ISSN 0136-3549
0320-3395

TALLINNA
POLÜTEHNILISE INSTITUUDI
TOIMETISED
499
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО
ИНСТИТУТА

TPI
'80

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

TPI '80

УДК 577.15.04.004

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Инженерная энзимология 1

Таллин 1980

ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ

Труды ТПИ № 499

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ
Инженерная энзимология 1

Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 30 мая 1980 г.
Под общей редакцией А.И. Кёстнера. Редактор А. Канн
Техн. редактор В. Ранник. Подписано к печати 16 дек. 1980 г.
Бумага 60x90/ 16. Печ. л. 6,5 + 0,5 приложение. Уч.-изд. л. 5,2
Тираж 300. МВ-09083. Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коскла, 2/9
Зак. № 650

Цена 80 коп.

© Таллинский политехнический институт, 1980

Teaduslik raamatukogu
ENSV TA
TALLINN

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.004.15

А.И. Кёстнер

РАСЧЕТ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ ИНЖЕНЕРНОЙ ЭНЗИМОЛОГИИ. I. ПРИНЦИПЫ И СТРУКТУРА ПРОГРАММЫ ДЛЯ РАСЧЕТА НА ЭВМ

При разработке биотехнологических процессов необходимо сравнивать по экономической эффективности разные варианты создаваемого процесса и на этой основе оптимизировать технологию. Такой подход, в частности, необходим при разработке и масштабировании технологических процессов, в которых применяются иммобилизованные ферменты (ИФ). Уже ранее было нами предложено комбинированное кинетико-экономическое уравнение для расчета эффективности процессов с применением ИФ [1-3]. Для использования предложенного уравнения в конкретных расчетах необходимо дополнительно определить количественные зависимости между отдельными показателями, а также целесообразно иметь возможность расчета вариантов эффективности с помощью ЭВМ.

В намеченной нами серии сообщений будут рассмотрены техника расчета и конкретные примеры оптимизации экономической эффективности с помощью предложенного комбинированного уравнения. В предлагаемом нами ниже первом сообщении приводится конкретизация обобщенного уравнения и описывается программа для расчета на ЭВМ.

Конкретизация обобщенного уравнения

Согласно разработанному нами подходу экономическая эффективность применения ИФ рассчитывается как соотношение стоимостей продукта и эксплуатации. Расчет ведется для одного цикла перезарядки реактора, т.е. для времени использования одной загрузки катализатора в реактор. Обобщенное

уравнение эффективности представляется в следующем виде [3].

$$E_P = \frac{C_P}{C_E} = \frac{P_P \cdot A_0 \cdot Y(\bar{x}, E)}{P_S \cdot A_0 \cdot W(\bar{x}, \tau) + C_C + C_R \cdot \tau}, \qquad (I)$$

где E_P – безразмерный показатель эффективности процесса;

C_P – стоимость продукта, вырабатываемого в течение одного цикла перезарядки, руб;

C_E – стоимость эксплуатации за то же время, руб.;

P_P – цена вырабатываемого продукта, руб/моль;

P_C – цена исходного субстрата, руб/моль;

A_0 – начальная стандартная активность загружаемого катализатора, моль/ч;

$Y(\bar{x},\tau)$ – функция, которая определяет относительное количество продукта, вырабатываемого в течение одного цикла перезарядки, с размерностью времени (ч);

$W(\bar{x},\tau)$ – подобная функция для расхода субстрата, ч;

$\bar{x}$ – условия эксплуатации, выраженные как алгебраический вектор;

τ – время перезарядки, ч;

C_C – стоимость загруженного катализатора, руб;

C_R – расходы на эксплуатацию (заработная плата с начислениями, энергия, косвенные расходы и т.п.), руб/ч.

В последующем уравнение (I) конкретизируется следующим образом.

I) Вектор $\bar{x}$ определяется как трехмерный и состоит из следующих членов:

S_0 – начальная концентрация субстрата, моль/л;

x_F – конечная степень конверсии, безразмерный показатель;

T – температура, K.

2) Функция расхода субстрата определяется через функцию и степень конверсии субстрата

$$W(\bar{x},\tau) = Y(\bar{x},\tau) / x_F. \qquad (2)$$

3) Функция $Y(\bar{x},\tau)$ определяется как произведение трех более простых функций

$$Y(\bar{x},\tau) = Y_x(S_0, x_F) \cdot Y_T(T) \cdot Y_E(T,\tau), \qquad (3)$$

где $Y_x(S_0, x_F)$ – интегральная производительность катализатора в зависимости от S_0 и x_F;

$Y_T(T)$ – скорость реакции в зависимости от температуры;

$Y_E(T,\tau)$ – интегральная производительность в зависимости от температуры и времени перезарядки.

4) Начальная стандартная активность A_0 и стоимость катализатора C_C рассматриваются как функции от количества (активности) исходного нативного фермента A_S.

На основе всего вышеизложенного уравнение эффективности представляется в виде (4)

$$E_P = \frac{P_P \cdot A_0(A_S) \cdot Y(S_0, x_F, T, \tau)}{P_S A_0(A_S) \cdot Y(S_0, x_F, T, \tau)/x_F + C_C(A_S) + C_R \cdot \tau}. \qquad (4)$$

Дальнейшие расчеты проведены по этому уравнению. Однако не исключены дальнейшие конкретизации уравнения (4). Например, в случае различия в оптимумах активности и стабильности катализатора по pH, концентрация водородных ионов должна быть рассмотрена как компонент вектора $\bar{x}$. Вполне реально также применение более сложной зависимости в качестве функции $W(\bar{x},\tau)$, чем это описано уравнением (2).

Определение подсобных функций

Активность A_0 препарата ИФ в зависимости от количества использованного нативного фермента A_S описывается гиперболой (см. уравнение (5))

$$A_0 = \frac{A_S \cdot A_M}{A_S + A_C}, \qquad (5)$$

где A_M, A_C – эмпирические постоянные с размерностью активности.

Гиперболическая зависимость между A_C и A_S неоднократно наблюдалась в наших экспериментах, а также описана в литературе. Кроме того, нами предложено одно возможное теоретическое описание подобной зависимости [4].

Из уравнения (5) определяется весьма широко применяемая характеристика процесса иммобилизации – коэффициент выхода активности γ при иммобилизации

$$\gamma = \frac{A_0}{A_S} = \frac{A_M}{A_S + A_C}. \qquad (6)$$

На основе уравнения (5) будет определена и стоимость катализатора

$$C_C = P_E \cdot A_S + C_J = P_E \frac{A_C \cdot A_0}{A_M - A_0} + C_y, \qquad (7)$$

где P_E – стоимость одной рабочей единицы активности нативного фермента;

C_J – стоимость иммобилизации при получении катализатора для одной загрузки реактора (носитель, иммобилизация, перезарядка), руб.

Функция интегральной производительности $Y_x(S_0, X_F)$, рассчитанной на единицу ферментативной активности, определяется уравнениями, которые разработаны Э.Х. Сиймером [5].

Вид функции $Y_x(S_0, X_F)$ определяется типом применяемого реактора. В случае реактора с изменяющейся степенью конверсии (колонка, периодический реактор с перемешиванием) производительность определяется:

$$Y_{x1} = -X_F/(d \cdot \ln(1 - X_F) + e \cdot X_F + c \cdot X_F^2/2). \qquad (8)$$

Для проточного реактора, работающего с постоянной степенью конверсии, производительность определяется следующим образом:

$$Y_{x2} = (1 - X_F)/(a + b \cdot X_F + c X_F^2). \qquad (9)$$

Между коэффициентами уравнений (8) и (9) определены связи

$$\begin{cases} d = a + b + c \\ e = b + c \end{cases}. \qquad (10)$$

Характерные коэффициенты a, b и c являются комбинациями элементарных кинетических констант, но могут быть также непосредственно определены из экспериментальных данных. Все эти коэффициенты зависят от начальной концентрации субстрата. Эта зависимость может быть определена системой (11)

$$\begin{cases} a = 1 + S_1/S_0 + S_2 \cdot S_0 \\ b = S_3 + S_4 \cdot S_0 \\ c = S_5 \cdot S_0 \end{cases}. \qquad (11)$$

В дальнейшем называем характерные коэффициенты $S_1 \ldots S_5$ коэффициентами Сиймера.

Для определения зависимости скорости ферментативной реакции от температуры нами предлагается применение производных двух функций:

$$Y_T(T) = Y_A(T) \cdot Y_B(T). \qquad (I2)$$

Здесь $Y_A(T)$ определяется общеизвестной экспоненциальной зависимостью:

$$Y_A(T) = e^{\left(\frac{H_1}{T_S} - \frac{H_1}{T}\right)}, \qquad (I3)$$

где H_1 – кажущаяся энергия активации данной реакции;
T_S – стандартная температура (30 °C = 303 К).

В качестве функции $Y_B(T)$ применяется функция, значение которой при низких температурах равняется единице, но при превышении оптимальной температуры быстро приближается к нулю. В данной программе функция $Y_B(T)$ определяется формальным уравнением:

$$Y_B(T) = (1 + \tanh(H_3(T_M - T)))/2, \qquad (I4)$$

где H_3, T_M – эмпирические коэффициенты.

Коэффициент T_M с размерностью температуры близок к определяемой экспериментально величине оптимальной температуры. H_3 имеет размерность обратной температуры.

Функция продуктивности $Y_E(\tau)$ катализатора определяется интегралом

$$Y_E(\tau) = \int_0^{\tau} \varphi(\tau)\, d\tau, \qquad (I5)$$

где функция $\varphi(\tau)$ определяет изменение активности во времени. В данном подходе эта функция определяется просто $\varphi(\tau) = e^{-k\tau}$. Это обосновано тем, что даже в случаях более сложной кинетики инактивации ИФ его продуктивность в основном определяется продуктивностью наиболее стабильной фракции. Соответственно функция Y_E определяется

$$Y_E = (1 - e^{-k\tau})/k, \qquad (I6)$$

где k – представляет собой суммарную константу инактивации, которая учитывает энзиматические и механические процессы:

$$k = k_м + k_E \cdot e^{\left(\frac{H_2}{T_s} - \frac{H_2}{T}\right)}, \qquad (I7)$$

где $k_м$ – константа скорости механической инактивации (уноса измельченного катализатора), $ч^{-1}$;

k_E – константа скорости энзиматической инактивации (денатурации) при стандартной температуре;

H_2 – энергия активации процесса денатурации.

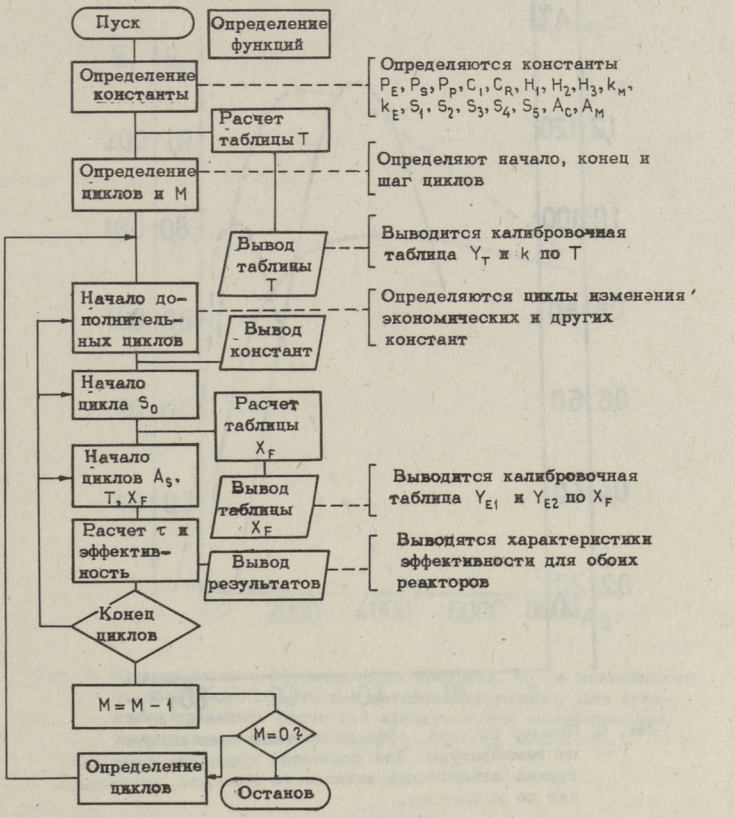
Уравнения (5)...(I7) достаточно определяют уравнение (4) и позволяют провести расчет эффективности E_p для любых заданных исходных величин. В ходе дальнейшего развития предложенного нами подхода отдельные уравнения из комплекта (5)–(I7) могут быть уточнены или изменены.

Структура и блок-схема программы

За основу расчета эффективности принимается, что процесс всегда имеет оптимум по времени перезарядки τ и что процесс следует вести оптимизованно по этому показателю. Поэтому при расчете каждого варианта проводится расчет оптимального значения τ. В данной программе безразмерное время перезарядки $k\tau$ вычислялось точностью 10^{-5}. При желании точность расчета может быть увеличена.

Основная структура программы (см. фиг. I) предусматривает циклическое изменение переменных и расчет в каждом варианте E_p для реакторов обоих типов. Номенклатура варьируемых переменных и закономерности их изменения могут быть изменены в ходе эксплуатации программы. В основу взято линейное изменение следующих четырех величин: S_0, A_s, T, x_F. Любая из этих величин может быть поддержана на постоянном уровне. В результате счета для каждого рассматриваемого варианта печатаются значения эффективности E_p для обоих типов реакторов, а также значения промежуточных величин. Кроме того, предусматривается возможность печати калибровочных таблиц некоторых специально определенных функций.

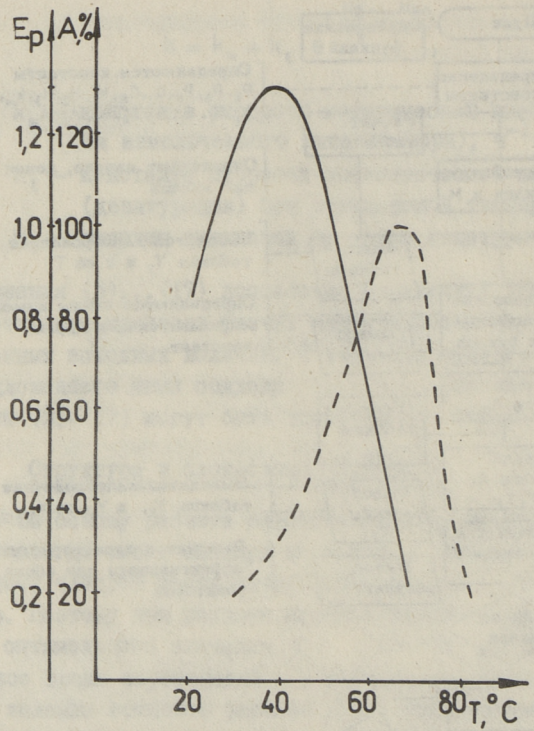
Программа написана на языке ФОРТРАН для ЭВМ единой серии. Основные расчеты проведены на ЕС–I022. Листинг программы может быть предоставлен по запросу.



Фиг. 1. Блок-схема программы для расчета эффективности на ЭВМ ЕС-1022. Обозначения приведены в тексте. M – параметр повторности счета по разным исходным данным.

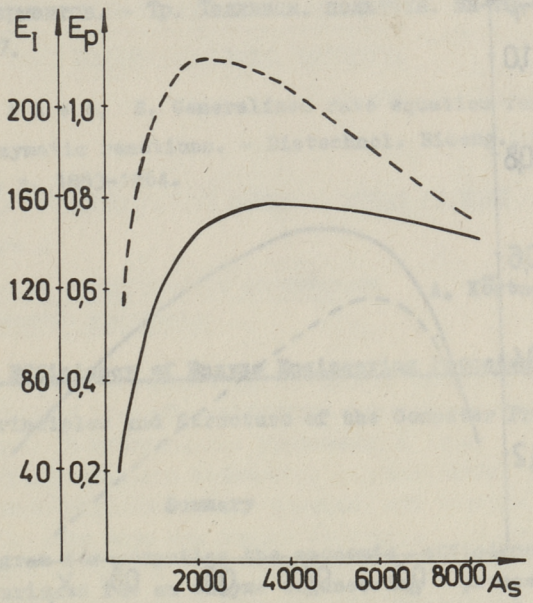
Примеры расчета

Вышеописанная программа использована, в первую очередь, для расчета экономической эффективности процесса обработки молочной сыворотки иммобилизованной β-галактозидазой. Эти расчеты проведены совместно с К.Э. Паппель и будут описаны в одном из последующих наших сообщений. Ниже приводятся только некоторые графики для характеристики типичных зависимостей (см. фиг. 2 – 4). Исходные данные для расчетов получены из наших экспериментов, а также предполагаемых экономических показателей.



Фиг. 2. Пример расчета эффективности в зависимости от температуры. Для сравнения приведена температурная зависимость активности фермента, рассчитанная по уравнению.
——— – эффективность; – – – – – активность.

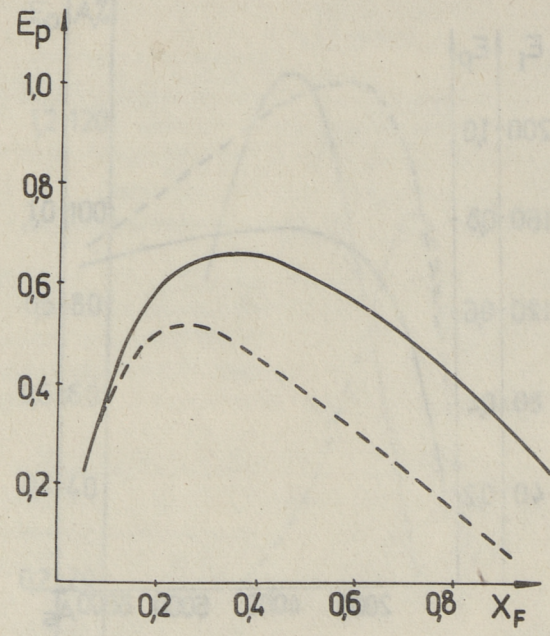
На основе приведенных графиков выясняется, что эффективность процесса в зависимости от температуры, степени конверсии субстрата и от количества использованного нативного фермента проявляет четкие максимумы. Приведенная для сравнения теоретическая кривая температурной зависимости энзиматической активности вполне хорошо согласуется с экспериментальными данными. Максимум кривой E_p по количеству введенной активности исходного фермента довольно хорошо согласуется с максимумом графика обобщенного критерия эффективности E_J. Этот показатель был предложен нами ранее для оптимизации процессов катализатора для технологии с неизвестными экономическими показателями. Это обстоятельство подтверждает целесообразность применения критерия E_J.



Фиг. 3. Пример расчета эффективности процесса E_p в зависимости от введенного количества нативного фермента. Для сравнения приведена расчетная эффективность иммобилизации, вычисляемая как $E_J = A_0 \cdot \gamma$ ——— E_p – – – – E_J.

Зависимость эффективности E_p от степени конверсии X_F при равенстве всех прочих показателей отличается для реакторов двух рассматриваемых типов. Проточный реактор перемешивания менее эффективен и проявляет максимальную эффективность при более низкой степени конверсии.

Более детальный анализ эффективности отдельных конкретных процессов с обоснованием выбора характерных констант для этих процессов будет опубликован нами в последующих сообщениях данной серии.



Фиг. 4. Пример расчета эффективности процесса в зависимости от степени конверсии субстрата: E_p – для реактора первого типа (колонка, периодический реактор с перемешиванием):
– – – – – – E_p – для реактора второго типа (проточный реактор с перемешиванием).

Литература

I. Кёстнер А.И. Принципы оптимизации процесса получения технологических катализаторов на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов. – В кн.: Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пущино, 1978, с. 64–80.

2. Кёстнер А.И. Функция оптимизации для процесса иммобилизации ферментов. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 9–12.

3. Köstner, A., Siimer, E. Problems in efficiency and optimization in enzyme engineering. – In: Enzyme Engineering: Future Directions. N.Y., Plenum Press, 1980, p. 415–435.

4. К ё с т н е р А.И. О пределах активности иммобилизованных ферментов. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 3-7.

