной помощи при организации и проведении как настоящей работы, так и всей научной стажировки.

Литература

1. Visser S., Van Rooijen P.J., Schattenkerk C., Kerling K.E.T. Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetic studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101-112 of bovine k-casein. - Biochim. Biophys. Acta, 1976, vol. 438, p. 265-272.

2. Visser S., Van Rooijen P.J., Schattenkerk C., Kerling K.E.T. Peptide substrates for chymosin (rennin). Kinetic studies with bovine k-casein-(103-108)-hexapeptide analogues. - Biochim. Biophys. Acta, 1977, vol. 481, p. 171-176.

3. De Koning P.J., Van Rooijen P.J., Visser S. Application of a synthetic hexapeptide as a standard substrate for the determination of the activity of chymosin. - Neth. Milk Dairy J., 1978, vol. 32, p. 232-244.

4. Visser S. Proteolytic enzymes and their action on milk proteins. A review. - Neth. Milk Dairy J., 1981, vol. 35, p. 65-88.

5. Lottenberg R., Hall J.A., Blinder M., Binder E.P., Jackson M.C. The action of thrombin on peptide p-nitroanilide substrates. Substrate selectivity and examination of hydrolysis under different reaction conditions. - Biochim. Biophys. Acta, 1983, vol.742, p. 539-557.

6. Bornzin A.Y., Miller F.I. The kinetics of protein adsorption on synthetics and modified natural surfaces. - J. Colloid Interface Sci., 1982, vol. 86, N 2, p. 539-558.

7. Suelter H.C., DeLuca M. How to prevent losses of protein by adsorption to glass and plastic. - Anal. Biochem., 1983, vol. 135, p. 112-119.

8. De Koning P.J. Thesis: Studies on rennin and the genetic variants of casein. University of Amsterdam.

9. Determination of chymosin and bovine pepsin content (Chromatographic method). IDF Standard 110:1982.

10. Березин И.В., Антонов В.К., Мартинек К. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы. М., том I, 1976. 296 с.

11. Tenenbaum-Bayer H., Levitzki A. The refolding of lactate dehydrogenase subunits and their assembly to the functional tetramer. - Biochim. Biophys. Acta, 1976, vol. 445, p. 261-279.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 57.086.835.004.14

Н.В. Архангельская, А.К. Абдвахитова,
А.Х. Калда, М.И. Крезн

ВЛИЯНИЕ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ НА РОСТ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ

Введение

Высшие растения являются основным и наиболее продуктивным источником лекарственных веществ и некоторых других биологически активных природных соединений. Использование целых растений в качестве сырья общепринято и в большинстве случаев наиболее целесообразно. Однако при затруднениях с культивированием целых растений в качестве альтернативного варианта рассматривают биосинтез с помощью тканевых и клеточных культур. Этот способ применения культур клеток растений (ККР) считается одним из перспективных направлений современной биотехнологии [1, 2]. В настоящее время в культуру введены почти все виды растений и идентифицировано более 200 веществ - продуктов их метаболизма, однако известно лишь около 30 соединений, которые накапливаются в ККР в количествах, равных или превышающих их содержание в исходных растениях [3]. В остальных случаях ККР пока не синтезируют требуемые соединения с продуктивностью, которая сделала бы этот метод экономически выгодным.

Разрабатываются различные способы повышения технологической эффективности процессов с ККР. Это получение высокопродуктивных штаммов методами мутагенеза и селекции, клеточной и генетической инженерии, а также получение быстрорастущих клеточных линий, культивируемых на простых питательных средах.

Питательная среда для ККР является одним из наиболее активно действующих факторов, определяющих направленность обмена веществ в клетках. В связи с этим исследователи обычно оптимизируют среды для каждой конкретной культуры и

в соответствии с целью ее выращивания. Тем не менее, существуют общие требования к составу питательных сред, включающих минеральные компоненты, углеводы, витамины, аминокислоты и стимуляторы роста. Наибольшая неопределенность просматривается в составе источников азотного питания, в качестве которых чаще всего используют минеральные соли (аммонийные и нитраты), пептон, экстракт дрожжей или гидролизат казеина, причем последний на рост многих тканей оказывает стимулирующее действие [4]. В то же время имеются сведения, что эффект гидролизата зависит от его происхождения, от присутствия в среде других источников азотного питания, и в ряде случаев может быть заменен действием одной или нескольких аминокислот [5]. В практике же пользуются различными импортными препаратами гидролизата казеина, не учитывая способа их получения и глубины гидролиза.

В связи с этим мы ставили своей целью изучение влияния на рост ККР различных полученных нами препаратов гидролизата казеина, в качестве основного источника азотного питания.

Работа проведена на культуре мака Papaver somniferum, способной к синтезу ряда алкалоидов и являющейся удобным модельным объектом для изучения роста и вторичного метаболизма [6].

Материалы и методы

Культура. Каллусная культура P. somniferum была предоставлена нам З.Б. Шаминой из Института физиологии растений АН СССР по договору о сотрудничестве. Ткань культивировали в пробирках на агаризованной среде при температуре 26 °С, в темноте. Минеральную основу питательной среды приготовляли по прописи Мурасиге и Скуга, добавляли витамины, ростовые вещества, сахарозу, гидролизат казеина. Среды автоклавировали при 0,7–0,8 атм в течение 30 мин. Пересаживали ткани через 29–32 дня.

Для характеристики роста культуры в различных условиях питания снимали ростовые кривые, отражающие скорость нарастания сырого веса w, относительный прирост сырого веса ткани $(\frac{w-w_0}{w_0})$ во времени, а также ростовой индекс $\frac{w}{w_0}$ и относительное содержание сухого вещества в ткани. Вес ткани каллусов измеряли через каждые 3–4 дня. Поскольку в течение

цикла роста наблюдался значительный разброс данных по сырому и сухому весу (до 30 %), то каждую точку ростовой кривой получали усреднением 3-х измерений. Для этого каллусную ткань при пассировании помещали в 30 пробирок на каждый вариант среды и при измерении веса эксплантат полностью извлекали, взвешивали, высушивали на воздухе до постоянного веса и измеряли сухой вес. Результаты по весу из трех пробирок усредняли и для построения кривых роста использовали средние арифметические значения.

Для определения интенсивности вторичного метаболизма культур определяли общее содержание алкалоидов в тканях на 28-е сутки роста, на стационарной фазе. Процессы роста и вторичного метаболизма, как правило, находятся в обратной зависимости из-за конкуренции за общие для них аминокислоты [9]. Поэтому максимальный синтез вторичных продуктов происходит, когда интенсивность белкового синтеза снижена, что характерно для завершения логарифмической фазы роста и перехода на стационарную. Алкалоиды экстрагировали из сухой измельченной ткани 15 % уксусной кислотой (на 1 г ткани 50 мл кислоты) в течение 1 часа, отфильтрованные экстракты подщелачивали до pH 9-10 и экстрагировали хлороформом при объемном отношении фильтрат:хлороформ = 2 : 1. Хлороформенные извлечения упаривали под вакуумом, растворяли в этаноле и снимали ультрафиолетовые спектры поглощения на Specord-40M (Карл Цейсс, Йена). Суммарное количество алкалоидов определяли по поглощению при 280 нм [7]. Количественное содержание веществ рассчитывали с помощью предварительно определенных значений коэффициентов удельного поглощения спиртовых растворов чистых модельных компонентов. Расчет содержания дается на 1 г сухого вещества ткани. Отдельно определяли содержание в пробах сангвинарина. Для этого высушенную ткань экстрагировали 12 часов подкисленным муравьиной кислотой хлороформом, хлороформенный экстракт промывали 5% серной кислотой. Сангвинарин переходит во фракцию серной кислоты, в которой измеряли оптическую плотность при 285 нм и 235 нм. Для оценки количества алкалоида сангвинарина использовали отношение E_{285}/E_{235} [8].

