Ep.6.7

ISSN 0135-3549 0320-3395

TP| |83

TALLINNA
POLÜTEHNILISE INSTITUUDI
TOIMETISED

552

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ





TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.04.002.237

ХАРАКТЕРИСТИКА

ДЕЙСТВИЯ

НАТИВНЫХ

И

МОДИФИЦИРОВАННЫХ

ФЕРМЕНТОВ

Инженерная энзимология 1У

Под общей радакцией доктора техн. наук, профессора А.И. Кёстнера



CLINNA POLOTENHILISE INSTITUUDI TOIMETISED

STEEL TARBUNCHOSO BOUNTENHAPOROSO MRCTHTVTA

VEK 577,15,04,002,287

XAPAKTEPHOTHKA GEЙCTBHЯ HATHBHЫX

модифицированных ферментов



TAILINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED
TPYJH TAJJUHCKOFO NOJUTEXHUYECKOFO UHCTUTYTA

УДК 541.127.001.57:577.15

А.И. Кёстнер, Э.Х. Сиймер, И.И. Таммерайд

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ МАКРОКИНЕТИКИ ИММОВИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ГЛУБОКОЙ КОНВЕРСИИ СУБСТРАТА

По литературным источникам хорошо известно, что видимая кинетика иммобилизованных ферментов существенно отличается от истинной кинетики ферментов, связанных с матрицей. Эти различия обусловлены образованием градиентов всех реактантов (субстратов и продуктов), которые возникают внутри зерна ферментативно активного материала, а также в поверхностном слое жидкой фазы у поверхности катализатора. То обстоятельство, что внутри ферментативно активного материала, т.е. в непосредственном окружении каждой молекулы фермента концентрация всех реактантов может значительно отличаться от тех же величин в растворе, вызывает значительные изменения выявляемой активности, видимых значений кинетических констант, а также стабильности иммобилизованных ферментов. По этой причине очевидна необходимость описания диффузионной кинетики и мобилизованных ферментов.

Диффузионная кинетика иммобилизованных ферментов рассмотрена многими авторами. Мы ссылаемся только на некоторые из них [I-5], а также на свои предыдущие работы [4,5]. В этих работах рассматриваются простые кинетические модели или отдельные конкретные примеры систем со сложной кинетикой.

Нами ранее опубликованы обобщенная модель и соответствующие этой модели кинетические уравнения для односубстратных ферментативных реакций в стационарном состоянии [6]. Эти уравнения могут быть непосредственно использованы для описания кинетики реакций, катализируемых растворимыми ферментами.

В настоящей статье излагается наш подход к описанию действия иммобилизованных ферментов с помощью обобщенного кинетического уравнения.

Математическая модель

В качестве моделируемой системы рассматривается сферическое зерно ферментативно активного материала, которое однородно по активности и по диффузионным показателям. Система рассматривается в стационарных условиях. Принимается, что диффузионное сопротивление внутри зерна и сопротивление массопередачи между фазами могут иметь сравнимый эффект при образовании градиентов концентраций. Скорость ферментативной реакции в любой точке зерна описывается функцией скорости $u(\bar{X})$, в которой \bar{X} представляет собой виде алгебраического вектора все условия системы (концентрация субстрата и продуктов, а также водородных ионов, температура и т.д.). В данном случае мы исходим из упрощения, что скорость реакции зависит только от концентрации субстрата S и концентрации продуктов ферментативной реакции р (принимается, что в случае образования, например, двух продуктов их концентрации равны). То есть предполагается, что действительно определение

и что все продукты реакции имеют примерно одинаковую скорость диффузии, или на кинетику реакции действует только один продукт. В этом случае наша система может быть описана системой из двух нелинейных дифференциальных уравнений второго порядка

$$\begin{cases} D_{s} \left(\frac{d^{2}s}{dr^{2}} + \frac{2}{r} \cdot \frac{ds}{dr} \right) = u(\bar{X}) \\ D_{p} \left(\frac{d^{2}p}{dr^{2}} + \frac{2}{r} \cdot \frac{dp}{dr} \right) = -u(\bar{X}). \end{cases}$$
 (2)

Представление системы в таком виде требует, чтобы функция скорости ферментативной реакции $u(\bar{X})$ была определена соответственно концентрации реактантов

$$u = f_1(s, p)$$
. (3)

Однако наши подходы для описания кинетики позволяют представить уравнение скорости в виде

$$u' = f_2(s_t, x),$$
 (4)

где S_t обозначает начальную концентрацию субстрата.

В этом случае для применения системы (2) при условии описания правых сторон уравнений через уравнение (4) вводим понятие условной начальной концентрации субстрата S_t, которое выражается уравнением (5) и может меняться по времени и по геометрическому координату

$$S_{+} = S + p. \tag{5}$$

Степень конверсии х определяется как соотношение

$$x = \frac{p}{s_t}.$$
 (6)

Для упрощения последующих рассуждений мы вводим также понятие обобщенной концентрации реактанта с, которое в данном случае описывается логическим соотношением

$$c = s \vee p . \tag{7}$$

Для решения дифференциальных уравнений требуется определение граничных условий. Из условия центральной симметрии действительно условие (8)

$$\frac{dc}{dr}\Big|_{0} = 0. \tag{8}$$

При описании системы в условиях, когда присутствует также значительный перепад концентраций у поверхности раздела фаз, второе граничное условие принимает вид

$$\frac{\mathrm{dc}}{\mathrm{dr}}\Big|_{R} = \beta_{c} \left(c_{s} - c_{R}\right) / D_{c}. \tag{9}$$

Учитывается, что коэффициент массопередачи β_{C} пропорционален коэффициенту диффузии данного вещества, и при изменении гидродинамических характеристик системы коэффициенты массопередачи изменяются для каждого реактанта пропорционально. Для облегчения расчетов вводим коэффициент соотношения констант диффузии (10)

 $\frac{D_{p}}{D_{s}} = K_{p}. \tag{10}$

Как правило, в исследуемой нами системе молекулы субстрата больше продуктов и поэтому почти всегда $K_{\rm D} > I$. Следует отметить, что принятые граничные условия поэволяют легко рассчитывать также фактически чистую внутридиффузионную кинетику. Для этого следует только задавать довольно большое значение ${\mathfrak B}_{\rm C}$, что приводит практически к нулевым гра-

диентам концентраций при межфазной массопередаче. Для решения системы мы применяли метод Штермера [7], который довольно быстро обеспечивает незначительную погрешность решения. Метод Штермера оправдал себя полностью в наших прежних работах по математическому моделированию диффузионной кинетики ферментов. При применении метода Штермера нужно проводить замену переменных и пользоваться не абсолютными значениями концентраций, а соотношением

$$\chi_c = c/r$$
. (II)

Применение этого условия автоматически обеспечивает выполнение условия (8). Для решения системы мы задаем число точек по радиусу, равное 50, и, следовательно, шаг по радиусу h равняется

 $h = \frac{R}{50} . \tag{12}$

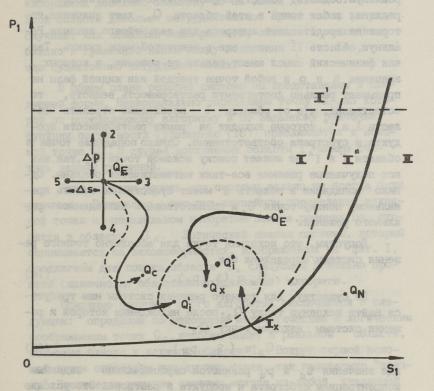
По существу, мы решаем граничную задачу, то есть определены значения $c_{\rm S}$, а остальные граничные показатели определены уравнением (9). Такие граничные условия обладают также четким физическим смыслом. Решение задачи методом Штермера требует определения начальных условий, то есть конкретной точки $Q_{\rm E}$ на абстрактной двухмерной поверхности исходных концентраций реактантов

$$Q_{F} \equiv (s_{4}, p_{4}), \qquad (I3)$$

где Q_E - значение концентрации субстрата и продукта в центре зерна.

При случайном выборе точки Q_E мы можем получить решения, которые содержат отрицательные значения концентрации p_i , что не имеет никакого физического смысла и искажает решения.

Обобщенная схема этой ситуации, а также наш подход к решению этой задачи схематически изображены на фиг. І. На этой схеме мы рассмотрим двухмерное поле первоначально заданных значений концентраций субстрата s_i и продукта p_i Логический анализ ситуации, который подтверждается цифровыми расчетами, показывает, что это поле условно делится на две области. Область І соответствует решениям, в которых не присутствуют отрицательные значения концентрации, т.е. область І представляет собой принципиально физически



Фиг. 1. Обобшенная схема поиска исходной точки для решения системы: I — область положительных решений; I', I'' — положительные решения, лишенные физического смысла; I_{χ} — искомая область удовлетворительных решений; I'' — область физически реальных решений с отрицательными значениями ρ ; Q_{χ} — искомая точка; Q_{ζ}' , Q_{ζ}'' — удовлетворительные точки; Q_{c} — точки неудовлетворительной конвергенции решений; Q_{ζ}' , Q_{E}'' — первоначальные оценки; Q_{N} — точка в нереальной области; 2, 3, 4, 5 — точки вокруг оценки ("звезда"); Δ 9, Δ P — шаги "звезды".

реальную область. Область Π физически и математически нереальна, льбая точка в этой области Q_n дает значения, которые не представляют интереса для дальнейшего анализа. Реальную область Π можно еще в некоторой мере сузить. Так как физический смысл имеют только те решения, в которых значения Π и Π в любой точке твердой или жидкой фазы не превышают реально достигаемую растворимость веществ, то естественно, что от области Π необходимо отрезать области Π и Π , которые выходят за рамки растворимости продукта и субстрата соответственно. Однако попадание точек в области Π и Π не мещает поиску искомой точки Π , так как все получаемые решения все-таки математически реальны. Однако попадание в область Π может существенно мещать правильному поиску точки Π 0 и препятствовать нахождению реального решения.

Допустим, что исходная точка для абсолютно точного решения системы определена как

$$Q_{x} \equiv (S_{x}, p_{x}). \tag{14}$$

По существу, для точного решения системы нам требуется найти исходную точку $Q_{\mathtt{D}},$ после нахождения которой и решения системы находим точку $Q_{\mathtt{x}}$

$$Q_{D} \equiv (s_{d}, p_{d}), \qquad (15)$$

где значения s_d и p_d равняются первоначально заданным концентрациям субстрата и продукта в растворе. Это условие мы можем сокращенно сформулировать как зависимость

$$Q_x \rightarrow Q_p$$
. (16)

В реальных случаях точное решение системы невозможно и практически даже не нужно. В действительности нам достаточно найти исходную точку Q_i , которая ведет к решению Q_s

$$Q_i \rightarrow Q_s$$
, (17)

в случае которого действительно неравенство

$$\varepsilon > \delta (Q_p - Q_s), \tag{I8}$$

где & - заданное значение допустимой погрешности;

б - функция определения погрешности.

Возвращаясь к схеме I, определяем, что достаточно попасть в область I_{χ} , внутри которой любые точки удовлетворяют неравенство (I8). Для наглядности на схеме область I_{χ}

изображена довольно большой, но на самом деле достижение этой области довольно затруднительно. Кроме того, в ряде случаев, как показали наши расчеты, область I_{χ} находится близко к граничной линии между областями I и II, что еще существенно затрудняет поиск.

В общем плане решение системы мы представляем в следующей форме. Первоначально определяем точку Q_i , из которой по определенному алгоритму и по заданному значению функции погрешности (уравнение (I8)) приближаются к искомой точке Q_x . В случае достижения области I_x можем считать задачу решенной.

Наши попытки решить эту систему далеко не всегда были удачными. Выяснилось, что при случайном определении исходной точки и неправильном алгоритме поиска решения не сходятся в области $\mathbf{I}_{\mathbf{x}}$. Логический анализ системы, который основывается на закономерностях, изображенных на фиг. $\mathbf{I}_{\mathbf{x}}$ предлагаем для поиска области $\mathbf{I}_{\mathbf{x}}$ следующий довольно простой (конечно, не обязательно идеальный) алгоритм.

Основные принципы этого алгоритма заключаются в следующем: определим по некоторым математическим и логическим соображениям точку Q_{ϵ} , которая лежит в реальной области, возможно близко к искомой области I_{\times} . Вокруг первой искомой точки определим ряд других точек, так называемую "звезду". Произведем решение системы, исходя из любой указанной точки. Для каждого решения определяем функцию погрешности. Точку, которая дает минимальную погрешность, принимаем как центр новой "звезды" в следующем цикле решений. В случае приближения к искомой области или критической линии раздела с нереальной областью II соответственно изменяется шаг образования звезды. Один вариант звезды, по которому мы производили расчеты, изображен на схеме фиг. I.

Для определения точки $Q_{\rm E}$ с константой скорости система характеризуется модулем Тиле

$$\lambda_{R} = R \sqrt{A \cdot D_{S} / K_{M}} . \tag{19}$$

Рассчитывая модуль Тиле также для первой точки

$$\lambda_{4} = \lambda_{R}/50 , \qquad (20)$$

можно рассчитать коэффициент уменьшения концентрации субстрата внутри зерна

$$f_{\lambda} = S0 \cdot sinn(\lambda_1) / sinn(\lambda_R).$$
 (21)

Расчет координаты по продукту проце и логическое рассуждение для условий, когда соотношение коэффициентов диффузии $\frac{D_P}{D_S} > I$, дает гарантированное по реальности значение P_{E4}

 $P_{E_1} = D_d + (s_d - s_{E_1}) / KD$. (22)

При решении уравнений на каждом шаге мы рассчитали приблизительные значения производных по радиусу (градиенты концентраций реактантов)

$$\frac{\mathrm{d}c}{\mathrm{d}r}\Big|_{r} \approx \mathrm{d}c_{1} = (c_{i} - c_{i-1})/n. \tag{23}$$

Для контроля правильности решения из логического условия пропорциональной симметрии каждой точке также была рассчитана величина Δd_i , которая при абсолютной точности решения должна равняться нулю,

$$\Delta d_i = ds_i \cdot D_s + dp_i \cdot D_p. \tag{24}$$

При расчете условий поверхностного слоя на основе граничного условия были рассчитаны значения концентраций реактантов в свободном растворе

$$c_s = c_R + dc_{so} \cdot D_c / \beta_c. \tag{25}$$

После этого можно вычислять функцию погрешности, которая в обобщенном случае выражается уравнением

$$\delta = f((s_s - s_d), (p_s - p_d)).$$
 (26)

Наши расчеты показали, что ход решений и возможность достижения удовлетворительной точки сильно зависят от формы уравнения (26). Не имея четкой теоретической основы для определения функции 5, мы воспользовались следующей функцией:

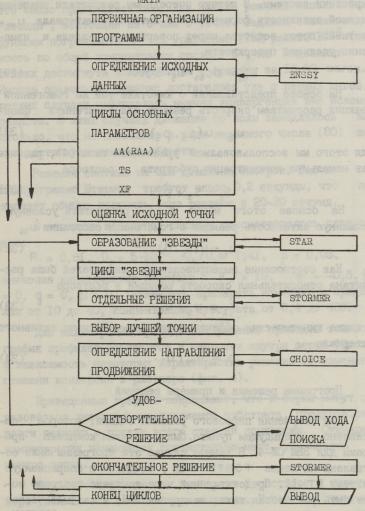
$$\delta = (p_s + s_s - s_d)^2 / (p_d + s_d) + (x_s / x_d) / c_x,$$

$$c_v > 1.$$
(27)

Мы не можем утверждать, что именно эта функция погрешности является наиболее целесообразной, но пользуясь этим уравнением, получили вполне хорошее решение системы.

При достижении условий, когда функция погрешности меньше заданной константы

$$\varepsilon \geqslant \delta((s_s - s_d), (p_s - p_d)), \tag{28}$$



фиг. 2. Упрощенная блок-схема комплекса программ для расчета кинетики:

MAIN - основная программа; ENSSY - подпрограмма определения исходных данных и их изменения с клавиатуры дисплея; STAR - подпрограмма определения координат точек "звезды"; CHOICE - подпрограмма для изменения шагов "звезды"; STORMER - подпрограмма решения системы диференциальных уравнений, а также для вывода на печать окончательного решения.

можно провести дополнительные расчеты для конечной характеристики системы. В первую очередь мы рассчитали значение видимой активности ферментативно активного материала u_m , учитывая поток вещества через поверхность раздела и изменение удельной поверхности

$$u_m = dc_{so} \cdot D_s \cdot 3/R. \qquad (29)$$

На основе представлений о кинетике той же гомогенной реакции рассчитаем скорость реакции для гомогенной фазы

$$u_s = u(s_s, p_s).$$
 (30)

Для этого мы воспользовались уравнением типа (4), рассчитав начальную концентрацию субстрата в растворе,

$$S_{+} = S_{s} + p_{s}$$
 (3I)

На основе этого можно было рассчитать условную начальную активность реакции в гомогенном состоянии u_{so}

$$u_{so} = u(s_t, 0).$$
 (32)

Как соотношение вышеприведенных показателей была рассчитана относительная скорость реакции в растворе

$$V_2 = u_5 / u_{50},$$
 (33)

а также кинетическая эффективность ферментативно активного материала

 $n = u_m/u_s. (34)$

Программа решения и примеры решений

Для получения цифрового решения задачи, которое поставлено в предыдущем пункте, был составлен комплекс программ для ЭВМ СМ-4. В данном случае эти программы были составлены на языке FORTRAN IV, входящем в операционную систему RT-II. Представленный ниже комплекс программ может быть реализован также на других ЭВМ, в математическое обеспечение которых входят развитые версии языка ФОРТРАН. Данные программы могут быть также переведены на другие высокоразвитые алгоритмические языки. Разработанный нами комплекс состоит из основной программы и трех подпрограмм. Упрощенная блок-схема комплекса приведена на фиг. 2.

Учитывая возможность конвергенции решений, в неправильной точке было ограничено также максимальное число последовательных шагов образования "звезды" (предварительно за это число принималось 80). Для поиска решений использовали "звезды", состоящие из 5 или 9 точек. Задавая значение функции погрешности $\mathfrak T$ по уравнению (18), равной 10^{-4} (точность по общей концентрации около $1\,\%$), на модельных системах достигнута конвергенция в среднем за $10\text{--}30\,$ шагов. Иногда правильное решение достигалось уже с первых шагов, в редких случаях наблюдалась мнимая конвергенция вне искомой области. В этих случаях движение по полю замедлялось настолько, что не позволило в ходе заданного числа (80) шагов достигнуть искомой области.

Решение системы на ЭВМ довольно быстрое. Расчет по подпрограмме Штермер требует около 0,2 секунды, что по-зволяет обычно получить одно решение в 20-30 секунд.

В качестве модельной системы рассматривалось следующее:

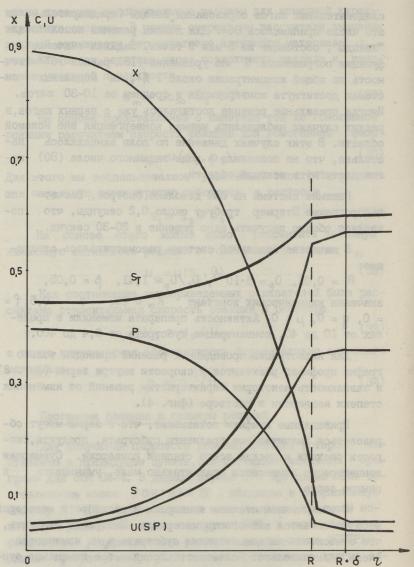
R = 0.0I, $D_p = 5 \cdot I0^{-6}$, $D_s/D_p = I.4I$, $\beta = 0.05$, значения кинетических констант $K_M = I0$, e = -0.5, f = 0, g = 0, $\mu = 0$. Активность препарата изменяли в пределах от I0 до 40, концентрацию субстрата от 0.4 до 400.

Для иллюстрации проведенных решений приведем только график профилей реактантов и скорости внутри зерна (фиг. 3) и зависимость некоторых характеристик решений от изменения степени конверсии в растворе (фиг. 4).