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

A. Kõstner

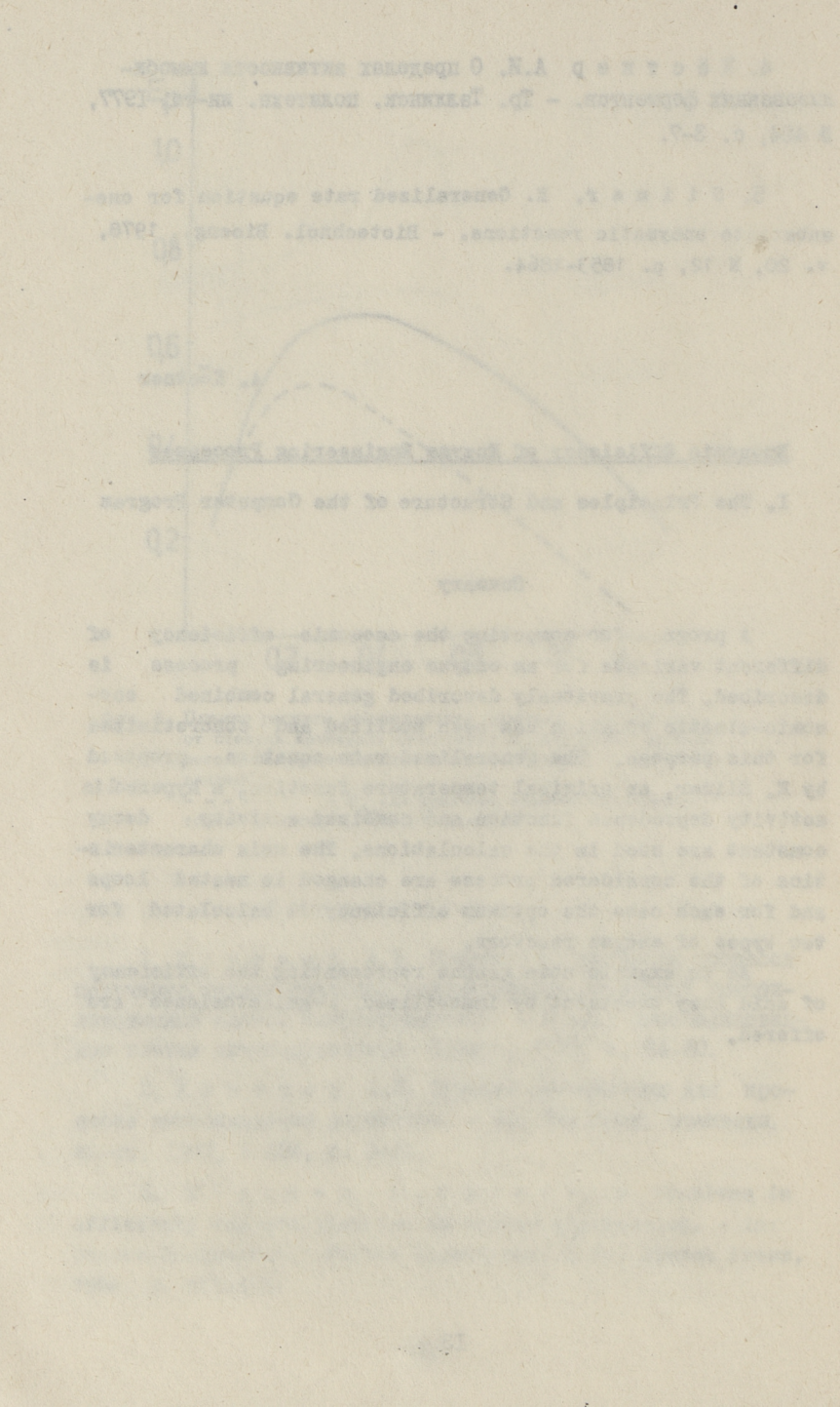
Economic Efficiency of Enzyme Engineering Processes

I. The Principles and Structure of the Computer Program

Summary

A program for computing the economic efficiency of different variants for an enzyme engineering process is described. The previously described general combined economic-kinetic equation has been modified and concretisized for this purpose. The generalized rate equation proposed by E. Siimer, an original temperature function, a hyperbolic activity dependence function and combined activity decay constant are used in the calculations. The main characteristics of the considered process are changed in nested loops and for each case the optimum efficiency is calculated for two types of enzyme reactors.

As an example some graphs representing the efficiency of acid whey treatment by immobilized β-galactosidase are offered.



№ 499
TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА
УДК 577.15.022:518.12

Э.Х. Сиймер

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Сообщение II

Определение коэффициентов обобщенного кинетического уравнения

В нашем первом сообщении [I] приведены базисная схема для ферментативных реакций, являющихся односубстратными, и соответствующее ей кинетическое уравнение. К этому типу можно отнести значительное количество ферментативных реакций, в том числе гидролитические реакции, при которых молярная концентрация воды как одного субстрата значительно превышает концентрацию второго (основного) субстрата. Уравнение описывает стационарную кинетику реакций, которые можно формально считать одноступенчатыми.

Если ингибирование продуктами и субстратом является полным, то кинетическое уравнение имеет вид

$$v = \frac{V_m(1-X)}{a + bX + cX^2}, \qquad (I)$$

где v – скорость реакции;
V_m – максимальная скорость реакции;
X – степень конверсии субстрата;
a, b, c – коэффициенты, являющиеся функциями кинетических констант и исходной концентрации субстрата.

Использование данного уравнения целесообразно во многих случаях [2]; мы надеемся в следующих сообщениях привести наиболее интересные результаты его применения для теоретических исследований и для практического изучения кинетики конкретных ферментативных реакций.

В данном сообщении коротко рассматривается проблема определения коэффициентов кинетического уравнения, применяя методы статистического анализа экспериментальных данных. Це-

лесообразность и необходимость математического подхода к изучению ферментативной кинетики очень хорошо доказано Корниш-Боуденом [3], однако до сих пор встречаются лишь попытки применять статистический анализ для более сложных (чем Михаэлис-Ментеновская) ферментативных реакций [4].

В общем случае, как нами показано ранее [2], коэффициенты a, b и c в уравнении (I) зависят от исходной концентрации субстрата $[S]_0$ следующим образом [I, 2]:

$$a = 1 + \frac{K_m}{[S]_0} + \mu[S]_0, \qquad (2)$$

$$b = e + f[S]_0, \qquad (3)$$

$$c = g[S]_0. \qquad (4)$$

В этих уравнениях e, f и g представляют собой арифметические выражения из констант равновесия, а μ обозначает обратную величину константы ингибирования субстратом (обычно обозначаемую K'_S).

Таким образом, для описания ферментативной кинетики в широком диапазоне исходных концентраций субстрата $[S]_0$ и степени конверсии X применимо уравнение

$$v = \frac{V_m(1-X)}{1 + \frac{K_m}{[S]_0} + \mu[S]_0 + eX + f[S]_0X + g[S]_0X^2}, \qquad (5)$$

которое содержит максимально шесть неизвестных величин:

$$V_m, K_m, \mu, e, f \text{ и } g.$$

В зависимости от конкретного типа реакции уравнение (5) может значительно упрощаться. Кроме того, часто можно отдельными опытами определять V_m и K_m из начальных скоростей, и в этом случае количество неизвестных уменьшается на два.

В общем случае, из экспериментальных данных, описывающих скорость реакции как функцию от $[S]_0$ и X, или степень конверсии X (концентрацию продукта) как функцию от продолжительности реакции и исходной концентрации субстрата, образуют систему линейных уравнений, которую решают методом наименьших квадратов.

Составление системы линейных уравнений

а) применение функции $v = f(X,[S]_0)$ для обработки экспериментальных данных периодических реакторов с перемешиванием.

В некоторых случаях из экспериментальных данных путем графического или математического дифференцирования несложно найти скорость реакции v как функцию от X и $[S]_0$.

Из уравнения (5) путем преобразования получаем:

$$eX + f[S]_0X + g[S]_0X^2 + \frac{K_m}{[S]_0} + \mu[S]_0 - \frac{V_m(1-X)}{v} = -1. \qquad (6)$$

При наличии большого количества экспериментальных данных $v = f(X)$, определенных при широко варьированных концентрациях субстрата, можно из n совокупностей $X_{(i)}[S]_{0(j)}$, $v_{(k)}$ составить систему из n линейных (т.н. условных) уравнений. При этом в состав системы должны принципиально входить взвешенные экспериментальные данные, т.е. все уравнения (6) надо умножить на индивидуальный для каждого условного уравнения весовой коэффициент.

б) применение функции $X = f(\tau,[S]_0)$ для обработки экспериментальных данных периодических реакторов с перемешиванием.

Чаще всего экспериментальные данные получаются именно в виде зависимости концентрации продукта $[P]$ от времени τ, которая адекватна функции $X = f(\tau)$, так как $X = \frac{[P]}{[S]_0}$.

Интегрированием уравнения (5) получаем:

$$\frac{V_m(\tau_2-\tau_1)}{[S]_0} = -\left(1 + \frac{K_m}{[S]_0} + \mu[S]_0 + e + f[S]_0 + g[S]_0\right)\ln\frac{1-X_2}{1-X_1} -$$

$$-(e + f[S]_0 + g[S]_0)(X_2 - X_1) - \frac{g[S]_0}{2}(X_2^2 - X_1^2). \qquad (7)$$

Введем новые обозначения

$$a_1 = V_m \qquad (8)$$

$$a_2 = K_m \qquad (9)$$

$$a_3 = \mu + f + g \qquad (10)$$

$$a_4 = e \qquad (11)$$

$$a_5 = f + g \qquad (12)$$

$$a_6 = g/2 \qquad (13)$$

$$Y = \ln \frac{1-X_2}{1-X_1}. \qquad (14)$$

В этом случае после преобразования уравнения (7) получаем:

$$a_1 \cdot \frac{(\tau_2-\tau_1)}{[S]_0} + a_2 \cdot \frac{Y}{[S]_0} + a_3 \cdot Y[S]_0 + a_4(Y + X_2 - X_1) +$$

$$+ a_5[S]_0(X_2-X_1) + a_6[S]_0(X_2^2 - X_1^2) = -Y. \qquad (15)$$

На основе уравнения (15) составляют для каждого комплекта экспериментальных данных одно условное уравнение, умножают его на необходимый весовой коэффициент, и составляют, таким образом, систему линейных уравнений. После решения системы методом наименьших квадратов легко вычисляются величины μ, f и g.

$$\mu = a_3 - a_5 \qquad (16)$$

$$f = a_5 - 2a_6 \qquad (17)$$

$$g = -2a_6. \qquad (18)$$

в) применение данных стационарного режима в проточном реакторе с перемешиванием (ПРП).

В стационарном режиме ПРП стационарная скорость v_{st} зависит от стационарной степени конверсии субстрата X_{st} (согласно уравнению (5)) следующим образом:

$$v_{st} = \frac{V_m(1-X_{st})}{1 + \frac{K_m}{[S]_0} + \mu[S]_0 + eX_{st} + f[S]_0X_{st} + g[S]_0X_{st}^2}. \qquad (19)$$

Если объем жидкости в реакторе равен V, объемная скорость протока жидкости q и исходная степень конверсии X_0, то материальный баланс ПРП можно выразить следующим образом:

$$V \cdot v_{st} = q[S]_0(X_{st} - X_0). \qquad (20)$$

Принимая

$$R = \frac{V}{q_7[S]_0}, \qquad (21)$$

получаем

$$v_{st} = \frac{X_{st} - X_0}{R}. \qquad (22)$$

Следовательно, из равенства выражений (19) и (22) получаем уравнение (кубическое в отношении X_{st}), описывающее стационарный режим в ПРП:

$$e X_{st}(X_{st} - X_0) + f[S]_0 X_{st}(X_{st} - X_0) + g[S]_0 X_{st}^2 (X_{st} - X_0) + \\ + \frac{K_m}{[S]_0}(X_{st} - X_0) + \mu[S]_0 (X_{st} - X_0) - V_m R(1 - X_{st}) = \\ = -(X_{st} - X_0). \qquad (23)$$

После разделения на член $(X_{st} - X_0)$ получаем

$$e X_{st} + f[S]_0 X_{st} + g[S]_0 X_{st}^2 + \frac{K_m}{[S]_0} + \mu[S]_0 - \\ - V_m R \frac{1 - X_{st}}{X_{st} - X_0} = -1. \qquad (24)$$

На основе уравнения (24) составляют условные уравнения для системы линейных уравнений, при необходимости используя весовые коэффициенты.

Интересно сравнить уравнение (24) с уравнением (6). Так как коэффициент неизвестного V_m в уравнении (24) равен $-\frac{1 - X_{st}}{v_{st}}$ (см. уравнение (22)), то, очевидно, уравнения (6) и (24) тождественны с той разницей, что уравнение (24) описывает стационарный режим в ПРП, а уравнение (6) – скорость реакции в любой момент в реакторе с изменяющимся составом.

Решение системы линейных уравнений методом наименьших квадратов

Согласно [5] для решения системы из n линейных (т.н. условных) уравнений

$$\begin{cases} a_1 x_1 + b_1 x_2 + \ldots + l_1 x_m = f_1 \\ a_2 x_1 + b_2 x_2 + \ldots + l_2 x_m = f_2 \\ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ a_n x_1 + b_n x_2 + \ldots + l_n x_m = f_n \end{cases} \qquad (25)$$

методом наименьших квадратов систему (25) преобразуют в систему т.н. нормальных уравнений с n неизвестными. Если обозначить $\Sigma a_i^2=[aa]$; $\Sigma a_i b_i=[ab]$ ...; $\Sigma l_i f_i=[lf]$, система из нормальных уравнений примет следующий вид:

$$\begin{cases} [aa]\bar{x}_1 + [ab]\bar{x}_2 + \ldots + [al]\bar{x}_n = [af] \\ [ba]\bar{x}_1 + [bb]\bar{x}_2 + \ldots + [bl]\bar{x}_n = [bf] \\ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ [la]\bar{x}_1 + [lb]\bar{x}_2 + \ldots + [ll]\bar{x}_n = [lf], \end{cases} \qquad (26)$$

где $\bar{x}_1, \bar{x}_2, \ldots, \bar{x}_n$ являются искомыми наивероятнейшими значениями неизвестных.

Система (26) может быть решена, например, методом элиминирования.

Оценка получаемых результатов может быть произведена по стандартной ошибке или по средней квадратичеокой ошибке каждого неизвестного. Умножением последних величин на критерий Стьюдента могут быть определены доверительные границы найденных величин.

Заключение

В настоящем сообщении предложены три варианты определения коэффициентов обобщенного кинетического уравнения. Их практическое использование дало хорошие результаты для описания кинетики ферментативного гидролиза дисахаридов на основе наших собственных экспериментальных данных. Однако проблема до конца еще не решена. Главной трудностью можно считать выбор обоснованных весовых коэффициентов. Для результатов, описывающих сложную интегральную кинетику, это крайне трудная задача. Что касается практических расчетов, то необходимо отметить, что для решения систем, содержащих до 100 условных уравнений, необязательно применять мощные ЭВМ. На "Наири-2" можно в рамках одной программы не только осуществить вычисление коэффициентов уравнений, но также решить систему методом наименьших квадратов, вычислить необходимые определители для расчета доверительных границ и т.д. с помощью имеющихся в ее памяти стандартных программ.

Литература

I. Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение I. Обобщенное кинетическое уравнение для формально двухступенчатых реакций. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. 11-18.

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

3. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, 1979. 280 с.

4. Нис П.С., Кольцова Э.В., Карпов В.Я. Митрофанов В.Б., Левитов М.М. Ферментативный гидролиз бензилпенициллина. - Биоорг. химия, 1976, т. 2, № 9, с. 1259-1265.

5. Батунер Л.М., Позин М.Е. Математические методы в химической технике. Л., Химия, 1968. 822 с.

E. Siimer

The Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions

Part II

Determination of Coefficients of the Generalized Kinetic Equation

Summary

The different experimental data from batch and continuous stirred tank reactors may be used for the determination of coefficients in the earlier published generalized kinetic equation. This equation describes the kinetics of one-substrate enzymatic reactions in the entire substrate conversion range at the different initial concentrations. From the experimental data the system of linear equations with six unknown parameters (incl. V_m and K_m) can be received and solved by the least squares method.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.022:536.6.004

А.А. Менерт, Э.Х. Сиймер

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Сообщение III. Термохимический метод исследования стационарной кинетики ферментативных реакций

Известно, что анализ полных кинетических кривых является эффективным средством исследования кинетики ферментативных реакций. Во-первых, полная кинетическая кривая всегда содержит гораздо больше информации, чем единичное значение начальной скорости. Во-вторых, часто можно использовать вместо абсолютных значений параметров реакции относительные величины, этим повышается точность результатов [1]. Анализ кинетических кривых может быть осуществлен непосредственно по измеряемым величинам (параметру, пропорциональному концентрации продукта или субстрата, и времени) или же дифференцированием кривых. Несмотря на широкое распространение химических и биохимических методов анализа реакционных смесей, часто предпочтение надо давать физико-химическим методам (спектрофотометрия, поляриметрия и др.), позволяющим в ряде случаев не только уменьшить трудоемкость анализа, но и повысить точность результатов.

В настоящей статье описывается термохимический метод исследования стационарной кинетики односубстратных реакций. Термохимические методы исследования используются для различных целей, в том числе и для исследования биологических объектов [2]. Однако для систематического кинетического анализа ферментативных реакций, по-видимому, калориметрия до сих пор не использовалась.

Сущность метода

Односубстратные ферментативные реакции обычно могут быть рассмотрены как формально двухступенчатые с катали-

тической константой $k_{кат}$, в которых суммарное изменение энтальпии равно ΔH:

$$E + S \underset{}{\overset{K_S}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_{кат}} E + \sum_i P_i + \Delta H. \qquad (I)$$

Действительная схема ферментативной реакции может быть, конечно, более сложной. Нами описана модель, учитывающая ингибирование продуктами и субстратом и рассматривающая скорость реакции как функцию от степени конверсии субстрата [3,4]. Несомненно, подчиняющиеся этой модели реакции могут также быть исследованы описываемым ниже термохимическим методом.

ΔH в уравнении (I) складывается, в первую очередь, из отдельных изменений энтальпии при ступенчатом образовании суммы продуктов $\sum_i P_i$ из субстрата S. Кроме того, в эту сумму входят возможные изменения энтальпии ΔH за счет изменения взаимодействия субстрата и продуктов с растворителем (теплота сольватации) и изменения концентрации комплексов фермента (ES, EP_i и др.). Так как обычно $[S]_0 >> [E]_0$, то последнее изменение энтальпии, очевидно, ничтожно по сравнению с ΔH основной химической реакции. Весьма вероятно, что изменения в теплотах сольватации в течение реакции гидролиза также незначительны. Поэтому можно допустить, что изменение энтальпии в реакции пропорционально количеству прореагировавшего субстрата (а также количеству образующихся продуктов и степени конверсии субстрата). По-видимому, для не слишком концентрированных растворов в условиях стационарности это действительно так. В сомнительных случаях справедливость этого допущения должна быть проверена измерением кинетики реакции другими, независимыми методами. Следовательно,

$$d(\Delta H) = -Q\,dX \quad (Дж), \qquad (2)$$

где dX – изменение степени конверсии субстрата X;
Q – общий тепловой эффект при полном завершении реакции (при $X \to 1$).

При проведении реакции в изолированной системе с теплоемкостью C, изменение энтальпии $d(\Delta H)$ вызывает изменение температуры dt, а общему тепловому эффекту Q соответствует общее изменение температуры $\Delta t_{общ}$. Ввиду малого изменения физических свойств и температуры раствора

теплоемкость системы (тепловое значение калориметра) C в течение реакции можно считать постоянной. Делением уравнения (2) на постоянную величину C получаем:

$$dt = \Delta t_{общ} \cdot dX \quad (°C). \qquad (3)$$

Интегрирование уравнение (3) при начальных условиях $X = X_0, t = t_0$ ведет к уравнению (4)

$$t = t_0 + \Delta t_{общ} (X - X_0) \quad (°C) \qquad (4)$$

или

$$X - X_0 = \frac{t - t_0}{\Delta t_{общ}}, \qquad (5)$$

где t_0 – начальная температура реакционной смеси при введении фермента.

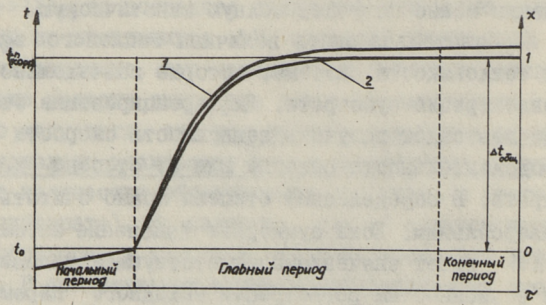
Таким образом, в описываемом методе предполагается, что изменение температуры в замкнутой системе (калориметре) пропорционально изменению концентрации (степени конверсии) субстрата или продуктов. Поэтому регистрацией температуры реакционной среды в зависимости от продолжительности реакции можно получить полную кинетическую кривую. При этом необязательно знать величины теплового эффекта реакции и теплоемкости системы, которые значительно зависят от концентрации субстрата. Дифференцирование этой кривой всегда позволяет получать зависимость скорости реакции от продолжительности реакции или от степени конверсии субстрата. В определенной степени можно считать этот метод универсальным. Если суммарное изменение энтальпии в реакции ΔH имеет значение, соответствующее условиям испытаний и возможностям регистрации выходного параметра (температуры, сопротивления термистора) в калориметрической системе, то в качестве этой реакции могут быть выбраны различные ферментативные реакции, и разумеется, некаталитические реакции.

В настоящей работе рассматривается один вариант применения калориметрического метода, когда используется калориметр с изотермической оболочкой. Необходимо учитывать две поправки – поправку на температурный ход калориметра (вызван теплообменом между калориметром и оболочкой, работой мешалки и т.д.) и на температурный коэффициент реакции, учитывая зависимость скорости реакции от температу-

ры. Расчет первой поправки может быть проведен общепринятыми методами [5], основывающимися на законе охлаждения Ньютона.

