

№ 6.1
465

ISSN 0136-3549
0203-9788

TALLINNA
POLÜTEHNILISE INSTITUUDI
TOIMETISED

465

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО
ИНСТИТУТА

ТРИ
'79

ПОЛУЧЕНИЕ
И ПРИМЕНЕНИЕ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
ФЕРМЕНТОВ



Технология пищевых продуктов УШ

Ep. 6.7

465

**ТРИ
'79**

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.002.237

● ПОЛУЧЕНИЕ
И ПРИМЕНЕНИЕ
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
ФЕРМЕНТОВ

Технология пищевых продуктов VIII

Таллин 1979

ТАЛЛИНСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
Труды ТПИ № 465
ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ
Сборник статей по химии и химической технологии УШ
Редактор А. Канн. Техн. редактор В. Ранник
Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 19 декабря 1978 года
Подписано к печати 1 ноября 1979 года. Бумага 60x90/16
Печ. л. 5,0 + 0,5 приложение. Уч.-изд. л. 3,1. Тираж 300. МВ-07743
Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коскла, 2/9. Зак. № 726. Цена 45 коп.

© ТПИ, Таллин, 1979



УДК 541.127.001.57:577.15

А. И. Кёстнер, И. И. Таммерайд

МАКРОКИНЕТИКА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ
В СЛУЧАЕ КОМПЛЕКСНОГО ИНГИБИРОВАНИЯ
ПРОДУКТАМИ

Математическое описание макрокинетики иммобилизованных ферментов (ИФ) должно количественно учитывать влияние диффузионного сопротивления на скорость реакции, что необходимо для моделирования процессов и установок инженерной энзимологии. Внутри- и внешнедиффузионная кинетика ИФ рассмотрена многими авторами [1-3], в том числе в наших ранних работах [4,5]. При этом выявлено, что основные дифференциальные уравнения макрокинетики

$$\operatorname{div} [D \cdot \operatorname{grad} c] = u(c), \quad (I)$$

где c - концентрация реагента;

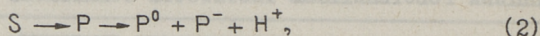
$u(c)$ - скорость реакции.

В случае типичных нелинейных кинетических уравнений ур. (I) аналитически не решается. Следовательно, конкретные выводы и обобщения о закономерностях макрокинетики ферментов должны быть сформулированы анализом приближенных уравнений или на основе цифровых решений ур. (I). Чаще всего макрокинетика ферментов рассматривается для уравнения Михаэлиса-Ментен. Известно также рассмотрение более сложных кинетических уравнений [6,7], учет генерируемых реакцией изменений pH [8] и расчет внешнедиффузионного транспорта в случае заряженной матрицы [9].

Однако нам не известны работы, в которых одновременно рассматривались бы все эти эффекты.

В нижеследующем мы предлагаем для анализа макрокинетику энзиматической реакции, в которой продукт одновре-

менно ингибирует реакцию, а кроме того, меняет скорость реакции из-за сдвига рН. Подобная реакция может быть описана уравнениями



где

$$[P] = [P^0] + [P^-]; \quad [P^-] = [H^+]. \quad (3)$$

Сущность приведенных схем не меняется, если наряду с продуктом Р образуется какой-то другой продукт, который меньше влияет на скорость реакции. Вышеприведенная схема достаточно хорошо описывает кинетику действия пенициллин-амидазы, фермента большого прикладного значения.

Предполагаем, что кинетика рассматриваемой реакции может быть описана произведением двух функций

$$u(s, p, q) = V_m \cdot \varphi(s, p) \cdot \psi(q), \quad (4)$$

где V_m - максимальная возможная скорость реакции ИФ;
 s, p - концентрации субстрата и продукта;
 q - концентрация ионов водорода.

На основе общеизвестных закономерностей ферментативной кинетики определяем

$$\varphi(s, p) = \frac{s}{s + K_m(1 + p/K_i)} \quad (5)$$

$$\psi(q) = \frac{1 + 2\sqrt{K_2/K_1}}{1 + q/K_1 + K_2/q}, \quad (6)$$

где K_m, K_i, K_1, K_2 - истинные кинетические константы иммобилизованного фермента.

Естественно, в каждой точке катализатора соблюдается равенство

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{dp}{dt} = u. \quad (7)$$

Так как водородные ионы образуются в результате диссоциации слабой кислоты Р, скорость их образования не может быть просто взята равной общей скорости реакции u , как это желали Бейли и Чоу [8]. Для нахождения скорости образования ионов водорода u_q исходим из уравнения диссоциации

$$K_A = \frac{p \cdot q}{p}. \quad (8)$$

Дифференцируя ур. (8) по времени и учитывая условия

$$\frac{dp^-}{dt} = \frac{dq}{dt} \quad (9)$$

$$\frac{dp}{dt} = \frac{dp^0}{dt} + \frac{dp^-}{dt}, \quad (10)$$

получим

$$u_q = \frac{dq}{dt} = -u \frac{1}{\frac{p^0}{q} + \frac{q}{K_A} + 1}. \quad (11)$$

В первую очередь рассмотрим упрощенные условия, по которым диффузия отдельных ионов невязаносвязана, т.е. не учитывает возможность образования диффузионного потенциала. В этих условиях при постоянстве константы диффузии для случая сферической симметрии из уравнения (I) получим систему (I2-I4)

$$D_s \left(\frac{d^2 s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{ds}{dr} \right) = u \quad (12)$$

$$D_p \left(\frac{d^2 p}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dp}{dr} \right) = -u \quad (13)$$

$$D_a \left(\frac{d^2 q}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dq}{dr} \right) = -u \frac{1}{p^0/q + q/K_A + 1}, \quad (14)$$

где D_s, D_p, D_a — коэффициенты диффузии в матрице.

В центре зерна градиенты отсутствуют

$$\left. \frac{ds}{dr} \right|_0 = \left. \frac{dp}{dr} \right|_0 = \left. \frac{dq}{dr} \right|_0 = 0. \quad (15)$$

На внешней поверхности зерна должны быть соблюдены следующие граничные условия

$$\left. \frac{ds}{dr} \right|_R \cdot D_s = k_s (s_s - s_R) \quad (16)$$

$$\left. \frac{dp}{dr} \right|_R \cdot D_p = k_p (p_s - p_R) \quad (17)$$

$$\left. \frac{dq}{dr} \right|_R \cdot D_a = k_a (q_s - q_R), \quad (18)$$

где индекс R обозначает поверхность катализатора;

индекс s — свободный раствор;

k_s, k_p, k_a — коэффициенты массопередачи между раствором и катализатором.

Из закономерностей массопередачи можно приблизительно оце-

НИТЬ

$$\frac{k_s}{D_s} \approx \frac{k_p}{D_a} \approx \frac{k_a}{D_a} \approx K_0. \quad (19)$$

Следовательно, граничные условия (16–18) могут быть представлены обобщенно

$$\left. \frac{dc}{dr} \right|_R = K_0(c_s - c_R). \quad (20)$$

Соотношение коэффициента массопередачи и коэффициента диффузии K_0 зависит от гидродинамического режима, и его величина может быть оценена на уровне 300 см^{-1} и выше [10].

Кроме граничных условий (20) из массобаланса вытекает также дополнительное условие (21)

$$\left. \frac{ds}{dr} \right|_R \cdot D_s + \left. \frac{dp}{dr} \right|_R \cdot D_s = 0. \quad (21)$$

Решение системы (12–14) в приведенных граничных условиях позволяет в первом приближении найти абсолютную и отрицательную активности катализатора в интересующих нас условиях.

Для более точного расчета макрокинетики необходимо учитывать также возникновение и влияние электрического поля в катализаторе. По теории растворов электролитов известно, что при диффузии электролитов, состоящих из ионов различной подвижности в стационарных условиях возникает электростатический диффузионный потенциал, который замедляет быстрые и ускоряет медленные ионы и, таким образом, обеспечивает равновесие зарядов.

Обозначая потенциал каждой точки катализатора относительно свободного раствора через E и учитывая закономерности электродиффузии, получаем уравнение (1) в форме

$$\text{div } D_c(\text{grad } c + z \cdot c \cdot \lambda \cdot \text{grad } E) = u(c), \quad (22)$$

где z — заряд иона;

λ — коэффициент $\frac{RT}{F}$, который при 303 K равняется 0,026.

Проводя векторные операции получим

$$D_c \left[\Delta c + z \lambda c \Delta E + z \lambda \frac{dE}{dr} \frac{dc}{dr} \right] = u_c, \quad (23)$$

где Δ обозначает лапласиан в сферических координатах

$$\Delta x \equiv \frac{d^2 x}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dx}{dr}, \quad (24)$$

в стационарных условиях соблюдается следующее условие

$$\Delta E = 0. \quad (25)$$

Следовательно, система уравнений представляется в виде

$$D_s \left(\frac{d^2 s}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{ds}{dr} \right) = u \quad (26)$$

$$D_{p^0} \left(\frac{d^2 p^0}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dp^0}{dr} \right) = -u(1-f_{\Delta}) \quad (27)$$

$$D_{p^-} \left(\frac{d^2 p^-}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dp^-}{dr} - \lambda \frac{dE}{dr} \frac{dp^-}{dr} \right) = -u q_+ f_D \quad (28)$$

$$D_Q \left(\frac{d^2 q}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dq}{dr} + \lambda \frac{dE}{dr} \frac{dq}{dr} \right) = -u f_D \quad (29)$$

$$\frac{dE}{dr} = (D_p \frac{dp^-}{dr} - D_Q \frac{dq}{dr}) / \lambda (D_Q q_+ + D_p p^-). \quad (30)$$

В этой системе уравнение (30) выведено из условия равенства потоков противоположно заряженных ионов. Скорость реакции u вычисляется по уравнениям (4-6), а функция диссоциации вытекает из ур. (31)

$$f_{\Delta} = \frac{1}{q/K_1 + 1}. \quad (31)$$

Сейчас влияние электродиффузии должно быть учтено также при составлении граничных условий, что будет представлено следующими уравнениями

$$D_s \left. \frac{ds}{dr} \right|_R = k_s (s_s - s_R) \quad (32)$$

$$D_p \left. \frac{dp^0}{dr} \right|_R = k_p (p_s^0 - p_R^0) \quad (33)$$

$$D_{p^-} \left(\frac{dp^-}{dr} - \lambda p^- \frac{dE}{dr} \right) \Big|_R = k_p [p_s^- - p_R^- - \lambda p_R^- (E_s - E_R)] \quad (34)$$

$$D_Q \left(\frac{dq}{dr} + \lambda q \cdot \frac{dE}{dr} \right) \Big|_R = k_Q [q_s - q_R + \lambda q_R (E_s - E_R)] \quad (35)$$

$$\lambda (E_s - E_R) = [k_p (p_s^- - p_R^-) - k_Q (q_s - q_R)] / (k_Q q_R + k_p p_R^-). \quad (36)$$

Для решения систем (12) - (14) и (32) - (36) нами составлены программы для ЭВМ ЕС-1020 на языке PL/I. Анализ полученных решений будет представлен в наших следующих сообщениях.

Л и т е р а т у р а

1. M u r r a y, J.D. A simple method for obtaining approximate solutions for a class of diffusion-kinetics enzyme problems I. General class and illustrative examples. - *Meth. Biosci.*, 1968, vol.2, N 3-4, pp. 379-411.
2. M o o - Y o u n g, M., K o b a y a s h i, T. Effectiveness factors for immobilized-enzyme reactions. - *Can. J. Chem. Eng.*, 1972, vol. 50, N 2, pp. 162-167.
3. E n g a s s e r, I.-M., H o r v a t h, C. Effect of internal diffusion in heterogeneous enzyme systems: evaluation of true kinetic parameters and substrate diffusivity. - *J. Theor. Biol.*, 1973, vol. 42, N 1, pp.137-155.
4. К ё с т н е р А.И. Математическое моделирование кинетики иммобилизованных ферментов. I. Кинетика зерна с однородным распределением ферментативной активности. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 1973, № 33I, с. 157-162.
5. К ё с т н е р А.И. Количественное описание кинетики в ферментативных системах при наличии диффузионного сопротивления - *Микроб. пром-сть. Реф. сб.*, 1973, т. 10, (106), с. 18-21.
6. R a m a c h a n d r a n, P.A., K r i s h n a, R., P a n c h a l, C.B. Analysis of immobilized multienzyme reaction systems with Michaelis-Menten kinetics. - *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 1976, vol. 26, N 4, pp. 214-224.
7. K o b a y a s h i, H., S u z u k i, H. Kinetic studies of β -galactosidase-containing mold pellets on PNFG hydrolysis. - *Biotechnol. Bioeng.*, 1976, vol. 18, N 1, pp. 37-52.
8. B a i l e y, J.E., C h o w, M.T.C. Immobilized enzyme catalysis with reaction-generated pH change. - *Ibid.*, 1974, vol. 16, N 10, pp. 1345-1359.
9. S h u l e r, M.L., A r i s, R., T s u c h i y a, H.M. Diffusive and electrostatic effects with insolubilized enzymes. - *J. Theor. Biol.*, 1972, vol. 35, N 1, pp. 67-76.

10. D a h o d w a l a, S.K., H u m p h r e y, A.E.,
W e i b e l, M.K. Pore diffusion model for two-substrate
enzymatic reaction: Application to galactose oxidase immo-
bilized on porous glass particles. - Biotechnol. Bioeng. -
1976, vol. 18, N 7, pp. 987-1000.

A. K^ostner, I. Tammeraid

Immobilized Enzyme Macrokinetics in the
Case of Complex Product Inhibition

Summary

The macrokinetics of spherical homogeneous immobilized enzyme particles is treated in the cases of product inhibition when both inter- and intraparticle diffusion resistances are present. Direct product inhibition and its influence on reaction rate through generated pH-changes are considered. A system of differential equations have been formulated both for independent diffusion and for electrodiffusion generated by electrostatic field. Appropriate boundary conditions have been fixed and programs for numerical solution compiled.

КИНЕТИКА ОДНОСУБСТРАТНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Сообщение I.

Обобщенное кинетическое уравнение для формально
двухступенчатых реакций

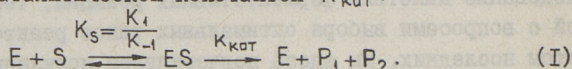
В связи с развитием новой отрасли науки – инженерной энзимологии – особое значение приобретает всестороннее исследование кинетики ферментативных реакций, тесно связанной с вопросами выбора оптимальных типов реакторов и расчетом последних. Мы здесь подчеркиваем прикладные аспекты исследования кинетики ферментов, никак не стараясь противопоставить их другим важным аспектам таких исследований. Придется лишь отметить, что в классических кинетических исследованиях изучению подлежит часто начальная скорость ферментативных реакций. Для практических целей, однако, необходимо иметь полную информацию о кинетике реакций до глубокой конверсии субстрата включительно. Итак, нашей целью является разработать обоснованные для практического применения удобные кинетические уравнения. В первую очередь будут рассматриваться односубстратные, формально двухступенчатые ферментативные реакции. Этому типу можно подчинить значительное количество ферментативных реакций, среди них заметное количество реакций прикладного характера.

В серию сообщений под общим названием мы включаем теоретические материалы и практические результаты их использования в лаборатории. Первое сообщение посвящено выводу обобщенного кинетического уравнения.