Приведенные графики показывают, что в зерне могут образоваться значительные градиенты субстрата, продукта, скорости реакции и прежде всего степени конверсии. Суммарная концентрация изменяется сравнительно мало, уменьшаясь в центре зерна.

С увеличением степени конверсии в растворе в некоторой мере уменьшается активность материала. Интересно отметить, что относительная концентрация субстрата $s_{\rm o}/s_{\rm s}$ изменяется очень незначительно. Более четко проявляется изменение суммарной концентрации реактантов и степени конверсии в центре зерна.

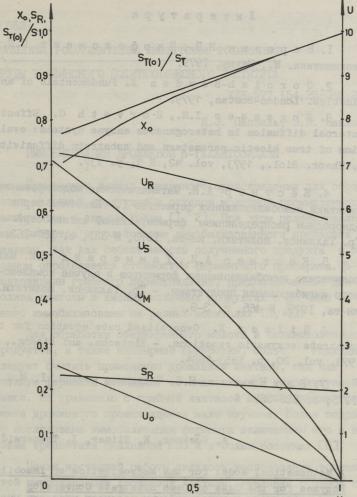
Сформулированные выводы действительны только для рассматриваемой конкретной системы. Для обобщения закономерностей влияния диффузионного сопротивления на интегральную кинетику будут накоплены дополнительные данные.



Фиг. 3. Профили характерных величин внутри зерна катализатора и вокруг него:

 S_{τ} — суммарная концентрация реактантов; P_{τ} — концентрация продукта; S— концентрация субстрата; X— условная степень конверсии (соотношение концентрации продукта к суммарной концентрации реактантов; U(S,P)— скорость реакции; R— поверхность зерна; δ — толщина пограничного слоя.

Исходные данные: максимальная скорость AA = 10; S_T в растворе 5,9; степень конверсии субстрата в растворе $X_F = 0,05$.



Фиг. 4. Зависимость величин характеристик от степени конверсии субстрата в растворе x_{F} .

- 1 в растворе: U_{ξ} скорость реакции (выявляемая активность) при отсутствии диффузионных сопротивлений;
- 2 для зерна катализатора: U_{M} выявляемая активность материала; U_{R} относительная активность материала;
- 3 в центре зерна катализатора: U_0 скорость реакции; X_0 условная степень конверсии субстрата; $S_{\tau(0)}/S_{\tau}$ отно-сительная суммарная концентрация реактантов;
 - 5_R относительная концентрация субстрата (обе величины в отношении соответствующих концентраций в растворе).

Исходные данные: максимальная скорость AA = 10, суммарная концентрация реактивов в растворе $\$_{\tau} = 25,6$.

Литература

- І. Березин И.В., Варфоломеев С.Д. Биокинетика. М., Наука, 1979.
- 2. C o r n i s h-B o w d e n A. Fundamentals of enzyme kinetics. London-Bostan, 1979.
- 3. Engasser I.M., Horvath 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, p. 137.
- 4. Кёстнер А.И. Математическое моделирование кинетики иммобилизованных ферментов І. (Кинетика зерна с однородным распределением ферментативной активности). Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1973, № 331, с. 157-162.
- 5. Кестнер А.И., Таммерайд И.И. Макрокинетика иммобилизованных ферментов в случае комплексного ингибирования продуктами. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. 3-9.
- 6. S i i m e r E. Generalized rate equation for one substrate enzymatic reactions. Biotechn. and Bioeng., 1978, vol. 20, p. 1853-1864.
- 7. Бахвалов Н.С. Численные методы. I. М., 1975, с. 520-523.

A. Köstner, E. Siimer, I. Tammeraid

A Mathematical Model for the Macrokinetics of Immobilized Enzymes for the Case of Deep Substrate Conversion

Summary

The macrokinetics of immobilized enzymes has been simulated with the help of the generalized equation for integral kinetics. The appropriate system of differential equation has been proposed. A special technique has been introduced and the programs to solve the equations numerically have been described. Some examples of solution and preliminary conclusions have been presented.

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED
TPYJE TALJUHCKOFO NOMUTEXHUYECKOFO WHCTUTYTA

УДК 577.154.25:002.237

К.Э. Паппель, Э.Э. Павлова

иммобилизация дрожжевой в-галактозидазы

Применение лактаз различного происхождения для обработки молочных продуктов и отходов молочной промышленности расширяется с каждым годом [I, 2]. При этом целенаправленным считается использование иммобилизованного препарата лактазы, так как себестоимость полученного предукта в основном определяется стоимостью ферментного препарата. В-галактозидазы грибного происхождения, предназначенные для гидролиза лактозы в кислых молочных продуктах с рН ниже 5, успешно иммобилизованы на разных носителях [3, 4].

Для обработки обезжиренного молока и цельномолочных продуктов, а также подсырной сыворотки, более годходящим следует считать применение дрожжевой лактазы, так как рНоптимум фермента совпадает со значением рН гидролизуемой смеси. По сравнению с грибной лактазой иммобилизация фермента дрожжевого происхождения мало изучена. Более подробно исследована иммобилизация фермента включением его в волокна триацетата целлюлозы [5] и в полых волокнах [6].

Целью настоящей работы являлось исследование возможностей иммобилизации дрожжевой лактазы. Учитывая, с одной стороны, простоту процесса иммобилизации и отсутствие химической модификации молекул фермента при включении в структуру геля, а с другой стороны, низкую стоимость и распространенность неорганических носителей, для иммобилизации дрожжевой β-галактозидазы были выбраны два метода:

- включение в структуру полиакриламидного и желатинового гелей;
- привязывание к неорганическому носителю силохрому. С целью повышения эффективности иммобилизации, а также применения полученных препаратов исследовалось влияние стабилизирующих агентов (сахар, декстрин).

Материалы и методы

Работа проводилась дрожжевой лактазой из Kluyveromyces fragilis датской фиры "Ново". Активность препарата по гидролизу синтетического субстрата (о-нитрофенил- β-D-галактопиранозидаза) равняется 450 Е/мл, удельная активность 2I,4 мг/мл.

Полиакриламидный гель (ПААГ) получили методом химической полимеризации из акриламида и N,N'-метилен-бис-акриламида фирмы "Реанал". В качестве инициаторов полимеризации применялись N,N,N',N'-тетраметил-этилендиамин производства фирмы "Реанал" и надсернокислый аммоний Олайнеского завода химреактивов. При модификации полиакриламидного геля использовались глутаровый альдегид фирмы "Мерк" и ангидрид итаконовой кислоты Олайнеского завода химреактивов. В качестве стабилизаторов (ПААГ или фермента) применялся аллилдекстран, который получили алкилированием декстрана Т 500 фирмы "Фармация" с помощью аллила бромистого Ереванского завода химреактивов. [7], разный сахар (сахароза, глюкоза, галактоза, лактоза) Шостскинского завода химреактивов.

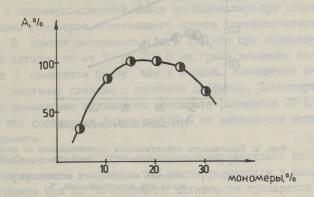
В качестве неорганического носителя применялся силохром СХ-2 Горьковского опытного завода диаметром пор 1000 Å и удельной поверхностью 51 м² на г. Силанизация носителя проводилась при помощи у-аминопропилтриэтоксисилана. В качестве сшивающего агента применялись глутаровый альдегид фирмы "Мерк" или 2,4,6-тринитробензолсульфокислота Олайнеского завода химреактивов.

Термостабильность иммобилизованных препаратов определялась при 50 $^{\rm O}$ C по методике, описанной нами ранее [8]. По данным зависимости остаточной активности от времени инактивации вычислялась константа инактивации κ_2 .

Результаты и обсуждение

Как известно из литературных данных, а также из наших исследований [10, II] эффективность иммобилизации ферментов в структуре полиакриламидного геля (ПААГ) определяется в основном общей концентрацией мономеров в полимеризационной смеси и относительной концентрацией сшивающего агента. Кон-

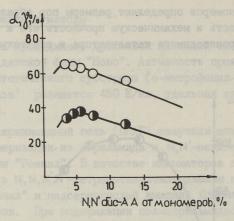
центрация мономеров определяет размеры пор образующегося геля, набухаемость и механическую прочность его и тем самым активность производимого катализатора и его технологическую стабильность.



Фиг. 1. Зависимость эффективности иммобилизации от общей концентрации мономеров:

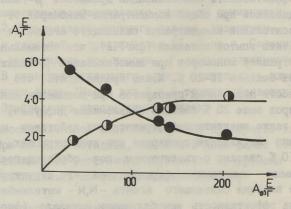
А - активность препарата.

Эффективность иммобилизации дрожжевой В-галактозидазы исследовалась при общей концентрации мономеров от 4 до 30 % и относительной концентрации сшивающего агента от 4 до 15 %. Результаты опытов показали (фиг. І), что оптимальной общей концентрацией мономеров при иммобилизации в-галактозидазы следует считать 15-20 %. Можно предполагать, что снижение активности полученных препаратов при повышении концентрации мономеров выше 25 % связано с явлениями диффузич, тично также инактивацией фермента под действием мономеров. Снижение активности препарата при концентрациях мономеров ниже ІО % связано с увеличением пор образующегося геля и вымыванием фермента из его структуры. тем самым учение влияния сшивающего агента - N.N'- метиленбисакриламида - на эффективность иммобилизации показало (фиг. 2), что оптимальным следует считать концентрацию его 5-7 %. Повышение содержания сшивающего агента в полимеризационной смеси выше 10 % приводит к снижению значений коэффициента / (характеризует сохранение активности при иммобилизации). Можно предполагать, что при высоких концентрациях сшивающего агента образуется гель с неравномерной структурой. Сравнение



Фиг. 2. Зависимость эффективности иммобилизации от относительной концентрации N,N'-метиленбисакриламида:

- Ο α коэффициент иммобилизации.



Фиг. 3. Зависимость эффективности иммобилизации от исходной концентрации фермента:

- активность иммобилизованного препарата, Е/г;
- - значения коэффициента у , %;
- $A_{\rm O}$ исходная активность препарата в полимеризационной смеси, E/r.

значений у со значениями коэффициента иммобилизации с указывает на инактивацию фермента в ходе иммобилизации.

Исходя из вышеизложенного, зависимость эффективности иммобилизации β-галактозидазы от исходного содержания фермента в полимеризационной смеси исследовалась при общей концентрации мономеров и сшивающего агента соответственно 20 и 5 %. В опытах выяснилось (фиг. 3), что при повышении исходной активности от IO до 200 Е на грамм, значения коэффициента ¼ снижаются более чем в 2 раза. Уменьшение значений ¼ частично связано с явлением диффузии. Достигнутая в опытах выявляемая активность препарата равняется 37 Е на греля, что составляет более чем 26 % от активности исходного фермента.

Рабочая стабильность препаратов определялась по данным непрерывного гидролиза 5 % раствора лактозы в насадочной колонке при 30 °C. Изменение активности препаратов при этом оценивалось по концентрации продукта (глюкозы) в гидролизуемой смеси, а также по данным определения активности в стандартных условиях один раз в рабочий день.

С целью повышения эффективности иммобилизации исследовалось влияние различных модификаторов (глутаровый альдегид, глюкоза, галактоза, сахароза, аллилдекстран) на выход связывания фермента. Предполагалось, что глутаровый альдегид как поперечно сшивающий агент, реагируя на аминогруппы фермента, способствует агрегации ферментных глобул, вследствие чего создается возможность увеличения концентрации и стабильности фермента в геле. Положительное действие сахаров, в частности галактозы, на термостабильность регалактозидазы показано нами ранее [8]. По литературным данным стабилизатором термоинактивации является также декстран [9].

Концентрацию глутарового альдегида в полимеризационной смеси изменили от 0 до 200 мкжкв на г. Оказалось (табл. I), что прибавление глутарового альдегида себя не оправдывает. Значения активности и коэффициента ў не превышают значений, полученных при включении фермента в ПААГ без модификатора. Дополнительные исследования показали, что глутаровый альдегид инактивирует β -галактозидазу уже в незначительных количествах. При изучении влияния различ-

ных сахаров выяснилось, что значительного повышения активности препаратов при добавлении сахаров не достигается (табл. 2).

Таблина I Иммобилизация дрожжевой β-галактозидазы

No	ENHABIZATOR	Модиф.	Исход.	Препарат	
п/п	Носитель	реагёнт	art., E/r	акт.,Е/г	8. %
Ĭ	ПААГ	Deser Jacen	140	37	26,4
2	ПААГ	AL	141	53,4	37,8
3	ПААГ	ГАЛ	200	44,7	22,4
4	ПААГ	ГА	159	32,0	20,1
5	CX-2	2. Servinsour	1300	180	13,8
6	CX-2	THEC	1300	360	27,7
7	CX-2	ГА	337	145,7	43,2
8.	ЖГ	ГА	90	28,8	32,0

 $\Pi AA\Gamma$ — полиакриламидный гель, CX-2 — силохром, $A\Pi$ — аллилдекстран, ΓA — глутаровый альдегид, THEC — тринитробензолсульфоновая кислота, $M\Gamma$ — желатиновый гель.

Таблица 2 Иммобилизация В-галактозидазы в ПААГ в присутствии сахаров

Ne	Caxap	Препарат		X. %	
п/п	Caxap	активн., Е/г	кол-во, г	0, 10	
I	Глюкоза	38,4	5,21	20,0	
2	Галактоза	44,7	5,00	22,4	
3	Глюкоза + галактоза	36,4	5,07	I8,49-	
4	Сахароза	26,4	5,21	13,75	

Условия опыта: концентрация сахара ІЗ %, исходная $A_{\rm O}$ = 200 E/r.

Наилучшие результаты получены в случае применения галактозы. При этом увеличивается активность полученного препарата, а значение χ несколько снижается. Исследование влияния аллилдекстрана (АД) показало, что добавление его в полимеризационную смесь значительно повышает как активность получаемого препарата, так и значение коэффициента χ (табл. 3). Наи-

высшая эффективность иммобилизации достигнута при концентрации АД 10 %. Можно предполагать, что прибавление АД повышает гидрофильность полученного геля и этим усиливает гидрофобные взаимодействия внутри белковой молекулы, а также способствует образованию геля более однородной структуры.

. Таблица З Иммобилизация β-галактозидазы в ПААГ в присутствии АД

施	АД. % от по-	Исходн. ак-	Препарат умов и им		
п/п	-HOMITESMITESMINT	тивн. смеси, Е/мл	кол-во, Г	E/r	8- %
I	4	178,8	6,0	44	26,8
2	5	180,0	6,58	51	37,3
3	IO .	I80,0	6,37	53,6	37,8
4	PN 15 OHXOT & O	180,0 most	6,76	42,9	32,2
5	20	I80,0	5,73	32,0	29,3

АД - аллилдекстран

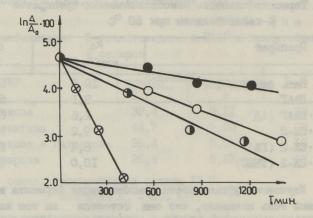
Таблица 4 Термостабильность иммобилизованных препаратов β -галактозидазы при 50 $^{\circ}$ С

14 11/11	Препарат	К ₂ , мин ^{-I} . 10 ³	Q ₂ ,
11/11	3. Weetall H.R., #	мин - 10	%
I	Нат. фермент	I0,0	58,0
2	HAAP and the engineer	3,I	59,6
3	ПААГ (АД)	1,6	62,8
4	CX-2	9,2	73,7
5	CX-2 (FA)	6,4	64,7
6	CX-2 (THEC)	10,0	33,5

Изучение эффективности иммобилизации фермента в желатиновый гель показало, что она сстается на том же уровне, что при включении фермента в ПААГ (табл. I). Оптимальным следует считать концентрацию желатина 10 % и сшивающего агента (глутаровый альдегид) — 0,3 %. При этом нужно отметить, что механические свойства желатинового геля значительно уступают тем же показателям ПААГ.

Существенное повышение активности иммобилизованной β-галактозидазы достигнуто при иммобилизации фермента на силохроме, в частности на носителе, активированном с помощью тринитробензолсульфоновой кислоты (THEC) (табл. I). Обработка носителя с ТНЕС проводилась при комнатной температуре в течение 60 минут. Полученные нитрогруппы на носителе восстановили дитионитом натрия при 70-75 °C в течение 30 минут. Диазотирование проводилось при 0-4 °C в течение 30 минут с помощью нитрита натрия. Фермент привязывали к полученному носителю при рН раствора 6,6. Время контакта с носителем при 20 °C равнялось 60 минут. Нужно подчеркнуть, что значения выявляемой активности препарата увеличивает также адсорбция фермента на поверхности силохрома (табл. I, опыт № 4).

Учитывая то, что эффективность применения биокатализатора зависит в основном от стабильности его в технологическом процессе, в последующем сравнивалась стабильность полученных препаратов при термоинактивации и при гидролизе 5 % раствора лактозы в реакторе колоночного типа. Выяснилось (табл. 4, фиг. 4), что стабильность иммобилизованных на си-



Фиг. 4. Стабильность иммобилизованных препаратов β -галактозидазы в рабочих условиях:

- - ПААГ (АД);О ПААГ;О СХ-2 (ГА);
- ⊗ адсорбированный на СХ-2.

лохроме препаратов значительно уступает стабильности β -галактозидазы, иммобилизованной включением в ПААГ. Особенно нестабильной оказалась β -галактозидаза, привязанная к силохрому с ТНБС (значения α_2 по сравнению с нативным ферментом уменьшаются почти в 2 раза) (табл. 4, опыт \Re I и \Re 6). Включение β -галактозидазы в структуру ПААГ увеличивает ее стабильность. Значение константы скорости инактивации κ_2 уменьшается почти в три раза (табл. 4, опыт \Re I и \Re 2). Положительный эффект имеет АД. Применение названного модификатора при включении фермента в ПААГ увеличивает рабочую стабильность препарата более чем в 4 раза (фиг. 4).

Таким образом, для получения иммобилизованного препарата дрожжевой разактозидазы целесообразно включить фермент в структуру полиакриламидного геля, прибавляя в полимеризационную смесь 10% аллилдекстрана.

Литература

- I. XXI Международный молочный конгресс. Краткие сообщения. М., ЦНИИТЭИ. 1982. Мясомолпром, т. I, с. 363-373.
- 2. Prenosil E., Peter J.. Bourne J.R. Hydrolytische Spaltung des Milchzuckers der Molke durch immobilisierte Enzyme in Festbett-Reactor. Verfahrenstechnik. 1980, N 6, S. 392-496.
- 3. We e t a 1 1 H.H., H a v e w a l a N.B., P i t c h e r Jr. Preparation of immobilized lactase continued studies of the enzymatic hydrolysis of lactose. Biotechn. and Bioeng., 1974, vol. 16, p. 689-696.
- 4. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И., Куликова А.К., Тихомирова А.С. Количественная характеристика гидролиза лактозы иммобилизованной β -галактозидазой. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1977, № 424, с. 19-27.
- 5. Pastore M. Produzione industruale di Latti Delattosati Mediante B-galaktosidasi Immobilizzata in Fibre. - II Latte Riv. techn. ind. lattiero-casenaria, 1977, vol. 2 N 7-8, July-August, 456-460.

- 6. Chambers R.P., Cohen W.. Baricos W.H. Physical immobilization of enzymes by hollowfiber membranes. - Methods in Enzymology, 1976, XLIV, p. 313.
- 7. Har. CMA F 3826767. Anionic dextran graft copolymers/Calgon. Corp./ABT. M300p. M.F. Hoover, G.D.M. Sinko-vitz, R.J. Schaper. 3asbm. 26.10.1972 F 3826767; Onyom. 30.07.1974. MKM CO8 B 25/04.
- 8. Лайдсаар Р.Б., Паппель К.Э. Изучение термоинактивации дрожжевой β-галактозидазы. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1982, № 526, с. 13-23.
- 9. Moriyama S., Matsuno R., Nakanishi K., Kakikubo T. Effect of dextran and its derivatives on thermal inactivation of glucoamylase. -Agric. Biol. Chem., 1980, vol. 44, N 12, p. 2763-2771.
- 10. Паппель К.Э., Кёстнер А.И., Фениксова Р.В., Тихомирова А.С. Получение и свойства иммобилизованной β-галактозидазы. – Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1974, № 6, с. 35-38.
- II. Мандель М.О., Лепп Э.Э., Сиймер Э.Х. Влияние моном∈ров на пенициллинамидазу при включении в полиакриламидный гель. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. 55-63.