Расчет результатов калориметрических опытов

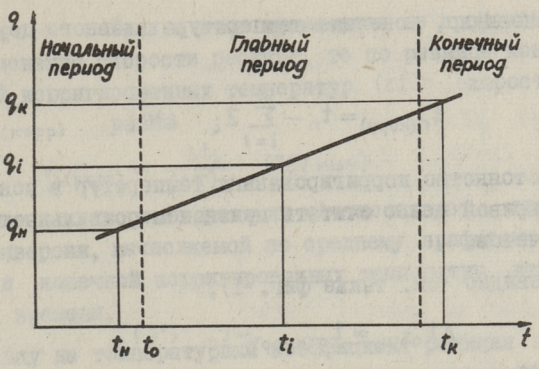
В калориметрическом опыте, состоящем из трех периодов (см. фиг. I), регистрируется температура t (кривая I)или какая-нибудь другая величина как функция от температуры,из которой рассчитывают t. Введением поправки на температурный ход системы получают корригированную температурную кривую (кривая 2), которую получили бы в изолированной системе при отсутствии побочных тепловых эффектов. Желательно получить экспериментальные точки (в количестве I0–20) для главного периода, что соответствует изменению степени конверсии порядка 0,05–0,I между двумя отсчетами. Чрезмерно большое число точек в эксперименте, особенно при статистическом подходе к результатам, бессмысленно, так как наблюдения должны быть независимыми [6]).



Фиг. 1. Температурные кривые в калориметрическом опыте:

1 – экспериментальная кривая;
2 – корригированная кривая, полученная введением поправки на температурный ход системы и описывающая также зависимость степени конверсии от продолжительности реакции.

Измеряют температурный ход $q_н$ (°С/мин) в начальном периоде при средней температуре $t_н$ и $q_к$ в конечном периоде при средней температуре $t_к$. Зависимость температурного хода q от температуры считается линейной. В этом случае (см. фиг. 2) любой температуре t_i в главном периоде соответствует температурный ход q_i.



Фиг. 2. Температурный ход калориметра в зависимости от температуры системы.

Согласно фиг. 2 q_i может быть вычислено уравнениями

$$q_i = q_н + M(t_i - t_н) \quad (°C/мин) \tag{6}$$

или

$$q_i = q_к - M(t_к - t_i) \quad (°C/мин), \tag{7}$$

где M (наклон прямой) является постоянной для одного опыта величиной

$$M = \frac{q_к - q_н}{t_к - t_н} \quad (мин^{-1}). \tag{8}$$

Интерпретация результатов

Для расчета зависимости степени конверсии X от продолжительности реакции τ предлагаем следующий подход.

Главный период может быть рассмотрен как сумма из n промежутков времени между отсчетами. Необходимо корригировать температурную кривую, т.е. надо найти кривую 2 на фиг. I. Для этого корригируют последовательно все отсчеты температуры, начиная с первого. Каждому промежутку времени $(\Delta\tau)_i$ соответствует поправка на изменение температуры z_i:

$$z_i = q_i \cdot (\Delta\tau)_i \quad (°C), \tag{9}$$

Вычисляя таким образом все значения z, находят последовательно корригированные температуры:

$$t_{j(корр)} = t_j - \sum_{i=1}^{j} z_i \quad (°C), \tag{10}$$

Очевидно, конечная температура главного периода $t_{n(корр)}$ равна:

$$t_{n(корр)} = t_n - \sum_{i=1}^{n} z_i \quad (°C). \qquad (II)$$

Постоянство корригированных температур в конце кинетической кривой можно считать признаком правильности проведения расчетов.

Очевидно (см. также фиг. I),

$$\Delta t_{общ} = t_{n(корр)} - t_0 \quad (°C), \qquad (I2)$$

что позволяет с помощью уравнения (5) трансформировать найденную зависимость в уравнение, описывающее зависимость степени конверсии субстрата от времени. В частном случае, если $X_0 = 0$,

$$X = \frac{t - t_0}{\Delta t_{общ}}, \qquad (I3)$$

где t является корригированной температурой.

Дополнительно надо внести в результаты поправку на температурный коэффициент реакции. Отдельными опытами определяют коэффициент γ, характеризующий среднее изменение скорости реакции в условиях опыта при изменении температуры на один градус. Для корригирования использованных промежутков времени $(\Delta\tau)_i$, при которых фактически наблюдалась средняя температура t_i, к базисной температуре $t_б$, величину $(\Delta\tau)_i$ надо умножать на величину $\gamma^{t_i - t_б}$. Необходимо корригировать все промежутки времени, что и позволяет получить исправленную зависимость X от τ, а также использовать любые величины $\Delta\tau$ в интегрированных кинетических уравнениях. После расчета степени конверсии может быть найдена зависимость скорости реакции от степени конверсии субстрата. Скорость реакции в единицах изменения температуры (°С/мин) находят дифференцированием кинетической кривой или же по экспериментальной кривой. В последнем случае величину v_i корригируют:

$$v_{i(корр)} = v_i - q_i \quad (°C/мин). \qquad (I4)$$

Если температура в опыте измеряется с высокой точностью, дифференцирование кривой можно проводить упрощенным методом. Пусть вычисляется скорость реакции в промежутке

времени $(\Delta\tau)_i$. Если в этом промежутке не происходит заметного изменения скорости реакции, то по разнице конечной и начальной корригированных температур $(\Delta t)_i$ скорость реакции $v_{i(корр)}$ равна

$$v_{i(корр)} = \frac{\Delta t_i}{(\Delta\tau)_i} \quad (°C/мин). \qquad (I5)$$

Вычисленная скорость реакции соответствует средней степени конверсии, вычисляемой по среднему арифметическому начальной и конечной корригированных температур данного промежутка времени.

Поправку на температурный коэффициент реакции вводят делением найденных величин скорости реакции на коэффициент $\gamma^{t_i - t_б}$, где t_i – фактически измеренная температура, к которой относится найденная скорость реакции.

Для получения величин скорости в единицах ферментативной активности (например, нкат/г или мкмоль/мин·г), найденные величины v_i (корр) умножают на постоянный для каждого опыта коэффициент α:

$$v_i^* = \alpha \cdot v_{i(корр)} \quad (Е/г), \qquad (I6)$$

где

$$\alpha = \frac{m}{\Delta t_{общ} \cdot G} \quad \left(\frac{мкмоль}{°C \cdot г}\right). \qquad (I7)$$

Здесь m и G обозначают количества использованного субстрата (мкмоль) и фермента (г) соответственно.

Хотя объем реакционной смеси $V_{л}$ в уравнения (I6–I7) не входит, скорость реакции V_i^* в принципе, конечно, отвечает количеству прореагировавшего субстрата в единице объема (мкмоль/л) при концентрации фермента I г/л.

Наконец надо отметить, что при расчете зависимости $X = f(\tau)$ найденные корригированные величины $\Delta\tau$ также желательно отнести к единичной концентрации фермента (например, I г/л) умножением на коэффициент $[E_0] = G/V$, что позволяет сравнить результаты опытов, проведенных при различных концентрациях фермента. Разумеется, при этом принимается, что скорость реакции в использованных условиях линейно зависит от концентрации фермента.

В таблице I приведен пример расчета одного калориметрического опыта. Отсчеты начального периода здесь не даны.

Таблица I

Пример расчета калориметрического опыта

(ферментативный гидролиз 0,4-молярной сахарозы (m = 70,8 ммолей); $q_н$ = 0,00I25 °С/мин; $t_н$ = I9,386 °С (из начального периода); $q_к$ = 0,00080 °С/мин, $t_к$ = 20,90I °С (из конечного периода), M = -2,97 x I0^{-4}, γ = I,086, $[E]_0$ = 0,945 г/л (G = 0,I673 г.)

№№	τ, мин	t, °С	Δτ, мин	$t_{ср}$	$\gamma^{t_{ср}-20}$	$\Sigma Z \times 10^3$	$t_{корр}$	$t_{ср(корр)}$	$X_{ср}$	X	$V_{i(корр)} \times 100$	$V^* \times 10^{-3}$
I	2	3	4	5	6	7	8	9	I0	II	I2	I3
	0	t_o=I9,40I					t_o=I9,40I					
I	I	I9,465	I	I9,433	0,954	I,2	I9,464	I9,433	0,022	0,044	6,604	I9,6
2	3	I9,605	2	I9,535	0,962	3,6	I9,60I	I9,533	0,092	0,I40	7,II7	2I,I
3	5	I9,738	2	I9,672	0,973	5,9	I9,732	I9,667	0,I86	0,232	6,728	20,0
4	7	I9,87I	2	I9,805	0,984	8,I	I9,863	I9,798	0,278	0,324	6,657	I9,7
5	9	20,00I	2	I9,936	0,995	I0,2	I9,99I	I9,927	0,369	0,4I3	6,435	I9,I
6	II	20,I28	2	20,065	I,005	I2,2	20,II6	20,054	0,457	0,50I	6,2I6	I8,4
7	I3	20,243	2	20,22I	I,0I8	I4,2	20,229	20,I73	0,54I	0,580	5,547	I6,5
8	I6	20,394	3	20,3I9	I,027	I7,I	20,377	20,303	0,632	0,684	4,805	I4,3
9	I7	20,437	I	20,4I6	I,035	I8,0	20,4I9	20,398	0,699	0,7I3	4,058	I2,0
I4	27	20,7I8	2	20,70I	I,060	26,8	20,69I	20,675	0,893	0,904	I,5I0	4,48
I5	29	20,749	2	20,734	I,062	28,5	20,705	20,698	0,909	0,9I4	0,659	I,95
33	7I	20,888	5	20,888		6I,I	20,827					
34	76	20,893	5	20,89I		65,2	20,828					
35	8I	20,897	5	20,895		69,2	20,828					
36	86	20,90I	5	20,899		73,2	20,828					

$$\Delta t_{общ} = \frac{20,828}{I9,40I} = I,427 \qquad \alpha = \frac{70,8 \cdot I0^3}{I,427 \cdot 0,I673} = 296,6 \cdot I0^3$$

Каждому промежутку времени $\Delta\tau$ соответствует средняя корригированная температура $t_{ср(корр)}$ (графа 9), средняя степень конверсии $X_{ср}$ (графа I0) и скорость реакции v^* (в данном примере в единицах мкмоль/мин г) (графа I3). Таким образом, данные граф I0 и I3 составляют один комплект результатов для кинетического анализа. Второй комплект результатов ($X = f(\tau)$) получают по конечным отсчетам каждого промежутка $t_{корр}$, которым соответствует степень конверсии X (графа II). Для корригирования промежутков времени $\Delta\tau$ и длительности главного периода τ данные графы 4 умножают на $\gamma^{t_{ср}-20}$ (графа 6) и величину $[E]_0$. В этом случае временная зависимость X соответствует температуре 20 °С и концентрации фермента I г/л.

Особенностью разработанного метода является применение для расчета основных величин X и v только разниц температур и относительных величин, что значительно повышает достоверность результатов. Конкретные результаты применения термохимического метода для исследования ферментативного гидролиза дисахаридов будут изложены в наших следующих сообщениях.

Литература

I. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. Глава 8. М., МГУ, I976. 320 с.

2. Кальве Э., Прат А. Микрокалориметрия. М., Наука, I963. 477 с.

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

4. Сиймер Э.Х. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение I. Обобщенное кинетическое уравнение для формально двухступенчатых реакций. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, I979, № 465, с. II-I8.

5. Попов М.М. Термометрия и калориметрия. М., МГУ, I954. 943 с.

6. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. М., Мир, I979. 280 с.

A. Menert, E. Siimer

The Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions

Part III

A Thermochemical Method for Investigation of the Steady State Kinetics of Enzymatic Reactions

Summary

Taking into account that in many cases the change of enthalpy in enzymatic reactions is proportional to the quantity of reacted substrate, a thermochemical method has been elaborated to receive the following dependences: reaction rate as a function of degree of conversion, and the last as a function of time. If a calorimeter with the isothermal envelope is used, two kinds of corrections must be done, considering the heat transfer and the dependence of the reaction rate on temperature. According to this method only the differences of temperature and relative values are used to calculate the main parameters, it is not necessary to know the values of reaction heat and heat capacity of the system.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 543.442:547.447:541.183:577.15

А.Я. Озолиньш

СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОСТУПНЫХ АМИНО- И АЛЬДЕГИДНЫХ ГРУПП НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ СИЛОХРОМАХ

Разработка процессов иммобилизации ферментов, а также создание материалов для афинной хроматографии требуют точного определения количества реакционноспособных групп, введенных на носитель в ходе химической модификации его поверхности. Одним из наиболее распространенных материалов, используемых для вышеназванных целей, являются пористые кремнеземные носители, такие как, например, силикагели и силохромы.

Широко применяемая обработка силохромов γ-аминопропилтриэтоксисиланом приводит к образованию на их поверхности полимерной сетки, содержащей первичные аминогруппы, через которые и производят в дальнейшем ковалентное связывание лигандов с носителем.

Методы определения количества реакционноспособных групп на различных носителях уже ранее описывались некоторыми авторами [1-7]. Определение тех же групп на кремнеземных носителях осуществлялось лишь немногими исследованиями [8]. При этом следует подчеркнуть, что весьма распространенное определение концентрации аминогрупп при помощи кислотно-основного титрования не может дать сведений о доступности этих групп для более крупных молекул иммобилизуемых лигандов.

С целью разработки чувствительных и быстрых методов определения реакционноспособных групп и сравнения их доступности для молекул разного размера было исследовано взаимодействие модифицированных силохромов с разными реактивами. Несколько реактивов было синтезировано нами специально для этих целей.

Материалы и методы

В работе использовали силанизированные кремнеземы с содержанием первичных аминогрупп от 30 до 300 мкмоль/г. Содержание аминогрупп определялось потенциометрическим титрованием [7]. Силанизированные силохромы были получены обработкой силохромов марки СХ 2,5 и марки С-80 раствором γ-аминопропилтриэтоксисилана в толуоле по методике, описанной в работе [8].

Пикриновая кислота (2,4,6-тринитрофенол) марки "ч" была дополнительно очищена перекристаллизацией из хлористого метилена.

2,4,6-тринитробензолсульфокислота была синтезирована на кафедре технологии пищевых продуктов ТПИ Х.Я. Киппером.

Хлористый метилен ("ч") использовали без дополнительной очистки. Триэтиламин ("ч") хранили над гранулированной гидроокисью калия и дополнительно очищали перегонкой.

Салициловый альдегид ("ч") дополнительно очищали вакуумной перегонкой и хранили в полиэтиленовом сосуде без доступа света.

3-аминопропанол квалификации "ч" очищали вакуумной перегонкой.

Хлорацетил-n-нитроанилид синтезировали из хлорангидрида хлоруксусной кислоты и n-нитроанилина.

β-5-нитрофурилакролеин ("ч") дополнительно очищали двукратной перекристаллизацией из изопропанола.

n-нитроанилиды глицина и D,L-аланина синтезировали из хлорангидридов соответствующих фталил-аминокислот и n-нитроанилина.

Все остальные реактивы соответствовали квалификации "ч" или квалификации "ч.д.а.".

Оптические плотности растворов определяли на спектрофотометре СФ-16. Коэффициенты молярной экстинкции комплекса пикриновой кислоты с триэтиламином, салицилового альдегида с 3-аминопропанолом и коэффициенты молярной экстинк-

ции 2,4,6-тринитрофениламинопропанола и β-5-нитрофурилакролеина определяли по калибрационным графикам при температуре 20 ±2 °С.

Силанизированный силохром, обогащенный альдегидными группами, получали обработкой силохрома марки С-80 с содержанием первичных аминогрупп 300 мкмоль/г 30-кратным избытком (по отношению к аминогруппам) 25 % раствора глутарового альдегида (Reanal).

Количество связанной пикриновой кислоты на силанизированных силохромах с разным содержанием аминогрупп определяли после десорбции кислоты триэтиламином по оптической плотности этанольного раствора при 385 нм согласно модифицированному методу [9].

В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции для комплекса пикриновой кислоты с триэтиламином ε_{385} = I6370 $М^{-1} \cdot см^{-1}$, определенный независимыми опытами.

Количество связанного салицилового альдегида на силанизированных силохромах определяли после инкубации силохрома с избытком альдегида и деструкции образовавшегося альдимина водным раствором 3-аминопропанола. Для расчетов использовали коэффициент молярной экстинкции продукта реакции альдимина салицилового альдегида с 3-аминопропанолом при 380 нм ε_{380} = 8880 $М^{-1} \cdot см^{-1}$.

Количество ковалентно связанного β-5-нитрофурилакролеина на силанизированных силохромах определяли после инкубации носителей с избытком альдегида по разности оптической плотности контроля и раствора альдегида контактированного с силанизированным носителем. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции β-5-нитрофурилакролеина при 360 нм ε_{360} = I9000 $М^{-1} \cdot см^{-1}$. Растворителем являлась смесь вода - диметилформамид (I0:I).

Ковалентно связанную на силанизированных силохромах 2,4,6-тринитробензолсульфокислоту определяли по количеству остаточной 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты в инкубационном растворе после контактирования с силанизированным силохромом. Для этого остаточную кислоту превращали в 2,4,6-тринитрофениламинопропанол обработкой избытком 3-аминопропанола. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции при 420 нм ε_{420} = II500 $М^{-1} \cdot см^{-1}$.

Количество хлорацетил-п-нитроанилида, связанного с носителем, определяли после инкубации носителя с избытком п-нитроанилида хлоруксусной кислоты по методу [I] удалением непрореагировавшего п-нитроанилида промыванием и щелочным гидролизом ковалентно связанного п-нитроанилида. Количество освобожденного п-нитроанилина определяли по оптической плотности гидролизата при 405 нм с использованием коэффициента молярной экстинкции $\varepsilon_{405} = 9620\ M^{-1} \cdot см^{-1}$.

Альдегидные группы на силанизированном силохроме, обработанном глутаровым альдегидом, определяли по количеству связанного модельного вещества - п-нитроанилида аминокислоты - согласно модифицированному методу [I].

Результаты и обсуждение

При потенциометрическом определении аминогрупп на силанизированных силохромах модифицирующим реагентом является протон, имеющий весьма небольшой эффективный объем. При этом логично предполагать, что результаты определения аминогрупп должны зависеть от строения и размеров молекулы модифицирующего реагента - титранта. Для проверки этого нами было исследовано взаимодействие пикриновой кислоты с силанизированными силохромами. Ранее пикриновая кислота с успехом была применена для определения аминогрупп на силанизированном пористом стекле [9], при этом полученные результаты совпадали с результатами кислотно-основного титрования.

Нами было обнаружено (см. табл. I), что для силанизированных силохромов с невысоким содержанием аминогрупп, до 100 мкмоль/г носителя, количество аминогрупп, доступных пикриновой кислоте, действительно близко к количеству, обнаруженному потенциометрическим титрованием. Однако для носителей с более высоким содержанием аминогрупп значительная часть групп недоступна для взаимодействия с пикриновой кислотой. Следовательно, данные для таких носителей, полученные с помощью пикриновой кислоты, занижены по сравнению с результатами кислотно-основного титрования. Для объяснения наблюдаемых неодинаковых результатов определения аминогрупп можно предположить, что при высоких концентрациях (поверхностной плотности) аминогрупп анионы пикриновой кислоты, уже

связанные с носителем, создают пространственные препятствия для подхода к нему новых молекул пикриновой кислоты из раствора.

Для определения доступности аминогрупп силанизированных силохромов для альдегидов, молекулярный вес и пространственный объем которых близки к таковому для глутарового альдегида, было исследовано взаимодействие носителей с салициловым альдегидом (2-оксибензальдегидом) и β-5-нитрофурилакролеином. Надо отметить, что β-5-нитрофурилакролеин является наиболее близким к глутаровому альдегиду модельным соединением, поскольку в его молекуле содержится алифатическая альдегидная группа, которая удалена от ароматического нитрофуранового кольца. Полученные результаты (см. табл.2) показали, что и для этих реагентов значительная часть аминогрупп матрицы недоступна. Обработка силанизированных силохромов значительными по отношению к аминогруппам избытками альдегидов при весьма длительных периодах инкубации ни в одном случае не приводила к количественной модификации аминогрупп. Вакуумирование (для удаления пузырьков воздуха из пор силохрома) во время контактирования носителей с реагентами не влияло на количество модифицированных аминогрупп. Надо указать, что количество доступных аминогрупп на силохромах со средней (150 мкмоль/г) и высокой (300 мкмоль/г) степенью силанизации одинаково для этих весьма различных по строению молекул альдегидов и незначительно (на 10-20 мкмоль/г) занижено по сравнению с результатами, получаемыми с пикриновой кислотой. Полученные результаты позволяют считать, что количество доступных и титруемых аминогрупп зависит не от характера реакции их с модифицирующим реагентом, а от строения нереагирующей части молекулы последнего.

Известно, что комплексы пикриновой кислоты с аминами, а также альдимины под влиянием растворителя могут распадаться на исходные компоненты.

Так как для определения доступных аминогрупп нами были использованы именно реакции образования комплекса пикриновой кислоты с аминогруппами и реакция образования альдиминов, то для проверки полученных результатов было необходимо определить количество доступных аминогрупп при помощи реагентов, образующих стабильную ковалентную связь. Для этой цели было ис-

Таблица I

Количество аминогрупп на силанизированных силохромах, доступное модификации кислотно-основным титрованием и пикриновой кислотой

Марка силохрома	Диаметр частиц носителя, мм	Количество аминогрупп (мкмоль/г), доступное модификации и время инкубации, ч			
		кислотно-основным титрованием	время инкубации, ч	пикриновой кислотой	время инкубации, ч
I	2	3	4	5	6
Сх 2,5	0,5-0,8	0	I	I	0,25
		30	I	26	0,25
		9I	I	89	0,25
		I00	I	94	0,25
		I20	I	I0I	0,25
		I40	I	I23	0,25
		I60	I	I27	0,25
		I80	I	I30	0,25
		230	I	I4I	0,25
		280	I	I88	0,25
С-80	0,I6-0,3	I50	I	I22	0,25
		250	I	I84	0,25
		280	I	I92	0,25
		300	I	I8I	0,25
		380	I	I3I	0,25
Сх 2,5	размельченный	I80	I	I28	0,25
		I80	I	I26	I6
		280	I	I90	I8

следовано взаимодействие силанизированных носителей с п-нитроанилином хлоруксусной кислоты и 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой. Полученные результаты (см. табл. 3) показали, что количество титруемых аминогрупп для п-нитроанилида хлоруксусной кислоты 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты ниже, чем для салицилового альдегида и β-5-нитрофурилакролеина (см. табл. 2).