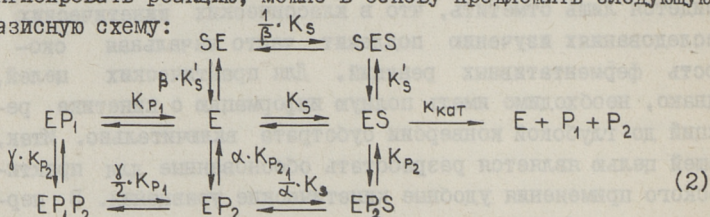
В наших работах [1–3] показано, что для многих гидро-

литических реакций характерно ингибирование продуктами и субстратом. Показано, что общий механизм реакций для двух различных ферментов — пенициллинамидазы и инвертазы — одинаков [1], хотя позже было доказано, что ингибирование вторым продуктом является неконкурентным, а бесконкурентным, как указано в статье. Обобщенное кинетическое уравнение нами применено для описания действия β -галактозидазы [2,3], а также описан один из возможных методов расчета значений входящих в уравнение коэффициентов непосредственно из экспериментальных данных [4]. Однако более детально сущность обобщенного уравнения и базисная схема реакций, взятая в основу этого уравнения, нами до сих пор не опубликовывались.

Для многих ферментативных реакций типично образование одного или двух (т.е. не более двух) продуктов. Часто эти реакции могут быть рассмотрены как формально двухступенчатые с каталитической константой $K_{кат}$:



Учитывая, что субстрат S и продукты P_1 и P_2 могут ингибировать реакцию, можно в основу предложить следующую базисную схему:



Согласно этой схеме принято, что

а) один из продуктов (P_1) ингибирует конкурентно, второй (P_2) — неконкурентно, может также образоваться комплекс $EP_1 P_2$.

б) для ингибирования субстратом учтена возможность существования непродуктивного комплекса SE ;

в) для упрощения считаются комплексы SES и $EP_2 S$ непродуктивными (полное ингибирование).

Все десять констант равновесия рассматриваются как константы диссоциации.

Учитывая, что в любой момент реакции

$$[P_1] = [P_2] = [P] \quad (3)$$

можно, применяя, например, удобный метод графов [5], вывести следующее кинетическое уравнение, соответствующее схеме (2):

$$v = \frac{k_{кат} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_s \left(1 + \frac{[S]}{\beta K'_s}\right) + K_s [P] \left(\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{\alpha K_{P_2}} + \frac{[P]}{\gamma K_{P_1} \cdot K_{P_2}}\right) + [S] \left(1 + \frac{[S]}{K'_s} + \frac{[P]}{K_{P_2}}\right)} \quad (4)$$

Целесообразно рассматривать скорость реакции как функцию от степени конверсии субстрата X , выраженной уравнением (5):

$$X = \frac{[P]}{[S]_0} = 1 - \frac{[S]}{[S]_0}, \quad (5)$$

где $[S]_0$ является исходной концентрацией субстрата.

На основе уравнений (4) и (5) после несложных преобразований, принимая максимальную скорость V_m равной произведению $k_{кат} \cdot [E]_0$, получаем следующее обобщенное уравнение скорости для одностратных формально двухступенчатых реакций:

$$v = \frac{d[P]}{d\tau} = \frac{V_m \cdot (1-X)}{a + bX + cX^2}. \quad (6)$$

В этом уравнении коэффициенты a , b и c являются функциями от $[S]_0$ и констант диссоциации, выраженными следующим образом:

$$a = 1 + \frac{K_s}{[S]_0} + \frac{K_s}{\beta \cdot K'_s} + \frac{[S]_0}{K'_s} \quad (7)$$

$$b = K_s \left(\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{\alpha K_{P_2}} + \frac{1}{\beta K'_s}\right) + [S]_0 \left(\frac{1}{K_{P_2}} - \frac{2}{K'_s}\right) - 1 \quad (8)$$

$$c = [S]_0 \left(\frac{1}{K'_s} - \frac{1}{K_{P_2}} + \frac{K_s}{\gamma K_{P_1} K_{P_2}}\right). \quad (9)$$

В зависимости от типа ферментативной реакции, выражения для a , b и c обычно упрощаются (например, обычно берется $\alpha = 1$, $\gamma = 1$). В таблице I приведены значения этих коэффициентов для некоторых чаще встречающихся типов реакций (применяется чисто произвольное распределение по типам).

Таблица I

Выражения для расчета коэффициентов a , b и c для чаше встречающихся типов ферментативных реакций

№	Характеристика типа реакции	K_{P_1}	K_{P_2}	K'_S	α	β	γ	a	b	c
I		3	4	5	6	7	8	9	10	II
1.	Нет ингибирования (Михаэлис-Ментеновская кинетика)	∞	∞	∞	—	—	—	—	-1	0
2.	Полное конкурентное ингибирование одним продуктом (P_1)	K_{P_1}	∞	∞	—	—	—	$1 + \frac{K_S}{[S]_0}$	$\frac{K_S}{K_{P_1}} - 1$	0
3.	Полное неконкурентное ингибирование одним продуктом (P_2)	∞	K_{P_2}	∞	1	—	∞	$1 + \frac{K_S}{[S]_0}$	$\frac{K_S}{K_{P_2}} + \frac{[S]_0}{K_{P_2}} - 1$	$\frac{[S]_0}{K_{P_2}}$
4.	Полное конкурентное ингибирование одним продуктом (P_1), полное неконкурентное ингибирование другим продуктом (P_2), комплекс E, P_1, P_2 не образуется	K_{P_1}	K_{P_2}	∞	1	—	∞	—	$K_S \left(\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{K_{P_2}} \right) + \frac{[S]_0}{K_{P_2}} - 1$	$\frac{[S]_0}{K_{P_2}}$
5.	Ингибирование ("бесконкурентное") субстратом	∞	∞	K'_S	—	∞	—	$1 + \frac{K_S}{[S]_0} \frac{K'_S}{K_S}$	$-\frac{2[S]_0}{K'_S} - 1$	$\frac{[S]_0}{K'_S}$

I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	II
6.	Ингибирование субстратом и полное конкурентное ингибирование одним продуктом (P_1).	K_{P_1}	∞	K'_S	—	∞	—		$\frac{K_S}{K_{P_1}} - \frac{2[S]_0}{K'_S} - 1$	$\frac{[S]_0}{K'_S}$
7.	Ингибирование субстратом, полное конкурентное ингибирование одним продуктом (P_1), полное неконкурентное ингибирование другим продуктом (P_2), комплекса $E P_1 P_2$ не образуется	K_{P_1}	K_{P_2}	K'_S	1	∞	∞	$1 + \frac{K_S}{[S]_0} + \frac{[S]_0}{K'_S}$	$K_S \left(\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{K_{P_2}} \right) + [S]_0 \left(\frac{1}{K_{P_2}} - \frac{2}{K'_S} \right) - 1$	$[S]_0 \left(\frac{1}{K'_S} - \frac{1}{K_{P_2}} \right)$
8.	Соответствует типу 7, но образуются также комплекс $E P_1 P_2$, $\chi = \alpha = 1$	K_{P_1}	K_{P_2}	K'_S	1	∞	1		$K_S \left(\frac{1}{K_{P_1}} + \frac{1}{K_{P_2}} \right) + [S]_0 \left(\frac{1}{K_{P_2}} - \frac{2}{K'_S} \right) - 1$	$[S]_0 \left(\frac{1}{K'_S} - \frac{1}{K_{P_2}} + \frac{K_S}{K_{P_1} K_{P_2}} \right)$

Часто целесообразно в расчетах использовать также величину начальной скорости реакции v_0 . При условии $X = 0$, из уравнения (6) получаем

$$v_0 = \frac{V_m}{a} \quad (I0)$$

и следовательно, относительную скорость $\frac{v}{v_0}$ можно выразить при помощи следующего уравнения

$$v_{\text{отн}} = \frac{v}{v_0} = \frac{1 - X}{1 + m_1 X + m_2 X^2}, \quad (II)$$

где $m_1 = \frac{b}{a}$ и $m_2 = \frac{c}{a}$.

Придется предпочитать обозначения m_1 и m_2 вместо K_1 и K_2 , примененных нами ранее [2-4].

Обобщенное уравнение (6) в наших следующих сообщениях будет подвергаться анализу с двух точек зрения:

- а) применение уравнения для расчетов работы различного типа реакторов и для сравнения их эффективности;
- б) исследование возможностей определения величин a , b , c , m_1 и m_2 .

Очевидно, оба аспекта тесно связаны между собой и требуют как теоретического подхода, так и экспериментального доказательства.

Будет показано, что использование обобщенного кинетического уравнения во многих случаях значительно упрощает кинетические расчеты. Уравнение применимо также для описания действия многих иммобилизованных ферментов, если молекулярная масса субстрата мала, т.е. диффузионные процессы не имеют существенного влияния на общую скорость реакций.

Л и т е р а т у р а

1. Сиймер Э.Х., Кросинг В.А., Мандель М.О., Кёстнер А.И. О механизме ферментативных реакций, ингибируемых субстратом и продуктами. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 1974, № 367, с. 3-7.

2. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И., Летунова Е.В., Тихомирова А.С.

Гидролиз лактозы иммобилизованной β -галактозидазой. Прикл. биохим. и микробиол., 1976, т. 12, № 2, с. 217-220.

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

4. Сиймер Э.Х., Паппель К.Э., Кестнер А.И. Новый метод описания кинетики ферментативных реакций. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 1977, № 424, с. 13-17.

5. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. Изд. МГУ, 1976, глава 13.

E. Siimer

The Kinetics of One-substrate Enzymatic Reactions

Part I

A generalized kinetic equation for formally two-step reactions

Summary

A generalized rate equation for one-substrate formally two-step enzymatic reactions has been derived in which the inhibition by two products and a substrate has been taken in consideration. The equation has the following form:

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

where v is the rate of reaction, V_m - the maximum rate, X - the degree of substrate conversion and a , b , c are the coefficients depending on the dissociation constants of the enzyme containing complexes and the initial substrate con-

centration. The values of a, b and c for the most often existing reaction types have been given. In the following reviews the analysis of this equation will be presented in two aspects: when used for reactors' calculations and for the determination of values a, b, c from experimental data. The generalized rate equation significantly simplifies kinetic calculations and in many cases can be used also for reactions catalyzed by immobilized enzymes.

Reaction

A generalized kinetic equation for the reaction of a substrate S with an enzyme E, which is inhibited by a product P, can be written as follows:

$$v = \frac{v_{max} S}{K_m + S + \frac{S^2}{K_i} + \frac{S}{K_{sp}}}$$

where v is the rate of reaction, v_{max} is the maximum rate, K_m is the Michaelis constant, K_i is the inhibition constant, and K_{sp} is the substrate inhibition constant.

Equation

The generalized rate equation can be used for the calculation of the reaction rate v for a given substrate concentration S, enzyme concentration E, and inhibitor concentration I. The equation can also be used for the determination of the kinetic constants v_{max}, K_m, K_i, and K_{sp} from experimental data.

К рН-ЗАВИСИМОСТИ РЕАКЦИИ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ
ФЕРМЕНТАМИ

Зависимость скорости реакции от концентрации водородных ионов является одной из важнейших характеристик ферментативной кинетики. При иммобилизации ферментов их рН-зависимости нередко меняются. Сдвиг рН-оптимума и изменение формы рН-кривой может быть результатом изменения истинных свойств фермента или может зависеть от перераспределения ионов водорода между раствором и матрицей [1, 2]. В большинстве работ по изучению свойств нативных и иммобилизованных ферментов экспериментально найденные рН-зависимости представляются лишь в виде графиков, что затрудняет количественный анализ полученных данных. Несмотря на то, является ли изменение рН-зависимости видимым или действительным изменением свойств фермента, целесообразно обработать экспериментальные данные для получения количественного описания исследуемого процесса. В настоящей работе предлагается простой способ определения видимых характеристик рН-кривых и с помощью этого метода проводится анализ некоторых литературных данных.

Теоретическая часть

Зависимость скорости ферментативной реакции от рН связана с особенностями механизма данной реакции, а также возможной ионизацией субстрата [3]. За основу последующих расчетов взято общепринятое уравнение для рН-зависимости двухстадийной ферментативной реакции (I)

$$V = \frac{V_m}{1 + [H^+]/K_A + K_B/[H^+]}, \quad (I)$$

где V - скорость реакции при данном рН;
 V_M - скорость реакции при оптимальном рН;
 K_A, K_B - константы диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Для выяснения характерных значений K_A и K_B было бы целесообразно использовать все экспериментальные точки по исследуемой области рН и найти характерные значения констант с помощью метода наименьших квадратов. С этой целью преобразуем формулу (1) в формулу (2)

$$\frac{V_M}{V} - 1 = [H^+] / K_A + K_B / [H^+], \quad (2)$$

$$y = a x_1 + b x_2, \quad (3)$$

что уже легко представить в удобной для регрессионного анализа форме 3. При этом применяется следующая преобразованная переменная

$$y = \frac{V_M}{V} - 1 \quad x_1 = K \cdot [H^+] \quad x_2 = 1/K [H^+],$$

где K - произвольная константа, введенная для уменьшения разницы в абсолютных значениях переменных x_1 и x_2 .

Введение константы K лишь незначительно усложняет расчеты, но зато уменьшает погрешность получаемых результатов. В зависимости от характера реакции K может быть принята в пределах 100 - 10000. Применяя общеизвестные принципы метода наименьших квадратов и учитывая взаимосвязь между a и b , получим систему (4) для выяснения K_A и K_B

$$\begin{cases} a \sum x_1^2 + b n = \sum x_1 y \\ a \cdot n + b \sum x_2^2 = \sum x_2 y \end{cases} \quad (4)$$

Решение этой системы дает уравнение для вычисления и

$$K_A = \frac{K_N}{N} (\sum x_1 y \cdot \sum x_2^2 / n - \sum x_2 y), \quad (5)$$

$$K_B = K \cdot N / (\sum x_2 y \cdot \sum x_1^2 / n - \sum x_1 y), \quad (6)$$

$$\text{где } N = \sum x_1^2 \cdot \sum x_2^2 / n - n. \quad (7)$$

Расчет значений K_A и K_B по экспериментальным данным не

представляет особых затруднений и может быть осуществлен с помощью маломощных ЭВМ. Нами составлена программа для настольной программируемой ЭВМ I5-BCM-5, которая позволяет вычислять значения K_A и K_B , найти по уравнению (8) расчетный рН-оптимум и по разности $\Delta rK = rK_b - rK_a$ чувствительность реакции к изменению рН.

$$pH_{opt} = \frac{rK_A + rK_B}{2} . \quad (8)$$

С помощью той же программы проводится дисперсионный анализ эксперимента. Для этого в последней точке измерения определяется относительное отклонение

$$\delta = \frac{V - V'}{V} , \quad (9)$$

где V - экспериментально определенная скорость реакции;
 V' - рассчитанная по уравнению (I) скорость реакции.

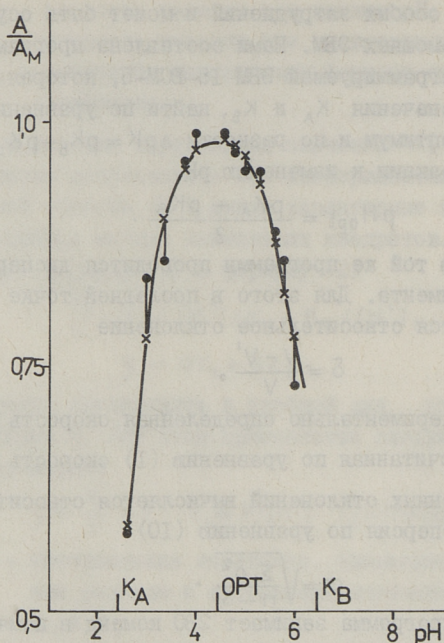
Из полученных отклонений вычисляется относительная остаточная дисперсия по уравнению (IO)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum \delta^2}{n-3}} . \quad (IO)$$

Составленная программа занимает 280 команд в памяти ЭВМ I5-BCM-5, удобна в использовании и позволяет провести анализ одной рН-кривой за несколько минут. Запись программы в командах I5-BCM-5 и инструкция для ее применения могут быть высланы по запросу.