Гидролизат казеина

В работе испытывали три препарата гидролизата казеина. Два из них получены при проведении процесса гидролиза с протосубтилином, свободным (препарат II) и иммобилизованным на органоминеральном носителе (препарат I), разработанном на кафедре органической и биологической химии Таллинского политехнического института. Для сравнения использовали отечественный опытный препарат НПО "Биохимреактив" (Олайне), полученный с панкреатином (III). Гидролиз 2%-го раствора казеина или Na-казеината проводили при 40 °С в течение 8 часов в реакторе периодического типа с перемешиванием. Используемые ферментные препараты имели активность 50-100 Ед/г сухого веса. Полученные гидролизаты были исследованы на степень гидролиза по содержанию аминного азота. Данные по гидролизатам казеина представлены в таблице I.

Хроматографическое исследование препаратов ГК проводили на колонке 2,5х25 см с сефадексом Г-10, элюировали боратным буфером с pH 8-8,5, содержание белка во фракциях детектировали по поглощению ультрафиолетового света при λ= 280 нм.

Результаты хроматографии подтверждают достижение наибольшей глубины гидролиза в препарате ГКIII, полученном с панкреатином. Кроме того показано, что во всех препаратах присутствуют высокомолекулярные фракции.

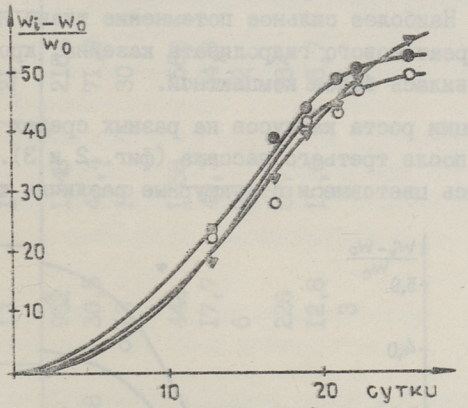
Таблица I

Условия проведения процесса гидролиза и характеристика используемых препаратов гидролизата казеина

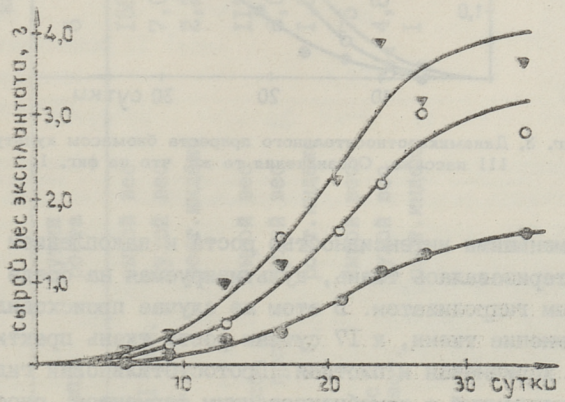
Название препарата ГК	Концентрация субстрата, %	pH среды	Акт-сть фермента, Ед протеол. акт-сти/г сух.вещ.	Содержание аминного азота в препарате ГК, М/г сух.веса
ГКI, полученный с иммобилизованным протосубтилином	2	8,5	20	5,79
ГКII, полученный со своб.протосубтилином	2	8,5	105	4,63
ГКIII, полученный с панреатином	2	8,0	377	7,76

Результаты и обсуждение

Ростовые кривые каллусов первого и третьего пассажей, культивируемых на исследуемых средах, представлены на фиг. I и 2. При пассировании каллусы были светлые, рассыпчатые. В первом пассаже на специальной среде ткань обычно еще не приобретает особых признаков, реакция или "привыкание" ткани происходит после двух-трех пассажей. Действительно, в нашем случае ростовые кривые первого пассажа на разных



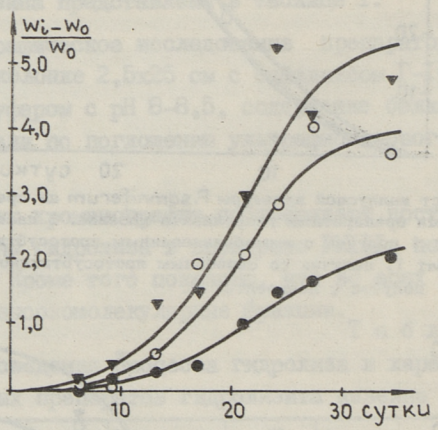
Фиг. 1. Рост каллусной культуры P.somniferum на средах с разными препаратами гидролизата казеина. 1 пассаж, препарат 1 получен с иммобилизованным протосубтилином, препарат 11 получен со свободным протосубтилином, препарат 111 получен с панкреатином.



Фиг. 2. Рост каллусной культуры на средах с разными препаратами гидролизата казеина. 111 пассаж. Обозначения те же, что на фиг. 1.

средах отличаются мало (фиг. I). Отличия в основном касаются цвета и структуры тканей. Примерно к 30-32 суткам все каллусы приобретали коричневый цвет, однако в течение ростового цикла цвет тканей сильно варьировал в разных вариантах опыта. Каллусы, культивируемые на среде с протосубтилиновым гидролизатом (иммобилизованный вариант) оставались светлыми и рассыпчатыми практически до конца пассажа (до 25 -29 суток роста). Протосубтилиновый гидролизат (без иммобилизации) вызывал некоторое потемнение ткани после двух недель роста. Наиболее сильное потемнение ткани наблюдалось в случае панкреатинового гидролизата казеина, кроме того ткань становилась более компактной.

Тенденции роста каллусов на разных средах отчетливо проявились после третьего пассажа (фиг. 2 и 3). Вместе с тем усилились цветовые и структурные различия тканей.



Фиг. 3. Динамика относительного прироста биомассы культуры 111 пассажа. Обозначения те же, что на фиг. 1.