Immobilization of Yeast \(\beta \)-Galactosidase

Summary

β-Galactosidase of Kluyveromyces fragilis has been immobilized by means of entrapping into polyacrylamide and gelatine gels lattice, but likewise by means of covalent binding to silochrome. The influence of total monomer concentration and relative amount of cross-link reagent on the immobilization efficiency by entrapment into gels has been investigated. The effect of several modificators or stabilizers (glutaraldehyde, glucose, galactose, saccharose, allyldextran) on the activity of preparations has been determined.

The thermal and operation stability of preparations has been investigated. The best results have been obtained on the case of 20 pc polyacrylamide gel with 5 pc relative content of crosslinks and 10 pc allyldextran.

6. Chasbers 2.F., Cohon W., Seric Sydrifting Physical Association of account to hellowfiber suchresse. - soldeds to Resymples, 1970, Kill, p. 313.

essbisotosiad deservo de notarrildommi

Her. Can i Decembra deservo de notarrildommi

Derechbra. Corp. Ant. Annagonal P. Nover, G. D. E. State

Titz. H. J. Schuper. - Decembra de Nover, G. D. E. State

Deservo de State Properties de Nover, Deservo de Nover, Deserv

adolested to verticate of the land of the case of the

11. W a mentioning of the manufacture to Musical Sold State of the Sta

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.156

М.К. Фриеденталь, М.И. Креэн

ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСКАМИНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА

Ферментативные гидролизаты казеина нашли широкое применение в практике, в частности, для производства питательных сред, лечения различных заболеваний и т.д. [I-2]. Эти гидролизаты характеризуются определенной степенью конверсии и составом пептидов. Во многих случаях степень конверсии определяется по реакции тринитробензолсульфокислоты с первичными NH2-группами, образующимися в ходе реакции [3, 4]. Метод очень чувствителен и позволяет определить малые количества аминного азота в пробах. Недостатком метода, однако, следует считать большой расход времени, требуемого для проведения анализов (медленное протекание реакции, которая длится около 2 часов).

Фиг. 1. Реакция флуорескамина с NH2-группами белка.

В последние годы большое внимание уделяется флуоресцентным методам определения продуктов гидролиза белка [5, 6].Методы основываются на измерении флуоресценции продуктов реакции флуоресцентного реагента, в частности, о-фталдиальдегида или флуорескамина с NH2-группами белка (фиг. I).

Метод отличается простотой, быстротой выполнения и точностью результатов, что делает его особенно пригодным для массовых определений содержания NH₂-групп в пробах.

Исходя из этого, цель настоящей работы — разработка конкретной методики определения продуктов ферментативного гидролиза казеина с помощью флуорескамина.

Материалы и методы

Флуорескамин синтезирован на Экспериментальном заводе Института органического синтеза АН Латвийской ССР. Калибровочный график для определения NH_2 -групп был построен по \mathfrak{D}, L -лейцину. Флуоресценцию измеряли на спектроколориметре "Specol" (Цейсс, ГДР), снабженном флуориметрической приставкой.

К 2,0 мл разведенного раствора Д, L -лейцина с рН 8,0 прибавляли 0,I мл флуорескамина (I,9 мг/мл) в ацетоне. Флуоресценция измерялась при 475 нм с возбуждением при 405 нм.

В качестве субстрата при гидролизе белка использовался 2-процентный раствор казеина по Гаммерштену с рН 7,0. Ферментным препаратом служил нативный протосубтилин Г ЗХ активностью 380 Е/г производства Вильнюсского ферментного завода. Гидролиз казеина проводили в реакторе периодического действия, перемешивая при температуре 40 °C. Глубину гидролиза характеризовали по концентрации первичных NH₂-групп, образовавшихся в ходе реакции. Концентрация NH₂-групп определялась с помощью тринитробензолсульфокислоти (ТНЕС) [3] и по флуоресцентному методу.

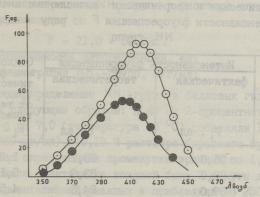
Для сравнения кинетических кривых, полученных с помощью применения различных методов, и для определения продуктов гидролиза использовали метод Ансона [7].

Результаты опыта обрабатывались с помощью математической статистики [8].

Результаты и обсуждение

Для выяснения конкретных условий проведения реакции флуорескамина с NH_2 -группами нами изучалось влияние длины волны (λ) возбуждения на интенсивность флуоресценции. Модельным веществом использовался $\mathfrak{D}_{\lambda}L$ -лейцин. pH раствора во всех опытах регулировали на значение pH = 8,0 (ре-

акция между флуорескамином и NH_2 -группами проводится при pH 8,0 - 9,0).



Фиг. 2. Интенсивность флуоресценции при определении Фл. - лейцина и продуктов гидролиза казеина с помощью флуорескамина в зависимости от длины волны возбуждения:

-O-O- раствор D,L-лейцина;
- - гидролизат казеина.

Результаты, представленные на фиг. 2, показывают, что предпочтительной длиной волны возбуждения при измерении флуоресценции следует считать $\lambda_{\text{возб}}=405$ нм. Исходя из этого, все следующие измерения, в том числе и для составления калибровочного графика с растворами \mathfrak{D},L -лейшина, проводились при $\lambda_{\text{возб}}=405$ нм. При таких условиях опыта наблюдалась прямолинейная зависимость между интенсивностью флуоресценции F и содержанием $\mathsf{NH_2}$ -групп в пределах концентрации $\mathsf{0},\mathsf{I}$ — $\mathsf{I},4$ мкг $\mathsf{NH_2}/\mathsf{мл}$.

Исходные данные для составления калибровочного графика приведены в таблице I.

Значения для третьего столбца вычислены по уравнению I путем подстановки в уравнение значений c_i для каждой концентрации NH_2 -групп.

Вычисленные значения стандартного отклонения σ и коэффициента регрессии r составляют 2,5 % и 0,993 соответственно.

Таблица I Фактические и теоретически вычисленные значения интенсивности флуоресценции F по ряду концентрации NH₂-групп

Концент-	Интенсивност	Отклоне-	Квад-	
рация NH ₂ - групп с; мкг/мл	фактическая F;, ед.	теоретическая F; ед	ние фак- тических средних от теоре- тических F; -F;	рат откло- нения $(F_i - \hat{F}_i)^2$
I,34	95,0	93,1	1,9	3,61
I,I7	89,0	83,9	5,I	26,01
I,18	89,0	84,5	4,5	20,25
I,02	76,0	75,9	0,1	0,01
I,02	76,0	75,9	0,1	0,01
0,95	71,0	72,I	-I,I	I,2I
0,97	71,0	73,2	-2,2	4,84
0,98	71,0	73,7	-2,7	7,29
0,89	62,0	68,9	-7,9	62,41
0,79	62,0	63,5	-I,5	2,25
0,82	62,0	65,I	-3,I	9,61
0,38	55,0	57,6	-2,6	6,76
0,63	55,0	54,9	0,1	0,01
0,68	58,5	57,6	0,9	0,81
0,52	48,5	48,9	-0,4	0,16
0,53	48,5	49,5	-I,O	I,00
0,42	44,0	43,6	0,4	0,16
0,42	44,0	43,6	0,4	0,16
0,24	35,0	33,9	I,I	1,21
0,25	35,0	34,5	0,5	0,25
0,20	33,5	31,8	1,7	2,89
0,23	33,5	33,4	0,1	0,01
0,16	29,5	29,6	-0,I	0,01
0,20	30,0	31,8	-I,8	3,24
0,10	28,5	26,4	2,1	4,41

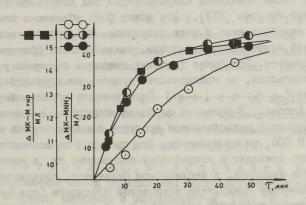
В данном случае интенсивность флуоресценции F в зависимости от концентрации NH₂-групп в растворе описывается следующим уравнением:

$$F = 2I,0 + 53,8 \cdot c,$$
 (I)

где F - интенсивность флуоресценции, ед;

с - концентрация NH2-групп, мкг/мл;

Опыты по определению NH₂-групп в белковых гидролизатах проводились следующим образом: К 40 мл 2-процентного раствора казеина с рН 7,0 (температура 40 °C) добавляли I,0 мл фермента (240 мг/мл) в 0,13 М растворе боратного буфера с рН 7,0. Через определенные промежутки времени по I,0 мл реакционной смеси кипятили на водяной бане 3 минуты для прекращения ферментативной реакции и прибавляли по 250 мл дистиллированной воды. К I,0 мл разведенной пробы прибавляли 5 мл 5-процентного раствора натрия тетраборнокислого до по-



Фиг. 3. Увеличение содержания NH_2 -групп в гидролизатах казеина, определенное различными методами:

Субстрат – 2-процентный казеин с pH 7,0; Фермент – протосубтилин Γ 3X;

Продукты определения:

-о-о- - по флуоресценции после осаждения макропептидов ТХУ;

-О-О- - по флуоресценции;

- no THБC;

- по методу Ансона.

лучения рН 8,0. К 2,0 мл полученной пробы прибавляли 0,I мл флуорескамина, смешивали и измеряли флуоресценцию.

Для сравнения кинетических кривых содержание NH_2 -групп в продуктах гидролиза казеина определяли по методу Ансона, ТНБС и флуоресценции.

Типичные кривые реакции гидролиза казеина изображены на фиг. 3. Концентрации NH_2 -групп выражены по разнице их содержания в гидролизатах и исходном субстрате. Начальное содержание NH_2 -групп в 2 % казеина составляло 10-15 мк-молей.

В начальной стадии наблюдается интенсивное накопление продуктов гидролиза, причем нет существенных различий, определены ли продукты по аминному азоту (ТНБС и флуоресценция), или по образованию пептидов, неосажденных под действием 5 % трихлоруксусной кислоты (метод Ансона). Отличие имеет кривая, полученная при определении аминного азота по флуоресценции после осаждения макропептидов под действием трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Это может быть объяснено тем, часть освобождаемых в ходе гидролиза NH, -групп связана с фракцией макропептидов и после осаждения этой фракции определяется. При более глубоких степенях конверсии, предполагалось, не наблюдалось существенных различий между кривыми (-0-0-, -0-0-, ---). Единственное ограничение имеет метод Ансона. В условиях глубокой конверсии, когда в реакции гидролиза накапливаются продукты с молекулярной массой ниже IO 000, он не применим. Эти продукты не осаждаются с ТХУ, что приводит к неизменному содержанию их, в частности остатков тирозина, в исследуемом фильтрате, следовательно, и к неизменному показателю оптической плотности (при λ =278 нм). Определение продуктов гидролиза по образовавшимся NH2-группам является истинным показателем глубины конверсии при изучении кинетики гидролиза белков. В то же время из фиг. 3 следует, что применение как метода ТНБС, так и флуоресценции, дает сходные результати.

На основе полученых данных для определения продуктов при изучении кинетических параметров гидролиза казеина можно рекомендовать метод флуоресценции. Простота метода поволяет применять его для рутинного определения NH₂-групп в белковых гидролизатах.

Литература

- I. В е л и ч к о А.Я. Влияние гидролизата казеина на азотистый обмен у больных сахарным диабетом. Врачебное дело, 1979, № 12, с. II-I3.
- 2. Гланц Р.М., Кириллов М.D. Сравнительная оценка анаболической эффективности гидролизатов казеина. - Советская медицина, 1980, № 10, с. 12-16.
- 3. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Schinoda T. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. J. Biochem., 1960, 47, N 5, p. 654-660.
- 4. A d l e r-N i s s e n J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. J. Agr. and Food Chem., 1979, 27, N 6, p. 1256-1262.
- 5. Garese R., Castell J., Yallejo G., Marco R. A fluorescamine-based sensitive method for the assay of proteinases capable of detecting the initial cleavage steps of a protein. Eur. J. Biochem., 1979, 99, N 2, p. 253-259.
- 6. To o m e V., Wegrzynski B. Application of fluorescamine. XIV. Determination of optical purity of a small amount of amino acids by the fluorescamine method. Analyt. Letters, 1981, 14, N B 20, p. 1725-1733.
 - 7. Петрова И.С., Винцпокайте М.М. Модифицированный метод определения протеолитической активности. Прикл. биохимия и микробиология, I966, № 2, с. 322-325.
 - 8. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск, Высшая школа, 1964. 326 с.

The Use of Fluorescamine for Determining the Products of the Enzymatic Hydrolysis of Casein

Summary

A new simple, fast and sensitive method has been established to determine the NH₂ groups in the hydrolysates of casein. The NH₂ groups react readily with fluorescamine to form pyrrolinone type chromophores, which have strong fluorescence spectrum with the fixed maximum. This reaction may be specially used to detect the cleavage (by determining the primary amino groups) of any type of protein substrates.

The solutions of D,L-leucine as the standard reagent to determine the NH2 groups were used.

To detect the protein hydrolysis, 0.1 ml of the fluorescamine solutions (0.2% in acetone) was rapidly added to 2.0 ml of diluted reaction mixture with pH 8.0 (the concentration of NH₂ groups may range between 0.1 and 1.4 µg/ml). The mixture was transferred into a 1.0 cm cell and the fluorescence was measured with a Carl-Zeiss fluorescence spectrophotometer (with excitement at 405 nm).

The results were similar to those obtained by determining the increase of NH2 groups in the hydrolysates with trinitrobenzensulfuric acid.

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.07

M.O. Мандель, Э.X. Сиймер, A. Хошке, Э. **Ласло**

RUHAPYLLON RILL ASALUMAONOULI RUHASULUAGOMMU ANOGUS OTOHSONOULI

Гидролиз разжиженного крахмала с применением иммобилизованной глюкоамилазы (ИГА) является перспективным способом получения глюкозного сиропа, который находит широкое применение при производстве фруктозосодержащих сиропов, так называемых "изосиропов". В настоящее время количество "изосиропа", вырабатываемого из глюкозного сиропа изомеризацией глюкозы, составляет свыше 2 миллионов тонн в год [I].

При создании промышленных процессов с применением высококачественной ИГА важное значение имеют проблемы выбора носителя, методы его активации, а также последующая иммобилизация фермента. Отечественные макропористые кремнесодержащие материалы типа силикагеля и силохрома нашли широкое применение при иммобилизации ферментов [2], в том числе глюкоамилазы [3].

В настоящей работе рассматриваются проблемы получения ИГА на основе активированного бензохиноном кремнеземного материала, предварительно обработанного у -аминопропилтри-этоксисиланом (АПТЭС). Нами ранее был предложен метод иммобилизации инвертазы [4]. В качестве ферментного препарата применялись коммерческие препараты глюкоамилазы, которые любезно предоставлены докторами А. Хошке и Э. Ласло из Будапештского технического университета.

Материалы и методы

Работа проводилась препаратами глюкоамилазы (I,4- α -D-glucan glucohydrolase EC 3.2.I.3) из Aspergillus niger датской фирмы "Novo" под фирменным названием "Amyloglucosi-

dase Novo 150" и препаратом фирмы "Miles" ("Miles IOO L"), которые применялись в неочищенном (табл. I) или очищенном виде. Очистка проводилась ступенчатым осаждением с этиловым спиртом балластных белков до активности IO 500 Е/мл и содержания белка 45 мг/мл. Активность глюкоамилазы выражали в микромолях глюкозы, образовавшейся в течение минуты при температуре 50 °C в I-процентном растворе крахмала в 0,I м ацетатном буфере (рН 4,6) под действием I мл нативного фермента или I г сухой ИГА. Концентрация глюкозы определялась глюкозооксидазным методом [5].

Таблица I Иммобилизация различных препаратов глюкоамилазы на активированный бензохиноном силохром

Показатели	Ед.		глюкоами-	
The prise and a constant of the prise of the	OTOSH d	NOVO 150	MILES 100 L	
Исходная активность	Е/мл	5340	3230	
Исходное содержание белка	мг/мл	230	350	
Взятое для иммобилизации ко-				
личество фермента	MT/ T	I,56	I,56	
Взятое для иммобилизации ко-				
личество белка	Mr/r	539	546	
Взятое для иммобилизации ко-				
личество единии активности	E/r	8330	5039	
Вымываемая после иммобили-	E/r	5123	3576	
зации активность	%	(61,5)	(70,9)	
Активность ИГА перед обра-				
боткой глутаровым альдеги-	E/r	1628	1321	
дамее быт предлежен метод мод	%	(19,5)	(26,2)	
Активность ИГА после обра-	E/r	1219	816	
ботки глутаровым альдегидом	%	(14,6)	(16,2)	
Связанный с носителем белок	Mr/r	125	162	
	%	(34,8)	(29,7)	

Свойства применяемых носителей Cx-2, MCA-2500 и CPG - 3000, а также их силанизация с помощью АПТЭС, описаны в источнике [4]. В зависимости от цели опытов, силанизация проводилась кипячением носителя в этаноле или в толуоле при различных концентрациях силана, а также контактированием водного раствора силана с гранулами. После силанизации гранулы

высушивали при II0°C и тщательно промывали водой.

Активацию аминоносителя осуществляли с помощью бензожинона по методу [4]. Дополнительная обработка препаратов ИГА проводилась по методу [6].

Рабочая стабильность ферментных препаратов определялась пропусканием через термостатируемую колонку при 50° С с ИГА 20-процентного буферного раствора мальтодекстрина в 0,1 М ацетатном буфере (pH 4,7).

В качестве субстратов применялись растворы растворимого крахмала ("Реахим"), 30-70-процентные буферные растворы крахмальной патоки Раквереского крахмало-паточного комбината, исходным содержанием глюкозы I60 мг/г сухого вещества и мальтодекстрин фирмы "Меізеп" (Австрия).

Результаты и их обсуждение

Стандартная методика предусматривает проведение цесса силанизации в органических растворителях при температуре IIO-I20°C в течение 4-8 часов, а в случае этанола при 75-85 °C. Длительность, необходимость органических растворителей и значительная сложность процесса побудили нас искать возможность проведения силанизации в водных растворах при комнатной температуре. За процессом силанизации следили по изменению активности препаратов ИГА. Применяли 0,5--15,0-процентные растворы силана расходным коэффициентом 3,0 мл/г сухого носителя. Было найдено, что процесс силанизации в воде протекает быстро: препараты, полученные на базе силанизированных в течение 20-30 мин носителей, имеют почти максимальную активность; увеличение длительности процесса силанизации практически не повышает активность получаемых препаратов ИГА. Можно наблюдать (см. табл. 2), что увеличение концентрации силана (продолжительность реакции І,5 часа) одинаково отражается в активностях препаратов, причем наивысшая активность достигается в случае силанизации в воде. Оптимальной концентрацией следует считать 200-400 мкэкв/г сухого носителя.

Опыты проводились очищенной глюкоамилазой "Miles 100L", так как предварительное сравнение данных иммобилизации по-казало преимущество ее перед препаратом фирмы "Novo" (см. таблицу I) при получении препаратов ИГА.

Табли на 2

Влияние концентрации АПТЭС в этаноле, толуоле и в воде на активность ИГА при иммобилизации очищенного фермента "Miles 100 L^{*} "

Конц. АПТЭС.		ивность ИГА, Е	:/r
мкэкв/г	в этаноле	в толуоле	в воде
57	762	850	925
II4	835	918	1264
228	1289	II08	1802
342	1329	1537	1875
570	IIIO	I549	2148
II40	1381	1583	2093
1710	993	1355	1848

Дополнительная очистка ферментного препарата глюкоамилазы осаждением балластных белков с помощью этанола, несомненно, дает препараты более высокой активности. Однако достигаемая активность препаратов ИГА около 2000 Е/г требует тщательной дозировки ферментного препарата. Сравнение данных неочищенного и очищенного ферментов показывает значительную разницу. В ходе иммобилизации связанные большие количества балластного белка вследствие диффузионных затруднений высокомолекулярного субстрата в зерне снижают выявляемую активность ИГА (табл. 3). Увеличение пористости носителя (пористое стекло СРG-10-300, размеры пор 312,5 нм) за счет уменьшения удельной поверхности не способствует получению высокоактивных препаратов.