Расчеты и обсуждение

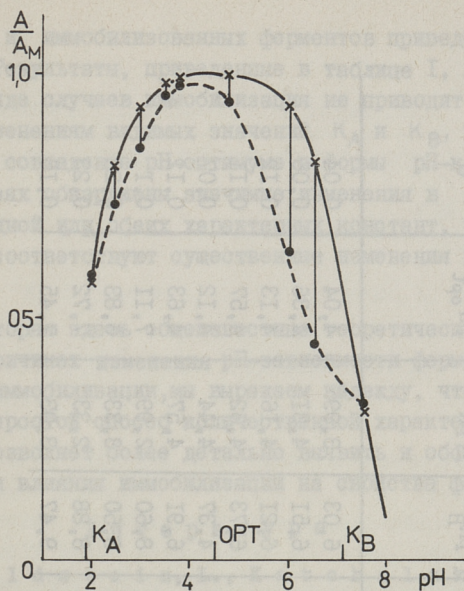
При использовании составленной программы для анализа наших собственных опубликованных данных, а также результатов, заимствованных из литературы, выяснилось, что во многих случаях для нативных и иммобилизованных ферментов рН-зависимости хорошо описываются уравнением (I) (см., например, фиг. I). В таких случаях дисперсия остается в пределах 0,02-0,1, что можно считать вполне удовлетворительным результатом. Однако в некоторых случаях обнаружены большие остаточные дисперсии и несовпадение экспериментально определенного и рассчитанного рН-оптимумов (см. фиг. 2). В отдельных случаях расчет по формуле (5) приводил к отрицательным значениям a или b , что лишено физического смысла и не позволяет провести



Фиг. 1. рН-зависимость для включенной в полиакриламидный гель; β -фруктозидазы на сахарозе при 40°C;
 • экспериментальные точки;
 —x— расчетная кривая $\sigma = 0,034$.

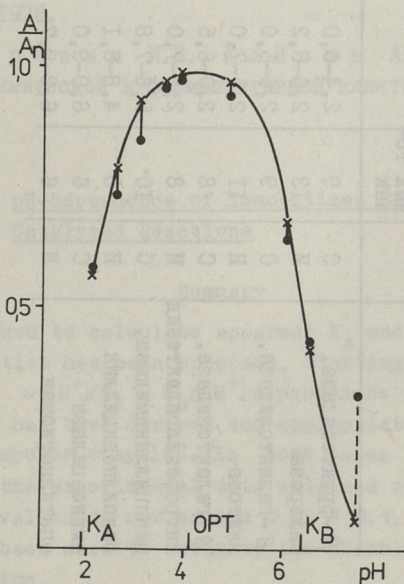
расчеты до конца. Можно предполагать, что такие резкие несовпадения экспериментальных кривых с уравнением (I) свидетельствуют о других механизмах рН-зависимости реакции или являются результатом экспериментальной погрешности. Например, когда из экспериментальных данных, изображенных на фиг. 2, исключить последнюю точку, то все остальные точки хорошо описываются уравнением (I) и весь расчет дает вполне удовлетворительную остаточную дисперсию $\sigma = 0,07$ (см. фиг. 3). При этом значительно меняется также значение K_B (по первоначальному расчету $pK_B = 7,15$, по расчету без последней точки $pK_B = 6,37$). Этот пример показывает, что предлагаемый способ довольно чувствителен к погрешностям опыта при экспериментальных рН и что для достоверного расчета необходима критическая оценка и проверка экспериментальных данных.

Некоторые конкретные примеры расчетов рН-зависимос-



Фиг. 2. pH-зависимость для свободной β -галактозидазы на 0-нитрофенилгалактозиде:

• — экспериментальные точки;
 — x — расчетная кривая $\sigma = 0,41$.



Фиг. 3. То же, что на фиг. 2, в расчете не учтена экспериментальная точка pH = 7,5, $\sigma = 0,07$.

Таблица I

Характеристика pH-зависимостей свободных (Р) и иммобилизованных (И) включением в полиакриламидный гель ферментов

Фермент, субстрат	Форма фермента	Число экспериментальных точек	Интервал pH	pK _A	pK _p	Δ pK	pH opt	б ²
β-фруктозидаза, сахараза	С	9	2,4-6,0	2,04	6,03	3,99	4,04	0,04
	И	13	2,6-6,2	2,20	6,51	4,31	4,36	0,06
β-галактозидаза, лактоза	С	9	2,0-6,0	2,05	6,21	4,16	4,13	0,12
	И	11	2,5-7,0	2,41	6,73	4,32	4,57	0,11
β-галактозидаза, нитрофенилгалактозид	С	8	2,0-6,5	1,88	4,37	4,44	4,12	0,07
	И	8	2,5-7,0	2,34	6,91	4,57	4,63	0,12
пенициллинамидаза, бензилпенициллин	С	10	5,6-7,8	5,61	8,60	2,99	7,11	0,1
	И	8	4,8-8,1	5,16	8,50	3,33	6,83	0,23
аминоцилаза, ацетилметионин	С	6	6,0-9,0	6,55	8,88	2,33	7,72	0,23
	И	6	6,2-8,7	6,44	9,47	3,03	7,45	0,16

ти нативных и иммобилизованных ферментов приведены в таблице I. Результаты, приведенные в таблице I, показывают, что в ряде случаев иммобилизация не приводит к существенным изменениям видимых значений K_A и K_B , чему соответствует совпадение рН-оптимума и формы рН-кривой. В других случаях обнаружены значимые изменения в видимых значениях одной или обеих характерных констант, чему, естественно, соответствуют существенные изменения в форме рН-кривой.

Не повторяя здесь общеизвестные теоретические соображения о причинах изменения рН-зависимости ферментов в результате иммобилизации, мы выражаем надежду, что предлагаемый простой способ количественной характеристики рН-кривых позволяет более детально выявить и обобщить закономерности влияния иммобилизации на свойства ферментов.

Л и т е р а т у р а

1. Goldstein, L., Katchalski, E. Use of water-insoluble enzyme derivatives in biochemical analysis and separation. - Z. Analyt. Chem. 1968, vol. 243, p. 375.

2. Иммобилизованные ферменты. Под ред. И.В. Березина. Т. 2, МГУ, 1976.

3. Березин И.В., Клёсов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. МГУ, 1976.

A. Köstner

pH-Dependence of Immobilized Enzyme Catalyzed Reactions

Summary

A method to calculate apparent K_A and K_B values for enzyme kinetics has been proposed. Starting from equation $V/V_M = A/(1 + [H^+]/K_A + K_B/[H^+])$ a procedure for least-square calculation has been derived and appropriate program for desk-top computer compiled. In most cases the theoretical curve fits the experimental data well and relative residual dispersion values do not exceed 0.05 - 0.1. The proposed method has been used to estimate the pH-changes due to immobilization.

К. Э. Паппель, А. К. Куликова, А. С. Тихомирова

ДЕЗИНФЕКЦИЯ РЕАКТОРА С ИММОБИЛИЗОВАННОЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗОЙ

В связи со строгими санитарно-гигиеническими требованиями, предъявляемыми к продукции пищевой промышленности, особое значение при внедрении иммобилизованной лактазы в промышленности имеет дезинфекция реактора. Очевидно, что во избежание инактивации фермента использование общеизвестных дезинфицирующих и моющих средств, применяемых в молочной промышленности, таких как нагретый пар, NaOH , Na_2CO_3 и т.д., в случае биохимического реактора невозможно. С другой стороны, требования, предъявляемые к продукции пищевой промышленности, ограничивают применение многих химических реактивов, применяемых при работе с ферментами, как толуол, мертиолат и др. Исходя из литературных данных [1, 2], перспективными для дезинфекции реакторов с иммобилизованной лактазой можно считать применение четвертичных аммониевых соединений и перекиси водорода. С точки зрения экономики и доступности реактивов следует предпочесть H_2O_2 . По данным Сантха [3] обработка молока H_2O_2 (0,1–0,4 г/л) не оказывает значительного воздействия на витамины и белки молока, а также не вызывает каких-либо пороков вкуса. Изучение пригодности и уточнения условий применения перекиси водорода для дезинфекции реактора с иммобилизованной лактазой при гидролизе лактозы в сыворотке молока является предметом данной статьи.

Материалы и методы

Работа проводилась с иммобилизованной на силохроме грибной лактазой (β -D-галактозид-галактогидролазой

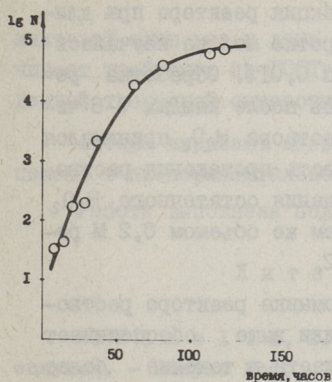
КФ 3.2.1.2.3) [4]. Активность препарата определялась по начальной скорости гидролиза субстрата (лактозы или о-нитрофенил- β -D-галактопиранозида) в стандартных ($t = 30^{\circ}$, $pH = 4.2$) или рабочих ($t = 50^{\circ}$, $pH = 4.5$) условиях. Гидролиз лактозы проводился в реакторе с псевдооживленным слоем при 50° и pH творожной сыворотки ($pH 4.5$). В качестве субстрата использовалась творожная сыворотка, полученная из Таллинского комбината молочных продуктов, со средним содержанием лактозы 4,2, белка I и жира 0,4%. Для частичного удаления белков сыворотка предварительно нагревалась при 93° в течение 10 минут, затем центрифугировалась. Опыты проводились при следующем режиме работы реактора: 7-8 часов гидролиза при 50° (скорость протекания раствора в колонке от 4 до 7 мл/мин) и 16-17 часов простого выдерживания при $20-22^{\circ}$.

Общее число бактерий и коли-титр в исходной и обработанной с помощью иммобилизованной лактазы сыворотке определялись согласно требованиям ГОСТа 9225-68. Для определения общего числа бактерий через каждые 4-5 часов из сыворотки отбирали пробы для посева в чашки Петри на мясопептонный агар. Из каждой пробы для посева готовили 3 - 4 разведения. При этом предполагалось, что при посевах на чашках вырастет не менее 50 и не более 300 колоний. Из каждого образца делали 3 параллельных определения. Количество колоний подсчитывалось после 48 часов выдерживания чашек Петри при 37° . Количество микроорганизмов вычисляли на 1 мл исследуемой пробы. Значение коли-титра определялось через каждые 2-3 суток работы реактора.

Линеаризацию экспериментальных данных по методу наименьших квадратов проводили с помощью вычислительной машины "Канола ЛП20".

Результаты и их обсуждение

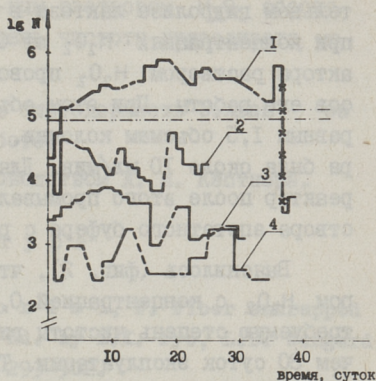
Изучение санитарно-гигиенических показателей при длительном гидролизе лактозы в сыворотке молока под действием иммобилизованной лактазы (ИЛ) показало, что в ходе работы общее число бактерий (N) в сыворотке резко возрастает (фиг. 1). Выясняется, что несмотря на уменьшение общего



Фиг. 1. Зависимость общего числа бактерий в гидролизате сыворотки молока от времени работы реактора с иммобилизованной β -галактозидазой; N - общее число бактерий.

числа бактерий в растворе при работе колонки при 50°, после 50 часов эксплуатации реактора значение N в гидролизате приближается к $1 \cdot 10^5$, т.е. к недопустимому по стандарту (ГОСТ 13277-67). Следовательно, проблема дезинфекции реактора при гидролизе лактозы с помощью ИЛ весьма актуальна. Учитывая вышеуказанное, исследовалась возможность дезинфекции реактора ИЛ с помощью перекиси водорода (H_2O_2).

Изучение влияния H_2O_2 на активность ИЛ показало, что константа скорости инактивации ИЛ, например, в 0,8%-ном растворе H_2O_2 при 50° равняется $1 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$. С повышением концентрации H_2O_2 в два раза, т.е. до 1,6%, значение константы скорости инактивации увеличивается еще приблизительно в 3 раза. При концентрации H_2O_2 до 3,9% константа скорости инактивации ИЛ равняется $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$. Итак, с точки зрения стабильности препарата ИЛ дезинфекцию реактора целесообразно проводить при концентрациях не



Фиг. 2. Общее число бактерий в гидролизате сыворотки молока в зависимости от времени эксплуатации реактора с иммобилизованной β -галактозидазой при дезинфекции санитации реактора раствором H_2O_2 различной концентрации:

- время работы реактора, суток;
- время "отдыха" реактора, суток;
- общее число бактерий, допустимое по ГОСТу для молока группы Б;
- общее число бактерий, допустимое по ГОСТу для молока группы А;
- ×—× однократная промывка 0,05% раствором H_2O_2 .

выше 0,8%. В связи с этим дезинфекция реактора при длительном гидролизе лактозы в сыворотке молока изучалась при концентрациях H_2O_2 от 0,5 до 0,01%. Обработка реактора раствором H_2O_2 проводилась после каждых 7-8 часов его работы. При этом объем раствора H_2O_2 принимался равным 1,5 объемам колонки. Скорость протекания раствора была около 10 мл/мин. Для удаления остаточного H_2O_2 реактор после этого промывался тем же объемом 0,2 М раствора ацетатного буфера с рН 4.2.

Выяснилось (фиг. 2), что промывка реактора раствором H_2O_2 с концентрацией 0,05% или выше обеспечивает требуемую степень чистоты гидролизата в течение более чем 30 суток эксплуатации. Так, например, общее число бактерий в гидролизате сыворотки при промывке реактора ИЛ один раз в день 0,1% раствором H_2O_2 не превышает $0,75 \cdot 10^5$. Значение коли-титра выше 3 мл.

Оказалось (табл. I), что при стерилизации реактора раствором H_2O_2 в концентрациях от 0,01 до 0,1% не наблюдается значительного изменения скорости инактивации ИЛ.

Т а б л и ц а I

Значения констант реакции инактивации ИЛ (K_I) при дезинфекции реактора раствором H_2O_2

№	H_2O_2 , %	$K_I \cdot 10^3$, часов ⁻¹
1	0,01	2,8
2	0,05	3,2
3	0,1	4,1
4	0,5	7,2

С повышением концентрации H_2O_2 до 0,5 % константа скорости инактивации ИЛ увеличивается приблизительно в 2 раза. Следовательно, применение 0,5%-ного раствора H_2O_2 при дезинфекции реактора ИЛ не целесообразно. Учитывая также бактериологические показатели гидролизата, можно сказать, что дезинфекцию реактора с иммобилизованной лактазой ИЛ целесообразно проводить 0,1%-ным раствором H_2O_2 .