Наименьшими интенсивностью роста и накоплением биомассы характеризовалась ткань, культивируемая на среде с панкреатиновым гидролизатом. В этом же случае происходило раннее потемнение ткани, к I7 суткам роста ткань практически вся была коричневая и плотная. Протосубтилиновый гидролизат I, приготовленный с иммобилизованным ферментом, способствовал наибольшему накоплению биомассы, превышающему вариант с панкреатиновым гидролизатом III примерно в 3 раза. Каллусы в

Таблица 2

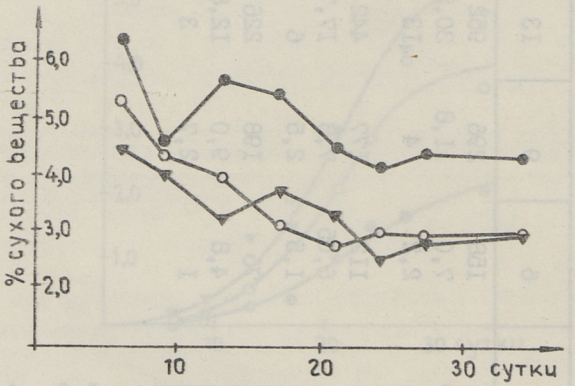
Данные по росту каллусов, культивируемых на средах с разными гидролизатами казеина (ГК). III пассаж

Вес (мг)	сутки роста	6	9	I3	I7	2I	24	27	34
ГК с I имм. прот.	сырой вес	I58	296	952	II48	2I84	3827	3086	3523
	сухой вес	7,0	II,8	30,5	42,4	7I,9	9I,7	88,0	I02,4
	рост. индекс	2,2	4	I3	I6	30	53	43	49
П ГК со своб. прот.	сырой вес	II2	I77	442	I458	I562	2I8I	2978	2726
	сухой вес	6,05	7,8	I7,7	45,3	44,8	65,4	86,6	79,7
	рост. индекс	I,5	2,5	6	20	22	30	4I	38
Ш ГК с панкреот.	сырой вес	75	I98	226	287	784	I087	I242	I5I3
	сухой вес	4,8	9,0	I2,8	I5,6	35,7	45,5	53,2	47,3
	рост. индекс	I	2,7	3	4	II	I5	I7	2I

данном случае сохраняли светлый цвет, рассыпчатость до конца пассажа. За циклы роста накопление биомассы составляло почти 4 г на каллус (при пассировании вес ткани равнялся 50-100 мг, т.е. за 4-5 недель получали прирост биомассы ~400 г на I л среды.

Протосубтилиновый гидролизат II (вариант без иммобилизации) также способствовал значительному накоплению биомассы, превышающему таковое в варианте с панкреатиновым препаратом примерно в 2 раза, и составляющему ~300 г на I л среды за пассаж (табл. 2).

Время удвоения сырого веса ткани для варианта с протосубтилиновым гидролизатом I (иммобилизованный фермент) составляло примерно 6 дней, для протосубтилинового гидролизата II (свободный фермент) и для панкреатинового препарата III - 8 дней. Ростовой индекс при месячном культивировании составил, соответственно 45, 39 и 19.



Фиг. 4. Динамика содержания сухого вещества в ткани каллусной культуры 111 пассажа. Обозначения те же, что на фиг. 1.

Динамика содержания сухого вещества ткани (фиг. 4) в целом примерно одинакова во всех вариантах опыта: процент сухого веса снижается за пассаж на I,5-2 %. Однако в варианте с панкреатиновым гидролизатом III в составе питательной среды (слабый рост культуры) на латентной фазе роста сначала наблюдается резкое падение содержания сухого вещества в ткани каллуса, а затем временное нарастание, что яв-

ляется косвенным доказательством изменений в характере роста ткани. Кроме того для этого варианта характерен и более высокий общий уровень сухого вещества ткани, что может быть вызвано замедленным делением клеток.

Культура клеток, дающая наиболее высокий выход биомассы, отличается также более высокой скоростью роста (фиг. 3). Максимальное накопление биомассы наблюдается для каллуса, растущего на протосубтилиновом гидролизате I (иммоб. вариант), через 24 дня. Протосубтилиновый гидролизат II (своб. вариант) способствует максимальному накоплению биомассы через 27 дней, а панкреатиновый гидролизат III - через 34 дня культивирования.

Данные по измерению содержания алкалоидов представлены в табл. 3 и свидетельствуют о несколько сниженном уровне синтеза вторичных продуктов в пересчете на вес ткани для вариантов среды с протосубтилиновым гидролизатом.

Таблица 3

Содержание суммы алкалоидов и сангвинарина в каллусной ткани на 28-е сутки роста

Препарат гидролизата казеина в составе питательной среды	Сумма алкалоидов, мг на 1 г сух. веса	Сангвинарин, мг/г сух.веса
Протосубтилиновый I (вариант с иммобилизованным ферментом)	0,18	0,018
Протосубтилиновый II (свободный фермент)	0,15	0,018
Панкреатиновый III	0,53	0,116

Коричневые, плохо растущие ткани на панкреатиновом гидролизате III синтезируют и большее количество сангвинарина. На культуре Papaver bracteatum было показано, что коричневая окраска ткани определяется именно сангвинарином [8], который в чистом виде имеет желто-коричневый цвет. Возможно, что и в случае P. somniferum , по крайней мере, одним из факторов, определяющих коричневение культуры, является синтез сангвинарина.

Тем не менее, учитывая интенсивный рост и высокий выход биомассы на средах с протосубтилиновыми препаратами

гидролизата казеина, особенно в варианте с иммобилизацией протеолитического фермента, общий выход вторичных продуктов, синтезируемых культурами на этой среде, достаточно высок. Следует учесть и то обстоятельство, что при многократном пассировании скорость роста плохо растущей культуры может еще снизиться.

Таким образом, использование в составе питательных сред гидролизата казеина, полученного с иммобилизованным протосубтилином по разработанному на нашей кафедре способу, целесообразно для накопления биомассы культуры растительной ткани, которую в дальнейшем можно использовать в качестве сырья для получения ценных вторичных продуктов или в каких-либо других целях.

Литература

1. Plant biotechnology / Ed. by S.H. Mantell and H. Smith. Cambridge University Press, 1983.

2. Gibbs D.F. Low energy routes by biotechnological processes. - Chem. and Ind., 1982, N 21, p. 858-860.

3. Staba E. Production of useful compounds from plant tissue cultures. - Plant Tissue Cult., 1982, Proc. 5 Int. Congr. Plant Tissue and Cell Cult. Tokyo and Lake Jamanaka, July 11-16, 1982. Tokyo, 1982, p. 25-30.

4. Kurz W.G., Constabel F. Plant cell culture, a potential source of pharmaceuticals. - Adv. Appl. Microbiol., 1979, 25, p. 209-240.

5. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М., 1964, с. 33.

6. Hodges C.C., Rapoport H. Morphinan alkaloids in callus cultures of Papaver somniferum. - J. Nat. Prod., 1982, 45, N 4, p. 481-485.

7. Slavik J. Occurrence of morphine as a minor alkaloid in Papaver decaisnei H. - Collect. Czechosl. Chem. Commun., 1980, 45, p. 2706-2709.

8. Рабинович С.А., Смирнов А.М. Алкалоиды каллусных тканей Papaver bracteatum. Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с. 63-64.

9. Ловкова М.Я. Биосинтез и метаболизм алкалоидов в растениях. М., 1981, с. 116.