Таблица 2

Количество аминогрупп на силанизированных силохромах, доступное модификации салициловым альдегидом и β-5-нитрофурилакролеином

Марка силохрома	Диаметр частиц, мм	Содержание аминогрупп (мкмоль/г), определенное кислотно-основным титрованием	Избыток модифицирующего реагента по отношению к аминогруппам матрицы (М)		Количество аминогрупп (мкмоль/г), доступное модификации, и время инкубации, ч			
			салициловый альдегид	β-5-нитрофурилакролеин	салициловый альдегид	время инкубации	β-5-нитрофурилакролеином	время инкубации
I	2	3	4	5	6	7	8	9
Сх 2,5	0,5-0,8	0			0	22		
Сх 2,5	0,5-0,8	30	200		I5	22		
Сх 2,5	0,5-0,8	9I	70		79	22		
Сх 2,5	0,5-0,8	I20	50		87	22		
С-80	0,I6-0,30	I50	40		97	22		
С-80	0,I6-0,30	300	20		I70	22		
Сх 2,5	0,5-0,8	9I		I2			80	2
Сх 2,5	0,5-0,8	I20		I0			89	2
С-80	0,I6-0,30	I50		9			95	2
С-80	0,I6-0,30	300		4			I70	2
Сх 2,5	0,5-0,8	9I		I2			8I	4
Сх 2,5	0,5-0,8	I20		I0			88	4
С-80	0,I6-0,30	I50		9			96	4
С-80	0,I6-0,30	300		4			I72	4

Таблица 3

Количество аминогрупп на силанизированных силохромах, доступное модификации п-нитроанилидом хлоруксусной кислоты и 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой

Марка силохрома	Диаметр частиц, мм	Содержание аминогрупп, определенное кислотно-основным титрованием, мкмоль/г	Избыток модифицирующего реагента по отношению к аминогруппам матрицы (М)		Количество аминогрупп, доступное модификации мкмоль/г и время инкубации, ч			
			п-нитроанилид хлоруксусной кислоты	тринитробензолсульфокислота	п-нитроанилид хлоруксусной кислоты	время инкубации	тринитробензолсульфокислота	время инкубации
Сх 2,5	0,5 -0,8	0			0	22		-
Сх 2,5	0,5 -0,8	30	400		8	22		
Сх 2,5	0,5 -0,8	9I	I30		62	22		
Сх 2,5	0,5 -0,8	I20	I00		67	22		
Сх 2,5	0,5 -0,8	I60	80		89	22		
С-80	0,I6-0,30	300	40		I30	22		
С-80	0,I6-0,30	I50		4			80	2
С-80	0,I6-0,30	300		2			I50	2

Понижение титруемости аминогрупп в случае нитроанилида является, очевидно, следствием его невысокой алкилирующей способности.

Пониженное количество титруемых аминогрупп для 2,4,6-тринитробензолсульфокислоты, вероятно, можно объяснить влиянием дополнительных пространственных затруднений, создаваемых весьма объемистой сульфогруппой.

Однако сам по себе факт отсутствия завышенных результатов для реагентов, образующих с аминогруппами ковалентную связь, позволяет предполагать, что комплекс пикриновой кислоты с первичными аминогруппами, а также альдимины салицилового альдегида и β-5-нитрофурилакролеина все же относительно стабильны и распад этих соединений не может быть единственной причиной заниженных результатов определения допустных аминогрупп.

Для определения количества доступных альдегидных групп на поверхности активированных глутаровым альдегидом силохромов использовали реакцию их с модельными веществами – n-нитроанилидами глицина и D,L-аланина. По количеству связанных модельных веществ было найдено, что на силанизированном силохроме С-80 с содержанием аминогрупп 300 мкмоль/г после обработки его 20-кратным избытком глутарового альдегида обнаруживалось до 75 мкмоль/г альдегидных групп.

Надо отметить, что столь низкое значение доступных альдегидных групп было получено также в работе [8] с использованием метода гидроксиламидного титрования.

Вышеприведенные результаты показывают, что предложенные нами методы определения количества реакционноспособных групп дают довольно близкие результаты, которые, в свою очередь, нередко значительно отличаются от результатов кислотно-основного титрования. Нам представляется, что определение реакционноспособных групп с помощью органических реагентов дает результаты, которые более объективно характеризуют поведение носителей в процессе иммобилизации биоактивных лигандов. Описанные в данной работе методы рекомендуется более широко применять для характеристики носителей.

Литература

I. Klockow, M., Hennrich, N. Determination of reactive groups of polymer carriers with amino acid 4-nitroanilides. - FEBS Lett., 1972, v. 26, N 1, p. 53-55.

2. Sharma, M., Slaunwhite, W.R. Quantitation of alkylamino side chains coupled to agarose beads. - Anal. Biochem., 1975, v. 68, N 1, p. 79-86.

3. Schmitt, H.W., Walker, F.E. Coupling capacity of solid phase sequencing supports. - FEBS Lett., 1977, v. 81, N 2, p. 403-405.

4. Miyagawa, A., Okuyama, T. An improved estimation method for amino alkyl ligand immobilized on matrix beads. - J. Biochem., 1977, v. 81, N 6, p. 1715-1720.

5. Kohn, J., Wilchek, M. A colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 1978, v. 84, N 1, p. 7-12.

6. Švec, F., Hrudkova, H., Kalal, J. Reactive polymers. XX. The preparation of a carrier with aldehyde groups by oxidation of a macroporous glycidyl methacrylate-ethylenedimethylacrylate copolymer with periodic acid. - Angew. makromol. Chem., 1978, v. 70, p. 101-108.

7. Тимофеева Л.А., Стенще Б.А., Веверис А.Я. Способ количественного определения аминогрупп в алкиламиносилохромах. - Тезисы докладов Всесоюзного совещания "Современные аспекты синтеза и производства ионообменных материалов." Черкассы, 1979, с. 80-81.

8. Рогожин С.В., Варламов В.П., Вальковский Д.Г. Получение модифицированных кремнеземов для биологически активных соединений. - Изв. АН СССР. Сер. хим., 1975, № 8, с. 1718-1721.

9. Lee, C.C.J., London, G.M. Quantitative determination of amino groups on derivatized controlled pore glass: a comparison of methods. - Anal. Biochem., 1979, v. 94, N 1, p. 60-64.

A. Ozolinsh

Spectrometric Method for Determining Available Amino and Aldehyde Groups on Silanized Silochromes

Summary

Interactions of silochrome (porous siliceous carrier) silanized by treating with γ-aminopropyltrietoxysilane with various reagents which are capable to modify aliphatic amino groups by forming ionic or covalent bonds have been investigated.

The amount of amino groups available for modification has been found to be different for every reagent and never reached that for hydrochloric acid, especially in the case of silochromes with a higher degree of silanization.

Ionic adsorption of picric acid on the silochromes with the amount of aminogroups up to $100 \cdot 10^{-6}$ M per gram of carrier has been found to be appropriate for quantitative determination, when at higher degrees of amination there were serious deviations from the results obtained by potentiometric titration.

Available aldehyde groups on silanized silochrome treated with glutaraldehyde have been determined from the amount of covalently bound model substance D,L-alanine-p-nitroanilide.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15

Л.В. Гаевая

СВОЙСТВА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НУКЛЕОЗИДФОСФОРИЛАЗ ИЗ E.coli

Нуклеозидфосфорилазы (нуклеозид:ортофосфат-(рибо)дезоксирибозилтрансферазы; КФ 2.4.2.1-4) катализируют обратимый фосфоролиз рибо- и дезоксирибонуклеозидов с образованием свободного азотистого основания и пентозо-1-фосфата. Кроме того, с помощью этих ферментов можно осуществлять перенос пентозы от одного основания к другому в ходе двух сопряженных реакций фосфоролиза по схеме:

основание 1-пентоза+Рнеорг. $\rightleftharpoons$ основание 1+пентозо-1-Р

пентозо-1-Р+основание 2 $\rightleftharpoons$ основание 2-пентоза+Рнеорг.

В бесклеточных экстрактах E.coli присутствует пуринфосфорилаза, для которой субстратами служат рибо- и дезоксирибозилпроизводные аденина и гуанина, и пиримидинфосфорилазы, осуществляющие фосфоролиз уридина и тимидина [1-3]. Благодаря этому ферментные препараты из E.coli получили практическое применение в синтезе нуклеозидов из модифицированных азотистых оснований в ходе трансрибозилазных реакций между разнообразными донорноакцепторными парами [4].

В настоящей работе описываются некоторые свойства препарата иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз из E.coli. При иммобилизации был использован разработанный нами метод включения в полиакриламидный гель в присутствии модификаторов [5-6]. Благодаря ковалентной межмолекулярной сшивке белковых молекул в полимеризационной смеси достигается прочное закрепление ферментов в структуре геля. Вход активности после иммобилизации достигает 30-40 % от исходной.

Работа выполнена в аспирантуре под руководством А.И. Кёстнера.

Материалы и методы

Ферментный препарат нуклеозидфосфорилаз из E.coli представлен нам СКТБ БАВ (г. Новосибирск). Дезоксирибозилтрансферазная активность препарата составляла 20–80 ед.акт./мг при содержании 50–80 % белка. Азотистые основания и дезоксирибонуклеозиды производства фирмы Koch Light Lab. (Англия).

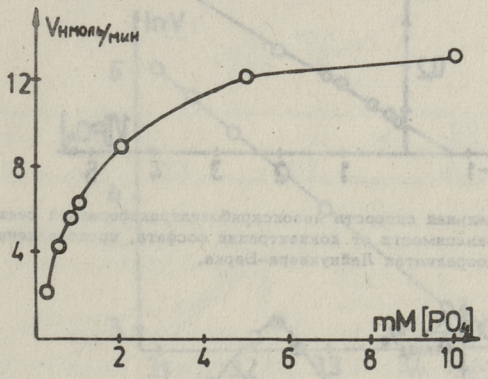
Дезоксирибозилтрансферазную активность препарата нуклеозидфосфорилаз определяли по скорости образования дезоксиаденозина из аденина и тимидина, используемого в качестве донора дезоксирибозы. Реакционную смесь получали растворением в 50 миллимолях цитрат-фосфатного буфера при pH 6,0 I миллимоль аденина и 5 миллимолей тимидина и ферментного препарата в количестве, обеспечивающем превращение в нуклеозид не более I0–20 % аденина за 30 минут инкубации при 37 °С. Разделение продуктов реакции проводили с помощью колоночной хроматографии на КМ-целлюлозе.

Результаты и обсуждение

Кроме нуклеозидфосфорилаз перенос пентозы между азотистыми основаниями катализирует также транс-N-дезоксирибозилаза (нуклеозиддезоксирибозилтрансфераза; КФ 2.4.2.6)-фермент, впервые выделенный из Lactob. helveticus [6]. Основное отличие в механизме реакций, катализируемых этими ферментами состоит в том, что для транс-N-дезоксирибозилазы из Lactob. helveticus не требуется наличия фосфата в инкубационной смеси и тем, что при этом не происходит образования свободного промежуточного продукта – пентозо-I-фосфата. По некоторым литературным данным в E.coli была обнаружена также дезоксирибозилтрансферазная активность, не зависящая от присутствия фосфата [8].

На первом этапе работы с нативным ферментным препаратом из E.coli нами также был обнаружен фосфатнезависимый перенос дезоксирибозы между азотистыми основаниями и было сделано предположение о присутствии в этом препарате транс-N-дезоксирибозилазы [9]. Однако при изучении свойств иммобилизованного в полиакриламидном геле (ПААГ) препарата оказалось, что зависимость дезоксирибозилтрансферазной ак-

тивности от концентрации фосфата носит типичный характер зависимости скорости реакции от концентрации субстрата, описываемой уравнением Михаэлиса-Ментен (фиг. I). Представление результатов в двойных обратных координатах Лайнуивера-Берка (фиг. 2) также показало, что экспериментальные точки хорошо укладываются в прямую. Значение K_M для фосфата равно I,3 миллимолей. При проведении реакции с иммобилизованным препаратом в отсутствие фосфата (трис-HCI) не было обнаружено дезоксирибозилтрансферазной активности. Все это говорит о фосфоролитическом механизме реакции переноса дезоксирибозы. Дезоксирибозилтрансферазная активность нативного препарата, не зависящая от присутствия фосфата, объясняется тем, что, как оказалось, в нем содержится 0,5–I,25 молей фосфата на миллиграмм препарата. При иммобилизации же этот эндогенный фосфат вымывается из гранул геля.



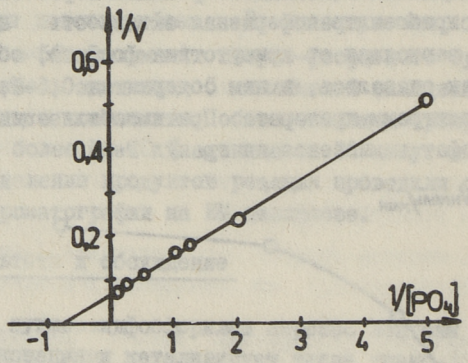
Фиг. 1. Начальная скорость дезоксирибозилтрансферазной реакции в зависимости от концентрации фосфата.

Таким образом, был сделан вывод, что перенос дезоксирибозы между азотистыми основаниями происходит в ходе сопряженных обратимых реакций фосфоролиза нуклеозидов. Ниже описаны некоторые свойства препарата нуклеозидфосфорилаз, иммобилизованных в ПААГ.

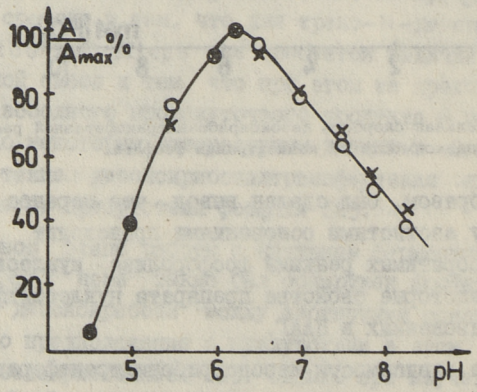
Изучение зависимости дезоксирибозилтрансферазной активности препарата иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз от pH проводили с использованием цитрат-фосфатного буфера при изменении pH от 4,5 до 8,3. Сравнение активности нативного

и иммобилизованного препарата при разных pH показало, что иммобилизация в ПААГ в присутствии модификаторов не влияет на характер pH-зависимости (фиг. 3). Максимальная активность наблюдается при pH 6,25.

Результаты, полученные при изучении стабильности иммобилизованного препарата нуклеозидфосфорилаз при 50 °С и при различных значениях pH, показаны на фиг. 4. Оказалось, что нуклеозидфосфорилазы более стабильны при щелочных значениях pH, чем при кислых, а максимальная стабильность на-

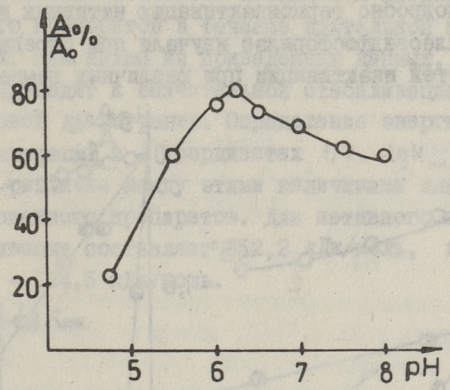


Фиг. 2. Начальная скорость дезоксирибозилтрансферазной реакции в зависимости от концентрации фосфата, представленная в координатах Лайнуивера-Берка.

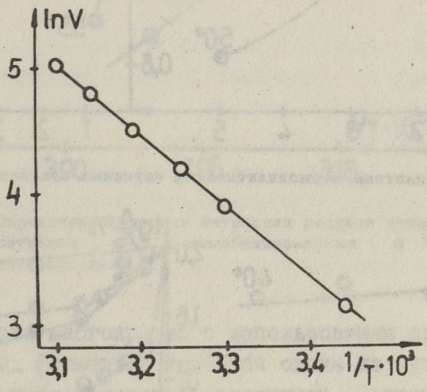


Фиг. 3. Дезоксирибозилтрансферазная активность нуклеозидфосфорилаз в зависимости от pH:

o – нативный препарат;
x – иммобилизованный препарат.



Фиг. 4. Стабильность иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз при 50 °С в зависимости от pH. Длительность выдержки часов.

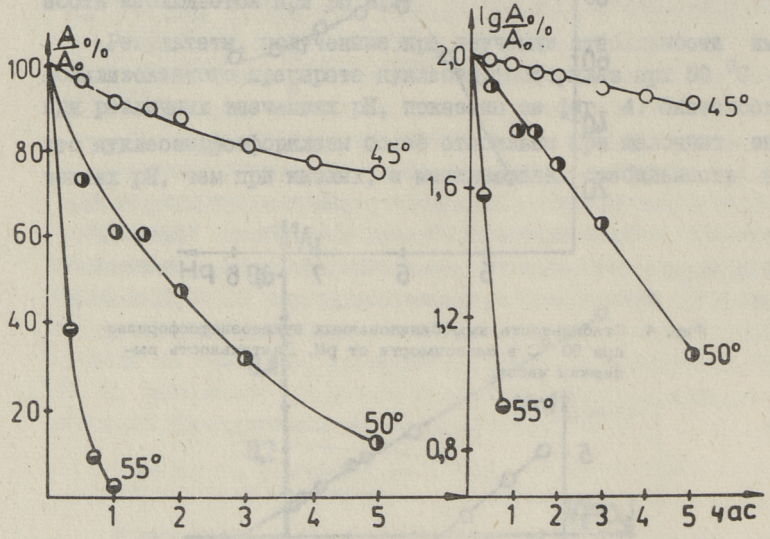


Фиг. 5. Скорость дезоксирибозилтрансферазной реакции в зависимости от температуры в координатах Аррениуса.

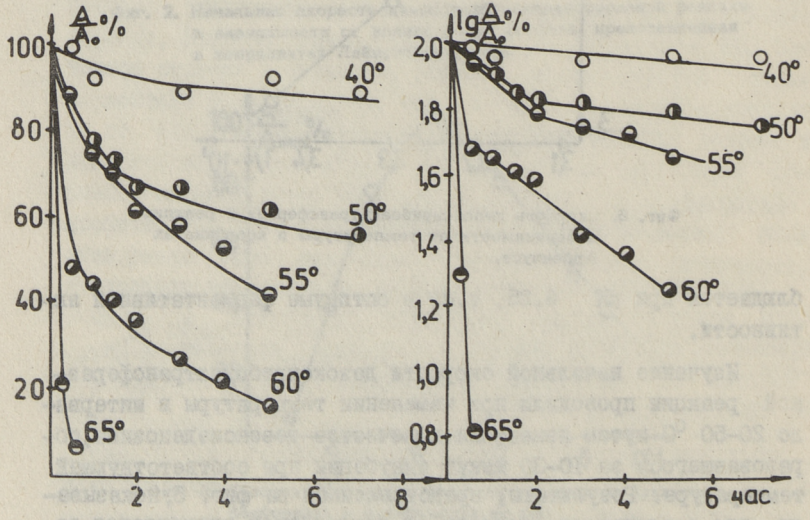
блюдается при pH 6,25, т.е. в оптимуме ферментативной активности.

Изучение начальной скорости дезоксирибозилтрансферазной реакции проводили при изменении температуры в интервале 20–50 °С путем изменения количества дезоксиаденозина, образовавшегося за 10–30 минут инкубации при соответствующей температуре. Результаты, представленные на фиг. 5, показывают, что зависимость скорости от температуры подчиняется закону Аррениуса. Энергия активации для этой реакции равна 47,7 кДж/моль.

Более подробно термоинактивацию нативных и иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз изучали при определении констант скоростей инактивации при различных температурах. На

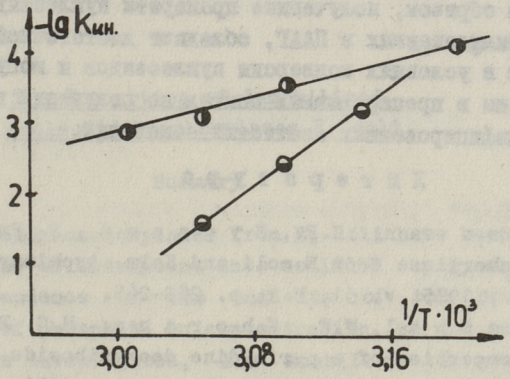


Фиг. 6. Кинетика термоинактивации нативных нуклеозидфосфорилаз.



Фиг. 7. Кинетика термоинактивации иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз

фиг. 6 и 7 показано изменение активности нативного и иммобилизованного препаратов в течение длительной инкубации при температурах. Как видно из приведенных данных, иммобилизация в ПААГ приводит к значительной стабилизации ферментов против тепловой денатурации. Определение энергии активации реакции денатурации в координатах $1/T$, $-\lg k_{ин.}$ (фиг. 8) также показало различие между этими величинами для нативного и иммобилизованного препаратов. Для нативного препарата энергия активации составляет 352,2 кДж/моль, для иммобилизованного – 134,5 кДж/моль.