Таким образом, промывка реакторе с иммобилизованной

лактазой один раз в день 0,1%-ным раствором H_2O_2 обеспечивает требуемую по ГОСТу степень чистоты гидролизата молочной творожной сыворотки.

Авторы выражают искреннюю благодарность Э.Аган за помощь в экспериментальной работе.

Работа выполнена под руководством А. И. Кэстнера.

Л и т е р а т у р а

1. D i n e l l i, D., M o r i s i, F. Fiber entrapped enzymes. - Enzyme Eng., 2-nd. Ed. by E.K. Pye, L.B. Wingard, N.Y., Plenum Press, 1974, pp. 293-302.

2. B a r n d t, R.L., L e e d e r, J.G., G i a c i n, J.R., K l e y n, D.H. Sanitation of biocatalytic reactor used for hydrolysis of acid whey. - J. Food Sci., 1975, vol. 40, pp. 291-296.

3. S a n t h a, I., G a n g u l i, N. Muriad uses of hydrogen peroxide in dairy industry. - J. Food Sci. and Technol., 1976, vol. 13, N 1, pp. 1-5.

4. П а п п е л ь К.Э., К е с т н е р А.И., Л е т у н о в а Е.В., Т и х о м и р о в а А.С. Иммуобилизация в-галактозы на силохроме. - Прикл. биохим. микробиол., 1976, т. 12, № 4, с. 411-415.

K. Pappel, A. Kulikova, A. Tikhomirova

Immobilised β -galactosidase Reactor Sanitation

Summary

Hydrogen peroxide has been used for immobilised β -galactosidase column sanitation. The enzyme has been covalently linked to Silochrome and used for whey treatment at 50 °C. The immobilised enzyme activity decay in different concentrations of H_2O_2 has been investigated and bacteriological analysis (total number of bacteria coli-index) of the enzyme treated whey has been carried out. On the basis of

these data 0,1 % H₂O₂ solution has been recommended for sanitation. Treating the column once a day with this solution provides the necessary bacteriological purity without significant enzyme inactivation.

Х. Я. Киппер, Х. Р. Егоров,
К. А. Кивисилла

ХАРАКТЕРИСТИКА МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРАМИ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ

При иммобилизации ферментов для обработки высокомолекулярных субстратов целесообразно использовать макропористые неорганические носители. Эти материалы вырабатываются с заданными размерами пор и их легко активировать разными способами. Препараты иммобилизованных ферментов, полученных на основе минеральных материалов, однако, не всегда обладают достаточной стабильностью в операционных условиях. Неудовлетворительная стабильность может быть связана с невысокой механической прочностью минерального скелета материалов.

В качестве макропористых неорганических носителей часто используют кремнезем-содержащие материалы как пористое стекло, силихром, силикагель и др. Для повышения реакционной способности и увеличения механической прочности этих материалов, а также для уменьшения инактивирующей адсорбции их можно модифицировать полимерами. Нами разработан способ активации силихромов и силикагелей полиметилметакрилатом, нейлоном и поликарбамидом [1]. В результате модификации кремнеземного каркаса могут изменяться физико-химические характеристики материала - удельная поверхность, форма и размеры пор, степень гидрофильности поверхности и другие показатели, которые существенны при иммобилизации биоактивных веществ.

В настоящей статье изучается влияние модификации носителей полимерами на их гидрофильность, механическую растяжимость материала, удельную поверхность пор, а также

на результаты иммобилизации панкреатических протеаз на этих носителях.

Материалы и методы

Исследовались силихромы и силикатели, выработанные Горьковским опытным заводом ВНИИП, и силихромы, выработанные в ВНИИ Люминофоров.

В качестве полимеров, использованных для модифицирования носителей, были использованы разные поликонденсационные смолы, в том числе эпоксидные и фенолоформальдегидные смолы.

Для иммобилизации использовали α -химотрипсин Олайнского завода химреактивов с удельной протеолитической активностью 5000 Е/г и панкреатин Рижского мясокомбината, очищенный нами гель-хроматографически на сефадексе Г-50 и лиофилизированный, в результате чего получен препарат с удельной протеолитической активностью 1500 Е/г.

Для определения удельной поверхности материалов был использован метод температурной десорбции (модифицированный метод БЭТ) [2]. Механическая растираемость определялась по методике для определения механической растираемости неорганических носителей [3].

Для характеристики лиофильности носителя контактировали сухой материал воздухом, насыщенным парами растворителя и зарегистрировали увеличение веса носителя.

Для этого сухой пористый материал или модифицированный полимером исходный помещали в короткую колонку. Длину колонки и вес ее вместе с наполнителем выбирали такими, при которых можно легко взвешивать на аналитических весах. Колонку соединяли в закрытую систему, в которой циркулировал воздух, насыщенный парами растворителя. Циркуляцию обеспечивали поршневым насосом. Температура помещения колебалась не более $0,5^{\circ}\text{C}$. Скорость циркуляции $0,3-0,4$ л/мин. Процесс проводили в течение не менее 2 часов.

Иммобилизацию ферментов проводили по способу, описанному в нашей ранней работе [1]. Время контакта фермента с носителем варьировали в зависимости от использованного активирующего реагента.

Определение ферментативной активности проводили по модифицированному методу Ансона на 2%-ном растворе казеина при pH 8,0 и температуре 30°C. Стабильность препаратов оценивали по остаточной активности препарата после проведения промывки в колонке 2%-ным раствором казеина в течение 5 часов. Скорость протекания раствора 0,6 см³/мин.

Результаты и обсуждение

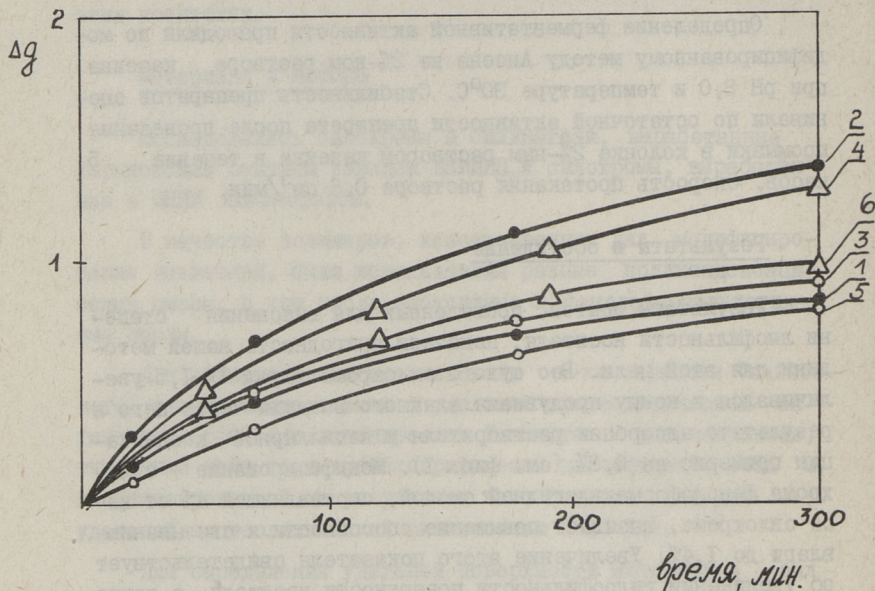
Результаты опытов, проведенных для выяснения степени лиофильности носителя, показали пригодность нашей методики для этой цели. Вес сухого силихрома марки СХ-1,5 увеличивался к концу продувания влажного воздуха через него в результате адсорбции растворителя и капиллярной конденсации примерно на 0,8% (см. фиг. 1). Модифицирование силихрома фенолоформальдегидной смолой, составляющей 4% от веса силихрома, вызывает повышение способности к связыванию влаги до 1,4%. Увеличение этого показателя свидетельствует об увеличении гидрофильности поверхности носителя, а также указывает на то, что в результате модификации эффективная пористость существенно не снизилась.

Опыты с другими растворителями показывают, что в молярном выражении этиловый спирт сорбируется на носителях практически идентично с водой, а сорбция толуола на 20% ниже.

Силихром, модифицированный полимерной смолой, при этих растворителях также связывает больше паров, чем исходный силихром.

Так, при модифицировании макропористых кремнеземных носителей полимерами лиофильность (в том числе и гидрофильность) носителей повышается, что является предпосылкой успешной иммобилизации большинства биоактивных веществ.

Изменение механической растираемости необработанного кремнеземного материала и того же материала, модифицированного полимерными смолами, характеризует таблица I, где представлены результаты определения механической растираемости силихрома СХ-1, обработанного разными способами. Как



Фиг. 1. Изменение веса носителей при циркуляции воздуха, насыщенного паром растворителя.

Δg - относительное увеличение веса, %

$$\Delta g = \frac{g \times 18}{M}, \quad \text{где}$$

g - количество адсорбированного растворителя, г на 100 г носителя,

18 - молекулярная масса воды,

M - молекулярная масса растворителя,

1,3,5 - исходный силихром,

2,4,6 - силихром, модифицированный фенолоформальдегидной смолой,

1,2 - вода,

3,4 - этанол,

5,6 - толуол.

видно, модифицирование макропористого кремнеземного материала полимерами уменьшает их механическую растираемость. При модификации силихрома эпоксидной смолой достигнуто уменьшение механической растираемости примерно на 10 и фенолоформальдегидной смолой на 8%.

В результате модифицирования носителя полимерами в некоторой степени уменьшается удельная поверхность его пор. В случае модифицирования силихрома СХ-1,5 эпоксидной смолой уменьшается удельная поверхность на 10-15% и при моди-

фицировании фенолоформальдегидной смолой на 15-20% по сравнению с удельной поверхностью исходного силихрома.

Т а б л и ц а I

Механическая растираемость носителей

Носитель	Размер исходной фракции, мм	Фракции, полученные после обработки, %			ρ	ε
		0,4-0,63 мм	0,1-0,4 мм	0,1 мм		
Силохром СХ-I	0,4-0,63	86	8	6	0,86	0,06
Силохром СХ-I, модифицированный эпоксидной смолой	0,4-0,63	95	2	3	0,95	0,03
Силохром СХ-I, модифицированный фенолоформальдегидной смолой	0,4-0,63	93	1	6	0,93	0,06

ρ, ε - коэффициенты, характеризующие растираемость носителя [3].

Как известно из литературных данных, а также как показали наши исследования, под влиянием высокомолекулярного субстрата происходит частичное смывание и инактивация молекул фермента с иммобилизованных ферментных препаратов. Об этом свидетельствуют данные, приведенные в таблице 2. Как видно, активность изученных препаратов под влиянием высокомолекулярного вещества - казеина - уменьшалась в большей степени по сравнению с влиянием буферного раствора. Такое явление, вероятно, обусловлено недостаточным числом ковалентных связей между ферментом и носителем.

Полимерная часть модифицированных носителей оказалась прочной и не смывалась под влиянием высокомолекулярного субстрата. При промывке модифицированных эпоксидной и фенолоформальдегидной смолой носителей 2%-ным раствором казеина при вышеназванных условиях вес носителей практически не изменился.

Т а б л и ц а 2

Изменение активности ферментных препаратов под действием растворов буфера и казеина

Фермент	Характеристика носителя	Исходная активность препарата, Е/г	Активность препарата после промывки			
			буфером		раствором 2%-ного казеина	
			Е/г	% от исходн.	Е/г	% от исходн.
Панкреатин	Силохром СХ-1, модифицированный фенолформальдегидной смолой	10,5	5,4	51,4	4,2	40,0
Панкреатин	Силохром СХ-1, модифицированный эпоксидной смолой	13,5	13,4	99,2	7,9	58,7
Химотрипсин	Силохром СХ-1, модифицированный эпоксидной смолой	16,8	16,8	100	14,1	83,7

Таким образом, использование в качестве носителей макропористых неорганических материалов, модифицированных полимерами, дает возможность получить ферментные препараты повышенной энзиматической и механической стабильностью, которые могут быть рекомендованы для обработки высокомолекулярных субстратов.

Авторы выражают благодарность инженеру проблемной лаборатории промышленной теплоэнергетики ТПИ К. Ражу за проведенные анализы удельной поверхности пор.

Работа выполнена под руководством А. И. Кёстнера.

Л и т е р а т у р а

1. К и п п е р Х.Я., Э р и н А.Э., Е г о р о в Х.Я., К и в и с и л л а К.А., К ё с т н е р А.И. Получение активированных изоцианатами кремнеземных носителей для иммобилизации ферментов. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 402, 1976, с. 21-27.

2. N e l s e n, F.M., E g g e r t s e n, F.T. Determination of surface area: adsorption and surements by a continuous flow method. - Anal. Chem., v.30, 1958, p. 1387-1390.

3. К ё с т н е р А.И., К и п п е р Х.Я., Э р и н А.Э., П е д а к М.Р. Определение механической растираемости неорганических носителей. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 424, 1977, с. 51-55.

H. Kipper, H. Yegorov,
K. Kivisilla,

Polymer Modified Inorganic Carrier Characterization

Summary

Some characteristics for macroporous siliceous materials, usual carriers for enzyme immobilization have been determined. The properties of commercial samples and polymer modified materials have been compared. Polymer coatings increase the lyophilicity and stability against attrition, decreasing the porosity not more than 10 - 15 %. The immobilized pancreas complex protease samples exhibit in the case of modified carriers enhanced operational stability.

ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ АМИНОАЦИЛАЗЫ РАДИОПОЛИМЕРИЗАЦИЕЙ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ

Аминоацилаза (Кф. 3.5.1.14), в частности, в иммобилизованной форме, представляет значительный практический интерес для разделения рацемических смесей аминокислот [1-2]. Аминоацилаза иммобилизована на разных носителях, применяя разные способы [3-5]. Учитывая то, что аминоацилаза действует на низкомолекулярные субстраты, для ее иммобилизации использовано и включение в полиакриламидный гель (ПААГ) [6]. Активный центр аминоацилазы является чувствительным окислительно-восстановительным инициатором полимеризации акриламида. Поэтому для ее иммобилизации рекомендовано применение радиационного иницирования как более нежного метода полимеризации. Этот метод рекомендован также для получения ряда других иммобилизованных ферментов [7-9]. Целью настоящей работы является оптимизация метода иммобилизации аминоацилазы радиополимеризацией в ПААГ.

Материалы и методы

Применяли препарат аминоацилазы из свиных почек производства Олайнского завода химреактивов с активностью 1000-800 Е/г. Ферментативная активность определялась на 0,1 М растворе N-D,L-ацетилметионина в 0,1 М фосфатном буфере рН 7,2 при температуре 37°C и активность вычислялась в микромолях в минуту. Активность геляминоацилазы определялась в реакторе перемешивания. Концентрация образующего метионина и других аминокислот определялась нингидриным реактивом и спектрофотометрированием при 570 нм. Субстрат ацетил-D,L-метионин был синтезирован нами аце-

тилизацией аминокислоты с помощью уксусного ангидрида. Исходные мономеры — акриламид и N,N' -бисакриламид венгерской фирмы "Реанал". Полимеризацию проводили на гамма-установке типа РКМ — 20 мощностью 0,3 до 1,0 Мрад/час.