N. Arkhangelskaya, A. Abdvakhitova,
A. Kalda, M. Kreen

The Influence of Nitrogen Source on the Growth of Papaver Somniferum Callus Culture

Summary

Papaver somniferum callus culture has been grown on nutrient medium with caseine hydrolisate as nitrogen source. Casein hydrolisate preparations have been obtained by soluble protosubtiline and protosubtiline immobilized on organic-mineral supports. The Soviet experimental preparation of caseine hydrolisate obtained by pancreatine has been used for comparison. Culture biomass yield, growth rates and synthesis of alkaloids have been studied.

Callus culture grown on caseine hydrolisate obtained by immobilized protosubtiline has been characterized with rapid growth and high biomass yield.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.152.34:577.112.389.4

Л.М. Якуницкая, А.И. Кёстнер, В.П. Тихомирова,
М.А. Самарцев

ПРИМЕНЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРОФОКУСИРОВАНИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ И ДИСК-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХИМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КИСЛЫХ ПРОТЕИНАЗ

Модификация функциональных групп белков, первоначально применявшаяся в основном как метод структурных исследований, в настоящее время все чаще используется для решениях практических задач в области биотехнологии, пищевой технологии и медицины. Наиболее перспективны возможности регулирования с помощью химических превращений термостабильности ферментов, так называемых "функциональных" свойств пищевых белков, иммунохимических свойств и токсичности белковых антигенов и иммуноглобулинов. Однако изучение физико-химических свойств модифицированных белков значительно отстает от прикладных разработок.

Ряд задач в аналитической и препаративной химии белка решается путем направленного изменения электрохимических свойств белковой молекулы при неспецифической химической модификации аминогрупп, в результате которой положительно заряженные аминогруппы превращаются в нейтральные или отрицательно заряженные группировки. Этим путем добиваются изменения электрофоретической подвижности иммуноглобулинов [1], диссоциации субъединичных белков [2, 3] и комплексов белков с нуклеиновыми кислотами [4], повышения растворимости пищевых белков [5], их эмульгирующей и пенообразующей способности [6, 7].

Нами было показано [8], что при модификации химотрипсина (pI 8,3) хлорангидридами или ангидридами одно- и двухосновных кислот, параллельно с увеличением электрофоретической подвижности (Эф-подвижность) в щелочном буфере, происходит сдвиг в кислую область изоэлектрических точек (pI)

белка. При этом, в отличие от электрофореза, изоэлектрофокусирование в тонком слое полиакриламида позволяет выявить гетерогенный характер продуктов даже в случае "предельной" модификации аминогрупп, при которой pI достигают значений 2,3-2,8 в случае ацетил-химотрипсина и I,8-2,5 - в случае малеил-химотрипсина. Существенно, что модификации проводились в условиях, при которых не происходит полного нарушения нативной конформации в области активного центра фермента, что подтверждено сохранением протеолитической активности у всех полос изоэлектрического спектра образцов ацилированного химотрипсина. Было сделано заключение, что при модификации в неденатурирующих условиях последовательное замещение аминогрупп белка идет несколькими параллельными путями и при "предельном" замещении приводит к смеси нескольких конечных продуктов, в каждом из которых небольшое число аминогрупп (по крайней мере одна) остается незамещенным в результате пространственного или зарядного экранирования [9].

Целью настоящей работы является исследование электромиграционных свойств продуктов модификации белков с низкими pI, в качестве примеров которых выбраны две кислые протеиназы - пепсин и микробный реннин из Mucor renninus. Представляло интерес не только провести модификации, аналогичные описанным выше для химотрипсина, но и изучить возможности смещения pI кислых белков в щелочную область за счет повышения основности ε-аминогрупп лизина или блокирования карбоксильных групп, в том числе с заменой их на положительно заряженные группировки.

Материалы и методы

В работе использовали микробный реннин производства Бердского химзавода с содержанием белка 80 % (по биуретовому методу), свиной пепсин фирмы Sigma (США) и кональбумин фирмы Serva (ФРГ). Изоэлектрофокусирование проводили на приборе Multiphore (LKB, Швеция) с использованием пластинок Servalyte precoates (Serva, ФРГ) в интервалах pH 3,5--I0 и 3-6 [8]. Окрашивание гелей проводили с помощью красителя Serva blue R = 250, проявление по активности с использованием пленок желатина - согласно [I0]. Диск-электро-

форез на приборе модель 69 (Reanal, Венгрия) проводили в буфере с pH 8,9 в соответствии с инструкцией к прибору.

Протеолитическую активность при pH 2,0 и 3,5 определяли по 2%-ному раствору гемоглобина [II].

Модификация микробного реннина ангидридами кислот. К охлажденному на ледяной бане раствору 200 мг реннина в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 6,0 добавляли раствор 100 мг малеинового ангидрида в 1 мл диоксана тремя порциями с интервалами 20 мин. при постоянном перемешивании. Реакцию проводили в течение 1,5 часа, затем раствор диализовали при 4 °С против воды (4 х 4 л) в течение суток и лиофилизовали. Аналогично проводили модификацию другими ангидридами; уксусный ангидрид добавляли тремя порциями по 30 мкл с помощью дозировочной микропипетки.

Карбодиимидная модификация. Раствор 200 мг реннина в 95 мл воды доводили до pH 3,0 с помощью 1 М HCl и охлаждали на ледяной бане. Отдельно готовили два раствора реагентов: 50 мг гидрохлорида N-этил-N'-диметиламинопропилкарбодиимида и 100 мг гидрохлорида этилендиамина по отдельности растворяли в 1 мл 10^{-3} М HCl. К охлажденному раствору фермента при перемешивании на магнитной мешалке добавляли по 0,5 мл растворов обоих реагентов двумя порциями с интервалами 30 мин. Реакцию проводили в течение часа, после чего раствор диализовали и лиофилизовали. Аналогично проводили карбодиимидную реакцию с аргинином и метиловым эфиром аргинина. При изменении соотношения реагентов и фермента пропорционально изменяли дозировку обоих реагентных растворов. Модификацию пепсина проводили согласно [12].

Гуанидинирование микробного реннина. К раствору 200 мг реннина в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 6,0 при охлаждении и перемешивании добавляли раствор 100 мг сульфата О-метилизомочевины в 5 мл того же буфера тремя порциями с интервалами 1 ч. После 4 ч реакции проводили диализ и лиофилизацию раствора.

Амидирование микробного реннина. Раствор 200 мг реннина в 100 мл воды при охлаждении доводили до pH 8,5 с помощью 1 М NaOH и при перемешивании добавляли гидрохлорид этилацетимидата двумя порциями по 50 мг с интервалом в 30 мин. Реакцию проводили в течение часа, раствор диализовали и лиофилизовали.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что две карбоксильные группы входят в активный центр кислых протеиназ, и глубокая модификация карбоксилов может привести к резкому падению активности [12], замещение проводили в условиях, гарантирующих сохранение активности [12], с контролем последней как в растворе, так и после изоэлектрофокусирования в тонком слое.