Фиг. 8. Определение энергии активации реакции денатурации нативных (○) и иммобилизованных (●) нуклеозидфосфорилаз.

Возможность многократного использования препаратов водонерастворимых ферментов является одним из существенных преимуществ иммобилизованных препаратов. Поэтому особое значение приобретает их стабильность в рабочих условиях.

Результаты, полученные в ходе многократного использования одного и того же препарата иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз для конверсии тимидина и дезоксиаденозина, представлены в табл. 1. Следует отметить, что после одиннадцати циклов с длительностью 1,5 часа использования препарата его активность практически не изменилась. Если учесть, что выход активности после иммобилизации составляет до 40 % от исходной, то даже за эти 11 циклов использования могло быть получено продукта в 4,5 раза больше, чем с тем количество нативного препарата, которое было взято для иммобилизации.

Таблица I

Процент превращения субстрата при многократной конверсии нуклеозидов

Время инкубации, мин	Номер цикла					
	I	3	5	7	9	II
I5	2I,3	23	2I,9	24	23,5	20,9
90	65,3	65,7	67,8	67,3	63	63

Таким образом, полученные препараты нуклеозидфосфорилаз, иммобилизованных в ПААГ, обладают достаточной стабильностью в условиях конверсии нуклеозидов и могут быть использованы в препаративных опытах по получению нуклеозидов из модифицированных азотистых оснований.

Литература

I. Jensen, K.F., Nygaard, P. Purine nucleoside phosphorylase from E.coli and Salm. typhimurium. - Eur. J. Biochem., 1975, v. 51, N 1, p. 253-265.

2. Razzel, W.E., Khorana, H.G. Purification and properties of a pyrimidine deoxyriboside phosphorylase from E.coli. - Biochim. Biophys. Acta, 1958, v. 28, p. 562-566.

3. Krenitsky, T.A. Uridine phosphorylase from E.coli. - Biochim. Biophys. Acta, 1976, v. 429, p. 352-358.

4. Filip, J., Pritasil, L., Neyedly, Z. Effect of reaction temperature of enzyme conversion of pyrimidine bases to nucleosides and 2'-deoxynucleosides. - J. Labelled Comp. and Radiopharm., 1977, v. 14, p. 297-305.

5. А.с. 530885 (СССР). Способ получения нерастворимых ферментов./ Таллинский политехнический ин-т/ Авт. изобр. А.И. Кёстнер, М.О. Мандель, В.Н. Федосеев, Э.Х. Сиймер. - Заявл. 08.02.I974, № I989900/I3; опубл. в Б.И., I976, № 37. МКИ С 07G 7/00.

6. А.с. 673642 (СССР). Способ иммобилизации ферментов в геле / Таллинский политехнический ин-т/ Авт. изобр. В.А. Кросинг, Х.Я. Кальюлэ, А.И. Кёстнер, А.З. Фролков, Б.З. Власова, Р.И. Шулутко. - Заявл. I5.II.I977, № 2543I03/23-05; опубл. в Б.И., I979, № 26. МКИ С 08. F 220/56.

7. M a c N u t t, W.S. The enzymically catalysed transfer of the deoxyribosyl group from one purine or pyrimidine to another. - Biochem. J., 1952, v. 50, p. 384-397.

8. Z m a d a, A., Z g a r a s i, S. Ribosyl and deoxyribosyl transfer by bacterial enzyme systems. - J.Bacteriology, 1967, v. 94, p. 1551-1559.

9. Г а е в а я Л.В. Иммобилизация N-дезоксирибозилтрансферазы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. 75-79.

L. Gayevaya

The Properties of Immobilized Nucleosidphosphorylases E. coli

Summary

Nucleosidphosphorylases from E. coli have been immobilized by means of entrapment into modified polyacrylamide gel. The dependence of the activity of the produced preparation of phosphate on concentration, pH and temperature has been investigated. The stability of obtained preparations in the course of nucleoside transformation has been characterized. The produced immobilized catalysts are proved to be usable for preparative transformation of nucleosides.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.156.5:637.1

М.К. Фриеденталь

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Сообщение II

Получение и характеристика иммобилизованного сычужного фермента

В связи с возрастающим дефицитом сычужного фермента в настоящее время большое внимание уделяется повышению эффективности использования молокосвертывающих ферментных препаратов [1, 2]. Заманчивым и перспективным в этом отношении является применение иммобилизованного фермента при свертывании молока [3, 4]. Этим ожидается существенное уменьшение расхода фермента и исключается возможность протекания нежелательных побочных процессов, сопутствующих образованию сгустка и образованию сыра.

Нежелательное протекание процесса характерно для большинства известных в настоящее время заменителей химозина (КФ 3.4.23.4). Естественно, производство сыра при помощи нерастворимого сычужного фермента – это новое направление в сыроделии и требует решения многих вопросов. Исходя из этого, первой задачей была нами поставлена разработка метода иммобилизации сычужного фермента, а также испытание пригодности получаемых ферментных катализаторов при длительном контактировании их с высокомолекулярным субстратом – молоком.

Работа выполнена в аспирантуре под руководством Э.Х. Сиймера и А.И. Кёстнера.

Материалы и методы

Для иммобилизации в качестве фермента использовали эталонный образец сычужного порошка, поставляемый заводом сычужного фермента г. Москвы. Носителем служил широкопористый силикагель МСА 2500, ГОСТ 20882-75.

Иммобилизацию осуществляли при помощи ковалентного привязывания фермента к поверхности активированного диазониевыми группами носителя. Для реактивации непрореагировавших в ходе иммобилизации активных диазониевых групп препарат обрабатывали растворами аминогруппу содержащих веществ.

После введения функциональных групп и окончательного диазотирования активированный силикагель промывали многократно ледяной водой до нейтральной реакции, затем 0,1-молярным раствором фосфатного буфера с pH 6,2 и инкубировали в растворе сычужного фермента. Полученный препарат иммобилизованного сычужного фермента подвергали тщательному промыванию с 1-молярным NaCl и фосфатным буфером с pH 6,2. Затем определяли его активность.

Субстратом использовали 12 %-ный раствор порошка сухого обезжиренного молока в 10 миллимолях $CaCl_2$, pH 6,4.

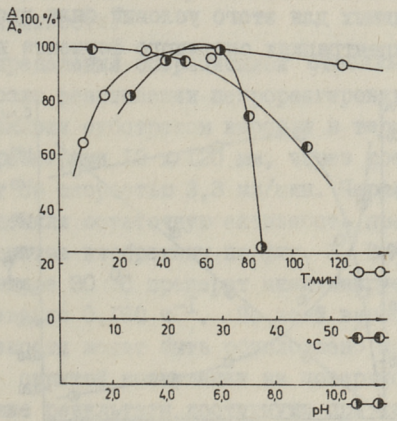
Активности препаратов определяли по модифицированному нами методу Бингхама, который основывается на осаждении продуктов гидролиза казеина при pH 5,2, растворении осадка в 1-молярном NaOH и последующем спектрофотометрическом определении пара-казеина при 290 нм. Для этого 0,5 мл реакционной смеси пипетировали в 3,0 мл 1-молярного ацетатного буфера при pH 5,2, охлаждали до 0...2 °C в стаканах центрифуги на ледяной бане. Образовавшуюся суспензию центрифугировали при 7000 x g в течение 10 минут при +2 °C (на центрифуге К 24 фирмы Янецки, ГДР). Осажденные продукты реакции растворяли в 10 миллилитрах 1-молярного раствора NaOH и содержание пара-казеина определяли спектрофотометрически при длине волны 290 нм (на спектрофотометре VSU-2P фирмы Цейсс, ГДР) против контроля - субстрата без ферментного препарата.

Опыты проводили в 40 мл термостатированном реакционном сосуде. 25 мл обезжиренного молока с pH 6,4 пипетировали в сосуд и при температуре 35 °C прибавляли определен-

ное количество ферментного препарата. Для анализа использовали 0,5 мл реакционной смеси, которую проанализировали вышеописанным методом.

Результаты и обсуждение

Для выяснения скорости иммобилизации варьировали время инкубации носителя с раствором фермента. Опыты проводили при комнатной температуре, концентрация раствора сычужного фермента I6 мг/мл, pH 6,2. Результаты представлены на фиг. I. Выясняется, что реакция присоединения носителем молекул фермента протекает довольно быстро и практически завершается в течение 30 минут. Исходя из этих результатов, все следующие опыты проводили с продолжительностью инкубации не менее 30 минут.



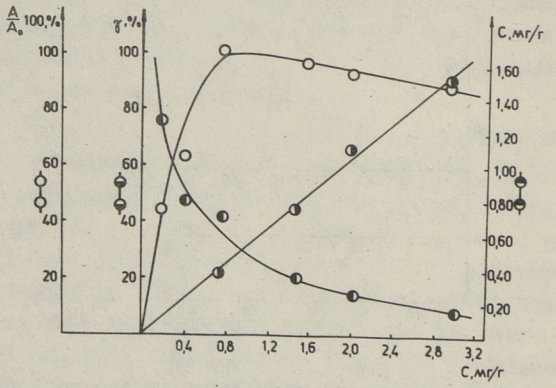
Фиг. 1. Относительная активность иммобилизованного сычужного фермента в зависимости от продолжительности, температуры и pH иммобилизации.

Для изучения температурной зависимости опыты проводили в тех же условиях при различных температурах. Как видно из фиг. I, при температуре выше 20–25 °C наблюдается значительное снижение активности иммобилизованного сычужного фермента, однако это не обусловлено инактивацией самого фермента. При температуре 45 °C и pH 6,2 в течение 30 минут заметных изменений в активности растворимого сычужного фермента не

обнаружено. Следовательно, инактивацию иммобилизованного препарата при повышенных температурах можно объяснить разрушением диазониевых групп на активированном носителе. Следовательно, иммобилизацию следует проводить при температуре не выше 20–25 °С.

Изучение выхода активности в зависимости от pH иммобилизации показало, что максимальный выход активности достигается при значениях pH 4–6. Эта зависимость полностью совпадает с кривой pH стабильности нативного фермента. Значения pH 4–6 соответствуют наибольшей стабильности нативного сычужного фермента.

При внедрении иммобилизованных ферментов 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 сычужного фермента в растворе.



Фиг. 2. Относительная активность иммобилизованного сычужного фермента, выхода активности и количества связанного на носителе белка в зависимости от концентрации исходного раствора.

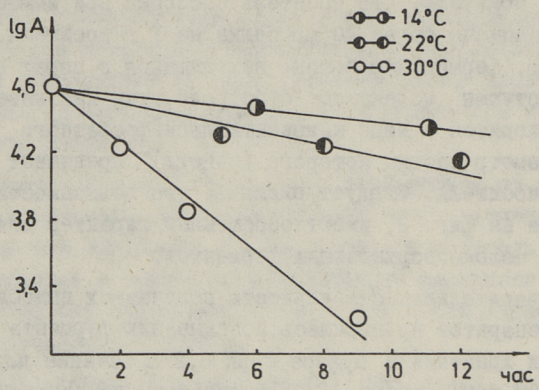
По фиг. 2 видно, что выход активности иммобилизованного сычужного фермента возрастает при увеличении концентрации сычужного фермента в растворе до 0,8...1,0 мг/мл. γ же составляет при этой же концентрации фермента ~ 40 %. Но интересно отметить, что увеличение концентрации фермента в растворе приводит к увеличению содержания белка на носите-

ле. Опыты показали, что носитель способен при иммобилизации привязывать более 40 мг белка на I г носителя. Следовательно, ферментный белок, находящийся в порах носителя, не доступен молекулам субстрата, так как казеин в молоке находится в виде казеинаткальцийфосфатного комплекса, диаметр частиц которого (мицелл) превышает диаметр пор носителя. Следует ожидать, что зависимости, представленные на фиг. 2, имеют обобщенный характер для иммобилизации молокосвертывающих ферментов.

Предварительная стабильность получаемых иммобилизованных препаратов проверялась по смыванию фермента с носителя при хранении в буфере с pH 6,2 в течение длительного времени при температуре 4 °С. Результаты показывали, что препараты имеют хорошую стабильность. Остаточная активность после 5-месячного хранения составляла около 70 % от исходной активности.

Для определения операционной стабильности получаемый препарат после реактивации непрореагировавших диазониевых групп и промывки субстратом вносили в термостатированную колонку с размерами I2 x I20 мм, через которую прокачивали субстрат со скоростью 3,3 мл/мин. Через определенное время определяли остаточную активность препарата. Результаты этих опытов изображены на фиг. 3. Выясняется, что при температуре 30 °С препарат инактивируется со скоростью инактивации 0,I60 $ч^{-I}$. По всей вероятности, уменьшение активности может быть обусловлено прежде всего наступлением скрытой коагуляции на поверхности зерна носителя. Хорошие результаты достигнуты при контактировании препарата со субстратом при температурах I4 и 22 °С. Соответствующие константы скорости реакции инактивации составляют 0,044 $ч^{-I}$ и 0,022 $ч^{-I}$. Следовательно, более оптимальным условием применения такого рода препаратов является их использование для проведения ферментативной фазы коагуляции при пониженных температурах, что препятствует стерической блокаде активных центров фермента образующимися микросгустками.

Таким образом, оказывается, что иммобилизация ферментов азосочетанием является оправданной при иммобилизации кислых протеиназ, в том числе и сычужного фермента,



Фиг. 3. Инактивация иммобилизованного сычужного фермента в зависимости от температуры раствора субстрата.

которые содержат преимущественно реакционноспособные тирозиновые остатки. Сычужный фермент, в частности, характеризуется высоким содержанием тирозина, фенилаланина и гистидина, которые способны легко реагировать с ароматическими диазопроизводными [5]. Итак, при иммобилизации эталонного образца сычужного порошка через диазониевые группы можно получить препараты, которые пригодны для длительной работы при пониженных температурах, и следовательно, быть катализаторами для двухфазной коагуляции молока.

Литература

I. Sternberg, M. Microbial rennets. - Adv. Appl. Microbiol., 1976, v. 20, p. 135-157.

2. Green, M.L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants. - J. Dairy Res., 1977, v. 44, p. 159-188.

3. Olson, N.F. Potential uses for immobilized enzymes in the dairy and food industries. - Sci. e Tecn. Latt.-Cas., 1976, v. 27, N 5, p. 365-401.

4. Hartmeier, W. Immobilisierte Enzyme für die Lebensmitteltechnologie. - Gordian, 1977, Bd. 77, N 9, S. 232-237.

5. Foltmann, B., Pedersen, V., Jacobsen, H., Kauffman, D., Wybrandt, G. The complete amino acid sequence of prochymosin. - Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 1977, v. 74, n 6, p. 2321-2324.

M. Friedenthal

Preparation, Properties and Application of Immobilized Milk Clotting Enzyme Preparatives

Part II

Preparation and Properties of Immobilized Rennet Preparative

Summary

Water soluble rennet preparative has been covalently bound to porous siliceous carrier MCA-2500 activated with diazo groups. For optimization of immobilization procedure the dependence of temperature, pH and enzyme concentration in solution on the activity of insoluble rennet preparative has been determined. Activity yields about 40...80 % have been obtained. In contact with skim-milk solution the inactivation rates of immobilized rennet preparatives were 0.160 h^{-1}, 0.044 h^{-1}, 0.022 h^{-1} at temperatures 30, 22 and 14 °C, respectively. The produced preparations exhibited good stability for skim-milk hydrolysis at low temperatures.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.07(087.8)

А.Х. Калда, Л.И. Воробьева

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ С АСПАРТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Сообщение I
Изучение влияния иммобилизации на аспартазную активность и жизнеспособность пропионовокислых бактерий

Получение L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония при помощи иммобилизованных клеток микроорганизмов - продуцентов аспартазы - является одним из наиболее интересных методов с практической стороны, так как продукт реакции широко используется в медицине и в пищевой промышленности [1]. Хотя реакция аспартазы (L-аспартат-аммиак-лиазы КФ 4.3.1.1,) одностадийная и не нуждается в кофакторах, все же более перспективной оказалась иммобилизация целых клеток микроорганизмов, в то время как выделенный и очищенный фермент нестабилен и плохо подчиняется иммобилизации [2]. Реакция аспартазы наблюдается в некоторых растениях и во многих бактериях. Наиболее известными продуцентами этого фермента являются разные штаммы Escherichia coli, но высокоактивный фермент найден и в Bacterium succinum, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcesiens, Brevibacterium roseum [3]. Активную реакцию L-аспартат-аммиак-лиазы обнаружили и в пропионово-кислых бактериях [4].

Задачей настоящего исследования являлось сравнение аспартазной активности некоторых видов Propionibacterium, иммобилизация клеток активного вида путем включения в полиакриламидный гель и изучение стабильности и жизнеспособности полученных препаратов.

Работа выполнена в аспирантуре под руководством А.И. Кёстнера.

Материалы и методы

Культуры Propionibacterium shermanii, P.technicum, P. petersonii и P. pentosaceum получали с кафедры микробиологии Московского государственного университета. Биомассу выращивали при температуре 30 °С в течение трех суток в среде следующего состава (выражено в процентах): глюкоза – 2; кукурузный экстракт – I-2; хлористый кобальт – 0,0005; сернокислый аммоний – 0,3; pH среды 6,7...6,8. Клетки выделяли из культуральной жидкости путем отцентрифугирования и включали в 20-процентный полиакриламидный гель. Приготовили полимеризационную смесь следующего состава: I г биомассы, 300 мг натриевой соли L-аспарагиновой кислоты; 3 мл фосфатного буфера (pH 8,5; 0,05 М); I мл 50-процентного раствора акриламида и N,N′- метиленбисакриламида в отношении 9:I; 0,I6 мг 50-процентного раствора персульфата аммония; 0,I6 мл 50 %-ного раствора N,N,N′,N′-тетраэтилметилендиамина. Полимеризацию проводили в водяной бане. Полученный гель измельчали протиранием через сито (0,6 мм) и несколько раз промывали водой. В некоторых опытах в процессе полимеризации дополнительно прибавляли сшивающий реагент – глутаровый альдегид (0,2 мг 25 %-ного раствора на I г биомассы). Прибавление глутарового альдегида может повышать стабильность иммобилизованных препаратов, по-видимому, из-за дополнительного сшивания молекул фермента внутри клетки и фиксирования клеточных стенок [9].

Аспартазную активность биомассы и готового препарата определяли раньше описанным методом [5]. Единицей аспартазной активности считали такое количество L-аспарагиновой кислоты в микромолях, которое продуцирует I г иммобилизованного препарата или I мг биомассы в течение I минуты в I-молярном растворе фумарата аммония при 37 °С. Стабильность иммобилизованных препаратов изучали путем инкубации гранул геля при 30 °С в субстрате.

Жизнеспособность клеток определяли по утилизации глюкозы свободными или фиксированными клетками [6]. Выживаемость микроорганизмов определяли также методом высева. Для этого около 2 г геля в стерильных условиях разбивали в ступке и клетки экстрагировали стерильным физиологическим раствором. Оптическая плотность начальной суспензии должна быть

в пределах 0,35...0,42, определена на ФЭК-56М-У 4.I зеленым фильтром № 6 в 0,3 см кювете. Из начальной суспензии делали разбавление 10^6 раз физиологическим раствором и высевали 0,25 мл в чашку Петри на твердую питательную среду выше описанного состава, добавляя I...2 % агара и 2 % карбоната кальция. Культуру выращивали в анаэробных условиях в течение 6...7 дней, затем считали колонии и вычисляли жизнеспособность в процентах, принимая за основу жизнеспособность, определенную сразу после иммобилизации.

Результаты и обсуждение

Известно, что пропионовокислые бактерии, иммобилизованные в полиакриламидном геле (ПААГ), успешно конвертируют глюкозу или крахмал в пропионовую и уксусную кислоту[7]. В 1976 году К. Шол включила клетки P. shermanii в ПААГ с целью получения аспарагиновой кислоты из фумарата аммония [4]. Полученные препараты в периодических условиях осуществляли конверсацию, но стабильность препаратов была невелика: на второй день активность уменьшилась на 50 процентов.

Мы исследовали аспартазную активность 4 видов пропионовокислых бактерий. Основные данные приведены в таблице I.

Из этих результатов можно сделать вывод, что, по-видимому, процесс полимеризации в известной мере нарушает клеточные стенки, увеличивая их проницаемость для субстратов и продуктов, поэтому коэффициент выхода по активности превышает единицу. После нескольких дней хранения иммобилизованных клеток в субстрате аспартазная активность еще увеличивается ввиду частичного автолиза клеток. После автолиза большей части микроорганизмов энзиматическая активность препарата будет уменьшаться наверно из-за вымывания фермента из гранул геля. Подобные данные приведены в литературе [7, 8].

Все препараты с иммобилизованными пропионовокислыми бактериями проявили хорошую стабильность. После 50 дней хранения препаратов в I-молярном субстрате при 30 °С аспартазная активность их не уменьшилась. Фиксированные в геле клетки P. shermanii в таких условиях сохраняют полностью активность во время 6 месяцев.