Результаты и обсуждение

В нашей работе [10] выявлены приблизительные условия для иммобилизации аминоацилазы радиационной полимеризацией. Так, выяснили, что минимальной дозой облучения следует считать 45 крад, которая обеспечивает образование препарата с хорошими механическими свойствами. Но со временем мощность источника (500 рад/мин) уменьшилась. Это заставило искать более мощный источник γ -лучи, использование которых обеспечивало бы минимальное время облучения. Слишком медленная скорость гелеобразования влияет тоже на активность фермента, так как мономеры сами могут оказаться инактивирующими веществами фермента. Поэтому в последующей работе использовали источник γ -лучей мощностью 16500 рад/мин. Результаты опытов облучения разными дозами приведены в табл. I.

Т а б л и ц а I

Зависимость активности от величины дозы

Доза прод.	Время облучения, мин.	Активность препарата Е/г	Относительный выход
32	2	5,7	78
80	5	9,8	100
160	10	9,8	100
240	15	9,6	96

Из результатов опыта выясняется, что для образования гелепрепарата с хорошими механическими и ферментативными свойствами подходящей дозой является 60–80 крад. Дальнейшее повышение дозы не изменяет активности гелепрепарата.

В качестве контрольного опыта проводили γ -облучение раствора свободной аминоацилазы в тех же условиях. Результаты опытов показывают (см. табл. 2), что с увеличе-

нием дозы облучения резко падает активность фермента. Происходит инактивация аминоксилы под действием γ -лучей.

Т а б л и ц а 2

Влияние γ -облучения на активность свободной аминоксилы

Доза, крад.	Время облучения, мин	Активность фермента, %
0	0	100
30	60	92
45	90	88
83	5	75
167	10	43
334	20	25

Учитывая влияние величины дозы на активность фермента, при приготовлении гелепрепарата целесообразным является применять дозу 85 крад. В тех же случаях γ -лучи не проявляют существенного инактивирующего действия на фермент.

Из нашей работы [10] выяснилось, что добавка α -аланина и ангидрида итаконовой кислоты в полимеризационную смесь позволила значительно улучшить показатели иммобилизации. Не удовлетворяясь достигнутым уровнем активности, нами проведены дополнительные поиски новых возможных добавок в реакционную смесь.

Для этого провели ряд опытов сначала свободной аминоксилы и использованием различных высоких доз γ -облучения. При этом мы хотели выяснить возможности защитных действий этих веществ для фермента против интенсивного γ -облучения. Использовались растворы цистеина, аскорбиновой кислоты, α -аланина. Смеси из фермента и добавки облучались при дозах от 83-668 крад. Результаты проведенного эксперимента показали, что применение этих добавок не давало особенного эффекта.

Учитывая результаты облучения раствора аминоксилы и новые сведения литературы [11] по включению аминоксилы в сополимеры акриламида, акриловой кислоты и ее со-

лей, нами была запланирована новая серия опытов для выяснения возможных новых составов геля. В результате опытов были получены разные гелепрепараты при облучении доз 80–160 крад. Серию опытов проводили по ортогональному дробнофакторному плану 2^3 . Варьируемые показатели и вызванные ими главные эффекты приведены в табл. 3. В опытах применялась реакционная смесь, в которую в качестве компонентов входили: раствор мономеров общей концентрацией 15%, раствор фермента с активностью 420 Е/мл, раствор α -аланина концентрацией 0,5% и концентрацией 0,2%, соответственно по плану опытов добавляли разные добавки.

Т а б л и ц а 3

Главные эффекты для опыта по изучению влияния разных добавок на эффективность иммобилизации

Измен. компоненты	Уровни, %		Главные эффекты	
	-	+	по выходу активнос- ти	по эффектив- ности иммоби- лизации
Аскорбиновая кислота	0	I	-II	-32I,5
Цистеин	0	0,00I	+0,72	+39,5
Акрилат натрия	0	I	-2,75	-109,9
Аскорб.кислота и цистеин	0,00I	I	+2,2	+9,0
Концентрация фермента	0,2	0,6	-6,5	+27,9

В качестве коэффициента эффективности иммобилизации был применен производным $A_0 \cdot \%$. Результаты, приведенные в таблице 3, показывают, что из варьируемых добавок положительный эффект достигается только добавлением цистеина.

На основе проведенных опытов, которые проводили с целью найти возможности улучшения свойства геляцилазы, можно сделать вывод, что первоначально рекомендованные нами компоненты α -аланин и ангидрид итаконовой кислоты отсекаются до сих пор самыми хорошими при применяемых нами условиях получения геляминоацилазы, при которых получают препараты с выходом активности 30–35%.

Работа выполнена под руководством А. И. Кёстнера.

Л и т е р а т у р а

1. Т о с а, Т., Ч и б а т а, И., С а т о, Т. Preparation and industrial application of immobilized aminoacylase. - Fourth Int. Ferment. Symp. Kyoto, 1972, 73-74.
2. J o h a n s e n, B., S y h r e, R., B e r g e r, R. Resolution of racemic acyl-amino acids-C¹⁴ by water-insoluble hog kidney acylase. - I. Labelled Compounds, 1972, vol. 8, nr. 3., p. 475.
3. Т о с а, Т., М о р и, Т., Ф у с е, Н. Studies on continuous enzymes reactions. III. - Enzymologia, 1967, 32, 153.
4. Т о с а, Т., М о р и, Т., Ч и б а т а, И. Studies on continuous enzymes reactions. VI. - Agr. Biol. Chem., 1969, 33, 7.
5. Y o k o t e, Y., F u j i t a, M., S h i m u r a, S., N o g u c h i, S., K i m u r a, K., S a m e j i m a, H. Immobilized aminoacylase on porous glass beads. - Agr. Biol. Chem., 1975, vol. 39, 8.
6. М о р и, Т., С а т о, Т., Т о с а, Т. Studies on immobilized enzymes, X. - Enzymologia, 1972, 43, 4.
7. К а w a s h i m a, К., У м е d a, К. Immobilization of enzymes by radiopolymerisation of monomers. - Biotechnol. Bioeng., 1975, 17, 4.
8. К а w a s h i m a, К., У м е d a, К. A method for preparing bead shaped immobilized enzyme. - Agr. Biol. Chem., 1976, 40, 6.
9. К а w a s h i m a, К., У м е d a, К. Immobilization of enzymes by the radiopolymerization of acryl amide. - Improv. Food Quality Irradiat., Vienna, 1974, p. 119.
10. К а л ь ю л а Х., К ё с т н е р А. Включение аминоацилазы в полиакриламидный гель радиополимеризацией. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 402, 1976, с. 9-14.
11. К а w a s h i m a, К., У м е d a, К. A method for preparing bead shaped immobilized enzymes. - Agr. Biol. Chem., 1976, vol. 40, 6.

Immobilization of Aminoacylase in Polyacryl-
amide by Radiopolymerization

Summary

A simple method for aminoacylase immobilization by radiopolymerization of acrylamide has been proposed. For this purpose enzyme-monomer solutions were irradiated with a different dose of 30 krad to 334 krad at 0 °C. The influence of dose on the enzyme activity and properties of immobilized enzyme was investigated. The best results were obtained by irradiation with a dose of 60 - 85 krad. To increase the enzyme activity retention in the gel the influence of some possible ingredients has been investigated.

ОПЕРАЦИОННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ
ПРОТЕАЗ

Анализ эффективности применения иммобилизованных ферментов показывает, что процесс получения этих катализаторов должен быть оптимизирован с учетом условий их применения [1]. При оптимизации процесса получения иммобилизованных ферментов в качестве коэффициента эффективности принята E_A

$$E_A = A_0 \cdot \gamma \cdot t_{1/2}, \quad (1)$$

где A_0 — начальная рабочая активность иммобилизованного фермента;

γ — коэффициент сохранения активности;

$t_{1/2}$ — полупериод работы иммобилизованного фермента (время полуинактивации).

Определение параметров A_0 и γ не представляет трудностей. Более сложным является вопрос определения полупериода работы иммобилизованного ферментного препарата.

Полупериод работы препарата зависит от многих факторов. Наряду со свойствами конкретного препарата значительное влияние оказывают условия работы препарата, в том числе тип реактора.

В данной работе определены полупериоды работы некоторых препаратов иммобилизованного панкреатина и химотрипсина с помощью специальных опытов, а также при проведении гидролиза казеина в колонке и в реакторе периодического действия с активным ротором.

Материалы и методы

В работе исследовались разные образцы иммобилизован-

ных препаратов панкреатина и химотрипсина, полученные в нашей лаборатории ковалентным привязыванием к обработанным поликонденсационными смолами пористому неорганическому носителю (силохром СХ-1,5 производства Горьковского опытного завода ВНИИПН). Имобилизация ферментов на модифицированных полимерами носителях описана нами ранее [2]. Основные показатели использованных препаратов приведены в табл. I. В дальнейшем нумерация препаратов соответствует таблице I.

Т а б л и ц а I

Исследованные препараты иммобилизованных протеаз

№ пре- парата	Фермент	Активная груп- па носителя	Характеристики иммобилизации	
			A_0 , Е/г	δ
1.	Химотрипсин	n-бензохинон	28,4	0,12
2.	Панкреатин	n-бензохинон	20,1	0,24
3.	Панкреатин	n-бензохинон	9,7	0,12
4.	Панкреатин	n-бензохинон	13,3	0,19
5.	Панкреатин	n-бензохинон	12,2	0,31
6.	Химотрипсин	циан	21,6	0,07
7.	Панкреатин	циан	14,1	0,26
8.	Химотрипсин	изоцианат	24,0	0,15
9.	Панкреатин	изоцианат	19,2	0,16

Протеолическую активность препаратов определяли по модифицированному методу Ансона на 2%-ном растворе казеина по ранее описанной методике [2].

Полупериод работы препаратов определяли в колонках или в реакторах перемешивания. Для определения колоночным методом в ряд колонок (обычно 8) с размерами 0,5x10 см поместили по 1 г изучаемого препарата и через все колонки при 30° одновременно пропускали раствор 2%-ного раствора казеина со скоростью 0,2 мл/мин. Через определенные промежутки времени колонки одну за другой выключали из работы. После промывки препарата боратным буфером с pH 8,0 активность его определяли стандартным способом.

Для вычисления значений полупериода работы препаратов в т.н. рабочих условиях использовались выявляемыми в таких условиях активностями препаратов. При проведении гидролиза 2%-ного раствора казеина с рН 8,0 в колонке, содержащей около 10 г иммобилизованного фермента, гидролизат соби- рали по отдельным фракциям и по содержанию в них неосаж- даемого ТХУ белка в течение 24 часов работы колонки вычис- ляли выявляемую активность препарата.

В случае применения реактора периодического действия с загруженным в ротор ферментом (т.н. реактор с активным ротором) одной порцией иммобилизованного фермента проводи- ли 10-20 пятичасовых циклов гидролиза 2%-ного раствора ка- зеина с рН 8,0. В каждом цикле по приросту неосаждаемого ТХУ белка определяли скорость гидролиза (выявляемую ак- тивность препарата).

Для вычисления значения константы инактивации k и полупериода работы препарата $t_{1/2}$ использовали общеизве- стные формулы (2-4) и графическим методом в координатах

$$\ln \frac{A_t}{A_0}, t \quad [3].$$

$$A_t = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

$$k = -\frac{1}{t} \ln \frac{A_t}{A_0} \quad (3)$$

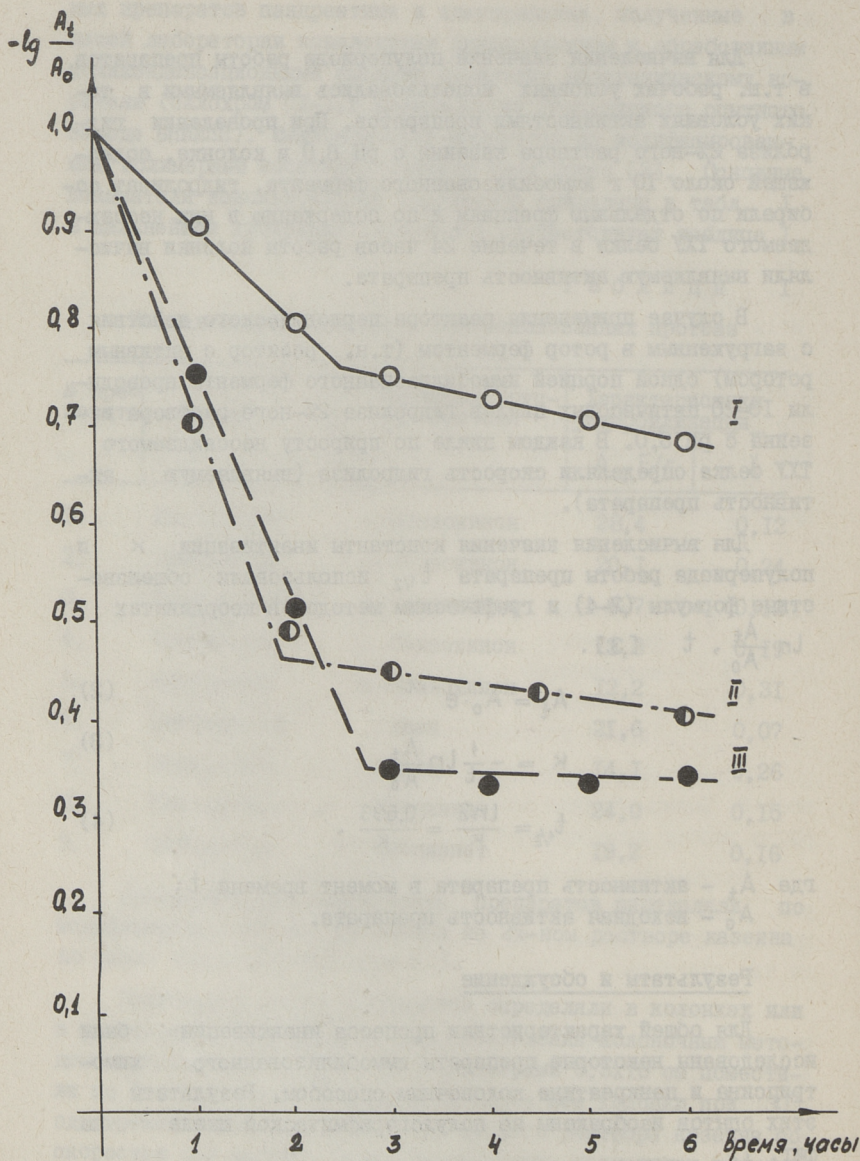
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad (4)$$

где A_t - активность препарата в момент времени t ;
 A_0 - исходная активность препарата.

Результаты и обсуждение

Для общей характеристики процесса инактивации были исследованы некоторые препараты иммобилизованного хими- трипсина и панкреатина колоночным способом. Результаты этих опытов изображены на полулогарифмической шкале на фиг. I.

Из фиг. I вытекает, что как в случае многих ферментов, так и иммобилизованных препаратов панкреатина и химотрипси-



Фиг. 1. Изменение активности препаратов иммобилизованных протеаз. Характеристика препаратов приведена в таблице 1.

- 1 - преп. № 1
- 11 - преп. № 2
- 111 - преп. № 6

на, в первые часы работы наблюдается резкое падение активности, которое в дальнейшем значительно уменьшается. Процесс описывается двумя пересекающимися прямыми, что дает основу говорить о присутствии в изучаемых препаратах не менее двух фракций с различной стабильностью.

При обнаруживании в препарате иммобилизованного фермента двух фракций (т.н. лабильной и стабильной) процесс получения иммобилизованного фермента оптимизируется по коэффициенту эффективности E'_A , выраженному по уравнению (5) [1].

$$E'_A = A_0 \cdot B_1 \cdot \gamma \cdot t'_{1/2},$$

где B_1 - доля стабильной фракции;

$t'_{1/2}$ - полупериод работы стабильной фракции.