Исследованный нами микробный реннин [13] представляет собой смешанный ферментный препарат, в котором обнаружено 6 белковых зон при диск-электрофорезе и 9 белковых компонентов с pI от 3,5 до 8,3 - при изоэлектрофокусировании в тонком слое полиакриламида в интервале pH 3,5-10. Проявление пластинок по активности с использованием желатинового субстрата позволило установить, что протеолитической активностью обладают три компонента с pI 3,5, 5,4 и 5,8, причем наибольшей активностью в смеси обладает протеиназа с pI 3,5. Выделение этой фракции в индивидуальном состоянии с помощью хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе позволило однозначно установить положение отвечающей ей наиболее интенсивной белковой зоны на диск-электрофореграммах и следить за изменением ее положения при модификациях.

Модификацию микробного реннина проводили с помощью реагентов, перечисленных в табл. I. Приведенные в таблице интервалы изоэлектрических точек препаратов, полученных при ацилировании аминогрупп ангидридами кислот, отвечают модификации суммы всех компонентов исходного препарата, то есть, например, в случае янтарного ангидрида в смеси продуктов модификации не содержалось компонентов с pI выше 4,8. В приведенном интервале содержится достаточно большое число дискретных полос, из-за тесного расположения которых их точный подсчет и идентификация затруднительны. Можно только заключить, что при достаточно глубокой модификации ангидридами все исходные компоненты, независимо от начальной pI, становятся сильно кислыми белками с $pI \leq 3,2$, что согласуется с результатом, полученным ранее для химотрипсина [8]. Как и следовало предполагать, ангидриды двухосновных кислот сдвигают pI ацилированных белков в более кислую область, чем уксусный ангидрид.

Таблица I

Характеристика химически модифицированных препаратов микробного реннина

Реагенты для модификации	Весовое отношение количества реагента к количеству фермента	Удельная протеолитическая активность, в % от активности исходного препарата	Изоэлектрическая точка, pI	Относительная электрофоретическая подвижность при pH 8,9
Исходный препарат	-	100	3,5	1,00
Янтарный ангидрид	0,5	56	2,3-4,8	1,19
Малеиновый ангидрид	0,2	56	2,1-4,8	1,15
Малеиновый ангидрид	0,5	89	1,8-3,0	1,57
Фталевый ангидрид	0,5	110	2,1-3,2	1,09
Уксусный ангидрид	0,5	89	3,0, 3,1	1,00
Водорастворимый карбодиимид (КДИ) + этилендиамин	0,33	78	3,5	0,95
КДИ + этилендиамин	0,5	141	3,5	0,85
КДИ + 1,4-диаминобутан	0,5	65	3,5	1,05
КДИ + аргинин	0,5	112	3,3	0,93
КДИ + метиловый эфир аргинина	0,5	113	3,3	0,86
КДИ + метиловый эфир аргинина	1	105	3,5, 3,6	0,81
КДИ + метиловый эфир аргинина	5	62	3,7, 4,0	0,80
О-метилизомочевина	0,5	121	3,4	0,97
О-метилизомочевина	1	62	3,5	0,93
О-метилизомочевина	10	32	5,0, 5,3	0,90
Метилацетимидат	0,5	128	3,3	0,89

В отличие от изоэлектрофокусирования, при диск-электрофорезе легко может быть идентифицирована интенсивная полоса, отвечающая модифицированной протеиназе с исходной pI 3,5. ЭФ-подвижность в результате замены аминогрупп на карбоксильные уменьшается, а при ацетилировании не изменяется, несмотря на однозначное смещение pI продукта ацетилирования в кислую область.

Совсем иной характер носит изменение электромиграционных свойств протеиназы с pI 3,5 при модификациях, связанных с повышением основности функциональных групп белка. Прежде всего отметим, что наблюдаемые изменения pI относительно невелики, что позволяет во всех случаях идентифицировать полосу или группу полос, отвечающих модификации интересующего нас компонента исходного продукта. При небольшой степени модификации pI вообще не изменяются или даже несколько смещаются в кислую область, при этом не может проявиться гетерогенность продукта модификации. В то же время уменьшение во всех случаях ЭФ-подвижности свидетельствует о том, что модификация прошла в ожидаемом направлении. И только при большом избытке модификатора pI изменяются в сторону повышения основности белка, и одновременно начинает проявляться гетерогенность модификации. Максимальный сдвиг pI до 5,0-5,3 наблюдался при гуанидинировании аминогрупп большим избытком О-метилизомочевины, при этом препарат сохранял 32 % исходной протеолитической активности. В то же время максимальное изменение ЭФ-подвижности произошло при модификации карбоксильных групп большим избытком метилового эфира аргинина с помощью карбодиимида, то есть при замене карбоксильных групп на сильноосновные гуанидиногруппы; при этом pI увеличилась всего на 0,5 единицы pH.

Сделанные наблюдения позволяют говорить об отсутствии прямой корреляции между изменениями pI и ЭФ-подвижности биологически активной формы данного фермента (то есть с сохранением, хотя бы частично, нативной конформации) при модификациях, ведущих к повышению основности функциональных групп. Изменение ЭФ-подвижности здесь является более надежным критерием модификации, чем изменение pI. С целью выяснения, насколько общий характер имеет это наблюдение, нами была проведена модификация другой кислой протеиназы - пепсина, а также нейтрального белка - кональбумина (pI 5,9).

Модификация кональбумина как по карбоксильным группам с помощью карбодиимида и этилендиамина, так и по аминогруппам действием О-метилизомочевины (при весовом соотношении реагента и белка 0,5:I) привела к получению при изоэлектрофокусировании серии большого числа дискретных полос с pI 5,9-7,2; о неглубокой степени модификации свидетельствует присутствие интенсивной полосы исходного белка с pI 5,9.

Таблица 2

Характеристика образцов химически модифицированного пепсина

Реагент для модификации	Весовое количество эфира аминокислоты, в мг на I мг пепсина (молей на I моль пепсина)	Активность по гемоглобину, % от активности пепсина		pI	Эф-подвижность относительно пепсина
		pH 2,0	pH 3,5		
Исходный пепсин	-	I00	I00	2,0	I,0
Водорастворимый карбодиимид КДИ[x]	-	54	I78	2,2-3,0	0,95-0,98
КДИ + метиловый эфир глицина HCl	0,3 (88)	60	278	2,4-2,9	0,78-0,9I
то же	0,6 (I75)	66	295	2,2-2,9	0,8I-0,94
то же[xx]	0,6 (I75)	94	265	2,3-3,4	не опр.
КДИ + метиловый эфир аргинина 2HCl	I,3 (I80)	55	235	3,5-5,7	0,73-0,93

x Во всех опытах использовали карбодиимид в расчете I9,2 мг на I00 мг пепсина, что отвечает отношению 35 молей реагента на I моль пепсина.

xx В опыте использовали отечественный свиной пепсин с содержанием белка 80 %.

Результаты модификации пепсина по карбоксильным группам представлены в табл. 2. Несмотря на относительно низкое разрешение полос в области pH 2,0-3,0, изоэлектрические спектры уже при слабой модификации состоят из набора хорошо

различимых полос со смещением pI только в щелочную область, то есть аномалия, имеющая место для микробного реннина, в случае пепсина и кональбумина не наблюдается. Существенно сохранение высокой активности модифицированного пепсина: некоторое снижение активности при pH 2,0 отражает изменение pH-оптимума активности. При диск-электрофорезе полоса модифицированного пепсина получается тем более широкой, чем больше сдвиг и шире интервал его изоэлектрических точек, аналогично наблюдавшемуся ранее для химотрипсина.