Продолжительность иммобилизации известным образом отражается на активности ИГА. После первых часов контакта носителя с ферментным раствором активность достигает своего максимального значения и дальнейшее контактирование даже уменьшает активность ИГА (таблица 4).

Преимуществом применения препаратов ИГА перед ее нативной формой при производстве глюкозного сиропа можно считать следующее:

- увеличение качества целевого продукта за счет устранения попадания ферментного белка и примесей фермента в гидролизат;

Таблица 3

				25	355573-03-03
Носитель		е для имм ество фер	обилизации мента	Характеристика им-	
	MF/F MJI	E/r	мл белка/г мг	фермента содержа- ние белка, мг/г	актив- ность, Е/г
CX-2	1,7	17610	75,4	64,7	2170
CX-2*	I,6	22700	325	122,7	I352
CX-2*	2,7	37800	540	215	410
CX-2*	II,0	I54000	2202	726	138
MCA-2500 ^{3€}	2,0	28000	400	210	167
CP-IO*	2,0	28000	400	251	306

^{* -} неочищенная глюкоамилаза активностью 5340 Е/мл с содержанием белка 230 мг/мл

- возможность проведения процесса гидролиза с увеличенной скоростью, повышая концентрацию фермента в объеме субстрата без загрязнения продукта;
- многократное или непрерывное использование препаратов ИГА, определяемое хорошей механической и увеличенной ферментативной стабильностью носителя, позволяет значительно увеличить удельную производительность фермента и уменьшить его расход.

Изучение свойств препаратов ИГА проводили по гидролизу водных растворов крахмала, крахмальной патоки и мальтодекстрина. Данные гидролиза крахмала различных концентраций при рН 4,6 и при различных температурах приведены в таблице 5. Начальная скорость гидролиза крахмала резко зависит от названных показателей, но предел максимальной температуры определяется заметной инактивацией фермента свыше 60°С.Концентрированные растворы крахмала (выше 6-7 %) имеют высокую вязкость и ферментативный гидролиз затруднителен. Переход от крахмальных растворов к крахмальной патоке позволяет гидролизовать субстраты концентрациями сухих веществ до 700 мг/мл. Как свидетельствуют данные таблицы 5, при этом

Таблица 4 Влияние времени иммобилизации и условий гидролиза крахмального раствора на выявляемую активность ИГА

Время иммобили-	+ 00	Условия гидролиза		
зации, ч	t,°C	концентрация крах-	активность, Е/г	
0,5	60	4,0	896	
I,0	60	4,0	IIIO	
10,0	60	4,0	1430	
24,5	60	4,0	I596	
44,5	60	4,0	II40	
82,3	60	4,0	820	
24,0	20	4,0	209	
24,0	25	4,0	245	
24,0	30	4,0	274	
24,0	40	4,0	387	
24,0	50	4,0	728	
24,0	60	4,0	1134	
24,0	70	4,0	1054	
24,0	60	0,5	247	
24,0	60	I,0	347	
24,0	60	2,0	548	
24,0	60	3,0	803	
24,0	60.	4,0	857	
24,0	60	5,0	96I	
24,0	60	7,0	1160	

наблюдается более низкая по образованию глюкозы производительность препаратов ИГА. Факт объясняется тем, что патока, полученная кислотным способом, содержит значительное количество глюкозы и других продуктов гидролиза, являющихся ингибиторами и тем самым уменьшающие скорость гидролиза патоки.

Ферментативная стабильность определяет длительность применения препаратов ИГА в рабочих условиях. Стабильность ферментов, ковалентно иммобилизованных с носителем, зависит не только от стабильности самого фермента, а также от скорости разложения связей носителя с ферментом. Было найдено [6], что силоксановые связи реакции носителя с АПТЭС

Таблица 5 Непрерывный гидролиз крахмальной патоки с помощью ИГА при 50 °C (скорость протока субстрата 2,9 мл/мин)

Исходная кон- центрация па- токи, мг/мл	рН патоки	Конечная кон- центрация глю- козы, мг/мл	Производитель- ность ИГА, мг/мин
200	4,4	196	18,9
300	4,4	285	27,6
400	4,4	362	35,0
500	4,4	455	44,0
605	4,4	587	56,7
700	4,4	580	56,I
600	5,0	468	45,2
600	5,5	431	41,7
600	5,9	403	38,9
600	7,5	388	37,5

гидролизуются в воде, причем скорость процесса зависит от природы растворителя. Нами изучалась стабильность препаратов, полученных иммобилизацией глюкоамилазы на силанизированных в различных средах (вода, толуол, этанол', носителя. Стабильность препаратов изучалась в растворе мальтодекстрина при рН 4,6 и температуре 50 °C. Через термостатированную с ИГА колонну пропускали со скоростью 0,3 мл/мин 20-процентный буферный раствор мальтодекстрина (общая продолжительность работы — 387 часов). Скорость образования глюкозы снижалась быстрее при применении препаратов ИГА, полученных силанизацией носителя в этаноле, табл. 6', стабильность остальных препаратов ИГА значительно выше.

Препараты получены (см. табл. 6) силанизацией сило-хрома Сх-2 в этаноле (I), толуоле (2) и в воде (3-5) обработкой бензохиноном, последующим связыванием фермента без дополнительной обработки (№ I-3) и обработкой глутаровым альдегидом концентрацией 2,6 мкэкв/г (№ 4) и 4,9 мкэкв/г (№ 5).

Таблина 6

Рабочая стабильность различных препаратов ИГА при 50 °C и рН 4,7 в условиях непрерывного гидролиза 20-процентного мальтодекстрина

№ пре- парата	Исходная активность, Е/г		гочная вность,	Скорость ин- активации ×I0 ³ , час ⁻ I	Коэффици- ент кор- реляции
I	296	IIO	37,2	0,813	0,9099
2	317	I85	59,2	1,19	0,9307
3	326	239	73,2	2,38	0,9187
4	244	191	78,3	3,94	0,9716
5	163	I36	83,5	8,43	0,9490

Таблица 7
Влияние концентрации глутарового альдегида
на активность ИГА

Концентрация глу-	Время,	Остаточная а	Остаточная активность ИГА		
тарового альдегида, мкэкв/г	МИН	E/r	%		
-одивальна силагазиро-	schien Kens	1862	100		
0,35	30 mou	I599	85,9		
1,55 egestes	30	I430	76,8		
2,00	30	II9I	63,9		
3,10	30	930	50,0		
4,90	30	824	44,3		
5,90	30	802	43,I		
9,65	30	796	42,7		
4,45	80	811	43,6		
4,35	I20	793	43,6		

Нами был предложен способ [7] стабилизации препаратов ИГА путем дополнительной обработки их слабыми растворами (до 3,0 мкэкв/г ИГА) глутарового альдегида. Глутаровый альдегид, по-видимому, реагирует ферментным белком и образует более стабильные коньюгаты из отдельных ферментных глобул. Можно предполагать, что глутаровый альдегид реагирует также с непрореагировавшими аминогруппами силана и таким образом увеличивает стабильность всего препарата. Изучение влияния концентрации и длительности процесса получения препара-

тов ИГА глутаровым альдегидом позволило найти оптимальные условия процесса (табл. 7). Однако сравнение стабильности препаратов показало, что увеличение рабочей стабильности их связано с уменьшением активности ИГА.

Литература

- I. Kain uma K. Изомеризованный сироп. История, химия и промышленные вопросы. J. Jap. Soc. Starch Sci., 1980, 27, N 2, 139-145.
- 2. Введение в прикладную энзимологию. Иммобилизованные ферменты / Под ред. И.В. Березина, К. Мартинека. Изд-во МГУ, М., 1982, с. 26.
- 3. Lomako O.V., Menyailova I.I., Nak-hapetyan L.A., Nikitin Y., Kiselev A.V. Immobilization of glucoamylase on porous silicas. Enzyme Microb. Technol., 1982, 4, N 3, 89.
- 4. Мандель М.О., Кросинг В.А. Иммобилизация β -фруктозидазы и получение инвертного сиропа. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 75-82.
- 5. Щербухин В.Д., Миронова Л.И., Кондырева А.В., Грюнер В.С. Определение глюкозы в патоке глюкозооксидазным методом использованием ферропианида калия. Прикладная биохимия и микробиология, 1970, 6, № 4, 467.
- 6. Ворошилова О.И., Киселев А.В., Никитин Ю.С. Синтез и исследование кремнеземистых носителей с поверхностью, модифицированной у-аминопропильными группами. Коллоидный журнал, 1980, 42, № 2, 223.
- 7. А.с. 744002 (СССР). Способ получения иммобилизованных ферментов / Таллинский политехнический институт; Авт. изобрет. А.Я. Озолиныш, М.О. Мандель, К.Э. Паппель, А.И. Кёстнер. Заявл. 29.09.1977, № 2527891/23-04; Опубл. в Б.И. 1980, № 24 МКИ С 07 С 7/02 // АбІ К 37/48 УДК 57715.07 (088.8).

M. Mandel, E. Siimer, A. Hoschke, E. Laszlo

Immobilization of Glucoamylase for the Production of Glucose Syrups

Summary

Preparations of the immobilized glucoamylase on the modified silochrom have been prepared. It has been shown that not only toluene and ethanol but also water can be successfully used as solvent for the silanization process. The treatment of immobilized glucoamylase with glutaric aldehyde decreases the activity of preparations but increases their stability up to 10 times.

TAILINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED TPYJI TAJJIHCKOFO NOINTEXHIYECKOFO NHCTITYTA

УДК 547.96:577.I56 А.Э. Эрин

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ФРАКЦИОНИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МОЛОКА И КРОВИ

Смеси свободных аминокислот и низших пептидов необходимы в качестве компонентов питательных сред для выращивания микроорганизмов и клеточных культур высших организмов. Подобные смеси требуются также в медицине для диетического и особого (параэнтерального или энтерального) питания. Обычно смеси аминокислот получают смешением чистых, чаще всего синтетических аминокислот. Такие смеси аминокислот высокую себестоимость и поэтому с практической точки зрения представляет большой интерес альтернативный способ получения смесей аминокислот путем ферментативного гидролиза белков. Задачей настоящей работы ставилось препаративное получение аминокислот и низкомолекулярных пептидов ферментативного гидролиза доступного белкового сырья. Решение этой задачи во многом зависит от правильного выбора субстрата и ферментной системы, а также метода выделения аминокислот и низших пептидов из смеси продуктов гидролиза. Одним из наиболее доступных источников полноценных белков можно считать молоко и бойную кровь. Известно, что отдельные белки гидролизуются ферментами легче, чем смесь этих белков [I]. Поэтому считали целесообразным использовать в субстрата отдельные фракции белков молока и крови. По нашим предыдущим работам [2] известно, что среди комплекбактериальных протеаз способностью обеспечения наиболее глубокой конверсии белковых субстратов отличается каназа. Эта комплексная протеаза, продуцентом которой является микроорганизм рода Streptomyces, вырабатывается ВНИИ прикладной энзимологии (Вильнюс). Почти такая же глубина гидролиза казеина достигнута при последовательном применении пепсина и панкреатина [2].По литературным данным глубокий гидролиз фибриллярных белков, а также казеина и некоторых других белков достигается террилитином (комплексной протеазой из микроорганизма Aspergillus Terricola [3]. Учитывая вышеуказанное для гидролиза фракционированных белков выбрали следующие ферменты: пепсин и панкреатин, каназа, террилитин.

Для выделения из гидролизных смесей фракции свободных аминокислот и низших пептидов использовали ультрафильтрацию и гельхроматографию.

Материалы и методы

Фракционированные белки молока:

- казеин по Гаммерштену (Реахим);
- глобулиновая фракция молочной сыворотки;
- альбуминовая фракция молочной сыворотки.

Фракционированные белки плазмы крови:

- глобулиновая фракция плазмы крови;
 - альбуминовая фракция плазмы крови.

Исходные фракции были получены из молочной сыворотки и плазмы крови, фракционировали их осаждением колодным этанолом. В случае белков молочной сыворотки при концентрации этанола 25 % осаждалась фракция лактоглобулинов, а при концентрации этанола 50 % — фракция лактальбумина. При фракционировании белков плазмы крови при концентрации этанола 40 % осаждалась фракция глобулинов, а при концентрации этанола 60 % — фракция альбуминов. Все операции осаждения и выделения осадка проводились при температуре 0 ± 3 °C.

Названия фракций "лактальбумины" и "лактоглобулины" в настоящей работе используются по технологической литературе [4] (классификация на основе осаждаемости белков сульфатом аммония), что не полностью соответствует биохимической терминологии. Использовали следующие протеолитические ферменты:

- I) пепсин медицинский активностью I28 мккат/г производства Алма-Атинского мясокомбината;
- 2) панкреатин технический активностью 48 мккат/г производства Рижского мясокомбината;

- 3) комплексный протеолитический препарат каназа активностью 19,5 мккат/г;
- 4) террилитин медицинский производства Московского объединения медпрепаратов активностью 20 мккат/г;
- 5) протосубтилин технический активностью 45 мккат/г; производства Вильнюсского ферментного завода.

Активность ферментных препаратов определяли по модифицированному методу Ансона. Степень гидролиза определяли по накоплению аминного азота в гидролизате, определяемой по реакции первичных аминогрупп с тринитробензолсульфокислотой (THEC) [5] и вычисляли по формуле

$$\frac{N_A \cdot 100}{N_D}$$

где N_A - содержание аминного азота в гидролизате;

N_n - суммарное содержание азота пептидных связей белка вычисляли по литературным данным о аминокислотном составе белков молока и плазмы крови [6,7].

Состав полученных гидролизатов определяли методом гельхроматографии на сефадексе Г-ІО в колонке размером ІО х х 540 мм, уравновешенном 0,2 М боратным буфером с рН соответствующей рН гидролизата. Фракции собирали по 2 мл. Содержание белка во фракциях определяли по оптической плотности при 280 нм. Гидролиз проводили в реакторе периодического действия перемешиванием при температуре +30 °C. Продолжительность одного цикла гидролиза составляла 6 часов. Субстраты использовали в виде 2-процентных растворов. Все фракционированные белки растворялись в кислой среде, так как растворение их в щелочной среде затруднительно. Гидролиз считали целесообразно проводить в два этапа. Гидролиз начинали пепсином при рН 2,0. После 5-часового гидролиза регулировали рН гидролизата и продолжали гидролиз каназой при рН 8,5 или панкреатином при рН 8,0 в течение 6 часов. Часть опытов гидролиза фракционированных белков каназой или террилитином проводили также в один этап без предварительного гидролизата пепсином. В этом случае в начале гидролиза субстрат был в виде суспензии, но растворился в течение первых 20 минут гидролиза. Казеин растворялся легко в щелочной среде и для проведения гидролиза каназой или террилитином не требовался предварительный гидролиз пепсином.

При выделении фракций низкомолекулярных пептидов и аминокислот методом ультрафильтрации использовали ультрафильтрационную ячейку "Millipore" и фильтры ДМ-5 (Amicon) и РБАС (Pellicon) и отечественную ультрафильтрационную мембрану. Пробы концентрировали до половины объема. Низкомолекулярную фракцию, проходящую фильтр, собрали и высушили лиофильно.

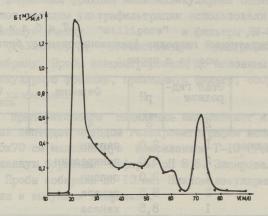
Для препаративного выделения аминокислот и низкомолекулярных пептидов методом гельхроматографии использовали колонку 5x70 см, наполненную молселектом Г-IO (Реанал), уравновешенную боратным буфером рН 8,5. Элюировали этим же буфером. Пробы собирали по IO-мл. Низкомолекулярные фракции объединили и высушили лиофильно.

Результаты и обсуждение

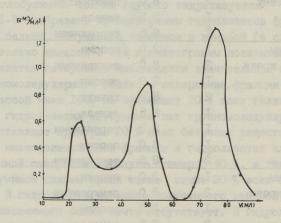
Результаты проведенных опытов (см. табл. І) показывают, что отдельные белки явно различаются по своей атакуемости протеазами. Альбумины молочной сыворотки, а также альбумины плазмы крови гидролизуются протеазами более глубоко, фракции глобулинов. Так же глубоко гидролизуется казеин. На фиг. І-5 изображены хроматограммы гидролизатов фракционированных белков, полученных пепсином и каназой (в случае казеина только каназой). Эти хроматограммы показывают, что в гидролизатах глобулинов наблюдается значительное содержание крупномолекулярного белка, а содержание фракции молекулярной массой ниже 1000 не превышает 20 % всех белковых веществ. В гидролизатах альбуминов пик крупномолекулярного белка составляет примерно 20 % всех белковых веществ, а содержание низкомолекулярной фракции в гидролизатах альбуминов молочной сыворотки образует примерно 40 %, в гидролизатах альбуминов плаэмы крови также свыше 30 % всех белковых веществ. В гидролизате казеина, полученного каназой, пик негидролизованного белка почти отсутствует. В гидролизате отмечены пики пептидов, молекулярной массой около IO 000 и 5000 и пик низкомолекулярной фракции молекулярной массой ниже 1000. Последний образует свыше 30 % от всех белковых веществ. В гидролизатах казеина, полученных террилитином (см. фиг. 6), отсутствует пик крупномолекулярных белков, но содержание низкомолекулярной фракции также совсем невелико.

Таблица І Ферментативный гидролиз фракционированных белков молока и крови

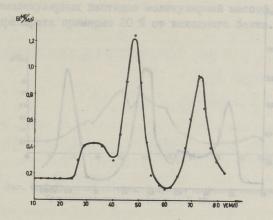
Белок	Этап гид- ролиза	рН	Фермент	5,0	Степень конверсии,%
I	2	3	4	100	5
Лактоглобулины	I	2,0	пепсин		21
	2	8,0	панкреатин		36
	I	2,0	пепсин		21
	2	8,5	каназа		38
	I	8,5	каназа		34
Лактальбумин	I	2,0	пепсин		23
	2	8,0	панкреатин		53
	I	2,0	пепсин		23
	2	8,5	каназа		60
	I	8,5	каназа		59
Казеин по	I	2,0	пепсин	Party la	22
Гаммерштену	2	8,0	панкреатин		52
	I	8,5	каназа		62
	/I	8,5	террилитин		39
Альбумины	I	2,0	пепсин	1"	21
плазмы крови	2	8,0	панкреатин		42
	I	2,0	пепсин		21
	2	8,5	каназа		56
	I	8,5	каназа		57
	I	8,5	террилитин		40
	I	2,0	пепсин		22
	2	8,5	террилитин		41
Глобулины	I	2,0	пепсин	5.2	21
плазмы крови	2	8,0	панкреатин		38
(2013)	I	2,0	пепсин		21
	2	8,5	каназа		41
	I	8,5	каназа		34



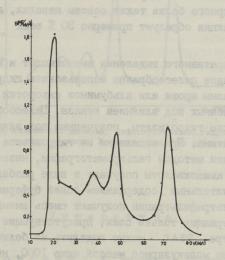
Фиг. 1. Гидролизат глобулинов молочной сыворотки. Двухступенчатый гидролиз пепсином и каназой. Хроматограмма на сефадексе Г-10.



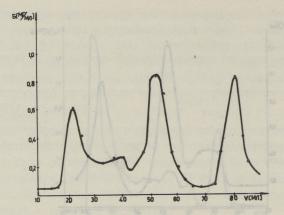
Фиг. 2. Гидролизат альбуминов молочной сыворотки. Двухступенчатый гидролиз пепсином и каназой. Хроматограмма на сефадексе Г-10.



Фиг. 3. Гидролизат казеина. Одноступенчатый гидролиз каназой. Хроматограмма на сефадексе Г-10.



Фиг. 4, Гидролизат глобулинов плазмы крови. Двухступенчатый гидролиз пепсином и каназой. Хроматограмма на сефадексе Г-10.



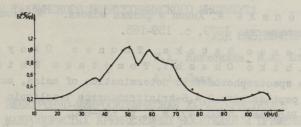
Фиг. 5. Гидролизат альбуминов плазмы крови. Двухступенчатый гидролиз пепсином и каназой. Хроматограмма на сефадексе Г-10.