По вышеописанной методике с применением ряда колонок нами определялись полупериод работы и содержание т.н. лабильной и стабильной фракций для некоторых препаратов иммобилизованного химотрипсина и панкреатина. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Стабильность некоторых препаратов иммобилизованного химотрипсина и панкреатина при контакте с казеином

№ преп.	Лабильная фракция		Стабильная фракция		Эффективность, E'_A
	содержание, %	$t'_{1/2}$, часы	содержание, %	$t'_{1/2}$, часы	
1	56,5	7,75	43,5	116,0	172
2	83,0	0,83	17,0	276,0	226
6	78,0	3,15	22,0	900	299

Как показывают представленные данные, полупериод работы стабильной фракции превышает в несколько десятков, а иногда даже в сотни раз полупериод работы лабильной фракции. А это значит, что практическое значение при изучаемых препаратах имеет именно содержание стабильной фракции. Поэтому в дальнейших опытах нами была определена

только доля стабильной фракции и вычислен полупериод ее работы.

Вычисленные по уравнению (5) значения коэффициента эффективности иммобилизации E'_A оказались довольно близкими и на основе их нельзя предпочитать того или другого метода привязывания.

Кроме специальных опытов определения полупериода работы, проведенных методом ряда колонок, для некоторых препаратов полупериоды работы вычисляли по данным их применения для гидролиза 2%-ного раствора казеина или в реакторе, снабженном активным ротором или в колонке. Результаты этих опытов приведены в таблице 3.

Т а б л и ц а 3

Операционная стабильность иммобилизованного
панкреатина и химотрипсина

№ преп.	Тип реактора	Содержание стабильной фракции, %	$t'_{1/2}$, час	E'_A
3	роторный	II	325	42
7		6	233	63
4	колонка	I6	50	20
5		60	70	159
8		10	35	13
9		63	II	21

По данным таблицы 3 полупериоды работы стабильной фракции препаратов иммобилизованных протеаз в роторном реакторе и колонке сильно отличаются.

Действительно, условия определения выявляемой исследуемым препаратом активности значительно отличаются в случае применения колонки или роторного реактора. При проведении гидролиза в реакторе с роторной мешалкой после каждого цикла препарат промывался буферным раствором и хранился в холодильнике до следующего цикла применения. Выявляемую препаратом активность определяли по увеличению неосаждаемых ТХУ пептидов в первом получасе гидролиза, т.е. при незначитель-

ном содержании продуктов, обладающих ингибирующим действием. Таким путем, условия определения активности оказались близкими к т.н. стандартным условиям определения активности. При проведении гидролиза казеина в колонке препарат в течение 24 часов работал в условиях сильного ингибирования и выявляемая препаратом в таких условиях активность составляет не больше 30-35% от его активности в стандартных условиях.

Но различия в условиях определения выявляемой активности не могут оказать влияния на стабильность препаратов.

Немаловажным в случае длительной работы препарата в колонке является его закупоривание мелкими частицами казеина, уменьшающими выявляемую активность иммобилизованного фермента.

Хотя значительные различия в эффективных полупериодах работы препаратов, определяемые в реакторе перемешивания и непрерывно работающей колонке, окончательно не выяснены, мы предполагаем, что в колонках поверхностные слои катализатора покрываются нерастворимыми остатками от субстрата. В реакторах перемешивания в ходе работы частицы фермента являются в подвижном состоянии, а после окончания рабочего цикла подвергаются промывке буферным раствором и, таким образом, не покрываются слоем нерастворимых частиц субстрата. В случае определения полупериода работы препарата т.н. методом ряда колонок возможное закупоривание зерен иммобилизованного фермента в стадии промывки и определения активности устраняется.

Заключение

Экспериментально определены полупериоды работы некоторых препаратов иммобилизованного панкреатина и химотрипсина. Обнаружено присутствие в изучаемых препаратах не менее двух фракций с разной стабильностью. При этом полупериод работы стабильной фракции превышает в несколько десятков, а иногда даже в сотни раз полупериод работы лабильной фракции.

Полупериод работы иммобилизованного ферментного препарата явно зависит от условий работы, в том числе от типа реактора.

Работа выполнена под руководством А. И. Кёстнера.

Л и т е р а т у р а

1. Кёстнер А.И. Принципы оптимизации процесса иммобилизации ферментов для получения технологических катализаторов. Тезисы II Всесоюзного симпозиума по получению и применению иммобилизованных ферментов. г.Абовян, 1977, с. 14-16.

2. Киппер Х.Я., Эрин А.Э., Егоров Х.Я. и др. Получение активированных изоцианатами кремнеземных носителей для иммобилизации ферментов. - "Тр. Таллинск.политехн. ин-та", № 402, 1976, с. 21-28.

3. Березин И.В., Клёсов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. Изд. Московского университета, 1976, с. 17-18.

A. Erin, M. Kreen

The Operational Stability of Immobilized Proteases

Summary

Pancreatic complex proteases and chymotrypsin have been bound to polymer coated porous siliceous carriers and the obtained preparations investigated in 2 % casein solution. The inactivation kinetics appropriates the supposed existence of several enzyme fractions with different stability. The apparent characteristics (amount and activity decay constant) of the most stable fraction strongly depend on operation conditions. In the optimal cases satisfactory half-life times up to 900 hours have been observed. However, casein solutions usually speed up the activity decay processes.

М. О. Мандель, Э. Э. Лепп, Э. Х. Сиймер

ВЛИЯНИЕ МОНОМЕРОВ НА ПЕНИЦИЛЛИНАМИДАЗУ ПРИ ВКЛЮЧЕНИИ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ

Пенициллинамидаза (ИПА), иммобилизованная в полиакриламидном геле нашла широкое практическое применение при производстве 6-аминопенициллановой кислоты – полупродукта на синтезе новых производных пенициллинов [1]. Эффективность применения катализатора зависит главным образом от удельной активности, а также от ферментативной и механической стабильности препаратов. Некоторые факторы, влияющие на вышеперечисленные эксплуатационные свойства ИПА, обсуждались в статьях [2, 3]. В настоящей работе рассматривается влияние мономеров полиакриламидного геля – акриламида (АА) и метиленбисакриламида (Бис-АА) на свойства ИПА.

Исходные вещества и применяемые методы

Для иммобилизации пенициллинамидазы (ПА) применялся ферментный препарат из *E coli* НРА – 3/5 [4]. Фермент производили на Рижском заводе медпрепаратов извлечением ПА из клеток микроорганизма и осаждением после очистки активного белка сульфатом аммония, высушивали. Удельная активность ферментного порошка 30–60 Е/мг сухого вещества или 200–250 Е/мг белка. В работе применялся водный экстракт порошка с активностью 20000–25000 Е/мл.

Получение ИПА было осуществлено методом [5] блочной полимеризации акриламида (АА) и метиленбисакриламида (Бис-АА) в присутствии модификаторов в растворе ПА под действием окислительно-восстановительных инициаторов надсерникозислого аммония и тетраметилэтилендиамина. Грануляция блока геля проводилась продавливанием его через металли-

ческое сито с размерами отверстий от 0,4 до 0,063 мм. Моделльные образцы ИПА синтезировали варьированием общей концентрации мономеров от 10 до 30%, а относительной концентрации Бис-АА от 9,0:1,0 до 9,95:0,05 соответственно АА:Бис-АА.

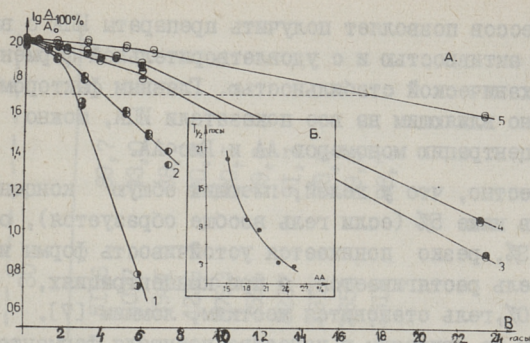
Активность ПА и ИПА определялась при pH 7,0 и при температуре 40° в присутствии 0,1 КСl титрованием освобожденной фенолуксусной кислоты с 0,01 М NaOH на pH-стате. Эксперимент определения активности проводился следующим образом: к раствору бензилпенициллина в термостатируемой 15 мл ячейке добавляли 0,01-0,1 г ИПА (конц. 1-10 Е/мл), устанавливали нужный pH и начинали запись кривой титрования. Активность выражалась в микромолях фенолуксусной кислоты на грамм влажного препарата ИПА (или на мл ПА), образовавшейся в течение часа.

Стабильность ИПА выражалась в % от остаточной активности после инкубации препаратов при pH 7,5 в 0,1 М фосфатном буфере и температуре 40° в течение 24 часов.

Результаты и их обсуждение

В полимеризационной смеси, где одновременно находятся ферментный белок, мономеры и остальные составные компоненты геля, происходят сложные химические процессы, которые приводят к образованию иммобилизованной в шитом полиакриламидном геле пенициллинамидазы. Среди химических процессов, влияющих на качество синтезируемой ИПА, следует отметить, в первую очередь, реакцию глутарового альдегида с акриламидом [6], а также с ферментным белком, вследствие чего образуется "суперполимер", который с трудом фильтруется из решетки матрицы в ходе применения препарата. Необходимо отметить, что эти же компоненты, атакуя активный центр, вызывают потери активности до образования полимера и таким образом снижается эффективность иммобилизации.

В ходе образования полиакриламидного геля выделяется значительное количество тепла (18,6 ккал/моль акриламида), вследствие чего увеличивается температура реакционной смеси до 20-25° при синтезе ИПА с 10%-ным содержанием мономеров. Только глубокое понимание сущности всех перечислен-

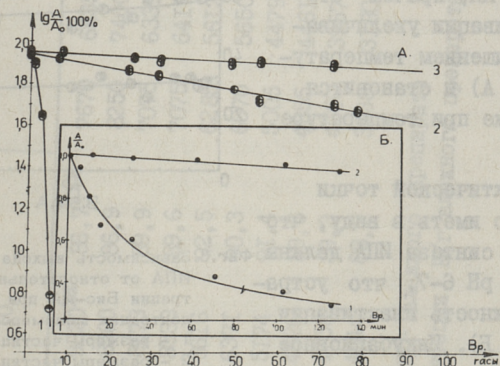


Фиг. 1. Влияние АА на активность ПА при pH 6,0 и 25°C

А. Зависимость активности ПА от времени инкубации от концентрации АА

- 1 - концентрация АА - 25,0%
- 2 - концентрация АА - 23%
- 3 - концентрация АА - 20%
- 4 - концентрация АА - 18%
- 5 - концентрация АА - 15%

Б. Время полуинактивации ПА от концентрации акриламида



Фиг. 2. Зависимость активности ПА от температуры реакционной среды в присутствии 9% АА, 1% Бис-АА, 2% глутарового альдегида и 1% тетраметилэтилендиамина.

А. Влияние температуры

- 1 - температура среды - 25°C
- 2 - температура среды - 30°C
- 3 - температура среды - 40°C

Б. Влияние pH среды

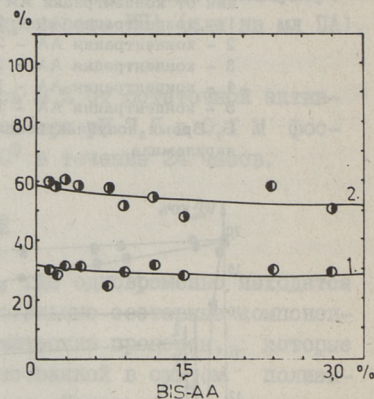
- 1 - pH - 6,0
- 2 - pH - 9,2

ных процессов позволяет получить препараты ИПА с высокой удельной активностью и с удовлетворительной ферментативной и механической стабильностью. Главным фактором, одновременно влияющим на все показатели ИПА, можно считать концентрацию мономеров АА и Бис-АА.

Известно, что у гелей, имеющих общую концентрацию мономеров ниже 5% (если гель вообще образуется), особенно ниже 3%, резко понижается устойчивость формы и упругость, гель растягивается, а при концентрациях, превышающих 20%, гель становится жестким, ломким [7]. Такие препараты не пригодны в качестве носителя ферментов для практических целей. Они либо легко разрушаются в реакторах с перемешиванием или сжимаются в реакторах колонночного типа.

Умеренное увеличение концентрации одного из мономеров (фиг. 1), например АА, приводит к резкому снижению активности ПА, причем степень инактивации увеличивается с повышением температуры (фиг. 2 А) и становится заметным уже при температуре 40°.

С практической точки зрения надо иметь в виду, что компоненты синтеза ИПА должны обеспечить рН 6-7, что устраняет возможность инактивации ПА (фиг. 2 Б). Инкубационное время (т.е. время начала гелеобразования) после добавления инициаторов полимеризации зависит в общем от концентрации инициаторов [7], а также от температуры исходной смеси. Однако увеличение общей концентрации мономеров (до 3 раз) повышает вязкость раствора и приводит к уменьшению (до 5 с) времени начала гелеобразования. Уменьшение Бис-АА в препаратах ИПА приводит, как правило, к уменьшению времени начала гелеобразования (табл. 2), но чрезвычайно низ-



Фиг. 3. Зависимость выхода активности ИПА от относительной концентрации Бис-АА при общей концентрации мономеров 30%
1 - размеры частиц до 0,4 мм
2 - размеры частиц до 0,063 мм

Удельная активность и стабильность препаратов ИША (размеры частиц 0,063 мм)

№ п.п.	Относит. конц. Бис-АА, %	Общая концентрация мономеров, %		И	Х	XX	XXX	7670	6635	86,5	5782	5186	89,7
		10	20										
1	10	10750 ^Х	9320 ^{XX}	86,7	XXX								
2	7,5	980 ^У	8500	86,9				8250	7400	89,7	6533	6077	93,0
3	5,0	9091	8173	89,9				7075	6339	89,6	4493	3981	88,6
4	4,0	9300	8333	89,6				7075	6417	90,7	4681	4236	90,5
5	3,0	7369	8616	92,5				6285	5612	89,3	4210	3793	90,1
6	2,5	7055	6371	90,3				6370	5650	88,7	4012	3595	89,6
7	1,5	5661	5174	91,4				5005	4479	89,5	3530	3237	91,7
8	1,0	5503	4926	89,5				4855	4461	85,7	3290	2915	88,6
9	0,75	5328	4758	89,3				4250	3957	93,1	2973	2655	89,3
10	0,5	5461	4844	88,7				3538	3180	89,9	2617	2319	88,7

X Исходная активность, Е/г влажного препарата

XX Активность после инкубации, Е/г влажного препарата

XXX Стабильность, %

кие концентрации сшивателя резко увеличивают время начала гелеобразования и образуются очень мягкие студенистые препараты ИПА.