Таким образом, протеиназа микробного реннина с pI 3,5 проявляет неожиданное свойство не изменять pI или даже изменять ее в сторону повышения кислотности при неглубокой модификации карбоксильных или аминогрупп с повышением основности (понижением кислотности) этих функциональных групп. Единственным объяснением этому может быть особенность пространственной структуры макромолекулы фермента, при которой повышение основности нескольких функциональных групп компенсируется их взаимодействием с окружением. В литературе нами обнаружен один пример такого рода [I4]: при восстановительном метилировании ε-аминогрупп лизина в β-лактоглобулине (pI 5,3) даже 80%-ная модификация сдвигает pI не более чем на 0,I. Вероятно, аналогичная аномалия может быть обнаружена и для некоторых других белков.

Литература

I. Ширгель Б. Количественный двумерный иммуноэлектрофорез (перекрестный электрофорез по Лорелду). – В кн.: Иммунологические методы / Под ред. Х. Фримеля. М., Мир, I979, с. I9-30.

2. Брок И. Фрагментирование иммуноглобулинов. – Там же, с. 298-3I7.

3. Nieto M.A., Palacián L. Effects of temperature and pH on the regeneration of the amino groups of ovalbumin after modification with citraconic and dimethylmaleic anhydrides. – Biochim. et Biophys. Acta, 1983, vol. 749, N 1, p. 204-210.

4. Pat. 4348479 (США). Recovery of proteinaceous material having reduced nucleic acid levels / J.L. Kinsella, J.K. Shetty – Опубл. 1982.

5. Barber K.J., Werthesen J.J. Some functional properties of acylated wheat gluten. - J. Agric. and Food Chem., 1982, vol. 30, N 5, p. 930-934.

6. Brinegar A.C., Kinsella J.E. Reversible modification of lysine in soybean proteins, using citraconic anhydride: characterization of physical and chemical changes in soy protein isolate, the 7S globulin and lipoxygenase. - J. Agric. and Food Chem., 1980, vol. 28, N 4, p. 818-824.

7. Waniska R.D., Shetty J.K., Kinsella J.E. Protein-stabilized emulsions: effect of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. - J. Agric. and Food Chem., 1981, vol. 29, N 4, p. 826-831.

8. Якуницкая Л.М., Беляков Н.В., Самарцев М.А., Кёстнер А.И. Гетерогенный характер модификации белков при замещении их аминогрупп. Ацилирование α-химотрипсина. - Биохимия, 1983, т. 48, № 10, с. 1596-1603.

9. Якуницкая Л.М., Самарцев М.А., Беляков Н.В., Кёстнер А.И. Нахождение условий максимальной модификации аминогрупп белка с контролем методом изоэлектрического фокусирования в тонком слое. - В сб.: УI Всес. симп. по химии белков и пептидов. Тезисы докладов. Рига, 1983, с. 131-132.

10. Burger W.C., Schroeder R.L. A sensitive method for detecting endopeptidases in electrofocused thin-layer gels. - Anal. Biochem., 1976, vol. 71, N 2, p. 384-392.

11. Шитова В.И., Самарцев М.А., Куликов С.В., Беляков Н.В. Выделение и характеристика кислой протеиназы из Aspergillus oryzae. - Хим. природн. соед., 1981, № 3, с. 366-373.

12. Ma C.-Y., Nakai S. Chemical modification of carboxyl groups in porcine pepsin. - J. Agric. and Food Chem., 1980, vol. 28, N 4, p. 834-839.

13. Belyauskaite I.P., Palubinskas V.J., Anchenko O.E., Vesa V.S., Glemzha A.A. Purification and some properties of the extracellular acid proteases from Mucor renninus. - Enzyme and Microb. Technol., 1980, vol. 2, N 1, p. 37-44.

14. Rowley B.O., Lund D.B., Richardson T. Reductive methylation of β-lactoglobulin. - J. Dairy Sci., 1979, vol. 62, N 4, p. 533-536.

L. Yakunitskaya, A. Köstner,
V. Tikhomirova, M. Samartsev

Application of Thin Layer Isoelectrofocusing and Disc Electrophoresis to Characterize Chemically Modified Acid Proteinases

Summary

Modification of microbial rennin (pI 3.5) with succinic, maleic, and phtalic anhydrides shifts its pI to 2.3-1.8 and increases the electrophoretic mobility at alcaline pH. Moderate modification increasing the basicity of functional groups, namely carbodiimide modifications of carboxylic groups with ethylenediamine or arginine methyl ester, and amino group guanidination or amidination, retains the pI in the region 3.3-3.5 and diminishes the electrophoretic mobility; a more profound carboxyl modification shifts the pI to 4.0-5.3. Alternatively, carboxyl modification of pepsin (pI 2.0) causes pI shifts even at moderate substitutions, and modification products revealed high isoelectric heterogeneity. All the modified enzyme products possessed high proteolytic activity.

№ 598

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 637.344+663.I4.039.4

Т.Э. Рандла, А.Э. Эрик

ЗАВИСИМОСТЬ ПЕНООБРАЗОВАНИЯ ОТ ВЕЛИЧИНЫ МОЛЕКУЛ БЕЛКОВ В МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКЕ

В промышленных процессах, связанных с выращиванием микроорганизмов, интенсивное пенообразование значительно затрудняет аэрацию, из-за чего снижается удельная производительность ферментатора.

В условиях интенсивного пенообразования среды требуемая производительность биореакторов не может быть достигнута без надежных пенорегуляторов, стабилизирующих заданный уровень пены. Для этой цели используют химические и механические пеногасители [I, 2]. В любом случае пеногашение требует дополнительных затрат и по возможности желательно снизить пенообразующую способность культуральной среды.

При выращивании кормовых дрожжей на молочной сыворотке наблюдается весьма интенсивное пенообразование, которое в основном связано с присутствием белковых веществ [3]. Из литературных данных известно, что в пене обезжиренного молока содержатся только поверхностно-активные белки, но нет молочного сахара [4].

Белки, которые остаются в молочной сыворотке после удаления казеина, обладают значительной пенообразующей способностью, которая может иметь положительное значение (например, при добавлении в пищевые продукты для их обогащения белком), но в случае использования сыворотки в качестве сырья для микробиологического синтеза существенно затрудняет технологический процесс.

Несмотря на практическую важность проблемы, количественные показатели пенообразования сыворотки изучены явно недостаточно.

Целью настоящей работы ставилась разработка методики определения способности пенообразования в молочной сыворотке путем частичного удаления или гидролиза белков, а также изучение возможности механического нарушения пены добавлением грубодисперсных материалов.

Материалы и методы

Для определения интенсивности образования пены использовали стеклянный цилиндрический сосуд с перфорированным дном. Испытуемую среду аэрировали при определенном давлении, температуре и расходе воздуха [5].