На фиг. 7 изображена хроматограмма гидролизата казеина, полученная пепсином и панкреатином. В этом гидролизате пик крупномолекулярного белка также совсем невелик, а низкомо-лекулярная фракция образует примерно 30 % всех белковых веществ.

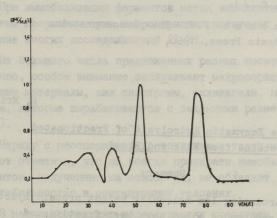
Для препаративного выделения аминокислот и низкомолекулярных пептидов целесообразно использовать гидролизаты
альбуминов плазмы крови или альбуминов сыворотки молока или
казеина, полученных под влиянием каназы. Целесообразно использовать также гидролизаты, полученные под влиянием пепсина и панкреатина. При выделении из гидролизата низкомолекулярной фракции методом гельхроматографии, низкомолекулярные пептиды и аминокислоты получают в виде разбавленных
растворов значительным содержанием солей буферного раствора. Методом ультрафильтрации получают смесь аминокислот и
пептидов, содержащих только соли, присутствующие в гидролизате. На фильтре PSAC можно выделить из белковых гидролизатов фракцию молекулярной массой ниже 1000, на отечественной ультрафильтрационной мембране молекулярной массой
ниже 2000, а на фильтре DM-5 ниже 5000.

При гидролизе альбуминов плазмы крови каназой и последовательном выделении низкомолекулярной фракции ультрафильтрацией через фильтр PSAC получен препарат аминокислот

и низкомолекулярных пептидов молекулярной массой ниже IOOO. Выход препарата примерно 20 % от исходного белка.



Фиг. 6. Гидролизат казеина. Гидролиз проведен террилитином. Хроматограмма на сефадексе Γ -10.



Фиг. 7. Гидролизат казеина. Двухступенчатый гидролиз пепсином и панкреатином. Хроматограмма на сефадексе Г-10.

Литература

- 1. Worowski K. Enzymatic degradation of protein mixtures. Enzyme, 1975, 19 N 1, 48-49
- 2. Эрин А.Э., Адамсон Т.П. Гидролиз казеина последовательным применением разных протеаз. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1982, № 526, с. 51-55.

- 3..ШатаеваЛ.К., Орлиевская О.В., Самсонов Г.В. Энзиматическая активность террилитина. Биохимия, 1973, т. 38, № 6, с. II69-II74.
- 4. Тёпель А. Химия и физика молока. М., Пищевая промышленность, 1979, с. 159-165.
- 5. Kazuo Satake, Tsuneo Okuyama, Mochihiko Ohashi, Tomotaka Shino-da. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid. The J. Biochem., 1960, 47, N 5, p. 654-660.
- 6. Дуденков А.Я., Дуденков Ю.А. Биохимия молока и молочных продуктов. М., Пищевая промышленность, 1972, с. 13.
- 7. Putnam F.W. The plasma proteins I. New York, London, Academic Press, 1960, p. 420.

A. Erir

The Enzymatic Hydrolysis of Fractionated Proteins from Milk and Blood

Summary

zates whey and bovine blood have been fractionated by means of precipitation with enthanol. Casein and the albumin and globulin fractions have been treated with pepsin, pancreatin, protosubtilin, terrilytin and kanase complex preparations. Pepsin has been used mainly in the first stage of a two-stage procedure. The alkaline proteinase fractions have been used also in the single-stage experiments. The course of hydrolysis has been followed by the increase of free amino groups and with the help of gel chromatography. None of the tested hydrolysis procedures can offer full hydrolysis. Therefore preparative gel chromatography and membrane filtration have been applied to separate the low molecular weight fraction from the total hydrolysate.

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED TPYJH TALINHCKOFO NOINTEXHNYECKOFO NHCTNTYTA

УДК 546.284:577.158

К.А. Кивисилла, М.А. Юхасоо, А.А. Паат

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОПОРИСТЫХ КРЕМНЕЗЕМНЫХ НОСИТЕЛЕЙ И ПРИМЕНЕНИЕ ИХ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

При иммобилизации ферментов метод ковалентного связывания на неорганических макропористых носителях привлекает внимание многих исследователей [I-3].

Из большого числа предложенных разных носителей, несомненно, особое внимание заслуживают макропористые кремнеземные материалы, как силохромы, силикагели, пористые стекла, которые вырабатываются с заданными размерами пор [4, 5].

Наряду с неоспоримыми достоинствами таких материалов следует отметить, что не всегда препараты иммобилизованных ферментов, полученные на основе их, не обладают достаточной стабильностью в операционных условиях.

В наших предыдущих исследованиях предложен метод улучшения свойств макропористых носителей путем обработки их реакционноспособными полимерами [5].

Возникали сомнения, что обработка полимерами может нежелательно изменить макроструктуру носителей. С целью исследования этих аспектов нами в этой работе проведено исследование структуры неорганических носителей с помощью сканирующего электронного микроскопа и исследовано связывание одного фермента на этих же носителях.

В качестве фермента была выбрана глюкозооксидаза, иммобилизованные формы которой имеют большое значение для
аналитических систем и могут быть применены в технологических процессах окисления D-глюкозы в глюконовую кислоту.

Материалы и методы

В качестве пористых кремнеземных носителей использовали следующие силикагели и силохромы Горьковского опытного завода ВНИИ НП:

- I) MCA-750-5 тов. с удельной поверхностью $52 \text{ m}^2/\text{г}$ и средним диаметром пор 80 нм;
- 2) MCA-I500-6 тов. и MCA-I500-259 с удельной поверхностью 35 M^2 /г и средним диаметром пор I48 нм;
- 3) MCA-2500-245 с удельной поверхностью II $\rm m^2/r$ и средним диаметром пор 320 нм;
- 4) СХ-I,5-333 с удельной поверхностью 27 $\text{м}^2/\text{г}$ и средним диаметром пор II5 нм и силикагель, полученный от Еронем ВНИИ ИРЕА:

С-170, с удельной поверхностью 170 м²/г и средним диаметром пор 50 нм.

Методы модифицирования кремнеземных носителей разработаны в Таллинском политехническом институте в сотрудничестве с ВНИИ прикладной биохимии НПО "Биохимреактив".

В качестве исходного фермента использовали глюкозооксидазу, полученную от Каменского спиртокомбината с удельной ферментативной активностью 200000 нкат/г.

Активность глюкозооксидазы определяли титриметрическим методом. В качестве субстрата использовали 3-процентный раствор D-глюкозы с рН 7,0 при аэрации воздухом.

Иммобилизацию глюкозооксидазы проводили путем контактирования ферментного раствора с носителем при комнатной температуре в течение 4-24 часов. После инкубации иммобилизованный препарат промывали буфером, I М раствором хлористого натрия и снова буфером.

Стабильность препаратов оценивали по остаточной активности после промывки препаратов в колонке с 3-процентным раствором $\,$ D -глюкозы при температуре 30 $\,$ C $\,$ B течение 5 часов.

Для определения микроструктуры макропористых неорганических носителей проводили их исследование с помощью ска-

нирующего электронного микроскопа БС-300 в лаборатории электронной микроскопии ТПИ.

Результаты и обсуждение

На фиг. І приведены микрофотографии, характеризующие гранулы силохрома марки СХ-І,5, откуда видно, что в случае силохрома обнаружены дефекты структуры. Микроструктура исследуемых носителей характеризуется значительной гетерогенностью с явными макропорами между участками с более узкой пористостью.

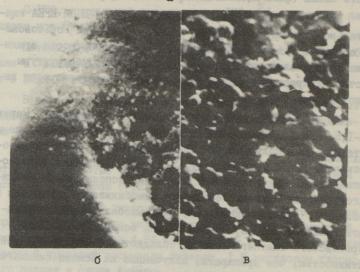
На фиг. 2 и 3 приведены микрофотографии силикагелей марки MCA-2500 и C-I70. Как видно из фиг. 2,в, силикагель марки MCA-2500 характеризуется малопористым слоем на поверхности гранул, но поверхность без слоя (рис. 2,б) и поверхность слома (фиг. 2,г) являются явно макропористыми.

Внешняя форма частиц силикагеля Еронем ВНИИ ИРЕА значительно отличается от формы частиц силикагеля Горьковского опытного завода (фиг. 3,а и 2,а). На поверхности армянских силикагелей видны мелкие частички или субструктуры частиц. Микроструктура этих носителей характеризуется высокой пористостью.

На фиг. 4 приведена микрофотография силохрома марки СХ-I,5, модифицированного активным полимером. На этих же носителях были получены иммобилизованные препараты глюкозооксидазы. Для сравнения результатов иммобилизации глюкозооксидазы на пористых кремнеземах нами использовались силикагели разных партий. Результаты иммобилизации приведены в таблице I. Данные показывают, что иммобилизованные препараты глюкозооксидазы, полученные на основе силикагелей Горьковского опытного завода, обладают в 2-3 раза меньшей активностью, чем препараты, полученные на основе силикагелей Еронем ЕНИИ ИРЕА или силохрома СХ-I,5.

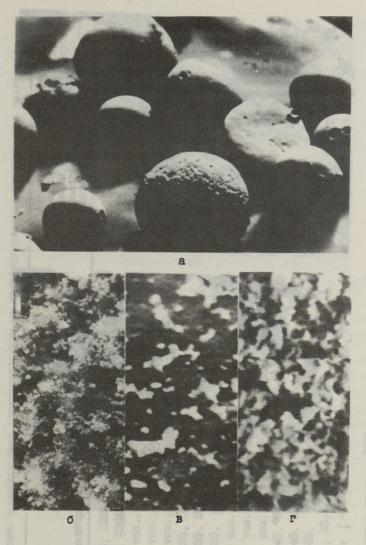
Препараты иммобилизованной глюкозооксидазы, полученные на основе модифицированного силохрома марки СХ-I,5 использовали в опытах окисления D-глюкозы в глюконовую кислоту. После полного окисления D-глюкозы использованный иммобилизованный препарат обладал 55-60 % от исходной активности.





Фиг. 1. Силохром марки СХ-1,5:

- а) внешний вид частиц. Ув. 200х;
 - б) поверхность частицы. Ув. 2000х;
 - в) микроструктура поверхности. Ув. 20000х.



Фиг. 2. Силикагель марки МСА-2500;

- а) внешний вид частиц. Ув. 100х;
- б) поверхность частицы. Ув. 2000х;
- в) микроструктура поверхности "типичной" частицы. Ув. 20000х;
 - г) микроструктура поверхности слома частицы. Ув. 20000х.



Фиг. 3. Силикагель ЕроНема-170:

- а) внешний вид частиц. Ув. 100х;
- б) поверхность частицы, КУв. 2000х;
- в) поверхность частицы. Ув. 2000х;
 - г) микроструктура поверхности частицы. Ув. 30000х.

Результаты иммобилизации глюкозооксидазы не модифицированных кремнеземных носителях

MONTON SONOTHING THE MANAGE TO A CONTROL OF THE	Активность Выход импобили- актив- зованного ности, препарата, %	BEXCOL ARTHBHOCTE ARTHER HOCTE, MERKE CYG-	Активность после про- мывки суб- стратом	OCT DOCT CYÓ-
Характеристика носителя	HRAT/F		нкат/г	%
C-170, 3C, IDIA	584	18,7	496	84,9
С-170, ЭС, ПЭПА, п-бензохинон	904	41,4	819,2	9,06
MCA-750-5 rob., 3C, H3HA, LA	299,2	9,11	235,2	78,6
МСА-750-5 тов., ЭС, ПЭПА, п-бензохинон	251,2	7,5	190,4	75,8
МСА-750-5 тов.,	291,2	12,5	240	82,4
MCA-1500-259, 3C, IIBITA, LA	180,8	5,2	124,8	0.69
мса-1500-259, ЭС, ПЭПА, п-бензохинон	174,4	1,9	88	50,5
мСА-1500-259, у-аминопропил-триэтоксисилан, ГА	132,8	5,2	123,2	95,8
MCA-1500-6 TOB., 3C, HEIRA, IA	254,4	9,4	251,2	7.86
MCA-1500-6 тов., ЭС, ПЭПА, п-бензохинон	233,6	8,3	150,4	64,4
мся-1500-6 тов., \ -аминопропил-триэтоксисилан, ГА	214,4	8,4	160	74,6
MCA-2500-245, 3C, IDIA, IA	217,6	8,5	9,501	48,5
МСА-2500-245, ЭС, ПЭПА, п-бензохинон	166,4	9,6	94.46	58,7
мся-2500-245, у - аминопропил-триэтоксисилан, ГА	216	8,4	158,4	73,3
СХ-1,5-388, ЭС, ПЭПА, п -бензохинон	9,6911	26,2	9,188	75,4
СХ-І,5-388, у-аминопропил-триэтоксилан, ГА	723,2	26,8	699,2	26,7
BE SEE THE SEE				



Фиг. 4. Силохром марки СХ-1,5, модифицированный активной полимерной пленкой, Ув. 20000х

Таким образом, электронно-микроскопические исследования разных кремнеземных материалов выявляют принципиальные различия во внешней форме и микроструктуре их. С помощью полученных иммобилизованных препаратов глюкозооксидазы удается провести процесс полного окисления D-глюкозы, но после этого препараты теряют 40-45 % активности.

Авторы выражают искреннюю благодарность М. Мильнеру за помощь в работе.

Работа выполнена под руководством А.И. Кёстнера.

Литература

- I. Иммобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы / Под ред. И.В. Березина, В.И. Антонова, К. Мартинен. Изд-во МГУ, 1976.
- 2. Кёстнер А.И. Иммобилизованные ферменты. Успехи химии, 1974. Т. XLIII, в. 8, с. 1480-1511.
- 3. Pat. N 1342186 (Brit.) Enzyme complexes /Nestle S.A., 5. 06. 1972, 28. 12. 1973; C1.C. 3 H₃, 08 H ½02.

- 4. Киппер Х.Я., Эрин А.Э., Егоров Х.Р., Къивисила К.А., Кёстнер А.И. Получение активированных изоцианатами кремнеземных носителей для иммобилизации ферментов. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1976, № 402. с. 21-28.
- 5. Киппер Х.Я., Егоров Х.Р., Кивисилла К.А. Характеристика модифицированных полимерами неорганических носителей. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1979, № 465, с. 33-39.

K. Kivisilla, M. Juhasoo,

Scanning Electron Microscopy Study of Some Macroporous
Siliceous Materials and Their Use as Carriers for
Immobilized Glucose Oxidase

Summary

Various types of macroporous siliceous materials such as carriers offering modification with reactive polymers have been investigated with scanning electron microscope. Glucose oxidase has been immobilized on the same carriers after activation with cyanogen bromide, p-benzochinon and glutar dialdehyde. The activities up to 1000 nkat/g have been obtained.

A. K K T B C D X. R. D D K H A. B. B F O D O B X. P. A. B R O D O B X. P. A. R. C D O B X R. C D O B

conside, M. efficient . M. constant . M. constant more more action of management of the constant of the consta

passance possore sponers notice to the formula to the possor to the passance possor sponers notice to the passance of the passance possors sponers notice to the passance of the passance possor that the passance possor sponers notice to the passance of the

authors derdere offer an additional of the restyle polymers
have been investigated with scending clackers engages of the case carriers
after scrivates has been immobilitied on the commobilities and
after scrivates with overages broade, p-benecocians and
glober dislocates in action average or to 1000 axet/g nave

1. Помобите ответрене фермонти. Совтемонно осстояние и персорогиям / Пом ред. и. В. реграмма. В. И. Автонова, И. М. Мартийна бильно 819, 1976.

2. H & C R R & P. A.M. Resociated by the department of the Resociation of the second s

3. Pet. N 1342986 (Bels.) Engrac dosplates /Seatle 5.1 5. 06. 1972, 28. 12. 0073: 09.0. 3 B., 08 B /08. TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED
TPYJH TALJUHCKOFO NOMITEXHUYECKOFO UHCTUTYTA

УДК 577.151.03:577.152.34

Л.М. Якуницкая, А.И. Кёстнер, М.А. Самарцев

ТЕРМИЧЕСКАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ ХИМОТРИПСИНА С РАЗЛИЧНОЙ ГЛУБИНОЙ МОДИФИКАЦИИ АМИНОГРУПП

Включение ферментов в гели природных и синтетических полимеров является распространенным способом их иммобилизации. Один из путей повышения стабильности получаемых таким образом биокатализаторов - включение в полимеризующиеся гели молекул фермента, предварительно модифицированных реагентами, содержащими двойные связи [1-6]. При этом происходит ковалентное связывание фермента с матрицей, в результате чего практически исключается вымывание фермента из геля раствором субстрата, а в случае протеолитического фермента подавляется также и автолиз. Изменение термической стабильности иммобилизованного таким путем фермента определяется одновременным действием нескольких факторов: химической модификацией функциональных групп фермента, изменением непосредственного окружения белковой глобулы, жением конформационной подвижности молекулы [6]. Раздельное изучение влияния этих факторов на поведение фермента бует постановки модельных экспериментов.

В настоящей работе анализируются изменения термостабильности химотрипсина при модификации его аминогрупп до различной глубины виниловыми мономерами — хлорангидридом акриловой кислоты и малеиновым ангидридом.

Материалы и методы

« -химотрипсин ("Sigma", США) очищали ультрафильтрацией на установке фирмы "Amicon" (Голландия) на полых волокнах с номинальным молекулярно-массовым пределом 10000.

Модификацию химотрипсина акрилоилхлоридом и малеиновым ангидридом проводили по методикам [5] и [7] с добавлением реагентов одной порции в количествах, указанных в табл. І. Реакционные смеси диализовали против воды (4х4 л) при $4\,^{\circ}\mathrm{C}$.

Таблица I Глубина модификации и активность образцов модифицированного химотрипсина

Модификатор	Молярное соотношение модификатора и фермента	Глубина моди- фикации в % от предельной	Удельная ак- тивность в % от нативного фермента
Хлорангидрид	7:I	24	66
акриловой	I4:I	24	68
кислоты	28:1	3I	40
	70:I	52	53
	I40:I	86	67
	280:I	85	8I
Малеиновый	7:I	58	79
ангидрид	28:I	84	47
MONDONNUATE OF THE PARTY OF THE	I40:I	85	32

Содержание белка в растворе определяли спектрофотометрически, принимая коэффициент молярной экстинкции химотрипсина и продуктов его модификации равным 50000 моль — [см—] [8].

Определение свободных аминогрупп белка проводили по реакции с тринитробензолсульфокислотой [9] калибровкой по растворам глицина. Глубину модификации рассчитывали в процентах от предельной модификации.

Включение акрилоил-химотрипсина в гель полиакриламида производили фотополимеризацией в воде при следующих соотношениях реагентов: 500 мг акриламида, 55,6 мг акрилоил-химотрипсина с глубиной модификации IOO %, 50 мг N,N-(I,2-дигидроксиэтилен)-бисакриламида, 5 мкл тетраметилэтилендиамина, рибофлавина в концентрации 0,015 мг/мл. Общий объем смеси I3 мл. Полимеризацию проводили при 20 °C в течение I8 часов при освещении ультрафиолетовым светом. Полученный гель измельчали и промывали декантацией воды и 0,I М фосфатным буфером рН 7,6, и хранили в этом же буфере при 4 °C.

При определении активности по гидролизу казеина, гемоглобина и п-нитроанилида ацетилтирозина (Ac-Tyr-pNA) пользовались методами [10, II, I2] соответственно; удельные активности препаратов рассчитывали в процентах от удельной активности нативного фермента. При определении активности акрилоил-химотрипсина, включенного в гель, навеску иммобилизованного фермента (I20 мг) инкубировали при перемешивании с 10 мл раствора субстрата (I0⁻³ M Ac-Tyr-pNA) при 20 ос и измеряли оптическую плотность раствора при 385 нм.

Термоинактивацию нативного и модифицированного химотрипсина изучали при 45 $^{\rm O}$ C в 0,I М фосфатном буфере с рН 7,6 в отсутствии ионов кальция. Пробы фермента по 0,3 мл концентрацией I,5 мг/мл инкубировали при 45 $^{\rm O}$ C в течение интервалов времени от I,5 до 20 минут, после чего охлаждали до комнатной температуры и определяли остаточную активность по гидролизу Ac - Tyr - p NA.