Т а б л и ц а 2

Показатели препаратов ИПА (общее содержание мономеров 10%)

№ п. п.	Относит. концентр. Бис-АА	Время начала гелеобразования, с	Относит. весовое увеличение ИПА, %	Сухие вещества, %	Относительное уменьшение содержания сухих веществ, %
1	10	180	100,0	13,6	100,0
2	7,5	115	103,6	12,0	113,3
3	5,0	92	112,7	11,9	114,3
4	4,0	76	114,3	10,9	124,8
5	3,0	70	120,7	9,6	141,7
6	2,5	64	124,3	9,3	146,2
7	1,5	55	148,2	7,2	188,9
8	1,0	68	181,3	5,2	261,5
9	0,75	145	200,8	4,9	277,6
10	0,5	240	251,4	4,4	309,1

Данные о влиянии концентрации АА и Бис-АА на активность и стабильность ИПА сосредоточены в таблице 1. Постепенное уменьшение выявляемой активности ИПА за счет увеличения общей концентрации мономеров, объясняется ин-активирующим действием компонентов ПААГ, а также изменением средней пористости матрицы фермента, вызывающим заметное увеличение диффузионного сопротивления продуктов и субстрата в ходе ферментной реакции.

Несмотря на то, что уменьшение Бис-АА сопровождается уменьшением активности ИПА, выход связанной с матрицей ПА (фиг. 3) остается почти постоянным.

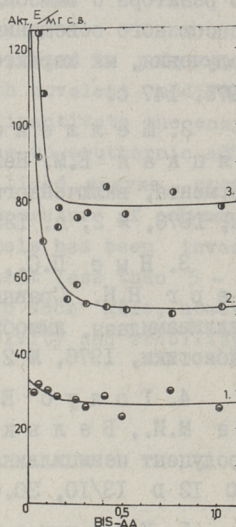
Анализируя данные таблиц 1 и 2, можно заключить, что уменьшение концентрации Бис-АА резко повышает водопогло-

шающую способность препаратов ИПА. Объемные увеличения ИПА достигаются до 250% (в случае 10% геля) от исходной величины, а увеличение выхода препаратов ИПА сопровождается одновременным уменьшением содержания сухих веществ до 310% от исходной величины. Таким образом, можно утверждать, что уменьшение активности полностью вызвано влиянием общей концентрации мономеров (главным образом АА). Перерасчет активности на сухие вещества катализатора (фиг. 4) указывает на незначительную роль Бис-АА при получении препаратов ИПА. Только чрезвычайно низкие концентрации сшивателя полиакриламидного геля могут вызвать изменение активности ИПА, но не влияют на стабильность катализатора (табл. I), т.е. вымывание ферментного белка из катализатора.

Выводы

1. Установлено, что при иммобилизации пенициллинамидазы в полиакриламидный гель механическое включение сопровождается с ковалентным связыванием молекул фермента с помощью глутарового альдегида между собой и с матрицей. Увеличение пористости матрицы, достигаемое уменьшением концентрации сшивателя, не приводит к вымыванию фермента из катализатора и к снижению ферментативной стабильности.

2. Выявлено, что потери активности в ходе иммобилизации пенициллинамидазы объясняются инактивирующим действием компонентов полимеризации, главным образом акриламида на фермент.



Фиг. 4. Влияние концентрации АА и Бис-АА на активность ИПА (в единицах на мг сухого вещества)

- 1 - общая концентрация АА и Бис-АА - 30%
- 2 - общая концентрация АА и Бис-АА - 20%
- 3 - общая концентрация АА и Бис-АА - 10%

Л и т е р а т у р а

1. Кёстнер А.И., Мандель М.О., Сиймер Э.Х. и др. Первые итоги работы опытно-промышленного реактора с иммобилизованной пенициллинамидазой. Тезисы Всесоюзного совещания "Кристаллические ферменты, методы получения, их характеристика и использование", Вильнюс, 1975. 147 с.

2. Шелленберг Н.Н., Ныс П.С., Савицкая Е.М. Некоторые физико-химические свойства фермента, включенного в полиакриламидный гель. Антибиотики, 1976, № 2, с. 125-130.

3. Ныс П.С., Савицкая Е.М., Шелленберг Н.Н. Сравнительное изучение стабильности пенициллинамидазы, иммобилизованной различными способами. Антибиотики, 1976, № 2, с. 130-136.

4. Голуб Е.И., Романова М.Б., Долгова М.И., Белькинц А.М. Штамм *E. coli* НРА - 3/5, продуцент пенициллинамидазы. Авт. свид. СССР № 512234, кл. с 12 d 13/10, 30.09.1974 (БИ 1976, № 16).

5. Кёстнер А.И., Мандель М.О., Федосеев В.Н., Сиймер Э.Х. Способ получения водонерастворимых ферментов. Авт. свид. СССР № 530885, кл. C07G7/00, 8.02.1974 (БИ 1976, № 37).

6. Reichel, R., Brager, M.D. Scanning electron microscopic observations of polyacrylamide gels. - Anal. Biochem., 1975, vol. 68, 415-428.

7. Richards, E.G., Lescanidon, R. Polymerization kinetics and properties of polyacrylamide gels. - Electrophores and Isoelec. Focus Polyacrylamide Gel. Berlin - New York, 1974, 16-22.

Action of Acrylamide Monomers on Penicillin
Amidase in Connection with Gel Entrapment

Summary

Penicillin amidase has been immobilized in polyacrylamide gel by entrapment concurrently with covalent modification. Higher acrylamide concentrations inactivate the enzyme especially at elevated temperatures. Due to exothermic effect of acrylamide polymerization the immobilized enzyme properties strongly depend on the initial temperature of polymerization mixture. Entrapment in different gels has been investigated. Gels containing cross-linking agent less than 5 - 10 rel. % swell strongly. Immobilization in such gels, however, yields preparations of satisfactory activity and stability.

М. К. Фриеденталь, Э. Х. Сиймер,

ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ПРИМЕНЕНИЕ
ИМОБИЛИЗОВАННЫХ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ
ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Сообщение I

Свойства сычужного препарата ВНИИМС

Сычужный фермент (реннин, химозин ЕС 3.4.23.4) широко применяется в сыроделии. В связи с дефицитом и высокой себестоимостью сычужного фермента телячьего сычуга в настоящее время интенсивно ведутся исследования в двух основных направлениях.

Во-первых, усилия направлены на изыскание дешевых и недефицитных заменителей сычужного фермента, которые по своему действию на молоко имели бы свойства, близкие к сычужному ферменту. В связи с этим рассматриваются возможности получения молокосвертывающих ферментных препаратов из желудка птиц и некоторых животных, а также из высших растений [1,2]. Интенсивно ведутся опыты по изучению свойств бактериальных и грибных препаратов [3,4,5]. Существует мнение, что микробиальные препараты, коагулирующие молоко, могут быть полноценными заменителями сычужного фермента. Но известно, что при использовании заменителей ферментных препаратов телячьего сычуга сыр приобретает горький вкус, нехарактерный данному продукту, обусловленный неспецифическим превращением казеиновых фракций и созданием неблагоприятных условий для жизнедеятельности бактериальных протеаз.

Во-вторых, изучаются возможности более эффективного

использования сычужного фермента, что достигается внедрением двухстадийного процесса свертывания молока [6] или применением иммобилизованных, нерастворимых ферментных препаратов. Последняя, в принципе, самая кардинальная возможность устранения дефицита в химозине, до сих пор изучалась явно недостаточно и без практических результатов. Иммобилизация сычужного фермента открывает возможность для его многократного использования, значительно уменьшая расходы на фермент. Естественно, исключается возможность развития ложных процессов, сопутствующих образованию сгустка и созреванию сыра, характерных для большинства известных в настоящее время заменителей химозина.

В 1977 г. на кафедре технологии пищевых продуктов Таллинского политехнического института начаты исследования в области иммобилизации сычужного фермента. Комплекс работ охватывает широкий круг проблем и экспериментов. Необходимо тщательное изучение свойств сычужного фермента до и после иммобилизации, чему в значительной степени препятствует неполная разработка методов исследования и различные противоречивые мнения о механизме действия сычужного фермента на молочные белки. Изучение свойств нативного фермента, очевидно, способствует обоснованному выбору методов и условий иммобилизации. Опубликованные до сих пор данные об иммобилизации химозина свидетельствуют о том, что эмпирический подход к процессу иммобилизации не гарантирует получения активных и стабильных препаратов. Наши работы также носят явно прикладной характер, и после разработки подходящих методов иммобилизации сычужного фермента предусмотрено конкретное решение технологических вопросов.

В настоящей статье приводятся первые результаты исследования свойств сычужного препарата ВНИИМС. Так как некоторые методы исследования свойств фермента в настоящее время находятся в стадии разработки, в данной работе ограничиваются результатами классического определения свертывания молока под действием препарата в различных условиях.

Материалы и методы

В качестве ферментного препарата^х использовали промышленный препарат ВНИИМС, который соответствует техническим условиям ТУ 49211-72. Препарат поставлял Завод сычужного фермента г.Москвы.

В качестве субстрата использовали свежее пастеризованное цельное молоко Таллинского комбината молочных продуктов с содержанием жира 3,2%. рН молока регулировали в случае необходимости добавлением малого количества 10%-ного раствора HCl при интенсивном перемешивании.

Активность препарата определяли по времени свертывания молока и отмечали в единицах, выражающих количество молока, свертывающегося под действием одной весовой единицы фермента в течение 40 мин. при температуре 35°C (ОСТ 49-78-75).

Для определения активности сычужного препарата в стакан емкостью 150 мл пипетировали 50 мл молока рН = 6,4 и выдерживали при температуре 35°C в течение 10 мин. Затем добавляли 1 мл ферментного раствора, содержащего 10-20 мг ферментного препарата, перемешивали, включили секундомер и фиксировали момент начала свертывания молока. По времени створоживания вычисляли сычужную активность по формуле:

$$A = \frac{40}{\tau} \times \frac{V}{g}, \quad (I)$$

где A — активность ферментного препарата;

τ — время начала свертывания молока, мин;

V — объем створоженного молока, мл;

g — количество добавленного ферментного препарата, г.

Препарат ВНИИМС при 35°C и рН = 6,4 имел активность около 80 000 ед.

^х Сычужный порошок часто называют сычужным ферментом. Такое наименование неточно, так как препарат содержит различные протеолитические ферменты кроме химозина (реннина), содержащиеся в сычуге, и поэтому было бы правильнее называть его не ферментом, а ферментным препаратом или сычужным порошком.

Результаты и обсуждение

Исследовалась зависимость активности препарата ВНИИМС от температуры, рН молока и от концентрации некоторых солей, добавляемых к молоку, а также от концентрации самого фермента в системе.

Выяснилось, что длительность свертывания молока практически обратно пропорциональна количеству добавляемого ферментного препарата в пределах количества фермента 0 - 1 г на 1 л молока. Эта зависимость общеизвестна и является, конечно, также основой уравнения (I) при определении активности. В другой интерпретации этот факт означает, что в названных пределах концентрации фермента активность препарата не зависит от его концентрации.

Свертывания молока при температурах ниже 20°C под действием химозина практически не происходит, а с повышением температуры в пределах 20-50° ускоряется. Понижение скорости свертывания при более высоких температурах обусловлено денатурацией ферментов, но, видимо, также физико-химическими изменениями в молоке. В таблице I приведены относительные скорости свертывания молока под действием препарата ВНИИМС в зависимости от температуры. Во всех опытах к 50 мл молока добавляли 20 мг препарата в виде раствора.

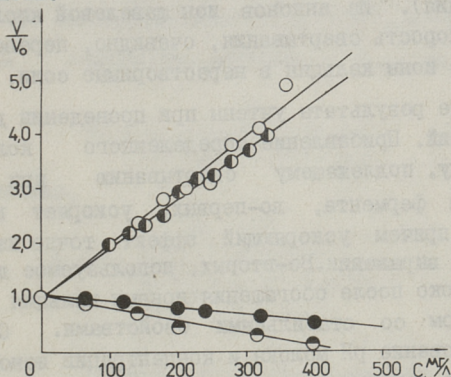
Т а б л и ц а I

Зависимость относительной скорости свертывания
молока от температуры

Температура, °C	Относительная скорость свертывания
24	0,25
30	0,46
35	0,66
45	1,00
55	0,83
60	не свернулось

При определении рН-зависимости сычужного препарата больший интерес представляет диапазон рН = 6...7, что соответствует действительному значению рН и применяется в сыроделии.

Скорость свертывания молока под действием сычужного препарата ВНИИМС значительно зависит от концентрации водородных ионов. В зависимости от исследованных проб, при понижении pH молока от 6,8 до 6,4 скорость свертывания увеличивается 3,0 - 3,8 раза, в среднем, в 3,44 раза. Следовательно, скорость свертывания приблизительно пропорциональна концентрации водородных ионов на степени 1,34. В сырделии необходимое снижение кислотности молока достигается в ходе его созревания. Для лабораторной практики при изменении активности сычужных препаратов необходимо всегда знать точное значение pH или регулировать его значение до требуемой величины, что гарантирует получение сопоставляемых результатов. Это было нами далее учтено при проведении систематических опытов.



Фиг. 1. Зависимость относительной скорости свертывания молока от концентрации прибавляемых ионов при 35°C pH = 6,4 (○ - Ca⁺⁺; ● - Mg⁺⁺; ◐ - C₂O₄⁻⁻; ● - HPO₄⁻⁻).

Как известно, свертывание молока значительно увеличивается под действием CaCl₂, что широко используется в практике. Ионы кальция необходимы для завершения второй стадии свертывания, коагуляции параказеина, образующегося в первой стадии. Поэтому обязательна количественная характеристика влияния ионов кальция (а также других ионов, могущих содержаться в молоке) на скорость свертывания молока. Интересно, что на фоне довольно высокой концентрации кальция в молоке (примерно 0,1%) малые количества прибав-

ляемого иона кальция резко увеличивается скорость свертывания [7, 8]. Очевидно, только малая часть кальция в молоке существует в ионной форме.

На фиг. I показана зависимость относительной скорости свертывания молока от концентрации прибавляемых ионов. Использовались растворы солей CaCl_2 , MgCl_2 , Na_2HPO_4 и $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$. Проводились также опыты с солями NaCl и KCl , которые практически не влияли на выявляемую активность фермента.

Как видно из фиг. I, скорость свертывания молока практически линейно зависит от концентрации ионов двухвалентного металла, при котором ионы кальция и магния имеют одинаковое влияние (наклон прямой равен $0,0096 \text{ мг/л}^{-1}$ или 197 экв/л^{-1} для иона кальция). Из анионов ион шавелевой кислоты резко понижает скорость свертывания, очевидно, переводя имеющиеся в молоке ионы кальция в нерастворимые соли.

Полученные результаты учтены при проведении дальнейших исследований. Прибавление определенного количества CaCl_2 к молоку, подлежащему свертыванию при действии сычужного фермента, во-первых, ускоряет процесс свертывания, причем ускоряющий эффект точно известен в количественном выражении. Во-вторых, используемое для исследований молоко после обогащения ионами кальция становится субстратом со стабильными свойствами. Одновременное регулирование pH молока и концентрации ионов кальция позволяет в течение длительного времени использовать молоко, поставляемое комбинатом в качестве субстрата, несмотря на нестабильность его состава и кислотности.

Специальные опыты показали, что умеренное разбавление молока существенно не влияет на выявляемую активность сычужного фермента, если концентрации ионов водорода и кальция после разбавления равны их концентрации до разбавления. Следовательно, концентрация белков (казеина) в молоке относительно мало влияет на скорость его свертывания. Несмотря на это, при регулировании pH и концентрации Ca^{++} желательно добавлять кислоту и раствор CaCl_2 в количествах, составляющих не более 5% объема исследуемого молока.