В настоящей работе использовали стеклянный цилиндр с высотой 1000 мм и диаметром 25 мм. Перфорированное дно выполнено в виде впаенного стеклянного фильтра ПС-4. Аэрацию среды осуществляли воздухом, давление которого поддерживали при помощи редуктора на уровне 0,1 МПа. Расход воздуха при этом составлял 0,2 л/мин, что является выше указанного в литературе [6].

В измерительный цилиндр вливали 50 мл исследуемой жидкости и после начала аэрации визуально измеряли и записывали высоту столба пены. В качестве количественных характеристик пенообразования выбрали начальную скорость увеличения высоты пены и конечную стационарную высоту пены. В случае обильного пенообразования определять последний показатель оказалось невозможным.

В опытах использовали творожную сыворотку, полученную из Таллинского комбината молочных продуктов. Значение pH сыворотки находилось в пределах 4,5-4,7. Термообработку сыворотки осуществляли кипячением в течение 15 минут. Образовавшийся осадок отделяли фильтрацией через бумажный фильтр или центрифугированием при скорости до 20 000 об/мин в течение 120 мин., для чего использовали препаративную центрифугу VAC-25.

Ультрафильтрацию сыворотки осуществляли на установке фирмы "Millipore" с фильтрами УАМ-100 и "Synpore" с диаметром пор, соответственно 0,125 и 0,17 мкм.

В качестве механического нарушителя пены в сыворотку добавляли пшеничные отруби.

Протеолиз сыворотки осуществляли, используя протосубтилин ГЗХ с активностью по казеину 86 Е.

Препарат протосубтилина растворяли в боратном буфере при pH 8,5. Раствор с концентрацией 50 мг/мл добавляли до получения концентрации фермента 0,01, 0,02, 0,05 и 0,1 % от массы сыворотки. Гидролиз проводили при температуре 40 °С в реакторе с перемешиванием в течение 4 или 24 часов. Глубину гидролиза оценивали по приросту протеозо-пептонной фракции. Для этого разбавленные буфером pH 4,6 в 10 раз образцы кипятили в течение 30 минут, охлаждали и доводили объем до первоначального, осадок отфильтровывали. Оптическую плотность фильтратов определяли по поглощению при 280 нм на спектрофотометре "Specord 2-P" (Цейсс, ГДР). Для снижения кислотности использовали 33% раствор NaOH. Образовавшийся осадок отделяли бумажным фильтром.

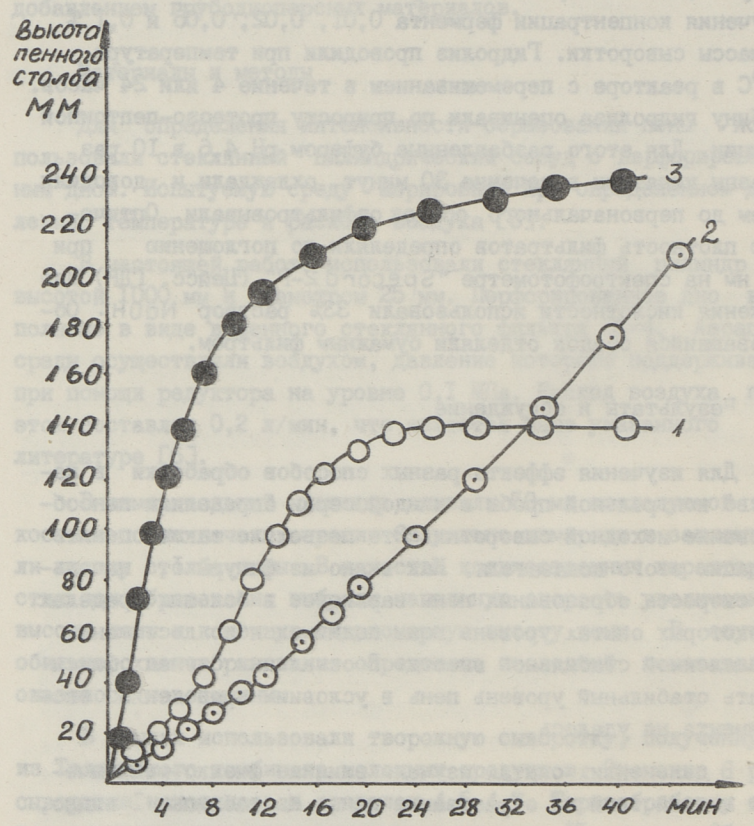
Результаты и обсуждение

Для изучения эффекта разных способов обработки в качестве контрольной пробы в каждой серии определяли пенообразование исходной сыворотки. Это позволило также оценить вариацию этого показателя. Как видно из фигуры I, начальная скорость образования пены варьирует в больших пределах. В некоторых опытах уровень пены поднимался до достижения определенной стабильной высоты. В остальных случаях фиксировать стабильный уровень пены в условиях проведения эксперимента не удалось.

В дальнейших опытах изучали влияние физико-механических воздействий на образование пены. Из таблицы I видно, что после кипячения начальная скорость образования пены по сравнению с первоначальной сывороткой уменьшается, но остается достаточно высокой, приводя к выходу пены за пределы измерения.

После более полного удаления белкового осадка центрифугированием скорость образования пены резко уменьшается. Результаты ультрафильтрации показывают, что при использовании фильтра фирмы "Synpore" с относительно большим диаметром пор интенсивность пенообразования повышается - начальная скорость по сравнению с необработанной сывороткой

несколько уменьшается, но не фиксируется уменьшение скорости и стабилизирования уровня пены в условиях проведения эксперимента.



Фиг. 1. Пенообразование сыворотки. 1, 2, 3 – различные партии сыворотки.

Использование фильтра УАМ-100 с относительно малым диаметром пор позволяет в значительной мере снизить пенообразование. Можно считать, что размеры основной пенообразующей фракции белка находятся в пределах от 0,125 до 0,17 мкм. Удаление этой фракции позволяет снизить пенообразование. Частицы с относительно крупными размерами (более 0,17 мкм) оказывают тормозящее действие на образование пены. Добавление пшеничных отрубей в относительно боль-

шой концентрации позволяет снизить пенообразование (2 % от массы сыворотки). Концентрация в 10 раз меньше заметного действия на образование пены не оказывала.

В дальнейшей серии экспериментов изучали влияние протеолиза на пенообразование. В литературе имеются данные по увеличению пенообразования сыворотки в условиях ограниченного протеолиза.

Таблица 1

Влияние физико-механических факторов на пенообразование сыворотки

	Начальная скорость повышения столба пены мм/мин	Стабильная высота столба пены, мм
Первоначальная сыворотка	22,2	240
Кипяченая сыворотка	17,2	≫240
Кипяченая и центрифугированная сыворотка	5	≫240
Ультрафильтрация через УАМ-100	5	40
Ультрафильтрация через "Synpore"	12,5	≫240
Добавка пшеничных отрубей 2 %	8,3	140
Добавка пшеничных отрубей 0,2 %	25	240

В наших опытах использовали препарат протосубтилина в концентрациях 0,01-0,1 % от массы сыворотки. Результаты, приведенные в таблице 2, показывают, что при относительно малых концентрациях фермента (0,01-0,02 %) пенообразование сыворотки после 4-часового гидролиза резко увеличивается. В дальнейшем ходе гидролиза скорость образования пены уменьшается, но уровень пены остается после суточного гидролиза значительно выше первоначального.