Препаративное изоэлектрофокусирование проводили на установке "MULTIPHORE" (LKB, Швеция) в колонке IIO мл в градиенте плотности сахарозы. Для создания градиента рН использовали смесь амфолинов (LKB, Швеция) с интервалами рН 4-6 (I мл), 6-8 (I мл) и 5-8 (0,5 мл). Начальный ток 6 мА, напряжение 450 В, время установления равновесия 2I,5 ч.

Результаты и обсуждение

По литературным данным при нековалентном включении химотрипсина в 40-процентный гель полиакриламида наблюдается повышение в несколько раз его стабильности при 50 °C, однако еще более эффективная стабилизация происходит при включении в тот же гель химотрипсина, сшитого с помощью глутаральдегида с сывороточным альбумином [13]. С чем связан этот эффект дополнительной стабилизации — с изменением химических свойств при модификации функциональных групп фермента или с повышением жесткости конформации белка и ограничением его подвижности? Ответ на этот вопрос может дать изучение свойств модифицированного фермента до и после включения его в гелевую структуру.

Для более подробного исследования этого вопроса мы проводили опыты по термоинактивации включенного в полиактриламидный гель модифицированных ненасыщенными кислотами препаратов Д-химотрипсина. В первую очередь мы исследовали модификацию фермента с нейтральными и кислотными ацилирующими агентами.

Основные результаты этой серии опытов, приведенные в табл. I, показывают, что активность химотрипсина при замещении его аминогрупп хотя и уменьшается, но все же остается, в основном, в пределах не ниже 50 % активности нативного фермента; несколько более выраженное снижение активности в случае предельной модификации малеиновым ангидридом можно приписать изменению суммарного заряда молекулы белка при замене аминогрупп на анионные карбоксильные группировки.

Активность определяли по гидролизу p-pq Ac-Tyr-pNA с концентрацией 10^{-3} M, pH 7,6 при комнатной температуре.

Полученные фракции модифицированного фермента иммобилизованы в ПААГ. При определении хода термоинактивации иммобилизованных препаратов была обнаружена нелинейность в полулогарифмических координатах. Так же, как и в случае нативного фермента или химотрипсина, модифицированного растворимым декстраном с молекулярным весом 40000 [13], наблюдаемые для наших модификаций скорости термоинактивации при 45 °C сильно зависят от концентрации фермента, а соответствующие кривые отвечают смешанному порядку реакции. Сложные кривые кинетики инактивации иммобилизованных, а также растворимых ферментов толкуются разными авторами по-разному: наличием нескольких фракций с различной стабильностью, процессами ассоциации-диссоциации и т.п. Мы разделяем выраженную в литературе точку зрения, что в случае протеолитических ферментов такой ход кривой свидетельствует об одновременном протекании мономолекулярной термоденатурации и автолиза. Учитывая, что автолитической инактивацией можно пренебречь лишь при концентрациях химотрипсина ниже 10⁻⁶ м [13], мы считали неправомерным проводить расчет констант скорости термоинактивации, и в табл. 2 приведены иллюстративные данные по изменению активности нескольких препаратов в концентрации I,5 мг/мл в течение 20-минутной инкубации при 45 °C

Термоинактивация ацилированного химотрипсина при 45 °C и рН 7,6

Модификатор	Глубина модифи-	Остаточная активность, % от начальной					
	каций,	I, 5 мин	5 мин	I2 мин	20 мин		
Нативный			1				
химотрипсин,		67	47	33	25		
модифициро-	24	94	82	65	55		
ванный:	3I	93	82	71	59		
хлорангидридом	52	79	64	45	31		
акриловой	85	71	51	38	30		
кислотн	86	76	59	42	38		
- 10x 1	58	71	58	42	33		
малеиновым	84	75	60	48	40		
ангидридом	85	70	40	23	20		

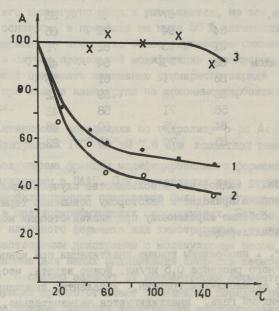
Из табл. 2 видно, что в большинстве случаев ацилирование химотрипсина приводит к некоторому повышению термостабильности, особенно выраженному при низкой степени модификации акрилоилхлоридом.

На фиг. I изображены кривые инактивации при концентрации ферментного раствора 0,5 мг/мл. Можно видеть, что в тех же условиях акрилоил-химотрипсин, ковалентно включенный в полиакриламидный гель, инактивируется незначительно, причем стабильность его существенно выше, чем при механическом включении в гель более высокой концентрации [13].

Сопоставление приведенных данных позволяет сказать, что основным фактором, приводящим к стабилизации кимотрипсина при ковалентном включении в гели, является резкое снижение конформационной подвижности за счет многоточечного связывания с полимерной структурой, что согласуется с трактовкой авторов, впервые предложивших концепцию многоточечного связывания как метод стабилизации ферментов [5].

Все полученные препараты модифицированного химотрипсина, по данным изоэлектрофокусирования, характеризуются высокой гетерогенностью, связанной с неоднозначностью реакции

ацилирования аминогрупп фермента. С целью уточнения вклада в суммарную активность и термостабильность препаратов отдельных компонентов с различными изоэлектрическими точками проведено препаративное изоэлектрофокусирование одного из образцов — малеил-химотрипсина со средней глубиной модификации 58 %.



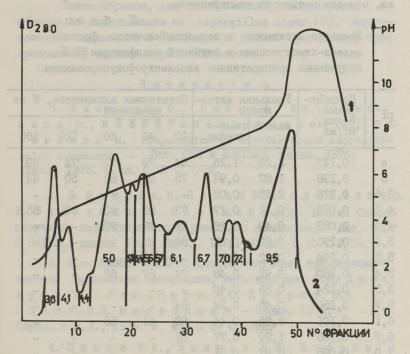
Фиг. 1. Термоинактивация образцов химотрипсина при 45° и рН 7,6:

1 - нативный химотрипсин;

2 - акрилоил-химотрипсин с предельной глубиной модификации;

3 - акрилоил-химотрипсин, включенный в гель полиакриламида.

Как видно из фиг. 2 препарат содержит большое число фракций с различными значениями изоэлектрических точек. Все фракции были подвергнуты диализу и охарактеризованы по активности с использованием в качестве субстратов I-процентного раствора казеина и 2-процентного раствора гемоглобина. Представленные в таблице 3 величины удельной активности показывают, что фракции неравноценны и вносят



Фиг. 2. Препаративное изоэлектрофокусирование малеил-химотрипсина с глубиной модификации 58%:

1 - градиент рН:

оптическая плотность раствора при 280 нм. Отбор фракций показан вертикальными линиями.

Условия выполнения опыта см. в тексте.

различный вклад в суммарную активность препарата. Однако к полученным значениям удельной активности нужно относиться с осторожностью, поскольку нет гарантии полного удаления амфолинов при диализе, а сумма активностей всех фракций после разделения на 37-40 % ниже исходной активности препарата, подвергнутого разделению.

При изучении устойчивости отдельных фракций к тепловым воздействиям (табл. 3) обнаружено, что величины остаточной активности фракций с различными изоэлектрическими точками для одного и того же времени инкубации при 45 °C

довольно близки и практически во всех случаях несколько ниже, чем для нативного химотрипсина.

Таблица
Удельная активность и термостабильность фракций малеил-химотрипсина с глубиной модификации 58 %, полученных препаративным изоэлектрофокусированием

pI	Концент- рация белка, мг/мл	Удельная актив- ность		Остаточная активность, начальной				, % ot
ρı		казеин	гемо- глобин	20 M	ину 40	т 60	120	180
a	0,147	2,20	I,25	84	79	77	74	69
б	0,198	I,87	0,94	75	69	62	50	44
3,6	0,128	0,15	0,08	-	-11	7-1-	-	-
4,I	0,081	0,32	0,17	73	66	63	59	55
4,4	0,083	0,49	0,20	81	72	70 *	-01	-
5,0	0,190	0,82	0,43	60	1-11	- 1	441	-
5,2	0,194	0,62	0,22	-1,8	19-10	1 80	4	-
5,4	0,180	0,92	0,48	74	67	60	+ 1	-
5,5	0,124	0,85	0,40	-	-	-	N- L	1-
5,7	0,156	0,45	0,24	64		-	-	-
6,I	0,101	0,92	0,44	69	6I	56	-	-
6,7	0,106	I,39	0,77	8I	_ 0	5 -	밀	-
7,0	0,095	0,97	0,51	-	-	-	-	-
7,2	0,069	0,88	0,46	80	73	68	62	60
9,5	0,143	I,07	0,56	78	74	72	68	6I

а - нативный химотрипсин;

Удельную активность по гидролизу І-процентного раствора казеина определяли при 35 $^{\rm O}$ C в течение IO минут, pH 7,6; по гидролизу 2-процентного раствора гемоглобина — при 35 $^{\rm O}$ C в течение 20 минут, pH 7,6.

Остаточную активность определяли по гидролизу І-процентного раствора казеина.

Так как величина изоэлектрической точки непосредственно связана с глубиной модификации аминогрупп, можно сказать, что в наших условиях не происходит резкого изменения свойств фермента в зависимости от количества модифицированных групп.

б - нефракционированный препарат.

Таким образом, для иммобилизации химотрипсина, в отличие от глюкоамилазы из Aspergillus niger [6], многоточечное связывание с носителем не должно приводить к прогрессивному падению термостабильности.

Литератур а

- 1. Jaworek D., Botsch K.H., Wei-mann G., Nelböck-Hochstetter M., Determann H. Preparation of carrier-bound macromole-cular compounds. Пат. США № 4081329, заявл. 1976; Опубл. 1978. М.Кл. С О7 С 7/02.
- 2. Д. Яворек, М. Нэльбёк-Хохштэттер, К. Беаукамп, Х. Бергмейер, К. Боч. Способ получения нерастворимого ферментного комплекса. — Пат. СССР № 52452I, заявл. 1973; Опубл. 1976. М. кл. С 07 С 7/02.
- 3. А.с. 666815 (СССР). Способ получения тромборезистентых полимерных материалов; Авт. изобрет. Л.И. В а л у \ominus в, М.А. А л ь Н у р и, Н.С. Е г о р о в, Н.А. П л а т \ni , В.В. Н а в р о ц к а я. Заявл. 1976; Опубл. в Б.И., 1979. М. кл. С 07 С 7/02.
- 4. Плате Н.А., Валуев Л.И., Егоров Н.С., Аль-Нури М.А. Ковалентное связывание ацилированного трипсина с полимерными носителями. Прикладная биохимия и микробиология, 1977, т. 13, № 5, с. 673-676.
- 5. Мартинек К., Торчилин В.П. Основные принципы стабилизации ферментов. В кн.: Итоги науки и техники. Биологическая химия, т. 12. Изд-во ВИНИТИ. М., 1978, с. 17-18.
- 6. Герасимас В.Б., Черноглазов В.М., Клесов А.А. Влияние последовательной химической модификации на активность и термостабильность растворимой и иммобилизованной глюкоамилазы. Биохимия, 1980, т. 45, № 6, с. 1086-1091.
- 7. Shinar S., Gertler A. Maleylation and pH-dependence of Streptomyces griseus protease B. Int. J. Peptide Protein Res., 1979, vol. 13, N 3, p. 218-222.

- 8. Reiner R., Siebaneick H.U., Christensen I., Döring H. Chemical modification of enzymes III; Cross-linked -chxmotrypsin. J. Mol. Catal., 1977, vol. 2, N 3, p. 335-349.
- 9. Satake K., Okuyama T., Ohashi M., Shinoda T. The spectrophotometric determination of amine, amino and peptide with 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid. J. Biochem., 1960, vol. 47, p. 654-659.
- 10. K u n i t z M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol., 1947, vol, 30, N 4, p. 291-310.
- 11. Ans on M.L. Estimation of pepsin, trypsin, papain cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physicl., 1938, voll. 22, N 1, p. 79-89.
- I2. Белки, ферменты и **стерины базидиальных** грибов / Под ред. О.П. Низковской. Л., Наука, I979. 34 с.
- 13. Kawamura Y., Nakanishi K., Matsuno R., Kamikubo T. Stability of immobilized -chymotrypsin. Biotechn. and Bioeng., 1981, voll. 23, N 6, p. 1219-1236.

L. Yakunitskaya, A. Köstner, M. Samartsev

The Thermostability of Chymotrypsin with Different Degree of Amino Group Modification

Summary

Chymotrypsin has been acylated by adding different amounts of acroloyl chloride or maleac anhydride. Due to the reaction extremely heterogeneous modification occurs which has been demonstrated by isoelectrofocusing technique. All modified products were active towards a small molecular weight substrate, the N-acetyl-L-tyrosine p-nitroanilide. Maleyl-chymotrypsin fractions of different pI values have somewhat lower thermostability relative to the native enzyme, while that of acryloyl-chymotrypsins was somewhat higher. The entrapment into polyacrylamide gel of highly substituted acryloyl-chymotrypsin increases substantially thermostability.

This phenomenon is due to covalent links between the enzyme molecule and polymer network. These covalent links are formed in the course of copolymerization of the modified enzyme and acryl monomers.

CHICARDONS, A TRANS US CHRISTIS HOMEOUNG CHICARDON DERE-

Christen B. Blebensick H.J., Chesical sollfication of Englasted at the Chesical sollwol. Catal. 1977, voyestraged . W. 335-399.

Shi describe ditw. nigoro eardQ. lo. willianterwedled or esign, amino and paptimoltantilbow. quorb. enima. to. Sermedleon nic soid. - J. Biochem., 1960, vol. 47, p. 65-409.

10. K c s i t z E. Caylersiane soybean trypsis inhibitor - I Gen. Physich., 1947, vol. 30, N 4, p. 291-310.

emumble of actological and been activated by andings direction amongs of actological activates of actorogical activates of actorogical activation of actorogical activation of activations activations.

This phonomenon is due to covalent links between the energy molecule and polymer network. These covalent links are formed in the course of copolymerisation of the modified eingme and acryl monomers.

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.07 (087.8)

А.Х. Калда

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ С АСПАРТАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ. СООБЩЕНИЕ ІУ. ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ВОДОРОДА И АММОНИЯ НА ХОД ПРЕВРАЩЕНИЯ ФУМАРАТА

Клетки Escherichia coli К I2 и Propionibakterius shermanii осуществляют конверсию фумарата в L-аспартат. Эта реакция применяется для синтеза L-аспарагиновой кислоты.

Под действием фермента аспартазы (L-аспартат-аммиаклиазы КФ 4,3.1.1), имеющегося в бактериях, происходит прямое минирование фумарата за счет аммиака. Но так как фумарат является промежуточным продуктом цикла трикарбоновых кислот, возможны превращения субстрата в реакциях общего метаболизма бактерий. Наши опыты показали, что в результате действия других ферментов клетки, молярный выход аспартата может оставаться ниже единицы. Из литературы известно, что одновременно с L-аспарагиновой кислотой из фумарата аммония образуется, по крайней мере, один побочный продукт [1]. Показано, что предварительное нагревание клеток Е. соli может увеличивать проницаемость клеточной оболочки цитоплазматической мембраны, а также изменять стабильность и активность отдельных клеточных белков, в результате чего позволяет получить клетки E. coli с высокой L-аспартазной активностью [2]. Изучая термочувствительность свободных и включенных в 10-процентный полиакриламидный гель (ПААГ) клеток E. coli и P. shermanii установили, что термическая обработка клеточной массы перед иммобилизацией не позволяет увеличивать выход аспартата. Задачей настоящего исследования являлось изучение влияния концентраций Н и

NH₄ - ионов в реакционной смеси на скорость превращения субстрата, а также на степень конверсии субстрата в целевой продукт.

Материалы и методы

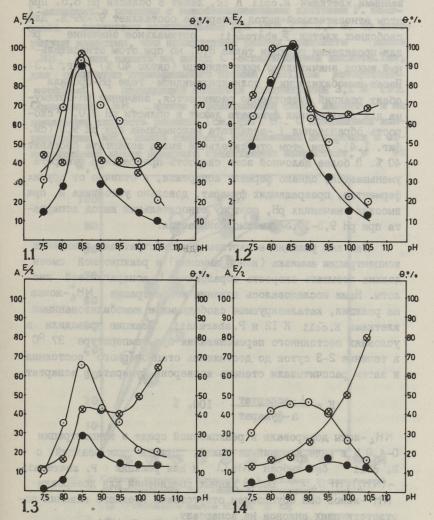
Исходная культура Р. shermanii представлена кафедрой микробиологии Московского государственного университета. Биомасса Р. shermanii выращена нами по ранее описанной методике [3], биомасса E. coli К I2 получена из НПО "Биохимреактив". Реакцию проводили при рН 8.5, температуре 37 °С и непрерывном перемешивании, в качестве субстрата использовали I M раствор фумарата аммония или фумарата натрия с добавлением определенного количества аммонийных солей. Иммобилизацию клеток в ПААГ проводили по методике [4]. При определении активности интактных клеток P.shermanii B реакционный сосуд добавляли 3 % толуола для частичного лизиса клеточных стенок и повышения проницаемости клеточной оболочки и цитоплазматической мембраны для субстрата и продуктов реакции. В аликвотах, отбираемых из реакционной смеси в определенное время, концентрацию фумарата определяли по поглощению при 240 нм [5], а концентрацию L-аспарагиновой кислоты - ингидриновым методом. На основе полученных зультатов рассчитывали скорость расхода субстрата Аф, скорость образования аспартата Ад (мимоль фумаровой или аспарагиновой кислоты мин за I г биомассы или препарата) и относительный выход целевого продукта

$$\theta = A_A/A_{\phi} \cdot 100, \%$$

Из этих же данных рассчитывалась также скорость нецеленаправленного расхода субстрата $A_{H}=A_{\Phi}-A_{A}$.

Результаты и обсуждение

В первых опытах изучалась pH-зависимость реакции превращения фумарата в L-аспарагиновую кислоту с целью выяснения оптимального значения pH среды для максимального выхода продукта. По литературным данным выделенная из клеток аспартаза устойчива при pH 6-8, причем изменение значения pH ниже 5,5 и выше 8,5 вызывает необратимую инактивацию фермента [6]. pH-оптимум синтеза L-аспарагиновой кислоты иммобилизованными клетками микроорганизмов может остаться при pH 8,5 [7], но может и снизиться с pH 10,5 до pH 8,5 [8]. Из данных, полученных нами (см. фиг. I.I, I.2), видно, что pH-оптимум реакций, катализируемых свободными и иммобилизо-



Фиг. 1. pH-зависимость превращения фумарата свободными и иммобилизованными клетками E. coli K 12 и P. shermonii:

- скорость расхода фумарата;
- скорость образования L-аспартата;
- относительный выход L-аспартата;
- 1.1. свободные клетки Е. сой К 12;
- 1.2. иммобилизованные клетки E. coli K 12;
- 1.3. свободные клетки Р. shermanii;
- 1.4. иммобилизованные клетки Р. shermonii

ванными клетками Е.coli К I2, лежит в области рН 8,5. При этом относительный выход аспартата составляет 97-99 %. Для свободных клеток Р. shermanii оптимальное значение рН для проведения реакции также 8,5, но при этом относительный выход значительно ниже единицы (около 40 %) (фиг. I.3). После иммобилизации в полиакриламидном геле рН-профили обеих реакций существенно расширяются, значение рН-оптимума для превращения фумарата лежит в области рН 9,0, скорость образования L -аспартата максимальна при рН 9,5 (см. фиг. I.4), при этом относительный выход аспартата составит 40 %. В более щелочной зоне скорость превращения фумарата уменьшается, однако фермент аспартаза, в отличие от других ферментов, превращающих фумарат, довольно устойчива и при высоких значениях рН, поэтому относительный выход аспартата при рН 9,5-I0,5 заметно повышается.