На основе результатов проведенных опытов можно выяв-

ляемую активность сычужного препарата при 35° в области рН 6,2-6,8 и при концентрации прибавленных ионов кальция 0-400 мг/л (0-0,02 экв/л) представить в виде следующего уравнения:

$$A = A_0 \times [H^+]^{1,34} \times (1 + 197 \cdot [Ca^{++}]), \quad (2)$$

где A - выявляемая активность препарата в единицах ОСТ 49-78-75, мин^{-I};

A_0 - коэффициент, пропорциональный удельной активности препарата и зависящий от свойств молока л/экв.мин;

$[H^+]$ - концентрация водородных ионов, экв/л;

$[Ca^{++}]$ - концентрация прибавленных ионов кальция, экв/л.

Если при концентрациях $[H^+]_m$ ($(pH)_m = -\log [H^+]_m$) и $[Ca^{++}]_m$ определена активность A_m , то, очевидно,

$$A_0 = \frac{A_m}{[H^+]_m^{1,34} (1 + [Ca^{++}]_m)}, \quad (3)$$

и следовательно,

$$A = A_m \frac{[H^+]^{1,34} (1 + 197) [Ca^{++}]}{[H^+]_m^{1,34} (1 + 197 [Ca^{++}]_m)} \quad (4)$$

или

$$A = A_m \times 10^{1,34(-pH+(pH)_m)} \times \frac{(1 + 197 [Ca^{++}])}{(1 + 197 [Ca^{++}]_m)}. \quad (5)$$

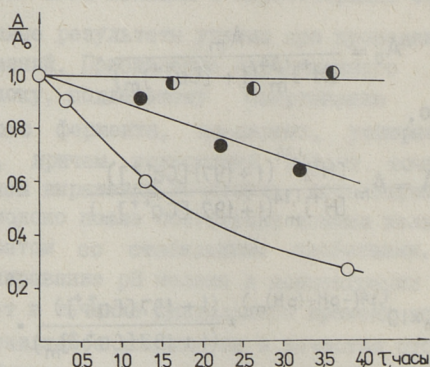
Например, если для препарата ВНИМС определена активность по створоживанию молока при $(pH)_m = 6,4$ ($[H^+]_m = 3,98 \cdot 10^{-7}$) и $Ca^{++} = 0$, равная 80000, можно вычислить активность A при других значениях рН и Ca^{++} согласно формуле (5) или вычислить значение A_0 по формуле (3) и применить для расчетов уравнение (2). В данном случае

$$A_0 = \frac{80000}{3,98 \cdot 10^{-7}} = 2 \cdot 10^{11},$$

что и является приблизительным значением A_0 для данного субстрата и ферментного препарата, но из-за непостоянности

свойств молока эта величина в некоторой степени зависит от состава, технологии получения и времени созревания молока.

Исследование сычужного ферментного препарата показало, что препарат имеет хорошую стабильность в растворах при рН 4–6,5 при комнатной или пониженной температуре. В связи с разработкой методов иммобилизации специальный интерес представляло изучение инактивации ферментного препарата от рН. Препарат хранился в ацетат-цитратных буферных растворах при 25°. Как видно из фиг. 2, препарат стабилен при рН = 6,05, относительно стабилен также в сильнокислой среде с рН 1,8 (время полураспада порядка 5 часов), но быстро инактивируется в щелочной среде. Кривая инактивации при рН 7,9 хорошо подчиняется реакции первого порядка, вычисленная константа скорости реакции инактивации равна 0,34 час⁻¹.



Фиг. 2. Изучение относительной активности сычужного препарата при температуре 25°С при хранении в буферных растворах с различным значением рН (○ - рН = 7,9; ● - рН = 6,05; ◐ - рН = 1,8).

Следовательно, выбор методов ковалентной иммобилизации сычужного препарата ВНИИМС ограничивается необходимостью проведения реакций в кислой среде, при надобности с учетом применения растворов низкого значения рН (2–3).

Авторы выражают благодарность А.Кинк, К.Веров и С.Оясуу за активное участие в экспериментальной работе.

Выводы

1. Определена зависимость активности сычужного ферментного препарата от температуры, pH и концентрации прибавленных к молоку солей.

2. Показана зависимость активности фермента от концентрации водородных ионов (в области pH 6,2-6,8) и добавленных ионов кальция (в диапазоне 0-0,02 экв/л), на основе чего выведено уравнение для расчета выявляемой активности препарата.

3. Определена стабильность препарата при хранении в зависимости от pH и выяснено, что для процесса иммобилизации целесообразно выбирать методы, гарантирующие протекание ковалентной прививки в кислых средах.

Работа выполнена под руководством А.И. Кёстнера.

Литература

1. Gupta, C.B., Eskin, N.A.M. Potential use of vegetable rennet in the production of cheese. - Food Technol., 1977, vol. 31, N 5, 62-66.

2. Sardinias, I.L. Calf rennet substitutes. - Proc. Biochem., 1976, vol. 11, N 4, 10-17.

3. Krishnaswamy, M.A., Nagaraja Rao, K.S., Sreekantiah, K.R., Mannar, M.C. Production of fungal rennet substitute for cheese making. - Journ. Food Sci. and Technol., 1976, vol. 13, N 4, 187-191.

4. Sternberg, M. Microbial rennets. - Advances in Applied Microbiology, 1976, vol. 20, 135-157.

5. Green, M.L. Review of the progress of dairy science: milk coagulants. - Journ. Dairy Res., 1977, vol. 44, N 1, 159-188.

6. Green, M.L., Crutchfield, G. Studies on the preparation of water-insoluble derivatives of rennin and chymotrypsin and their use in hydrolysis of casein and the clotting of milk. - Biochem. Journ., 1969, vol. 115, 183-190.

7. Tsugo, T., Yamachi, K. Comparison of clotting action of milk coagulating enzymes. Comparison of

factors affecting clotting time of milk. - The Intern. Dairy Congr., London, 1960, vol. 2, 636-642.

8. I v a s a k i, S., T a m u r a, G., A r i m a, K. - Agr. Biol. Chem., 1967, vol. 31, 546-551.

M. Friedenthal, E. Siimer

Preparation, Properties and Application
of Immobilized Milk Clotting Enzyme Preparatives

Part I

Properties of rennet preparative VNIIMS

Summary

The dependence of activity of rennet preparative VNIIMS on temperature, pH and concentration of salts added to milk has been determined. The activity of preparative strongly depends on hydrogen ions concentration and linearly added calcium ions concentration in the range of pH 6,2 - 6,8 which permits to use a simple equation for calculating the activity of the preparative or the clotting time of milk. The stability of rennet has been determined at various pH and a relatively good stability in acid media has been established. Consequently, for the covalent binding of rennet to carriers the solutions with pH 2 - 7 must be favored and immobilization reactions effective in acid media must be chosen.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ N-ДЕЗОКСИРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ

N-дезоксирибозилтрансфераза (транс - N - дезоксирибозилаза, КФ 2.4.2.6) катализирует перенос дезоксирибозильной группы от нуклеозида к основаниям и позволяет этим путем осуществлять ферментативный синтез нуклеозидов с заданной структурой. Препаративное использование этого фермента имеет особое значение для получения нуклеозидов из меченых оснований. В настоящее время данный фермент выделяется только в лабораторных условиях в небольших количествах и в препаративных процессах было бы целесообразно многократное применение иммобилизованной формы данного фермента. По имеющимся данным N-дезоксирибозилтрансфераза до сих пор не получена в иммобилизованном виде. Целью настоящей работы мы ставили разработку метода иммобилизации этого фермента и испытание пригодности получаемых ферментных катализаторов для многократного превращения нуклеозидов. Учитывая сравнительно небольшой молекулярный вес обрабатываемых субстратов для иммобилизации нами выбран метод включения в структуру полиакриламидного геля (ПААГ) [1, 2]. Для повышения эффективности связывания применен метод включения фермента с одновременной ковалентной модификацией [3].

Материалы и методы

Использовался препарат фермента из *E. coli*, выделенный и предоставленный нам СКТБ биологически активных веществ г. Новосибирск, с активностью 300 Е/мг. Активность фермента определялась на смеси аденин-тимидин в цитрат-фосфатном буфере при pH 6,0 и температуре 37°C. Состав реакционной смеси после инкубации с ферментом определялся хро-

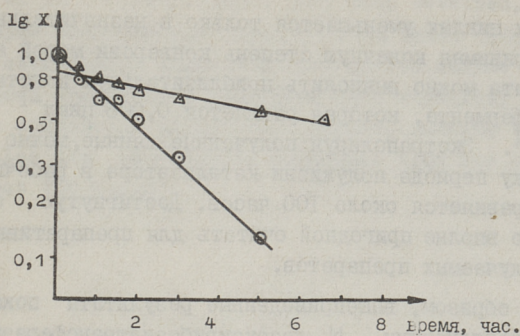
матографированием на колонке с карбоксиметилцеллюзой с последующим определением оптической плотности во фракциях при 260 нм на спектрофотометре VSU2-P. Имобилизацию фермента проводили включением в полиакриламидный гель в присутствии глутарового альдегида и других модификаторов. В опытах применялась концентрация геля 20-25% с относительным содержанием сшивающего агента 5%. Для иницирования полимеризации использовали систему из равных количеств надсернистого аммония и тетраметилэтилендиамина в пределах концентраций от 0,20 до 0,75%.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах стабильность получаемых иммобилизованных препаратов проверялась по вымыванию фермента из геля при хранении в течение 5 дней при 4°C. Результаты этих опытов показывали, что включение фермента в немодифицированный ПААГ даёт низкоактивные препараты, из которых, кроме того, большая часть (до 90%) фермента вымывается в вышеуказанных условиях.

В опытах по оптимизации процесса иммобилизации выяснилось, что только совместное действие глутарового альдегида с некоторыми другими модификаторами позволяет получить препараты с активностью до 300 Е/г, чему соответствует коэффициент сохранения активности при иммобилизации около 40%. При выдержке таких препаратов в холодильнике в течение 5 дней вымывается не больше 10-20% включенной активности. Все дальнейшие исследования были проведены именно с подобными препаратами.

Для сравнения термостабильности нативного и иммобилизованного фермента была исследована их инактивация при 50°C. Результаты этих опытов изображены на фиг. I. Анализ данных, приведенных на фиг. I, показывает, что иммобилизованный препарат может содержать до 20% менее стабильной фракции. Константа скорости инактивации стабильной фракции в условиях опыта равна 0,075 час⁻¹. Исходный ферментный препарат оказался по стабильности однородным и константа скорости инактивации равняется примерно 0,42 час⁻¹. Таким образом, при иммобилизации достигнута стабилизация

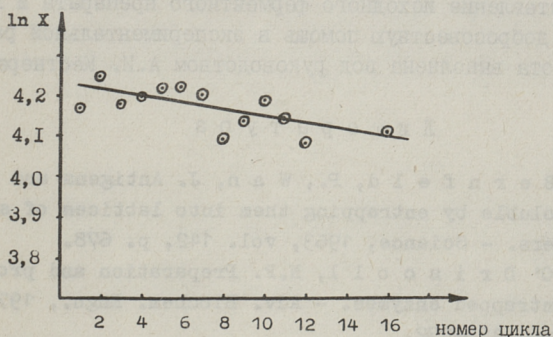


Фиг. 1. Инактивация нативной и иммобилизованной N- дезоксирибозилтрансферазы при 50°C.

X - процент сохранения активности:

○ — нативный фермент:

△ — иммобилизованный фермент.



Фиг. 2. Стабильность иммобилизованной N- дезоксирибозилтрансферазы при многократном использовании.

X - процент превращения субстрата в конце 1,5 - часового цикла.

фермента более чем в 5 раз, что следует считать довольно хорошим результатом.

Для определения операционной стабильности получаемый препарат был многократно использован для конверсии нуклеозидов при температуре 37°C, pH 6,0 с длительностью цикла 1,5 часа. Эффективность работы препарата оценивали по конечной степени конверсии субстрата. Всего было проведено 16 циклов, результаты которых изображены на фиг.2. Данные фиг. 2 показывают, что конечная степень конверсии

в повторных циклах уменьшается только в незначительной степени. Принимая конечную степень конверсии мерой активности препарата можно вычислить приблизительную константу инактивации фермента, которая равняется $0,008 \text{ цикл}^{-1}$ или $0,005 \text{ час}^{-1}$. Экстраполируя полученные данные, можно дать также оценку периода полужизни катализатора в рабочих условиях, что равняется около 100 часов. Достигнутую стабильность можно вполне пригодной считать для препаративного применения получаемых препаратов.

Таким образом, вышеприведенные результаты показывают, что при иммобилизации N-дезоксирибозилтрансферазы в модифицированный ПААГ достигнута значительная (около 5 раз) стабилизация фермента и получены препараты, пригодные для длительной работы при конверсии нуклеозидов.

Авторы выражают благодарность Т.Беляевой и С.Ефимовой за предоставление исходного ферментного препарата и Г.Пеньковой за добросовестную помощь в экспериментальной работе.

Работа выполнена под руководством А.И. Кёстнера

Л и т е р а т у р а

1. B e r n f e l d, P., W a n, J. Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into lattices of synthetic polymers. - Science, 1963, vol. 142, p. 678.

2. O' D r i s c o l l, N.F. Preparation and properties of gel entrapped enzymes. - Adv. Biochem. Engn., 1976, vol. 4, pp. 155-172.

3. Кёстнер А.И., Мандель М.О., Федосеев В.Н., Сиймер Э.Х. Способ получения нерастворимых ферментов. Авт. свид. СССР № 530885, заявл. 8.02.1974, реш. 30.07.1975. М.кл. С 07 d 7/00, С 012 d 13/10.

L. Gayevaya

Immobilized N-deoxyribosyltransferase

Summary

N-deoxyribosyltransferase has been immobilized by means of entrapment into modified 20 - 25 % polyacrylamide gel. Activity yields about 30 - 40 % and initial preparation

activity up to 300 nmole/min.g have been obtained. Immobilized enzyme inactivation rate 50 °C is about 0.075 h^{-1} which is essentially lower than for native enzyme (0.42 h^{-1}). The produced preparation exhibited good stability for nucleosides conversion in 1.5-hour cycles. Running 16 consecutive cycles its operational half-life time has been estimated about 100 hours.

С о д е р ж а н и е

1.	А.И. Кёстнер, И.И. Таммерайд. Макрокинетика иммобилизованных ферментов в случае комплексного ингибирования продуктами.	3
2.	Э.Х. Сиймер. Кинетика односубстратных ферментативных реакций.	II
3.	А.И. Кёстнер. К рН-зависимости реакции с иммобилизованными ферментами.	19
4.	К.Э. Пашпель, А.К. Куликова, А.С. Тихомирова. Дезинфекция реактора с иммобилизованной β -галактозидазой.	27
5.	Х.Я. Киппер, Х.Р. Егоров, К.А. Кивисилла. Характеристика модифицированных полимерами неорганических носителей.	33
6.	Х.Я. Арунийт. Изучение иммобилизации аминоклазы радиополимеризацией в полиакриламидный гель	41
7.	А.Э. Эрин, М.И. Креэн. Операционная стабильность иммобилизованных протеаз.	47
8.	М.О. Мандель, Э.Э. Лепп, Э.Х. Сиймер. Влияние мономеров на пенициллинамидазу при включении в полиакриламидный гель.	55
9.	М.К. Фриеденталь, Э.Х. Сиймер. Получение, свойства и применение иммобилизованных молокосвертывающих ферментных препаратов.	65
10.	Л.В. Гаевая. Иммобилизация N-дезоксирибозилтрансферазы.	75





EESTI AKADEEMILINE RAAMATUKOGU



1 0200 00082122 7

Цена 45 коп.