Наилучшие результаты достигнуты при использовании концентрации фермента 0,05 % от массы сыворотки. Интенсивность пенообразования заметно снизилась уже после 4 часов гидролиза. В дальнейшем скорость образования пены и высота столба пены уменьшались еще в незначительной мере.

Таблица 2

Влияние различных концентраций протеолитического энзима на пенообразование сыворотки

Концентрация энзима, %	Время гидролиза, часы	Концентрация белка, мг/мл	Прирост неосажденного протеозо-пептонным методом белка, мг/мл	Неосажденный белок / общий белок, %	Начальная скорость повышения столба пены, мм/мин	Стабильная высота столба пены, мм
0	0	5,5		67,3	7,7	I40
0,0I	4	5,7	3,5	69,I	20	⩾240
	24	5,9	7,6	92,I	8,6	⩾240
0,02	4	5,8	6	70,9	33,5	⩾240
	24	6,5	I5,4	78,8	II,8	⩾240
0,05	4	6,2	9,8	74,5	4	40
	24	6,9	I9,6	83,I	2,5	20
0,I	4	6,3	I2,6	77	6,7	40
	24	6,9	I9,6	83,6	2,5	20

Дальнейшее повышение концентрации фермента уже нецелесообразно.

Следует считать, что пенообразующие свойства гидролизатов не зависят от степени гидролиза, измеренной по приросту протеозо-пептонной фракции, но выработать более подходящий метод оценки глубины гидролиза нам не удалось.

В дальнейшем изучали влияние pH среды при проведении протеолиза на пенообразование. После проведения pH среды до 8,5 белковые вещества частично выпадали в осадок. Как видно из таблицы 3, интенсивность пенообразования полученного фильтрата значительно выше, чем у первоначальной сыворотки, и повышается в ходе гидролиза. Видимо после добавления щелочи в растворе остается сильно пенящаяся фракция белка или в щелочной среде увеличивается пенообразующая способность присутствующих в сыворотке веществ.

Из вышесказанного видно, что интенсивность пенообразования сыворотки можно снизить добавлением в реакционную среду определенной оптимальной концентрации протеолитиче-

ского энзима, ультрафильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,I25 мкм, что позволяет освободиться от основной пенообразующей фракции белка в сыворотке, а также добавлением достаточного количества пшеничных отрубей как механического разрушителя пены.

Таблица 3

Влияние pH среды во время протеолиза на пенообразование сыворотки

pH	Время гидролиза, часы	Начальная скорость повышения столба пены, мм/мин	Стабильная высота столба пены, мм
	0	4	-
4,6	4	6,7	II0
	24	4	80
	0	8,7	-
8,5	4	II	-
	24	I2,5	-

В меньшей мере позволяет уменьшать пенообразование и центрифугирование кипяченой сыворотки, в ходе которого пенообразующая фракция частично осаждается.

Следовательно, для уменьшения пенообразования сыворотки мы можем рекомендовать протеолиз и ультрафильтрацию, обязательно соблюдая конкретные условия проведения этих процессов.

Литература

I. Левитан Е.С, Виестур У.Э., Долгицер Н.С., Иванова Т.Н. Пена в технологических процессах. - МСНТИ по химии и химической промышленности. М., I98I, вып. 5 (I07).

2. Okhawa A., Yamagiwa K., Sakai N., Takahara Y. Performance evaluation of mechanical foam-breakers utilizing the empact face of dispersed liquid particles. - J. Ferment. Technol., 1981, vol. 59, N 2, p. 149-155.

3. Тёпел А. Химия и физика молока. М., Пищевая промышленность, I979, с. 32I.

4. Siedel, Hesse. Physik der Milchwirtschaft. - Molkereizeitung Hildesheim, 1900, 14, S. 638.

5. Гапонов К.П. Процессы и аппараты микробиологических производств. М., 1981, с. 84.

6. Грачева И.М., Гаврилова Н.Н. и др. Технология микробных белковых препаратов аминокислот и жиров. М., 1980, с. 227.

T. Randla, A. Erin

Formation of Foam Depending on the Molecular Size of Proteins in the Whey

Summary

The formation of foam is undesirable in the fermentation of whey. The possibility of reducing the foaming with elimination or hydrolysis of large protein molecules was examined.

The whey was partially hydrolysed by proteolytic enzymes from Bac. subtilis or ultrafiltrated and the foaming abilities of treated and untreated whey were compared.

The foaming ability increased when the proteins in the whey had the molecular size $< 0{,}17$ nm. However, it decreased when the proteins had the molecular size $< 0{,}125$ nm.

Содержание

I. А.И. Кёстнер, И. Роос. Программы для оптимизации биокаталитических процессов. I. Оптимизация симплексным методом..... 3

2. А.А. Менерт, Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение УП. Характеристика кинетики гидролиза лактозы с помощью автоматического анализатора "Контифло" 9

3. Э.Х. Сиймер, М.А. Курвитс. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение УШ. Применение калориметров типа Кальве для исследования стационарной кинетики..... I9

4. Р.И. Дагис, А.Б. Паулюконис, Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение IX. Исследование кинетики гидролиза L-лизинамида по данным полных кинетических кривых..... 3I

5. Л.М. Пикков, Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус. Скорость массопередачи и интенсивность циркуляции в пневматически перемешиваемых суспензиях..... 37

6. Г.Г. Калбин. Электродиффузионные потенциалы в гетерогенных ферментативно активных системах. Сообщение I. Амидазы в мембранных системах.... 45

7. А.Я. Кяэрд. Модификация белковых веществ иминоэфирами. I. Получение и свойства диэтилового эфира бисиминоадипиновой кислоты..... 55

8. А.Я. Кяэрд, И.И. Таммерайд. Модификация белковых веществ иминоэфирами. II. Математическая модель кинетики процесса..... 67

9. А.Х. Калда, Т.Э. Рандла. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение У. Возможность направленного изменения селективности прекращения фумарата микробными клетками..... 77

I0. Р.Б. Лайдсаар. Иммобилизация β-галактозидазы с помощью производных I,3,5-триазина..... 89

II. К.Э. Паппель, Р.Б. Лайдсаар. Свойства иммобилизованной β-галактозидазы..... 99

I2. М.К. Фриеденталь. Стабильность химозина и бычьего пепсина в разбавленных растворах..... I07

I3. Н.В. Архангельская, А.К. Абдвахитова, А.Х. Калда, М.И. Креэн. Влияние разных источников азотного питания на рост каллусной культуры..... II7
I4. Л.М. Якуницкая, А.И. Кёстнер, В.П. Тихомирова, М.А. Самарцев. Применение изоэлектрофокусирования в тонком слое и диск-электрофореза для характеристики химически модифицированных кислых протеиназ..... I29
I5. Т.Э. Рандла, А.Э. Эрин. Зависимость пенообразования от величины молекул белков в молочной сыворотке..... I39

EESTI AKADEEMILINE RAAMATUKOGU
1 0200 00089847 2

руб. 1.20