Таблица I

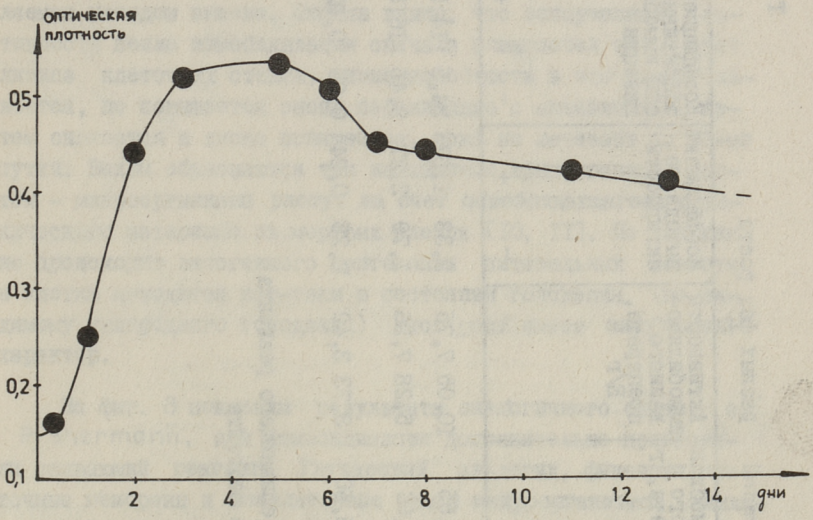
Включение клеток пропионовокислых бактерий в ПААГ

Вид бактерий	Активность свободных клеток, Е/мг	Введенная в гель активность	Вес иммобилизованного препарата, г		Активность иммобилизованных препаратов, Е/г		Коэффициент выхода по активности		Коэффициент эффективности иммобилизации	
			–	+	–	+	–	+	–	+
P. shermanii	0,023	23	5,34	5,55	I0,05	7,75	2,33	I,87	24,5	I4,5
P. petersonii	0,03I	3I	5,34	5,52	7,4I	4,86	I,28	0,86	9,48	4,I8
P. technicum	0,048	48	5,48	5,64	7,32	5,87	0,84	0,69	6,I5	4,05
P. pentosaceum	0,0I4	I4	5,4I	5,60	4,68	4,49	I,8I	I,79	9,79	8,04

+ иммобилизация проведена с добавлением сшивающего реагента

– иммобилизация проведена без сшивающего реагента

Так как препараты иммобилизованных клеток P. shermanii получены наибольшей эффективностью иммобилизации, дальнейшие опыты проводили микроорганизмами этого вида. Чтобы установить, при каком возрасте клетки лучше всего подходят для иммобилизации, определяли кривую роста P. shermanii (фиг. I) и изучали аспартазную активность в зависимости от фазы роста.



Фиг. 1. Кривая роста культуры P. shermanii определена по оптической плотности на ФЭК.

Интенсивный рост микроорганизмов начинается I час после посева и продолжается 3 дня, затем культура перейдет в стационарную фазу. Фаза отмирания начинается с седьмого дня. Из таблицы 2 выясняется, что высшая эффективность иммобилизации достигается с клетками логарифмической фазы. Нестабильные препараты стационарной фазы и фазы отмирания стабилизируются в некоторой мере, если добавляется при иммобилизации сшивающий реагент.

При иммобилизации живых микроорганизмов большое значение имеют вопросы жизнеспособности и интактности клеток после фиксирования в геле, особенно при многостадийных процессах, нуждающихся в кофакторах, так как после гибели клеток и лизирования их стенок нужные кофакторы могут легко вымы-

Таблица 2

Включение в ПААГ P. shermanii разных фаз роста

Фаза роста	Возраст культуры, дни	Активность свободных клеток, Е/мг	Введенная в гель активность, Е	Вес иммобилизованного препарата, г		Активность иммобилизованного препарата, Е/г		Коэффициент выхода по активности		Коэффициент эффективности иммобилизации		Степень сохранения активности после 10 дней инкубации в субстрате при 30 °С, %	
				–	+	–	+	–	+	–	+	–	+
Лог-фаза	3	0,023	23	5,34	5,55	10,05	7,75	2,33	1,87	24,5	14,5	100	100
Стац. фаза	6	0,016	16	5,43	5,06	5,28	7,26	1,79	2,27	9,45	16,5	61	74
Фаза отмирания	14	0,080	80	5,36	5,50	3,73	3,42	0,25	0,24	0,93	0,82	13	26

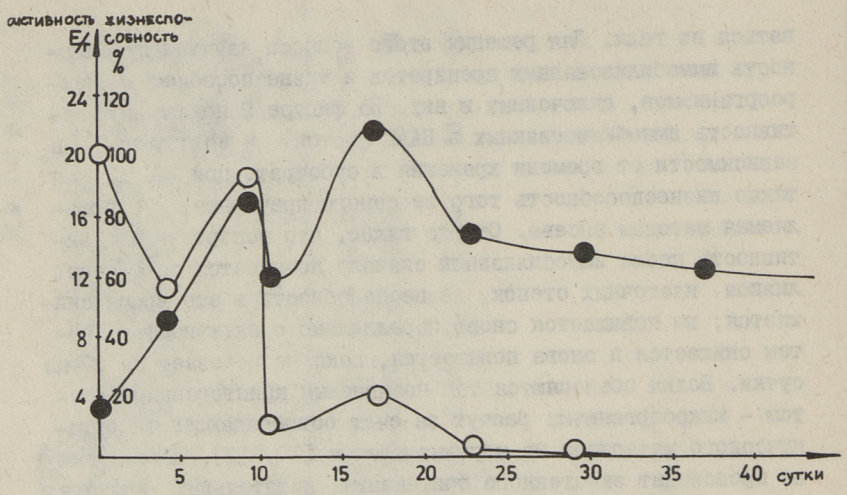
+ иммобилизация проведена с добавлением сшивающего реагента

– иммобилизация проведена без сшивающего реагента

ваться из геля. Для решения этого вопроса изучали стабильность иммобилизованных препаратов и жизнеспособность микроорганизмов, включенных в них. На фигуре 2 показана активность иммобилизованных в ПААГ клеток P. shermanii в зависимости от времени хранения в субстрате при 30 °С, а также жизнеспособность того же самого препарата, определяемая методом высева. Отсюда видно, что аспартазная активность после иммобилизации сначала повышается за счет лизиса клеточных стенок, жизнеспособность в это время снижается, но повышается снова параллельно с активностью, затем снижается и снова повышается, пока не исчезает на 30-ые сутки. Волны объясняются так называемым криптогенным ростом - микроорганизмы растут за счет освобождающегося органического материала из мертвых клеток [10, 11]. Но так как не происходит экзогенного притекания питательных веществ и клетки находятся все-таки в состоянии голодания (по-видимому углеродного голодания) этот рост имеет затухающий характер.

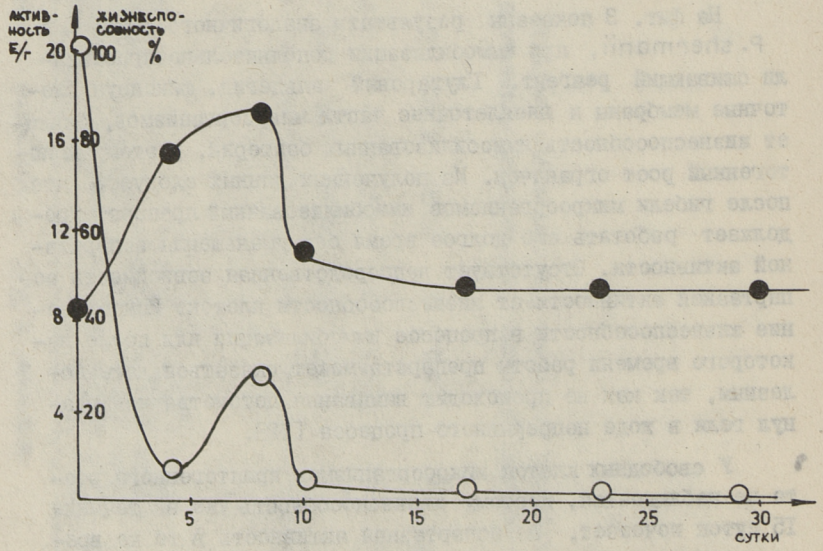
На фиг. 3 показаны результаты аналогичного опыта с P. shermanii, при иммобилизации дополнительно прибавляли сшивающий реагент. Глутаровый альдегид, фиксируя клеточные мембраны и внеклеточные части микроорганизмов, снижает жизнеспособность иммобилизованных бактерий, поэтому криптогенный рост ограничен. Из полученных данных следует, что после гибели микроорганизмов иммобилизованный препарат продолжает работать еще долгое время без уменьшения аспартазной активности. Отсутствует непосредственная зависимость аспартазной активности от жизнеспособности клеток. Исчезновение жизнеспособности в процессе иммобилизации или после некоторого времени работы препарата может оказаться даже полезным, так как не происходит вымывания потомства из гранул геля в ходе непрерывного процесса [12].

У свободных клеток микроорганизмов криптогенного роста не наблюдается, поэтому жизнеспособность уже в течение 15 суток исчезает, но аспартазная активность в то же время повышается за счет лизиса клеток (фиг. 4). Так как метод высева довольно неточен, то мы провели опыты по установлению факта криптогенного роста, за которым наблюдали по поглощению глюкозы свободными и включенными в ПААГ



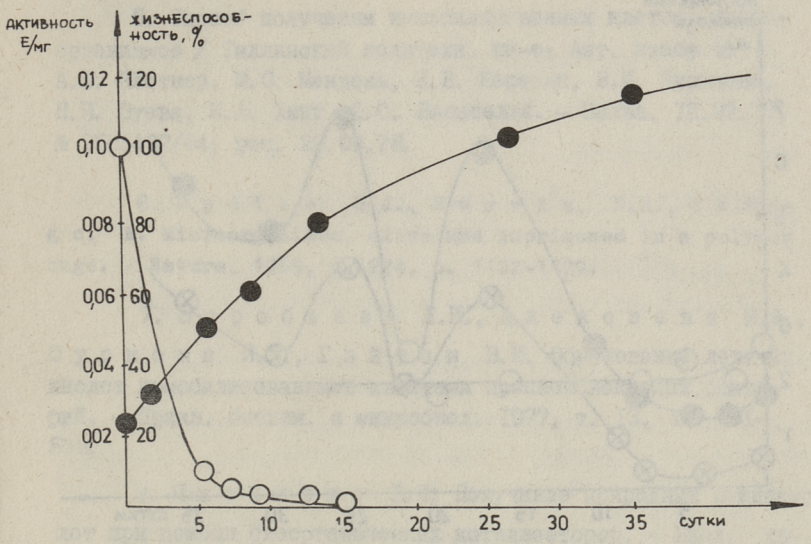
Фиг. 2. Активность и жизнеспособность иммобилизованных в ПААГ клеток P. shermanii в зависимости от времени хранения в субстрате при 30 °С:

● – активность; ○ – жизнеспособность.



Фиг. 3. Активность и жизнеспособность иммобилизованных в ПААГ клеток P. shermanii с добавлением глутарового альдегида в зависимости от времени хранения в субстрате при 30 °С:

● – активность; ○ – жизнеспособность.

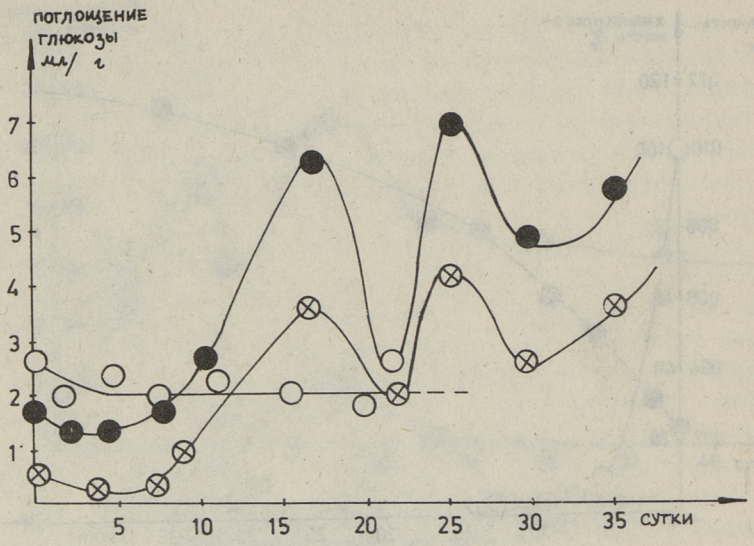


Фиг. 4. Аспартазная активность и жизнеспособность свободных клеток P. shermanii в зависимости от времени хранения в субстрате при 30 °С:

● – активность; ○ – жизнеспособность.

клетками. Полученные данные (см. фиг. 5) подтверждают те результаты, которые мы получили при использовании метода высева.

На основе полученных данных можно сделать вывод, что в аспартазной реакции отсутствует необходимость сохранять жизнеспособность клеток в процессе иммобилизации, так как энзиматические свойства клеток (аспартазная активность, а также гликолитическая активность) во включенном в ПААГ состоянии сохраняются еще долго после исчезновения способности микроорганизмов расти и размножаться.



Фиг. 5. Поглощение глюкозы свободными и иммобилизованными в ПААГ клетками P. shermanii в зависимости от времени хранения в субстрате при 30 °С:

○ - свободные клетки; ⊗ - иммобилизованные с глутаровым альдегидом; ● - иммобилизованные без глутарового альдегида.

Литература

I. Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. Production of L-aspartic acid by microbial cells entrapped in polyacrylamide gels. - Meth. Enzymol., 1976, v. XLIV, p. 739-746.

2. Tosa, T., Sato, T., Ishida, I., Chibata, I. Reason for higher stability of aspartase activity of immobilized E. coli cells. - Biochim. Biophys. Acta., 1977, v. 483, p. 193-202.

3. Chibata, I., Tosa, T., Sato, T. Immobilized aspartase-containing microbial cells preparation and enzymatic properties. - Appl. Microbial., 1974, v. 27, p. 878-885.

4. Scholl, K. Zur Immobilisierung von Propionibacterium shermanii. - Diss. Dokt. Naturwiss. Univ. Stuttgart, 1976. 85 S.

5. Способ получения иммобилизованных клеток микроорганизмов / Таллинский политехн. ин-т; Авт. изобрет. А.И. Кёстнер, М.О. Мандель, И.В. Березин, В.И. Яковлева, Н.Н. Зуева, И.А. Хинт, Л.С. Ванаселья. - Заявл. 12.07.77, № 2505482/04; реш. 29.09.78.

6. Updike, S.J., Harris, D.R., Shrago, E. Microorganisms, alive and imprisoned in a polymer cage. - Nature, 1969, v. 224, p. 1122-1129.

7. Воробьева Л.И., Алексеева М.А., Суркова И.Т., Гайтан В.И. Образование летучих кислот иммобилизованными клетками пропионовокислых бактерий. - Прикл. биохим. и микробиол. 1977, т. 13, с. 531-538.

8. Яковлева В.И. Получение природных аминокислот при помощи биоорганических катализаторов. - Биол. химия, 1978, т. 12, с. 140-153.

9. Linko, Y.-Y., Pohjala, L., Linko, P. Immobilization of whole cell glucose isomerase within cellulose fibers. - 5th Int. Ferm. Symp., Berlin, 1976, p. 274.

10. Гулевская С.А., Луста К.А., Суходольская Г.В., Краснова Л.А. Морфология и некоторые особенности размножения иммобилизованных микроорганизмов. - II Всесоюзный симп. Пол. и прим. имм-ных ферментов, Абовян, 1977, с. 100.

11. Кощеенко К.А., Скрябин Г.К. Физиолого-биохимические особенности иммобилизованных клеток, трансформирующих стероиды. - там же, с. 92.

12. Jack, T.R., Zajic, J.S. The enzymatic conversion of L-histidine to uroeanic acid by whole cells of Micrococcus luteus immobilized on carbodiimide activated carboxymethylcellulose. - Biotechnol. Bioeng., 1977, v. 19, p. 631-648.

A. Kalda, L. Vorobyova

Immobilization of Microbial Cells with Aspartase Activity

I. The Effect of Immobilization on Aspartase Activity and Viability of Propionobacteria Cells

Summary

Aspartase activity of various propionobacteria, entrapped into 20 percent polyacrylamide gel, was investigated. The stability of preparations of immobilized microbial cells was determined by employing the incubation of the gel-cell granules in a solution of 1 M ammonium fumarate (pH 8,5, containing 1 mM $MnCl_2$) at 30 °C. The curve of growth was determined for Propionibacterium shermanii, the dependence of aspartase activity on the phase of growth was explored. The viability of gel-entrapped P. shermanii was investigated by two methods, the fact of secondary growth of microorganisms was determined. Adding the crosslinking reagent to the polymerization mixture, the viability of entrapped cells was decreased, therefore the secondary growth was limited. It was shown that high catalytic activity of immobilized Propionibacterium shermanii cells can be obtained without keeping their viability at high levels.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.154.08:547.632

М.О. Мандель, В.А. Кросинг

ИММОБИЛИЗАЦИЯ β-ФРУКТОЗИДАЗЫ И ПОЛУЧЕНИЕ ИНВЕРТНОГО СИРОПА

Гидролиз сахарозы при помощи иммобилизованной сахаразы β-фруктозидазы инвертазы, β-фруктофуранозидазы (КФ 3.2.1.26), является перспективным способом получения инвертного сиропа, который находит применение в качестве источника на производстве фруктозы [1].

Для создания промышленных процессов гидролиза сахарозы необходимо разработать эффективные методы иммобилизации β-фруктозидазы (ФР). Способы иммобилизации ФР в полиакриламидном геле [2] и в армированных макропористых носителях [3] описаны нами ранее. Однако общим недостатком этих методов является низкая удельная активность получаемых препаратов и неудовлетворительные механические свойства, препятствующие практическому применению получаемых катализаторов.

Целью настоящей работы являлась разработка метода ковалентного связывания ФР с применением отечественных кремнеземистых материалов и проверка пригодности получаемых препаратов для гидролиза концентрированных растворов сахарозы.

Материалы и методы

Работу проводили с дрожжевой ФР "Инвертин" (марка "А") из Олайнского завода химреактивов с активностью 105 Е/мг (удельная активность 210 Е/мг белка). Иммобилизацию ФР осуществляли ковалентным связыванием фермента с предварительно обработанным γ-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТЭС) и с п-бензохиноном (БХ) (Шосткинский завод химреактивов) кремнеземным материалом типа силохрома (изготовлено на Горьков-

ском опытном заводе ВНИИНП). Количество реакционноспособных аминогрупп на носителе после силанизации его АПТЭС определяли разработанным специально для этой цели методом [4] с применением тринитробензолсульфокислоты, а качество реакции аминогрупп силохрома с БХ оценивали определением концентрации реагента иодометрически [5]. Для увеличения стабильности иммобилизованной ФР (ИФР) препарат дополнительно обрабатывали водным раствором глутарового альдегида (ГА, фирма "Мерк", ФРГ).

Активность нативной и иммобилизованной ФР определяли 67 %-ном растворе сахарозы по количеству редуцирующих сахаров, образующихся в течение минуты при pH 4,8 и 40 °С [6]. Активность выражали в единицах (Е) на мл или грамм сухого материала. Скорость инактивации фермента определяли по снижению стандартной активности препарата, после чего его инкубировали в буфере (pH 4,8) при 60 °С.

Гидролиз концентрированных растворов сахарозы осуществляли на термостатируемой при 50 °С колонке.

Результаты и обсуждение

Силанизация силохромов с применением АПТЭС была подробно изучена в работе [7]. С целью выяснения оптимальных условий обработки препаратов с БХ нами была проведена серия опытов. Показано, что реакция БХ с алифатическими аминогруппами на силохроме (с содержанием аминогрупп 180 мкмоль/г) достигает своего максимума уже после 1-2-часовой обработки при комнатной температуре (20-25 °С). Как свидетельствуют данные таблицы 1, увеличение исходной концентрации БХ приводит к увеличению количества связанного с матрицей БХ и соответственно повышает активность ИФР. В ходе реакции при высоких концентрациях БХ расходуется около 5-30 % его количества. Лимитирующим фактором является реакционная способность силанизированной матрицы.

Увеличение применяемой при иммобилизации концентрации фермента приводит к монотонному росту количества связанного с матрицей фермента (таблица 2), и при больших концентрациях последнего активность достигает определенного предела. При этом возрастает активность получаемой ИФР,

Таблица I

Иммобилизация β-фруктозидазы на силанизированном силохроме

Условия опытов: СХ-2 (0,25-0,5 мм, с содержанием аминогрупп 180 мкмоль/г), обработанный этанольным раствором п-бензохинона различной концентрации в течение I часа при 20-25 °С в этаноле с последующим контактированием с ферментом (300 мг/г) в течение I часа при 20-25 °С в 0,05-молярном ацетатном буфере при pH 4,8.

Количество БХ		Остаточное содержание БХ		Связанный с СХ БХ		Акт. ИФР	
мг/г	мг/мл	мг/мл	%	мг/г	%	Е/г	%
20	I,0	0,I08	I0,8	I7,8	89,2	3220	I0,2
40	2,0	0,756	37,8	24,8	62,2	3350	I0,6
I00	5,0	2,90	58	42,0	42,0	3830	I2,2
I50	7,5	5,40	72,0	42,0	28,0	4070	I2,9
200	I0,0	7,70	77,0	46,0	23,0	5II0	I6,I
250	I2,5	I0,I5	8I,5	48,0	I8,5	6I90	20,5
300	I5,0	I2,4	93,3	52,0	6,7	77I0	24,5
5,4	0,I08					2I40	I6,2
37,8	0,756					23I0	I7,6
I45	2,90					3070	23,4
270	5,40					3420	26,0

однако падает выход иммобилизации, сопровождаемой увеличением доли удаленной с промывными водами активности.