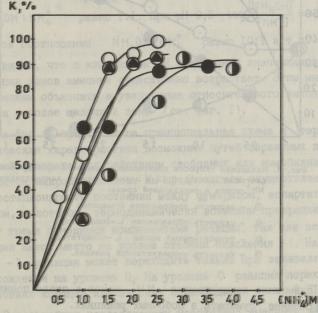
Так как реакция аспартазы двухсубстратная, повышение концентрации аммиака (ионов аммония) в реакционной смеси должна повышать скорость образования L-аспарагиновой кислоты. Нами исследовалось влияние концентрации NH_4^+ -ионов на реакции, катализируемые свободными и иммобилизованными клетками E.coli K I2 и P.shermanii. Реакцию проводили в условиях постоянного перемешивания при температуре 37 °C в течение 2-3 суток до достижения стационарного состояния и затем рассчитывали степень конверсии фумарата в аспартат

$$K = \frac{L-acпартат}{\Delta - \dot{\phi}ymapaT}$$
 • 100, %

 NH_4 -ионы дозировали в реакционной среде в концентрации 0-4,0 М в виде аммонийных солей, причем для реакций с E. coli был выбран NH_4Cl и для реакций с P. shermanii - $(NH_4)_2HPO_4$. Выбор данных соединений для дозировки NH^+ -ионов был обусловлен отсутствием вредного влияния соответствующих анионов на аспартазу.

Как следует из фиг. 2, концентрация NH_4^+ и и существенно влияет на степень конверсии субстрата в целевой продукт. При низких концентрациях NH_4^+ и и нонов степень конверсии снижается. Для клеток E. coli K 12 подходящей концентрацией является $[NH_4^+] \ge 2,5$ M, для свободных клеток P. shermanii $[NH_4^+] \ge 3,0$ M. Степень конверсии фумарата в

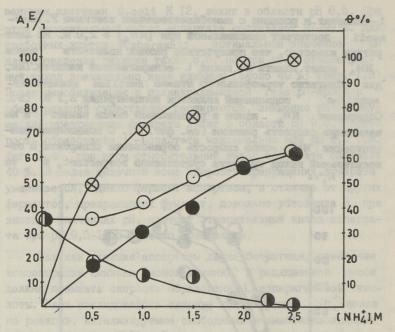
L-аспартат в реакции с иммобилизованными клетками Р. shermanii достигает максимальной при [NH⁺₄] ≥ 2,0 М. Из литературы известно, что присутствие разных количеств ионов NH⁺₄ может влиять на выход L-аспарагиновой кислоты.Так, для облигатно термофильного штамма Bacillus stearothermophilus подходящей является концентрация 3,1 М [9]. Содержание NH⁺₄ ионов в реакционной смеси влияет и на начальную скорость реакции (см. фиг. 3). С повышением концентрации NH⁺₄ ионов скорость образования аспартата и относительный выход продукта существенно возрастают, в



Фиг. 2. Степень конверсии фумарата в L-аспартат в зависимости от концентрации NH 4-ионов в реакционной среде:

- О свободные клетки Е. coli К 12;
- иммобилизованные клетки Е. сой К 12;
- свободные клетки Р. shermanii;
- иммобилизованные клетки P.shermanii.

время как клетки микроорганизмов активно превращают фумарат и в отсутствие NH₄⁺- ионов в реакционной смеси. С увеличением скорости реакци: фумарат L-аспартат скорость непеленаправленной реакции A_н уменьшается. Отсюда следует,



Фиг. 3. Начальная скорость превращения фумарата свободными клетками Е. coli K 12 в зависимости от концентрации NH_h^+ -ионов в реакционной среде:

- скорость превращения фумарата;
- скорость образования L-аспартата;
- ⊗ относительный выход ∟-аспартата;
- скорость непродуктивной реакции.

что повышение концентрации NH_4^+ -ионов в среде понижают превращение фумарата в побочных реакциях.

Исходя из этих данных, можно предполагать, что разное содержание ионов аммония в реакционной смеси может влиять и на рН-зависимость аспартазной реакции, так как изменение рН изменяет и равновесие в системе

$$NH_3 + H_20 \implies NH_40H \implies NH_4^+ + 0H^-$$

Отсюда $K_B = \frac{[NH_4^+][0H^-]}{[NH_40H]} = 1,8 \cdot 10^{-5}$.
При $C_0 = [NH_4^+]_0 = \frac{[NH_4^+]}{[NH_40H]} = \frac{K_B}{[0H^-]}$.

Tak kak
$$[0H] = \frac{K_w}{[H^+]} , \quad \frac{[NH^{\frac{1}{4}}]}{[NH_40H]} = \frac{K_8 \cdot [H^{\frac{1}{4}}]}{K_w} ;$$

$$\log \frac{[NH_4OH]}{[NH_4^+]} = pK_B + pH - pK_W = 5.5 - 14 + pH =$$

= -8,5 + pH.

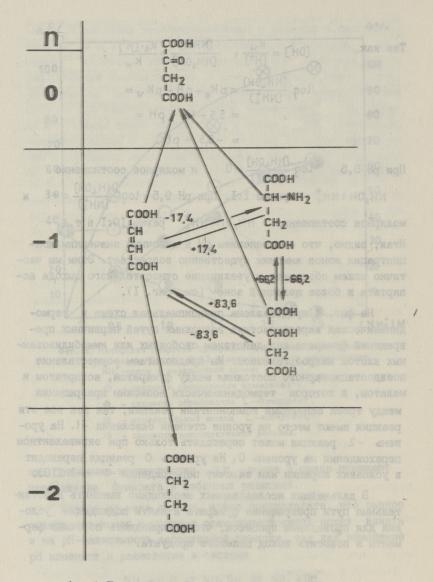
При pH 8,5 $\log \frac{[NH_40H]}{[NH_4^+]} = 0$ и молярное соотношение $NH_40H:NH_4^+$ равно I:I. При pH 9,5 $\log \frac{[NH_40H]}{[NH_4^+]} = +1$ и

молярное соотношение NH,OH:NH, равно IO:I и т.д.

Итак, видно, что с изменением pH к щелочным значениям, концентрация ионов аммония существенно возрастает. Этим мы частично можем объяснить и увеличение относительного выхода аспартата в более щелочной зоне (см. фиг. I).

На фиг. 4 представлена принципиальная схема и термодинамическая характеристика возможных путей первичных превращений фумарата под действием свободных или иммобилизованных клеток микроорганизмов. Мы предполагаем осуществление
псевдостационарного состояния между фумаратом, аспартатом и
малатом, в котором термодинамически возможны превращения
между тремя основными компонентами реакции, так как все эти
реакции имеют место на уровне степени окисления -1. На уровень -2 реакция может переходить только при эквивалентном
перехождении на уровень 0. На уровень 0 реакция переходит
в условиях аэрации или за счет перехождений -1 -- -2 [10].

В дальнейших исследованиях необходимо выяснить действительные пути превращения фумарата и найти подходящие условия для проведения процесса, чтобы упразднить побочные ферменты и повысить выход целевого продукта.



Фиг. 4. Принципиальная схема возможных первичных превращений субстрата;

п - средняя степень окисления углерода в позициях 2, 3.

у реакций указаны значения изменения стандартных свободных энергий образования соединений ($\Delta \Gamma_{\mathbf{r}}^{\bullet}$).

Литература

- І. Березин И.В., Яковлева В.И., Зуева Н.Н., Малофеева И.В., Щербакова В.Н., Андреева А.П., Губницкий И.С. Некоторые кинетические закономерности аспартат-аммиак-лиазной реакции, катализируемой свободными и иммобилизованными клетками Escherichia coli - Доклады АН СССР, 1978, т. 242, № 4, с. 953-956.
- 2. Зуева Н.Н., Яковлева В.И., Щербакова В.Н., Губницкий Л.С., Андреева А.П., Малофеева И.В., Березин И.В. Зависимость скорости аспартат-аммиак-лиазной реакции, катализируемой свободными и иммобилизованными клетками Е. coli, от температуры и предварительной тепловой обработки клеток. — Биокимия, 1979, т. 44, вып. 2, с. 364—367.
- 3. Калда А.Х., Воробьева Л.И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение І. Изучение влияния иммобилизации на аспартазную активность и жизнеспособность пропионовокислых бактерий. — Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 63-74.
- 4. Калда А.Х., Воробьева Л.И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение П. Иммобилизация клеток Escherichia coli. Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1981, № 510, с. 37-47.
- 5. А.с. 69752I (СССР). Способ получения иммобилизованных клеток микроорганизмов / Таллинский политехнический институт; Авт. изобрет. А.И. Кёстнер, М.О. Мандель, И.В. Березин, В.И. Яковлева, Н.Н. Зуева, И.А. Хинт, Л.С. Ванаселья. — Заявл. I2.07.1977, № 2505482/23—04; Опубл. в Б.И. 1979, № 42. МКИ С 07 G 7—02 АбІ К 37/48.
- 6. Рудан Е.Л., Вердина Н.М., Бутенко С.А. и др. Биосинтез аминокислот микроорганизмами. М., Наука, 1968. 196 с.
- 7. Tosa T., Sato T., Mori T., Matuo Y., Chibata I. Continuous production of L-acpartic acid by immobilized aspartase. Biotechn. and Bioeng., 1973, vol. XV, p. 69_84.

- 8. Chibata 1., Tosa T., Sato T. Production of L-aspertic acid by microbial cells, entrapped in polyacrylamide gels. Methods in Enzymology, 1976, vol. XLIV, p. 739-746.
- 9. Y u z u r u S., T a d a s h i Y., Y u j i M., S h i g e o A. Production of L-aspartic acid from fumaric acid by a fumaric acid assimilating obligate thermophile, Bacillus stearothermophilius KP 1041. Eur. J. Appl. Microbiol. and Biotechnol., 1980, vol. 11, N 1, p. 23-27.

10. Мецлер Д. Биохимия. М., Мир, 1980, т. I,

c. 20I-240.

A. Kalda

Immobilization of Microbial Cells with Aspartase Activity IV

The Effect of Concentration of H⁺ and NH₄ Ions on the Course of Conversion of Fumarate

Summary

As the result of the action of other enzymes, existing in the bacterial cell, a part of fumarate converts into byproducts.

As the thermal treating did not give the expected result, the effect of the concentration of H⁺ and NH₄⁺ ions on the reaction activity and selectivity was investigated. pH optimums for the reactions with free and immobilized E_{*}coli K 12 and P_{*}shermanii cells were determined. It was shown that changing the pH of reaction mixture to the more alkaline values the relative yield of L—aspartic acid increases. The increased concentration of NH₄⁺ ions accelerates the conversion of fumarate to the aspartate, at the same time slowing down the nonproductive process. The pincipal scheme of thermodynamically possible ways of primary conversions of fumarate has been presented.

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 577.15.07 (087.8)

Л.Э. Йыэлехт, Р.Б. Лайдсаар, А.Х. Калда

ПОЛУЧЕНИЕ И МОДИФИКАЦИЯ БИОМАССЫ CITROBACTER MEDIUS C ТИРОЗИН-ФЕНОЛ-ЛИАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Пиридоксаль-фосфат зависимый фермент тирозин-фенол-лиаза (КФ 4.I.99.2) имеет групповую субстратную специфичность и катализирует ряд реакций α , β -отщепления, β -замещения и рацемизации [I, 2], например:

Многие микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae являются тирозин-фенол-лиазной активностью, особенно высока активность в родах Escherichia, Proteus, Citrobacter, Erwinia [3].

Мы изучали тирозин-фенол-лиазную активность клеток Citrobacter intermedius (бывшее название Escherichia intermedia) с целью выяснения возможности использования их в свободном или иммобилизованном виде для синтеза L-тирозина из фенола, пирувата и аммиака.

Материалы и методы

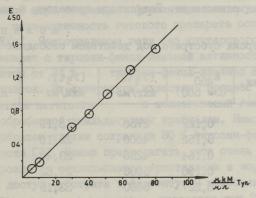
Культура Citrobacter intermedius предоставлена проф. В.М. Белковым (Институт элементоорганических соединений АН СССР). Культивирование продуцента тирозин-фенол-лиазы проводили на искусственной питательной среде следующего состава: I,7 % КН₂РО₄, O,I % MgSO₄, O,OI % FeSO₄, O,OI пиридоксингидрохлорида, O,2 % L-тирозина. Проверяли рН раствора и при необходимости добавлением 24-процентного раствора NH₄OH доводили до 8,O.

Готовую питательную среду выливали по 100 мл в 300 миллиметровые конические колбы и стерилизовали в течение 30 минут при I атм. Стерилизованную питательную среду охлаждали до комнатной температуры и в каждую колбу в стерильных
условиях доливали около 10 мл посевного материала. Биомассу культивировали на термостатированных качалках " Еіроп
357" 24 часа при температуре 30 °C. Для получения нового
инокулята биомассу выращивали 48 часов. Биомассу отцентрифугировали от культуральной среды на центрифуге "Janetzki"
К 70 D при 5500 об/мин в течение 20 минут и промывали
0,05 М К-фосфатным буфером (рН 8,0). Промытую клеточную массу непосредственно использовали для синтеза тирозина или
сохраняли I-2 суток при температуре I-4 °C для дальнейшей
иммобилизации.

Для выращивания музейной культуры в нашей лаборатории разработали агаризованную питательную среду в 0,05 М К-фосфатном буфере (рН 7,0) с содержанием 5-2 % кукурузного экстракта, 0,1 % MgSO₄, 0,001 % FeSO₄, 2 % агара.

Для приготовления субстрата I % фенола, I % натриевой соли пировиноградной кислоты и I % уксуснокислого аммония растворяли в дистиллированной воде, рН доводили до 8,0 добавлением 24-процентного раствора NH₄OH.

Содержание тирозина в реакционной смеси в ходе реакции определяли спектрофотометрически по поглощению при 450 нм по описанной методике [3]. Для вычисления тирозинфенол-лиазной активности составили калибровочную кривую (см. фиг. I).



Фиг. 1. Калибровочная кривая для определения содержания тирозина в реакционной смеси.

Иммобилизацию клеток Citrobacter intermedius проводили в IO-процентном полиакриламидном геле по методике [4]. В некоторых опытах в процессе полимеризации прибавляли сшивающий реагент — глутаровый альдегид (0,2 мл 25-процентного раствора на I г клеток) с целью повышения стабильности препарата [7].

Для выделения продукта после конверсии из реакционной смеси каталитический материал отцентрифугировали, или отфильтровали, полученный раствор концентрировали на ротационном вакуумном испарителе при 30 °C. Кристаллизацию тирозина проводили при рН I,0 [3].

Результаты и обсуждение

Биомассу Citrobacter intermedius отцентрифугировали из 1870 мл культуральной жидкости и использовали для определения тирозин-фенол-лиазной активности. Расщепление тирозина тирозин-фенол-лиазой в фенол, аммиак и пируват легко обратимое при высоких концентрациях пирувата и аммиака и адекватной концентрации фенола [1]. Реакцию проводили в термостатированном реакторе емкостью 50 мл перемешиванием при 37 °C в течение 52 часов для выяснения максимальной степени конверсии фенола в целевой продукт и времени наступления равновесия. Результаты приведены в таблице I.

Таблица I Конверсия субстрата под действием свободных клеток

№ п/п	Время,	E ₄₅₀ (L = 500)	[Туг] - мкг/мл	[Туг], мкМ/мл	К, %
I	I	0,122	2750	15,19	14,3
2	2	0,152	4000	22,10	20,8
3	3	0,164	4250	23,48	22,2
4	4	0,196	5000	27,62	26,I
5	5	0,227	6000	33,15	31,3
6	6	0,250	6750	37,29	35,2
7	24	0,299	8000	44,20	41,7
8	27	0,302	8000	44,20	41,7
9	30	0,303	8000	44,20	41,7
10	52	0,298	8000	44,20	41,7

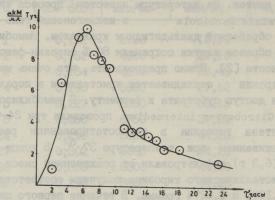
L - кратность разбавления пробы.

Реакция, катализируемая свободными Citrobacter intermedius с тирозин-фенол-лиазной активностью I,64 мкМ/мин на I л культуральной жидкости, достигает равновесия в течение 24 часов, степень конверсии в это время образуется 4I,7%. По литературным данным клетки Erwinia herbicola могут осуществлять синтез тирозина с выходом 65-70% [2].

Можно считать вероятным, что выкристаллизация тирозина в ходе реакции изменяет результаты определения, поэтому кажущийся выход продукта остается маленьким. С точки зрения экономичности более перспективным является процесс с иммобилизованными клетками микроорганизмов. Среди различных матриц для иммобилизации микробных клеток, по-видимому, наиболее подходящими являются полимеры – производные акриловой кислоты. Они механически довольно устойчивы и инертны к разложению под действием микроорганизмов [6]. Мы изучали процесс включения биомассы Citrobacter intermedius в 10-процентный полиакриламидный гель. В некоторых случаях прибавление сшивающего реагента в процессе полимеризации повышает стабильность иммобилизованного препарата [5]. Добавление глутарового альдегида в полимеризационную смесь в значительной мере повреждает ферментную систему клеток, вследствие чего активность готового препарата остается низкой (0,05 Е/г). Приготовление геля без глутарового альдегида дает препарат с тирозин-фенол-лиазной активностью 0,4 Е/г, что образуется от 24 % тирозин-фенол-лиазной активности свободных клеток. Из литературы известен процесс включения клеток Erwinia herbicola в коллагеновый гель с следующей обработкой диальдегидным крахмалом. Иммобилизованные таким образом клетки сохраняли 80 % тирозин-фенол-лиазной активности [2]. Можно предполагать, что очень мало растворимый тирозин откладывается кристаллами в порах геля, преграждая доступ субстрата к ферменту. С иммобилизованными клетками Citrobacter intermedius проводили три 24-часовых синтеза тирозина в термостатированном реакторе перемешиванием при температуре 37 °C. В конце цикла препарат (6,3 г) отфильтровали от реакционной смеси (40 мл). Сухого кристаллического тирозина получили соответственно 0,1352, 0,1965 и 0,0274 грамма. В течение первого цикла клетки микроорганизмов активировались за счет частичного лизиса клеточных стенок. Возможно и разрушение клеток изза образования кристаллов тирозина внутри клеточной стенки. Так как фермент тирозин-фенол-лиаза локализуется в микробной клетке периплазматически [7], разрушением клеточных стенок фермент вымывается из геля, вследствие чего препарат утрачивает каталитическую активность.

10 г препарата клеток Citrobacter intermedius, включенных в 10-процентный ПААГ, использовали для непрерывного синтеза тирозина в колонке. Чтобы колонка не забивалась кристаллами тирозина, в опыте применяли 0,5-процентный субстрат. Как видно на фиг. 2, в течение первых часов работы колонка активировалась из-за частичного лизиса клеточных стенок, после этого стала быстро инактивироваться, вероятно, вследствие вымывания фермента из колонки. Максимальной степенью конверсии при скорости протекания субстрата 0,33 мл/мин является 45,2%, которая после 12 часов ра-

боты снижалась до 6,5 %. Чтобы избежать накопления кристаллов в реакционной среде, реакцию проводили непрерывным процессом в термостатированном реакторе с протеканием субстрата (5,I г 10-процентного полиакриламидного препарата,объем реактора 50 мл, скорость протекания 0,35 мл/мин). На основе данных, приведенных в таблице 2, можно сказать, что
после разрушения клеток скорость образования тирозина быстро снижается, двое суток постоянной работы почти инактивирует препарат. Максимальная степень конверсии не превышает двадцати процентов.



Фиг. 2. Синтез тирозина в колонке с иммобилизованными в 10-процентном полиакриламидом геле клетками С. intermedius.

Свойство клеток адсорбироваться к различным ионообменным или инертным материалам в водной среде можно использовать с целью получения иммобилизованных микробных биокатализаторов [8]. В литературе есть данные о стабилизации целых бактериальных клеток на пути адсорбции их на носителях. В результате получают иммобилизованные клетки с высокой ферментативной активностью, пригодные для проведения в реакторных системах и в колонках в непрерывном режиме [9, 10].