Как свидетельствуют данные таблицы 2, марка силохрома и, таким образом, удельная поверхность и пористость матрицы мало влияют на активность ИФР.

Известно, что БХ легко образует сильно окрашенные продукты. Это позволяет обнаружить продукты его взаимодействия с аминосоединениями при чрезвычайно низких концентрациях (10^{-5} моль) и таким образом, судить о качестве реакции иммобилизации. Для проверки характера связи гранулы ИФР промывали в I-молярном растворе KCl (в ацетатном буфере при pH 4,8) в течение 24 часов. Было обнаружено, что такая промывка в некоторых опытах вызывала даже увеличение

активности ИФР, а снижение активности колебалось в пределах 0,5–I,0 % от общей активности. При промывке не наблюдалось вымывания следов окрашенных продуктов взаимодействия БХ с аминами. На основе опытов можно предполагать, что ФР связывается ковалентно с матрицей.

Таблица 2

Иммобилизация β-фруктозидазы на силанизированном силохроме, обработанном п-бензохиноном (200 мг/г). Остальные условия см. табл. I

Марка силохрома	Удельная поверхность, $м^2/г$	Диаметр пор, нм	Количество ФР, мг/г	Акт., Е/г	ИФР, %	Вымываемая акт., %
СХ I	25–35	220–250	I00	3020	28,7	—
СХ I,5	35–45	220–I30	I00	2790	26,5	—
СХ 2	45–60	I30–I00	I00	2530	24,I	—
СХ 3	70–90	70–I00	I00	2300	2I,9	I7,6
МСА-2500	60–90	40–70	I00	470	4,5	—
СХ 2	45–60	I30–I00	25	550	2I,I	I2,9
СХ 2	45–60	I30–I00	50	II60	22,I	I6,8
СХ 2	45–60	I30–I00	200	3030	I4,4	I9,5
СХ 2	45–60	I30–I00	300	3690	II,7	3I,8
СХ 2	45–60	I30–I00	400	3770	9,0	52,8

Анализ экспериментальных данных иммобилизации ФР (таблицы I, 2) позволяет заключить, что степень реакции силанизированного силохрома с БХ и глубина связывания фермента с активированным носителем, выражавшемся в выходе иммобилизации (не выше 20–25 %), не экономичны: остаточные растворы содержат 70–90 % БХ и 60–80 % исходной активности. Для выяснения эффективности повторного применения БХ провели серию опытов (таблица I, опыты № 8–I2). После реакции активированного использованным раствором БХ носителя с ферментом (I25 мг/г) удалось получить препараты ИФР с удовлетворительной активностью. Результаты повторного применения ферментного раствора иллюстрируются нижеследующим примером.

К 50 г сухого силанизированного силохрома СХ-2 (содержание аминогрупп 180 мкмоль/г) добавляют 10 г БХ в 250 мл технического этанола. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 1 часа, промывают сперва этанолом, а затем 0,05-молярным ацетатным буфером при pH 4,8. Получают 148 г влажного материала. К 100 г активированного носителя добавляют 14,0 г ферментного препарата "Инвертин" с активностью 105 Е/мг (всего 1470000 Е) в 500 мл 0,05-молярном ацетатном буфере при pH 4,8. После 1,5-часового инкубирования смеси при комнатной температуре надосадочная жидкость обладала активностью 1860 Е/мл (всего 930000 Е, 63,3 %), а ИФР (после промывки 1-молярным раствором KCl) - 4269 Е/г (всего 426900 Е, 29,0 %). Ферментный раствор использовали для привязывания ко второй порции активированного носителя. Для этого 48 г носителя суспендировали в ферментном растворе и хранили в течение 18 часов в холодильнике. Активность промытого препарата 4217 Е/г (всего 202420 Е, 13,8 %), а ферментный раствор 97 Е/мл (всего 48500 Е, 3,3 %). Общий выход иммобилизации 42,8 %.

Основным критерием эффективного применения ИФР в процессах гидролиза сахарозы является стабильность катализатора. Для выяснения стабильности ИФР определяли ее остаточную активность после инкубирования при 60 ^{o}C в ацетатном буфере. В наших ранних работах показано, что нативная ФР инактивируется не менее в двух формах константами инактивации $k_1 = 0,1$ мин$^{-1}$ и $k_2 = 0,0024$ мин$^{-1}$ для быстро и медленно инактивирующих форм соответственно [8]. Определение стабильности ФР, ковалентно связанной на силохроме с помощью БХ не наблюдается стадии быстрой инактивации, а k_2 равняется 0,0034 мин$^{-1}$, время полужизни ИФР 86 минут.

После нуклеофильного присоединения БХ с носителем и ферментным белком на внутренней поверхности носителя образуется слой ферментного белка, который, по нашему мнению, вследствие диссоциации может легко удаляться и тем самым уменьшать стабильность ИФР. Мы предполагаем, что дополнительная сшивка молекул белков в этом слое может стабилизировать препарат. Для проверки данного предположения ИФР обрабатывалась с глутаральдегидом (ГА), известным бифункциональным реагентом.

Обработку ИФР проводили водным раствором ГА (0,5 мкмоль/г носителя) в течение часа при комнатной температуре. В течение обработки не наблюдалось изменения активности ИФР. Сравнение стабильности препаратов, обработанных с ГА, показывает, что стабильность препаратов увеличивается до 3 раз ($k_2 = 0{,}0014$ мин$^{-1}$, а время полужизни 160 мин).

Работоспособность ИФР, полученной стабилизацией ГА, контролировали при гидролизе 70 %-ного раствора сахарозы в термостатируемой колонке. Соответствующие экспериментальные данные приведены в таблице 3.

Таблица 3

Работоспособность иммобилизованной β-фруктозидазы в термостатируемой колонке при 50 °С с 50,5 г влажным катализатором, через который пропускают раствор сахарозы с концентрацией 700 г/л

Скорость протока субстрата, мл/мин	Степень конверсии, %	Производительность ИФР, кг/кг · ч	Производительность колонки, г/ч
3,6	100	3,1	156
7,2	100	6,1	309
10,3	100	8,9	448
14,0	98,6	11,5	579
19,5	90,0	14,2	737
25,9	87,1	18,8	948
36,0	75,7	22,8	1145

По найденным в таблице 3 данным можно заключить, что максимальная производительность 1 кг влажного препарата ИФР при 100 % конверсии сахарозы находится в пределах 10–11 кг инвертного сиропа (по сухим веществам) в течение часа. Надо отметить, что в ходе гидролиза сахарозы из ИФР не вымываются красящих веществ продуктов взаимодействия БХ.

Об увеличении стабильности ИФР в концентрированных растворах сахарозы сообщалось нами ранее [8]. Это создает хорошие условия для длительной эффективной эксплуатации ИФР в вышеуказанных условиях (таблица 3) со скоростью протока субстрата через слой катализатора 10,3 мл/мин в течение 20 дней, не снижая активности последнего.

Колонку время от времени эксплуатировали в течение 2 лет без потери активности. В течение этого времени произвели всего 1030 кг инвертного сиропа.

Литература

1. Moroz, D.M., Sullivan, J.P., Troy, J.P., Broeg, Ch.B. Levulose and invert sugars. - Sugar y azucar, 1973, N 8, p. 46-52.

2. Мандель М.О., Кросинг В.А., Кивисилла К.А., Калуняниц К.А., Кёстнер А.Н. Получение иммобилизованных в полиакриламидном геле ферментов для промышленных опытов. - Микробиол. пром., 1975, т. 129, № 9, с. 19.

3. Кросинг В.А., Трейман Р.Э., Кёстнер А.И. Иммобилизация инвертазы в армированном полиакриламидном геле. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1976, № 402, с. 15-20.

4. Озолиньш А.Я. Спектрофотометрические методы определения доступных амино- и альдегидных групп на модифицированных силохромах. - См. наст. сб. с., 33.

5. Бауер К. Анализ органических соединений. Изд. иностранной лит. М., 1953, с. 129.

6. Tegge, G., Nierle, W. Eine neue Methode zur Bestimmung reduzierender Zucker in Stärkehydrolysaten. - Stärke, 1965, 17, N 4, S. 107-110.

7. Киппер Х.Я., Кёстнер А.И., Мгедиашвили Б.В. Силанизация пористого стекла γ-аминопропилтриэтоксисиланом. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1975, № 383, с. 43-49.

8. Кросинг В.А., Ярвет Ю.Й., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И. Термическая инактивация свободной и иммобилизованной в полиакриламидный гель инвертазы. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1975, № 383, с. 17-22.

M. Mandel, V. Krosing

Immobilization of β-Fructosidase to Obtain Inverted Syrup

Summary

A method for obtaining covalent bound yeast β-fructosidase has been observed in this paper. Activated silochrome, previously treated with silane and n-bensokinone was used as a matrix. Two-step use of enzyme solution permits to obtain preparate with the activity of 7000 E/g and total yield of 45 %. Treatment of preparations with glutaraldehyde has been found not to reduce the activity of the preparations, but increasing thermostability to 3 times. Maximum productivity of 1 kg preparation at 50 °C and 100 % conversion of 70 % solution of saccharose is about 10... 11 kg per hour.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.154.25:637.344

К.Э. Пашель, Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус

ПОЛУЧЕНИЕ СУХОЙ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛАКТОЗЫ

Одной из важнейших задач, стоящих перед молочной промышленностью, является обеспечение наиболее полного использования сырьевых ресурсов молока. Из основных компонентов молока при его переработке используется: молочного жира – 98 %, белков – около 59 %, молочного сахара – около 40 % [1]. Остальная часть молочного жира, белков и молочного сахара остается в обезжиренном молоке, молочной сыворотке и пахте, так называемом вторичном или побочном сырье. Из этих видов вторичного сырья менее всего используется молочная сыворотка, получаемая при производстве сыра, творога и казеина в объеме 75 % от переработанного сырья. Между тем в сыворотке содержится около 6,5 % сухих веществ, в том числе: белка – 1,0 %, лактозы – 4,5 %, минеральных солей – 0,7 %, жира – 0,4 %, пищевая энергия 1 кг свежей сыворотки составляет 237 ккал.

Ежегодный объем молочной сыворотки в мире превышает 74 млн.т. Технико-экономическая оценка основных направлений ее переработки и использования показывает, что особенно эффективна с народнохозяйственной точки зрения промышленная переработка молочной сыворотки в долго сохраняемые концентраты – сухие и сгущенные продукты, молочный сахар, заменитель цельного молока. Это обеспечивает их равномерное использование в различных отраслях пищевой промышленности независимо от сезонности производства. Предварительный гидролиз лактозы в молочной сыворотке дает возможность значительного расширения области ее применения [2–4]. Ввиду относительно высокой цены нативного фермента гидролиз лактозы рационально проводить с помощью иммобилизованной β-га-

лактозидазы. Иммобилизация фермента и изучение свойств полученных препаратов и кинетики реакции описаны в ряде работ [5–8]. В данной статье излагаются результаты опытов получения сухой молочной сыворотки с пониженным содержанием лактозы при предварительной обработке продукта иммобилизованной β-галактозидазой.

Материалы и методы

В работе использовалась творожная сыворотка, полученная с Таллинского комбината молочных продуктов со средним содержанием лактозы 3,9 %, белка 0,84 %, жира 0,4 % и pH 4,7. Гидролиз лактозы проводился в реакторе с активным ротором [13] общим объемом 50 л при температуре 50 °С и при исходном значении pH творожной сыворотки. Частота вращения активного ротора в опытах была 300 об/мин. В реактор загружали 3,86 кг влажного препарата (после фильтрования на фильтре Нутча) иммобилизованной β-галактозидазы[x] со средней активностью по гидролизу лактозы при 50 °С 42,9 Е/г. Сыворотка нагревалась до 55 °С, затем для удаления казеиновой мути она фильтровалась через лавсановую ткань и заливалась в реактор.

Гидролиз лактозы проводился циклически. Средняя длительность циклов 100 минут, общее количество обработанной сыворотки 1 т. Ход гидролиза исследовался по образованию глюкозы в гидролизуемой смеси, концентрацию которой определяли глюкозооксидазным методом [9]. Кроме того, периодически, между циклами определялась активность препарата в стандартных условиях.

Сгущение обработанной молочной сыворотки проводилось на вакуумиспарителе при 55–60 °С до достижения сухих веществ от 15 до 40 %. Сгущенная сыворотка сушилась на распылительной сушилке типа Ниро-Атомайзер с объемом камеры 0,425 м^3 при высоте 0,93 м. Распыление раствора в сушилке производилось диском пневматической турбины при скорости вращения 40 000 об/мин. Подача жидкости в сушильную камеру

---

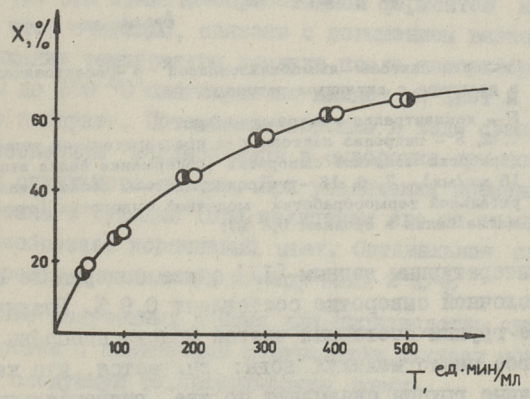
[x] Препарат нативной β-галактозидазы получен из Ин-та биохимии им. А.Н. Баха АН СССР от Тихомировой А.С.

осуществлялась дозирующим насосом. Скорость подачи питательной жидкости регулировалась от 2 до 6 литров в час. Температура воздуха после калорифера сушилки была от 240 до 310 °С.

Для характеристики сухой молочной сыворотки определялись содержание сухих веществ, кислотность и растворимость (по стандартным методикам), а также содержание глюкозы [9] и белка [10]. Содержание лактозы в исходной сыворотке определялось по методу Шомодьи-Нельсона [11].

Результаты и обсуждение

С помощью иммобилизованной β-галактозидазы (ИГ) обработано 1050 кг молочной сыворотки. Достигнутая степень конверсии во всех опытах превышала 50 %. Опыты показали, что эффективная активность ИГ в полупромышленном реакторе не уступает ее активности в лабораторных реакторах. Кривые, характеризующие зависимость достигнутой степени конверсии лактозы от т.н. нормализованного времени действия, совпадают (фиг. I).

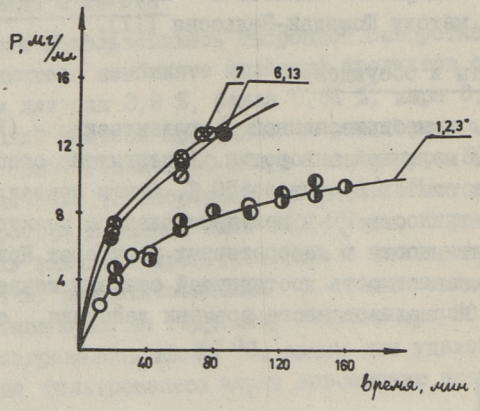


Фиг. 1. Зависимость степени гидролиза лактозы (x) от нормализованного времени действия (T) при обработке молочной сыворотки иммобилизованной β-галактозидазой:

●—● – гидролиз лактозы в полупромышленном реакторе;
○—○ – гидролиз лактозы в лабораторном реакторе.

Инактивация ИГ по значению константы скорости реакции при длительном гидролизе лактозы в полупромышленном реакторе

равняется $4,2 \times 10^{-3}$ $ч^{-1}$, что также ниже величины, полученной при гидролизе лактозы в лабораторных реакторах. Опыты подтвердили важность предварительной очистки молочной сыворотки от казеиновой муки перед гидролизом. В противном случае частицы белка закупоривают фильтрующую поверхность активного ротора и частично покрывают поверхность катализатора, вследствие чего скорость реакции резко падает (фиг. 2).



Фиг. 2. Гидролиз лактозы иммобилизованной β-галактозидазой в реакторе с активным ротором:

P – концентрация глюкозы, мг/мл;
1, 2, 3 – гидролиз лактозы без предварительной термообработки молочной сыворотки (содержание белка выше 15 мг/мл). 7, 6, 13 – гидролиз лактозы после предварительной термообработки молочной сыворотки (содержание белка в среднем 0,8 %).

По литературным данным [II] общее содержание связанной влаги в молочной сыворотке составляет 0,9 %. Различные функциональные группы составных частей молока способны связывать неодинаковое число молекул воды: считается, что карбонильные и амидные группы связывают по две, гидроксильные и аминные – по три, а карбоксильные – по четыре молекулы воды. В связи с наличием различных функциональных ионогенных и неионогенных групп количество влаги (%), связываемое составными частями молока, составляет: казеином – 49,I–55,I, лактоальбумином 29,I–29,6, фосфолипидами II,6–I8,4, углеводами и минеральными солями 5,86–6,7. Нужно отметить, что вследствие гидролиза лактозы на глюкозу и галактозу гидроскопичность

смеси повышается, что отрицательно влияет на процесс сушки. Учитывая вышеописанное, при исследовании получения сухих препаратов обработанной β-галактозидазой молочной сыворотки изучали влияние степени сгущения молочной сыворотки, скорости подачи питательной жидкости, а также режима сушки на эффективность процесса. Сводные данные опытов представлены в табл. 2.

Сравнительная сушка исходной молочной сыворотки и сыворотки, обработанной ИГ (табл. I), показала, что продукт, полученный из гидролизованной сыворотки, по сравнению с негидролизованной, более липкий, цвет его более темный. Дополнительных трудностей при сушке предварительно сгущенной сыворотки не наблюдалось. В связи с тем, что сушка сгущенных растворов более экономична (затраты на энергию меньше), в последующих опытах на сушку направлялись предварительно сгущенная в вакууме сыворотка. При этом выяснилось, что оптимальным следует считать сгущение сыворотки перед сушкой до содержания сухих веществ I5–20 %, т.е. почти в 2 раза ниже, чем при сушке необработанной ферментом молочной сыворотки, что, очевидно, связано с повышением вязкости раствора. Снижение температуры воздуха после калорифера сушилки с 3I0 до 200 ^{o}C благоприятно влияет на цвет и вкус полученного продукта. Потемнение порошка в ходе сушки связано с образованием меланоидинов в сыворотке при повышении температуры сушильного агента. При увеличении времени пребывания порошка в сушилке (при налипании его на стенке камеры) он приобретает коричневый цвет. Оптимальная скорость подачи сыворотки в сушильную камеру была 2 л/ч.

На основе полученных данных для производства сухой молочной сыворотки с пониженным содержанием лактозы можно рекомендовать следующую технологическую схему:

Таблица I

Сравнение сушки исходной и обработанной β-галактозидазой молочной сыворотки

№	Исходный раствор	Режим сушки, °С температура до сушилки/после сушилки	Сухая молочная сыворотка		
			сухие вещества, %	глюкоза, %	внешний вид
I	2	3	4	65	6
I.	Молочная сыворотка	295/90	90,5	следы	сероватый
2.	Молочная сыворотка, обработанная β-галактозидазой	290/90	90,7	I8,3	бледно-коричневый
3.	Молочная сыворотка, сгущенная в вакууме до содержания сухих веществ I0-I5 %	3I0/85-90	90,7	следы	сероватый
4.	Молочная сыворотка, обработанная β-галактозидазой и сгущенная в вакууме до содержания сухих веществ I0-I5 %	3I0/85-90	90,2	I3,7	бледно-коричневый

Таблица 2

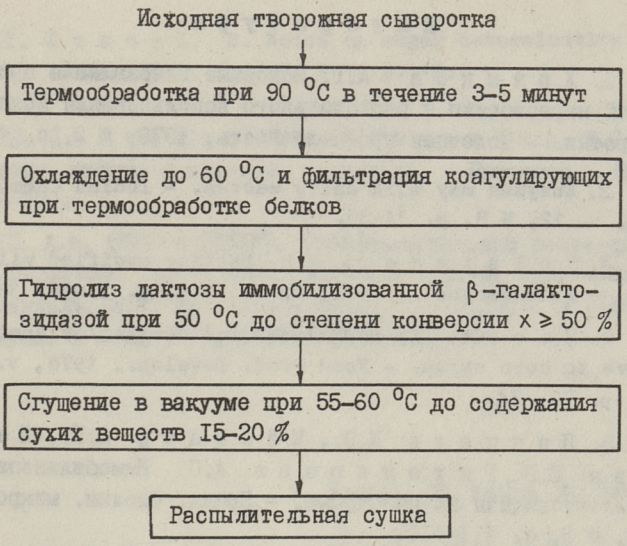
Получение сухой молочной сыворотки с пониженным содержанием лактозы

№	Режим сушки		Сухая молочная сыворотка					
	Темп.воздуха, до сушилки/ после сушилки	Скорость питания, л/ч	сухие вещества, %	глюкоза, %	белок, %	кислотность, °Т	растворимость, мл	внешний вид
I	2	3	4	5	6	7	8	9
I.	3I0/96	4	82,7	I7,3	20,4	67	0,4	коричневый
2.	280/90	4	84,3	I6,7		74	I,0	коричневый
3.	3I0/93	4	87,6	I5,6		92	I,0	коричневый
4.	3I0/95	4	85,5	I5,2	I8,5		0,55	коричневый
5.	250-260/80-90	2	84,0	I8,4	I4,7	73	I,0	бледно-коричневый
6.	220/98	2	90,4	I6,6		78	0,4	бледно-кремовый
7.	200/97	2	84,3	22,3	I9,6	75	0,36	бледно-кремовый
8.	200/97	2	8I,4	20,6		80	0,55	желтовато-белый
9.	2I0/97	2	85,5	I8,8	I2,2	85	0,4	серовато-белый

Таблица 3

Характеристика сухой молочной сыворотки с пониженным содержанием лактозы

№	Количество, г	Сухие вещества, %	Глюкоза, %	Белок, %	Кислотность, °Т	Растворимость, мл сырого осадка	Внешний вид
I	435	83,3	I8,4	I7,9	70	0,4	бледно-кремовый
2	385	8I,8	I9,9	I9,0	79	0,42	серовато-белый
3	750	8I,7	23,0	I8,2	75	0,39	серовато-белый



Сухая сыворотка, полученная в опытах (табл. 3), представляет собой мелкодисперсный гигроскопичный порошок, содержащий незначительное количество плотных комочков. Цвет порошка от кремового до желто-сероватого. Вкус сухой сыворотки сладко-солоноватый, слегка кисло-сывороточный. Содержание сухих веществ более 81 %, растворимость сырого осадка в мл не более 0,5, содержание глюкозы в сухих веществах в среднем 20 %, содержание белка 18 %

Сухая сыворотка применима для приготовления сывороточных напитков и для добавления в хлебо-булочные и кондитерские изделия.