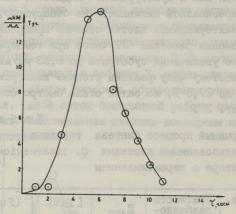
В наших опытах колонку наполнили амберлитом ИР-410 (6,0 г), I л культуральной жидкости с выращенными клетками Сitrobacter intermedius пропускали через колонку со скоростью 0,35 мл/мин. Полученный препарат промывали в колонке с 0,05 М фосфатным буфером (рН 7,0) и использовали для синтеза тирозина из фенола, аммиака и пирувата (0,5-процентный

раствор). Так как в культуральной жидкости, выходящей из колонки, тирозиназной активности не обнаружено, можно решить, что бактериальные клетки отлично прикрепились к амберлиту. Колонка работала II часов при температуре 37 °C со скоростью увеличения субстрата до 0,33 мл/мин. В ходе работы к шестому часу реакции степень конверсии субстрата повышалась до 27,6%, но затем стала быстро понижаться (см. табл. 3, фиг. 3).

Непрерывный процесс синтеза тирозина иммобилизованными клетками С. intermedius в реакторе с перемешиванием

№ п/ п	Время,	Кратность разбавле- ния пробы	E ₄₅₀	[Tyr]. мкг/мл	[5уг], мкМ/мл	К, %
I	I	10	0,107	55	0,304	0,57
2	2	IO	0,594	320	I,77	3,33
3	3	IO	0,899	475	2,62	4,94
4	4	10	I,4	735	4,06	7,66
5	5	IO	I,58	835	4,6I	8,70
6	6	20	0,97	1030	5,69	10,74
7	7,5	20	I,095	II50	6,35	18,98
8	II,2	20	1,105	1160	6,41	12,09
9	19,5	40	0,563	1160	6,4I	12,09
IO	19,75	40	0,489	1040	5,75	10,85
II	21,75	40	0,422	900	4,97	9,38
I2	23,25	40	0,406	860	4,75	8,96
13	25,25	20	0,662	700	3,87	7,30
14	26,75	20	0,576	500	2,76	5,20
15	27,25	20	0,522	450	2,49	4,70
16	32,25	10	0,762	400	2,21	4,17
17	44,0	10	0,486	260	I,44	2,72
18	48,0	IO	0,312	165	0,91	1,72

Инактивацию колонки, вероятно, может вызывать вымывание периплазматической тирозиназы, а также целых клеток микроорганизмов в результате десорбции их от носителя.



Фиг. 3. Синтез тирозина в колонке с адсорбированными на амберлите ИР-410 клетками C. intermedius.

Таблица 3 Синтез тирозина в колонке адсорбированными на амберлите ИР-410 клетками С. intermedius

№ п/п	Время,	Кратность разбавле- ния пробы	E ₄₅₀	[Тут], мкг/мл	[Туг]. мкМ/мл	К, %
13,0I	5,75 I	nter OPOIs	1,91	99	0,55	I,03
2	2	ro- Woods	2,04	102	0,56	I,06
3	3	IO	I,62	850	4,70	8,86
4	5	50	0,944	2500	13,81	26,06
5	6	100	0,506	2650	14,64	27,62
6	7	100	0,208	I500	8,29	15,64
7	8	100	0,221	II50	6,35	II,99
8	9	50	0,289	775	4,28	8,07
9	IO	50	0,175	425	2,35	4,43
10	II	50	0,089	200	1,10	2,08

Выводы

Биомассу Citrobacter intermedius иммобилизовали в 10-процентном полиакриламидном геле или на амберлите ИР--410. С полученными препаратами проводили синтез тирозина из фенола, аммиака и пирувата циклическим процессом в ко-

лонке или в реакторе с протеканием субстрата. На основе полученных данных можно сказать следующее:

- I. В ходе реакции кристаллы тирозина вследствие низкой растворимости накапливаются в реакционной среде.
 - 2. Накопление кристаллов тирозина вызывает:
- неточность определения содержания продукта в реакционной среде;
- -) забивание колонки кристаллами тирозина, повышение гидродинамического затруднения, сопровождающее понижение скорости потока;
- -) уменьшение ферментативной активности препарата вследствие стерических затруднений в связи с накапливанием кристаллов в порах геля;
- разрушение клеток из-за образования внутриклеточной стенки с последующим вымыванием периплазматической тирозин-фенол-лиазы из колонки.

Из этого следует, что использование данными методами иммобилизованных клеток Citrobacter intermedius для синтеза тирозина нецелесообразно. Более обнадеживающие результаты дает циклический процесс со свободными клетками, так как биомасса Citrobacter intermedius в подходящих условиях синтезирует тирозин довольно высоким выходом.

Литература

- 1. Nagasawa T., Utagaua T., Goto J., Kim C.-J., Tani Y., Kumagai H., YamadaH. Synthesis of I-tyrosine-related amino acids by tyrosine phenol-lyase of Citrobacter intermedius. Eur. J. Biochem., 1981, N 117, p. 33-40.
- 2. Я к о в л е в а В.И., М а л о ф е е в а И.В., К у п л е т с к а я М.Б. Использование иммобилизованных клеток микроорганизмов для получения природных форм аминокислот. В кн.: Иммобилизованные клетки микроорганизмов / Под ред. К.А. Кощеенко. Пущино, 1978, с. 118—127.
- 3. Enei H., Matsui H., Yamasheta K., Okumura S., Yamada H. Distribution of tyrosine phenol lyase in microorganisms. Agr. Biol. Chem., 1972, vol. 36, N 11, p. 1861-1868.

- 4. Калда А.Х., Воробьева Л.И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение І. Изучение влияния иммобилизации на аспартазную активность и жизнеспособность пропионовокислых бактерий. — Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1980, № 499, с. 63-74.
- 5. Калда А.Х., Воробьева Л.И. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. II. Иммобилизация клеток Escherichia coli. — Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1981, № 510, с. 37-47.
- 6. Иммобилизованные ферменты. I / Под ред. И.В. Березина, В.К. Антонова, К. Мартинека. М., Изд-во МГУ, 1976, с. 243-259.
- 7.M c K e n z i e D., R o b b D.A. The periplasmic location of tyrosine phenollyase in Erwinia herbicola. FEMS-Microbiol. Lett., 1980, vol. 9, N 4, p. 255-258.
- 8. Fletcher M. Attachment of bacteria to surfaces in aquatic environments. Adher. Microorg. Surf., 1979, London e.a., p. 87-108.
- 9. Pat. 4246349 (US). Stabilization of immobilized bacteria/ Corning Glass Works Messing R.A., Oppermann R.A., Ramsey W.S., Takerguchi M.M. 5.09.78; 20.01.81. Cl C 12 N 11/14.

IO.Кощеенко К.А., Аринбакарова А.О., Скрябин Г.К. Окислительно-восстановительные реакции при трансформации гидрокортизона и преднизолона адсорбированными клетками Мусовастегіш globiforme. Прикладная био—химия и микробиология, 1979, т. 15, № 5, с. 645-653.

7.2. N & c + c 600 c c d , DASS a 6 30 c c o 40 70 5 11.99

L. Jôeleht, R. Laidsaar, A. Kalda

Producing and Modification of the Biomass of Citrobacter intermedius with Tyrosine Phenol Lyase Activity

Summary

Tyrosine phenol lyase activity of Citrobacter intermedius cells was investigated in order to explain its possibility to synthesize tyrosine from phenol, cemmonia and pyruvate. The biomass of Citrobacter intermedius was entrapped in 10 percent polyacrylamide gel or on amberlite IR-410. The preparations obtained were employed in the batch and in the continuous processes in a packed bed reactor and a continuous feed stirred tank reactor.

The product of the reaction tyrosine is very little dissolvable. Erystyls of tyrosine accumulate in the reaction mixture clogging columns, enhancing the aerodynamic and steric hindrance and damaging cell walls that results in the leaching of the periplasmically localized tyrosine phenol lyase out of the column.

On the base of our experiments it is apparent that entrapping Citrobacter intermedius cells by the methods described to synthesize tyrosine is not economic. More suitable seems to be the cyclic process by intact cells since the biomass of Citrobacter intermedius synthesizes tyrosine in comparatively good yields.

4. Калда А.Х., Воробьево Л.И. Измобилизации изеток информациямов с аспаравной активностью Сообщение I. Изучение влижния менобилизации на аспартавную активность и резенто проимоновожислия бастария. Тр. Такивной, политехи, пр. 1980, в 499, с. 63-74.

5. Karaa A.X., Bopoos an A.K. Marotarestondent and the suppose of the suppose o

pearma, B.K. Arronosa, K. Maprasona, M. Man-so MTV 1976.

C.n. 843-76 badoratio to valvatos essyl longed enisovy?

est statopas o på sebuo at betantasavat asw elles sutbasret
landament, laneda mort entermit estantava of vallatismod
reme subbassavat medosoppio o essentid edi anavany bas
estiladam sorro ter epimalvaportog insorra of propagatas
subtrato obavolame anarabonatado en trapagata en 1970-41

belithlever eigenische bestehe geben ein der bestehe bestehe besteht der eine eine der product der bestehe geben eine der bestehe der bestehe geben der der bestehe geben der der bestehe geben der der bestehe der der bestehe der bestehe der bestehe der bestehe der bestehe der der bestehe der be

affected shear to be the opolic profess by threat we relief at no the blosess of Ottrobacter intermedius synthesizes tyrosine in comparatively good yields.

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

УДК 66.097.64

Э.Н. Теаро, Л.М. Пикков, Э.Г. Уус

БАРБОТАЖНЫЙ МЕТОД ИНТЕНСИФИКАЦИИ БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

Использование иммобилизованных ферментов вместо тивных означает переход от гомогенного катализа к гетерогенному и связано с целым рядом новых проблем, так как при этом появляются внешнее и внутреннее диффузионные сопротивления, возникает вопрос наиболее рационального способа контактирования субстрата с катализатором, его внешней формы и внутренней структуры и т.д. Интенсификация таких биокаталитыческих процессов возможна за счет уменьшения внешнего и внутреннего диффузионных сопротивлений. Нами было показано [I], что воздействовать на внутридиффузионное сопротивление зернистых материалов возможно путем изменения внешнего давления и, в частности, путем пульсирующего вакуума, так как внутри пористых носителей иммобилизованных ферментов - материалов типа силохром, пористого стекла и т.д. всегда остаются газы. При изменении внешнего давления объем изменяется и они начинают выступать в роли поршня насоса, прокачивая субстрат по капилляру. Однако использование указанного эффекта технологически затруднительно и может найти место только в случаях, когда полностью внешнедиффузионное сопротивление. Величина этого сопротивления определяется условиями обтекания зерен катализатора субстратом и, следовательно, зависит от конструкции каталитических реакторов и способа перемешивания катализатора в аппарате. Необходимо отметить, что современные носители иммобилизованных ферментов, исключая пористое стекло, являются механически весьма малопрочными и довольно быстро истираются при перемешивании. Перемешивание может осуществляться различными путями, но наиболее часто осуществляется механическими устройствами, что, как показали наши исследования, не является самым рациональным, так как сильно истирает, измельчает катализатор.

Пневматическое перемешивание катализатора является более мягким, щадящим. Опасение того, что газ будет затруднять контакт субстрата с катализатором, оправданное случае насадочных аппаратов, в данном случае оказалось лишним. При интенсивном перемешивании катализатора газовые пузыри не оказывают экранирующего эффекта на зерна катализатора.

При перемешивании зернистого катализатора с субстратом барботажем газа в аппарате возникает трехфазная система, гидродинамические закономерности и условия массообмена которой еще далеко не изучены. Существенное значение при этом имеет определение расхода воздуха, необходимого не для псевдоожижения катализатора, но и для создания условий интенсивного массообмена.

Нами исследовались условия псевдоожижения носителей типа силохрома с частицами диаметром от 0,2 до I мм в узких каналах и на тарелках, снабженных различного вида барботерами, в зависимости от расхода воздуха, высоты слоя барботажа и т.д. [2]. Эти исследования показали, что в зависимости $\Delta p = f(V)$, (T)

где Δp - сопротивление слоя,

V - расход газа барботажа,

наблюдается ярко выраженная петля гистерезиса, хорошо известная из практики двухфазных псевдоожиженных слоев [3]. Ее образование проявляется в том, что возникший трехфазный псевдоожиженный слой (ТПС) может существовать при значительно меньших расходах газа, чем требуется для его возникновения. На кривой $\Delta p = f(v)$ можно отметить точки, характеризующие нижний предел расхода газа, меньше которого происходит разрушение ТПС, и катализатор оседает на дно аппарата, и верхний предел, выше которого весь слой переходит во взвешенное состояние.

Представляет интерес исследование зависимости скорости газа барботажа в этих точках от конструкции барботажного устройства и карактеристик псевдоожижаемой системы. Так как это позволит определить необходимый и достаточный расход газа для перемешивания катализатора с субстратом. Анализ экспериментального материала позволяет связать этот расход с интенсивностью диссипации энергии при барботаже и предложить для расчета фиктивной скорости газа (скорости газа, рассчитанной на полное сечение аппарата) в нижней предельной точке зависимость (2)

$$Re' = 6.2 Ar^{0.7} \left(\frac{d_0}{r}\right)^{0.24} C^{0.06} \left(\frac{B}{r}\right)^{-0.147}$$
 (2)

и в верхней предельной точке зависимость (3)

$$Re' = 1,77 \, Ar^{0,7} \left(\frac{d_0}{r} \right)^{-0,3} \left(\frac{B}{r} \right)^{-0,447}, \tag{3}$$

где d_о - диаметр отверстия;

г - радиус влияния струи;

С - концентрация катализатора в суспензии;

В - ширина канала (диаметр аппарата);

 $Re' = \left(\frac{\epsilon d_{\kappa}^4}{\rho_c v_c^3}\right)^{1/2}$ пульсационный критерий Рейнольдса;

к - диаметр частицы катализатора;

√ с – кинематический коэффициент вязкости среды;

Е - интенсивность диссипации энергии.

$$\varepsilon = \rho_{\rm c} q \, w_{\rm r} \,, \tag{4}$$

где w_{Γ} - фиктивная скорость газа, рассчитанная на полное сечение аппарата;

q - ускорение свободного падения.

 $Ar = \frac{d^3 \rho_c(\rho - \rho_c) g}{\mu_c^2}$ - критерий Архимеда,

где

μ_с - коэффициент динамической вязкости среды;

р - плотность катализатора.

Справедливость этих формул проверена при следующих условиях:

плотность жидкости ρ_{c} 1000—1200 кг/м³ вязкость жидкости μ_{c} 1·10⁻³—6,2·10⁻³ Па·с высота слоя жидкости 0,05 < H < 0,35 м ширина канала (диаметр аппарата) 0,03 < B < 0,184 м концентрация катализатора (объемных долей) 0,05 < C < 0,5

диаметр отверстий шаг отверстий

0.0008 < do < 0.002 M 0.03 < S < 0.12 M.

Они позволяют определять с точностью +20 % необходимый расход газа барботажа для обеспечения ТПС в аппарате.

Исследование условий массоотдачи от зерен катализатора показывает, что зависимость β_1 от диссипации энергии может быть аппроксимирована по известной формуле [4, 5]:

$$Sh = 2 + 0.6 \, Sc^{1/3} (Re')^{1/2},$$
 (5)

где $Sh = \frac{\beta_L d_K}{\Gamma}$ - критерий Шервуда;

 $Sc = \frac{9}{D}$ - коэффициент массоотдачи;

 $\mathsf{Re}' = \left(\frac{\epsilon \, \mathsf{d}_{\,\kappa}^{\,4}}{\rho_{c} \, v^{\,3}}\right)^{\frac{1}{2}}$ — пульсационный критерий Рейнольдса.

Из этого следует, что в условиях барботажного перемешивания интенсивность массоотдачи от жидкости к частицам катализатора может быть оценена по зависимости

$$\beta_{L} = 0.5 \cdot \{0^{-6} \, \mathcal{E}^{0.25} \left[\frac{\mathsf{M}}{\mathsf{C}} \right], \tag{6}$$

где ε - диссипация энергии в системе [Bt/m^3] по формуле (4).

В экспериментально исследованных нами процессах интенсивность перемешивания составляла 30-120 Вт/м3. Она. как показывают расчеты, обеспечивает 90 % от теоретической скорости каталитического превращения для системы молочная сыворотка - в -галактозидаза, что имеет место при приведенной скорости газа около 0,02 м/с. Эта скорость, однако, сит от кинетики реакции и поэтому для каждого конкретного биокаталитического процесса может быть установлена оптимальная интенсивность перемешивания.

Литература

І. Теаро Э.Н., Уус Э.Г., Иосуа Л.А. влиянии пульсирующего вакуума на процессы с иммобилизованными ферментами. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1981, Nº 510, c. 107-114.

- 2. Теаро Э.Н., Уус Э.Г., Каппо Ю.В. Гидродинамика трехфазного псевдоожиженного слоя в узком барботажном канале. - Тр. Таллинск. политехн. ин-та, 1982, \$\mathbb{\beta}\$ 526, c. 79-86.
- 3. Гельперин Н.М., Айнштейн В.Г., Кваша В.В. Основы техники псевдоожижения. М., Химия, 1967. 664 с.
- 4. Yermakova A., Kuzmin V., Skomo-rokhov V., Umbetov A. The examination of local mass transfer between particle and liquid. Hung. J. Ind. Chem., 1981, vol. 9. p. 99.
- 5. S i d e m a n S. Direct contact heat transfer between immiseible Liquids. Adv. Chem. Eng. London, 1966, vol. 6.

E. Tearo, L. Pikkov,

A Barbotage Method for Biocatalytical Process Intensification

Summary

Some problems of hydrodynamics and mass transfer phenomena in barbotage mixed biocatalytic modules are discussed.

It has been concluded that the intensity of mass transfer in barbotage mixed biocatalytic modules depends on the amount of energy dissipated in the system and may be quite simply calculated.

Содержание

I.	А.И. Кёстнер, Э.Х. Сиймер, И.И. Таммерайд. Ма- тематическая модель макрокинетики иммобилизо- ваных ферментов для глубокой конверсии субстрата	3
2.	К.Э. Паппель, Э.Э. Павлова. Иммобилизация дрож- жевой в-галактозидазы	17
3.	Фриеденталь М.К., Креэн М.И. Применение флуореска- мина для определения продуктов ферментативно- го гидролиза казеина	29
4.	Мандель М.О., Сиймер Э.Х., Хошке А., Ласло Э. Иммобилизация глюкоамилази для получения глю- козного сиропа	37
5.	А.Э. Эрин. Ферментативный гидролиз фракциониро-ванных белков молока и крови	47
6.	К.А. Кивисилла, М.А. Охасоо, А.А. Паат. Электрон- но-микроскопическая характеристика макропористых кремнеземных носителей и применение их для иммо- билизации глюкозооксидазы	57
7.	Л.М. Якуницкая, А.И. Кёстнер, М.А. Самарцев. Тер- мическая стабильность химотрипсина с различной глубиной модификации аминогрупп	67
8.	А.Х. Калда. Иммобилизация клеток микроорганизмов с аспартазной активностью. Сообщение ІУ. Влияние концентрации ионов водорода и аммония на ход превращения фумарата	79
9.	Л.Э. Йыэлехт, Р.Б. Лайдсаар, А.Х. Калда. Получение и модификация биомассы Citrobacter intermedius с тирозин-фенол-лиазной активностью	89
10.	Э.Н. Теаро, Л.М. Пикков, Э.Г. Усс. Барботажный метод интенсификации биокаталитических процессов	IOI



Таллинский политехнический институт

Труды ТПИ № 552 ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕЙСТВИЯ НАТИВНЫХ И МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ Инженерная энзимология 1У

Редактор А. Канн. Технический редактор Е. Зорина Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 01 апреля 1983 года Подписано к печати 19 декабря 1983 года, формат 60х90/16 Печ. л. 6,75 + 0,5 приложение. Уч.-изд. л. 6,4. Тираж 300 МВ- 11709. Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коскла, 2/9 Заказ № 746. Цена 90 кол.

С) Таллин, ТПИ, 1983

Содержани

	89
ружоляминей бакановитической виниканий пртви Карактеристика действия нативных	
Vo. 11708 Porminer THA, Tanner, ya. Kecasa 2/9	



Цена 90 кон.