Выводы

В результате проведенных укрупненных лабораторных исследований показана пригодность иммобилизованной β-галактозидазы для гидролиза лактозы в молочной сыворотке. Определены условия упаривания и сушки сыворотки с пониженным содержанием лактозы. Определены свойства сухой сыворотки и показана возможность ее использования в хлебо-булочном и кондитерском производствах. Предложена технологическая схема производства сухой сыворотки с пониженным содержанием лактозы.

Литература

I. Храмцов А.Г. Основные направления промышленной переработки и рационального использования молочной сыворотки. – Молочная промышленность, 1978, № 2, с. 4–8.

2. Enzymes may milk dairy wastes. – Indian Chem. J., 1978, v. 12, N 8, p. 34-35.

3. Holsinger, V.H. Lactase modified milk and whey. – Food Technol., 1978, t. 32, N 3, p. 35-36, 38,40.

4. Moore, K. Hydrolyzed lactose: a low cost alternative to corn syrup. – Food Prod. Develop., 1978, v. 12, N 4, p. 72, 74.

5. Паппель К.Э., Кёстнер А.И., Летунова Е.В., Тихомирова А.С. Иммобилизация β-галактозидазы на силохроме. – Прикл. биохим. микробиол., 1976, № 3, с. 411–414.

6. Паппель К.Э., Киппер Х.Я., Кёстнер А.И., Куликова А.К., Тихомирова А.С. Стабильность иммобилизованных препаратов лактазы. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1976, № 402, с. 3–8.

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

8. Сиймер Э.Х., Паппель К.Э., Кёстнер А.И. Новый метод описания кинетики ферментативных реакций. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 13–16.

9. Щербухин В.Д., Миронова Л.И., Кондырева А.В., Грюнер В.С. Определение глюкозы в патоке глюкозооксидазным методом с использованием ферроцианида калия. – Прикл. биохим. и микробиол., 1970, Т. 6, № 4, с. 467.

10. Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. – Analyt. Biochem., 1972, v. 48, p. 422.

II. S o m o g i, M. Notes on sugar determination. - J. Biol. Chem., 1952, v. 195, N 1, p. 19.

I2. Д ь я ч е н к о П.Ф., К о в а л е н к о М.С. Технология молока и молочных продуктов. - Пищепром., 1974, с. 170-179.

I3. А.с. 568674 (СССР). Биокаталитический реактор/Таллинск. политехн. ин-т; авт. изобрет. Л.П.-Ф. Роосимельдер, М.О. Мандель, А.И. Кёстнер. - Заявл. I2.II.1975, № 2188886/26; Опубл. в Б.И. 1977, № 30. МКИ с I2BI/I0.

K. Pappel, E. Tearo, E. Uus

Production of Whey Powder with Low Lactose Content

Summary

A pilot scale experiment to produce whey powder with a low content of lactose has been carried out.

For the enzymatic hydrolysis of lactose in whey, 1000 kg of whey was passed in portions at 50 °C through a 50 litres capacity active rotor bioreactor wherein β-galactosidase attached to the particulate silochrome carrier as a catalyst was used.

The enzymatically treated whey was concentrated in a vacuum evaporator at 55...60 °C up to the content of 15... 40 % of dry substances in product and then passed through the Niro Atomizer type spray dryer to obtain whey powder.

№ 499

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.156.04.004.14

М.И. Креэн, М. Качаровска-Кончыньска

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПЕПСИНА

Успешное внедрение иммобилизованных ферментов в практике, в том числе и иммобилизованного пепсина в производстве иммуносывороток, главным образом, зависит от их активности и стабильности. Иногда в результате иммобилизации достигнута существенная стабилизация ферментов [1], но во многих случаях стабильность иммобилизованных ферментов не превышает стабильности их нативных форм [2]. Предполагается, что инактивация ферментов в технологических условиях и при хранении протекает по одному и тому же механизму (не учитывая вымывания фермента из носителя, частичного разрушения носителя и т.д.) [3]. Таким образом, полученные в модельных условиях данные о стабильности фермента могут быть хорошей характеристикой о его применимости в технологическом процессе.

В настоящей работе сравнивается стабильность двух препаратов пепсина, иммобилизованного разными методами ковалентного присоединения. Из многих инактивирующих воздействий изучено денатурирующее влияние температуры и деструкция фермента при хранении при низкой температуре. Из факторов, действующих в технологическом процессе, рассмотрено влияние длительного контакта с высокомолекулярным субстратом – гемоглобином.

Работа выполнена во время стажировки М. Качаровской-Кончыньской в ТПИ.

Материалы и методы

Для иммобилизации использовался кристаллический пепсин Олайнского завода химреактивов с активностью 25,7 Е/мг. В

качестве носителя использовался силохром марки СХ-I,5 (производство Горьковского опытного завода ВНИИНП) с диаметром зерен 0,40–0,63 мм и удельной поверхностью 35 $м^2/г$ в исходном или в модифицированном и активированном виде. Модификация поверхности силохрома поликонденсационной эпоксидной смолой и активация бромистым цианом была проведена по разработанной в нашей лаборатории методике [4].

Для присоединения пепсина бромциановым методом носитель предварительно промывали 0,I-молярным фосфатцитратным буфером при pH 4,6. Отфильтрованный из буфера носитель перемешивали раствором пепсина с концентрацией 40 г/л в том же буфере в соотношении I,5 мл на I г сухого носителя. В течение первых 30 минут реакционную смесь вакуумировали для удаления воздуха из пор носителя, а затем выдерживали при 4 °С в течение I2 часов. Иммобилизованный препарат многократно промывали вышеназванным буфером, затем I-молярным раствором хлористого натрия для удаления адсорбированного белка. Последнюю промывку проводили буфером, и отфильтрованный препарат хранили в холодильнике в буфере при pH 4,6.

При иммобилизации пепсина глутаральдегидным способом использовалась методика, описанная Луковявичене и др. [5].

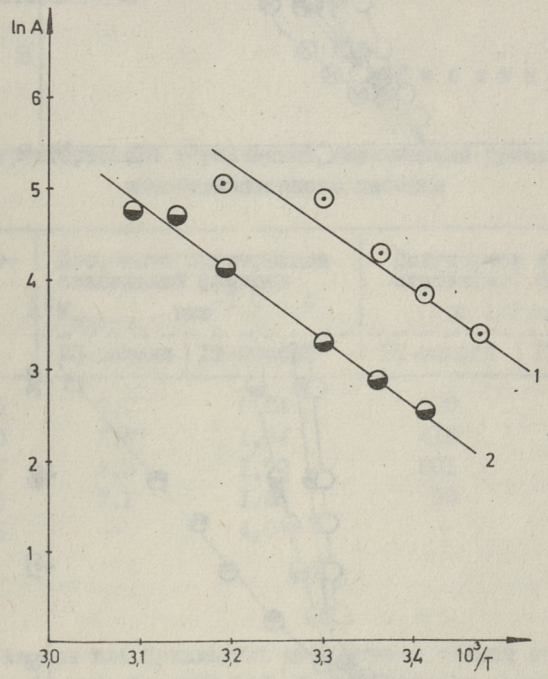
Ферментативную активность свободного и иммобилизованного пепсина определяли по модифицированному методу Ансона, используя в качестве субстрата 2 %-ный раствор гемоглобина при pH I,8. Реакцию проводили при 30 °С в термостатированной ячейке, снабженной магнитной мешалкой. Активность выражали в международных единицах на I г сухого носителя (по приросту содержания тирозина в неосаждаемых трихлоруксусной кислотой продуктах гидролиза).

Термическую стабильность препаратов иммобилизованного пепсина изучали в интервале температур от 45 до 65 °С в 2 %-ном растворе гемоглобина при pH I,8. После выдержки препаратов определенное время при данной температуре их активность определяли вышеописанным способом.

За сохранением активности препаратов наблюдали при их длительном хранении в холодильнике при pH 4,6, а также при их контактировании с раствором гемоглобина при pH 3,2. Воздействие гемоглобина изучали в колонке при комнатной температуре.

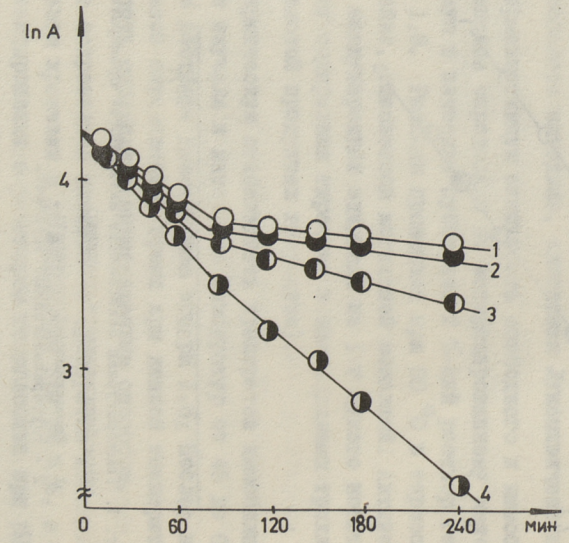
Результаты и обсуждение

Изготовленные нами для этой работы два препарата иммобилизованного пепсина, бромциановый (БЦ-пепсин) и глутаральдегидный (ГА-пепсин), обладали высокой исходной активностью – 516 и 831 Е/г соответственно. Эти активности составляют 33,5 и 53,9 % от взятой на I г носителя активности нативного пепсина. Для сравнительной характеристики препаратов в первую очередь определяли температурную зависимость их активностей и на основе этого вычисляли значения энергии активации (см. фиг. I). В температурных оптимумах препара-

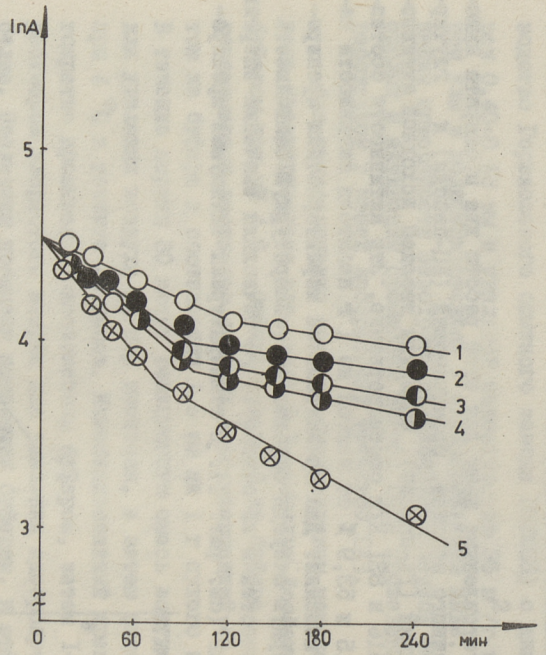


Фиг. 1. Температурная зависимость активностей препаратов иммобилизованного пепсина:

1 – бромциановый препарат;
2 – глутаральдегидный препарат.



Фиг. 2. Термическая инактивация иммобилизованного с помощью бромистого циана пепсина:
1 – 45°; 2 – 50°; 3 – 55°; 4 – 60°.



Фиг. 3. Термическая инактивация иммобилизованного глутаральдегидным методом пепсина:
1 – 45°; 2 – 50°; 3 – 55°; 4 – 60°; 5 – 65°.

тов обнаружили разницу – для БЦ-пепсина оптимальной температурой оказалось 40 °С, а для ГА-пепсина – 50 °С. Значения энергии активации препаратов практически совпадают, равняясь 59,2 и 63,8 кДж/моль для БЦ- и ГА-пепсина соответственно.

Термическую инактивацию препаратов изучали в интервале температур от 45 до 60 или 65 °С. С целью приближения условий опыта к технологическим термическую инактивацию изучали в присутствии макромолекулярного субстрата-гемоглобина. Результаты, представленные в полулогарифмических координатах на фиг. 2 и 3, показывают, что оба препарата содержат две различные по стабильности фракции, т.н. лабильную и стабильную.

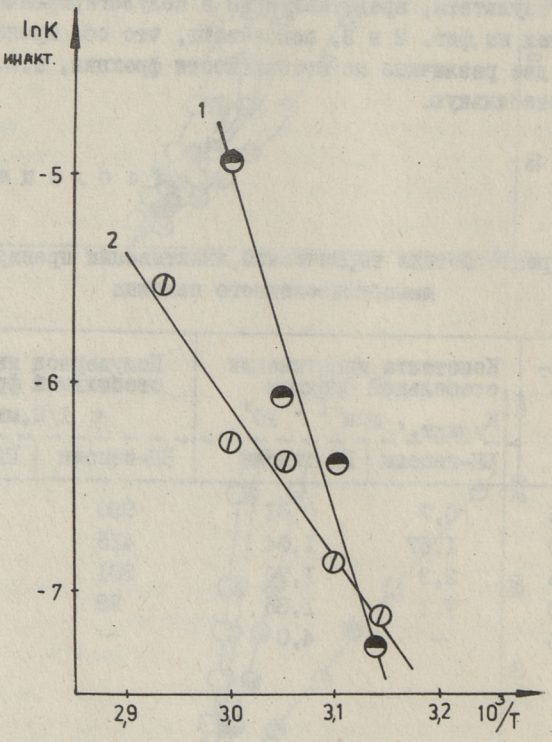
Таблица I

Характеристика термической инактивации препаратов иммобилизованного пепсина

Температура, °С	Константа инактивации стабильной фракции $K_{инакт.}$, $мин^{-1} \cdot 10^3$		Полупериод инактивации стабильной фракции τ 1/2, мин	
	БЦ-пепсин	ГА-пепсин	БЦ-пепсин	ГА-пепсин
45	0,7	0,81	990	855
50	1,67	1,04	415	666
55	2,3	1,70	301	408
60	7,1	1,85	98	375
65	–	4,0	–	173

Так как для прикладных целей более важной является т.н. стабильная фракция [6], нами вычислены значения констант инактивации и полупериоды инактивации именно для этой фракции. В таблице I представлены эти значения при различных температурах.

По данным таблицы I видно, что стабильность глутаральдегидного препарата в некоторой мере больше, чем бромцианового. По мере повышения температуры эффект стабилизации глутаральдегидного препарата увеличивается. Это доказывается и значениями энергии активации процесса термоинактивации (60,3 и 133,1 кДж/моль для ГА- и БЦ-пепсина соответственно), которые вычислены из приведенной на фиг. 4 температурной зависимости констант скорости термоинактивации.



Фиг. 4. Термическая зависимость констант скорости термоинактивации иммобилизованного пепсина:

1 – бромциановый препарат;
2 – глутаральдегидный препарат.

Кроме термической стабильности препаратов иммобилизованного пепсина нами было сравнено сохранение их активности в условиях хранения в холодильнике при 4 °С в фосфат-

цитратном буфере при pH 4,6, а также в условиях промывки с 2 %-ным раствором гемоглобина со значением pH 3,2. Результаты этих опытов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Сохранение активности препаратов иммобилизованного пепсина в разных условиях

Препарат	Активирующий реагент	Исходная активность A_0, Е/г	Активность при 4 °С, pH 4,6 через				Активность после промывки с 2 %-ным гемоглобином pH 3,2, 4,5 ч	
			8 дней		72 дня			
			Е/г	%	Е/г	%	Е/г	%
БЦ-пепсин	бромистый циан	516	486	94,2	425	82,4	155,6	30,1
Га-пепсин	глутаровый альдегид	831	448	54,0	402	48,4	129,2	15,5

По данным таблицы 2 можно убедиться в том, что активность бромцианового препарата отлично сохраняется при длительном хранении в холодильнике. Этот результат согласуется с данными, представленными на фиг. 4. Из экстраполяции прямых на фиг. 4 следует, что при низких температурах константа инактивации БЦ-пепсина значительно меньше, чем у ГА-пепсина.

Весьма неблагоприятное действие на активность препаратов оказывает обработка раствором гемоглобина. Полученные нами с другими протеазами аналогичные данные позволяют предполагать, что имеет место вымывание пепсина из носителя, а не инактивация фермента.

Таким образом, изготовленные нами два препарата пепсина, иммобилизованного на силохроме с помощью бромистого циана и глутарового альдегида, обладали оба высокой исходной активностью (516 и 831 Е/г соответственно). Сравнение термической стабильности препаратов показало большую стабилизацию пепсина при его иммобилизации глутаральдегидным методом. Следовательно, под действием глутарового альдегида достигнуто значительное закрепление нативной структуры ферментной глобулы. Стабильность исследованных препаратов иммобилизованного пепсина в среде буфера значительно отлича-

ется от их стабильности в среде высокомолекулярного белка. Вымываемость фермента из носителя требует дальнейших исследований с целью повышения технологической стабильности иммобилизованного пепсина.

Литература

I. Kahn, M.N., Bana, B., Saleemuddin, M., Siddigi, M. Stabilization of enzymic activities of pepsin and trypsin against high temperature and urea concentration. - 10th Int. Congr. of Biochem.,1976, p. 163.

2. Line, W., Kwong, A., Weetall, H.H. Pepsin insolubilized by covalent attachment on glass: preparation and characterization. - Biochim. Biophys. Acta, 1971, v. 242, N 1, p. 194-202.

3. Мартинек К. Стабилизация ферментов - один из ключевых факторов при внедрении биокатализа в практику. - В кн.: Успехи биоорганического катализа. М., МГУ, 1979, с. 105.

4. Егоров Х.Я., Кивисилла К.А., Киппер Х.Я., Креэн М.И., Кёстнер А.И. Иммобилизация протеаз на кремнеземных и полимерных носителях.- Мат. II Всесоюзн. симп. по химии протеолитических ферментов. Углич, 1979, с. 114.

5. Лукошявичене Н.Ю., Садаускас П.Б., Чюрлис Т.К., Креэн М.И., Кёстнер А.И. Иммобилизация пепсина на кремнеземных материалах. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 57-66.

6. Кёстнер А.И. Принципы оптимизации процесса получения технологических катализаторов на основе иммобилизованных клеток микроорганизмов. - В кн.: Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Пущино, 1978, с. 64-80.

M. Kreen, M. Kaczorowska-Rzqozynska

Characterization of the Stability of Immobilized Pepsin Preparations

Summary

Active preparations of immobilized pepsin have been prepared by means of covalent binding to polymer-modified and aminosilochrome. Polymer-coated carrier has been activated with cyanogen bromide and aminosilochrome has been treated with glutar aldehyde. The thermostability of obtained preparations has been investigated at temperature up to 65 °C. Pepsin, immobilized by glutar aldehyde exhibited higher stability at elevated temperatures, but was less stable, when stored at 4 °C. The energy of activation for the activity decay reactions was different for two types of immobilized pepsin. The preparations showed great difference in the stability in buffer solution and in the medium of hemoglobin to the detriment of the latter.

Содержание

I. А.И. Кёстнер. Расчет эффективности процессов инженерной энзимологии. I. Принципы и структура программы для расчета на ЭВМ. 3

2. Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение II. Определение коэффициентов обобщенного кинетического уравнения. I5

3. А.А. Менерт, Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций. Сообщение III. Термохимический метод исследования стационарной кинетики ферментативных реакций. 23

4. А.Я. Озолиньш. Спектрофотометрические методы определения доступных амино- и альдегидных групп на модифицированных силохромах. 33

5. Л.В. Гаевая. Свойства иммобилизованных нуклеозидфосфорилаз из E.coli 45

6. М.К. Фриеденталь. Получение, свойства и применение иммобилизованных молокосвертывающих ферментных препаратов. Сообщение II. Получение и характеристика иммобилизованного сычужного фермента. 55

7. А.Х. Калда, Л.И. Воробьева. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. I. Изучение влияния иммобилизации на аспартазную активность и жизнеспособность пропионовокислых бактерий. 63

8. М.О. Мандель. В.А. Кросинг. Иммобилизация β-фруктозидазы и получение инвертного сиропа 75

9. К.Э. Паппель, Э.Н. Теаро, Э.Г. Уус. Получение сухой молочной сыворотки с пониженным содержанием лактозы. 83

I0. М.И. Крээн, М. Качаровска-Жончыньска. Сравнительное изучение стабильности препаратов иммобилизованного пепсина. 95

Цена 80 коп.