

424

TALLINNA POLÜTEHNILISE  
INSTITUUDI TOIMETISED

ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО  
ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 424

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ  
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

(Сборник статей по химии и химической  
технологии XLV)



Er. 6.7

TALLINNA POLÜTEHNILISE INSTITUUDI TOIMETISED  
ТРУДЫ ТАЛЛИНСКОГО ПОЛИТЕХНИЧЕСКОГО ИНСТИТУТА

№ 424

1 9 7 7

---

УДК 577.15.002.237

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ  
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

(Сборник статей по химии и химической  
технологии XLV)

Т а л л и н 1 9 7 7

663

Секрет

ВНЕШНЕПАРТИЙНЫЕ СООБЩЕНИЯ

ДОКЛАДЫ И ЗАЯВЛЕНИЯ  
НАРОДНО-ОБОРОТНОГО ДЕПАРТАМЕНТА

О РАБОТЕ ПО ЗАЩИТЕ И УЛУЧШЕНИЮ  
КАЧЕСТВА РАБОТЫ

Всесоюзный институт  
Технической кибернетики  
IV  
Техническая кибернетика

О ПРЕДЕЛАХ АКТИВНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ  
 ФЕРМЕНТОВ

По соображениям эффективности действия реакторов с иммобилизованными ферментами (ИФ) всегда целесообразно добиваться максимальной начальной активности получаемых препаратов  $A_0$ , выраженной через количество вырабатываемого продукта на единицу веса (объема) в рабочих условиях [1]. В связи с тем, что удорожание ферментной единицы при иммобилизации, описываемое уравнением (I), обратно пропорционально коэффициенту выявления активности  $\gamma$ , наряду с  $A_0$  должен быть учтен и этот показатель.

$$K_{y\phi} = \frac{1}{\gamma} \left( \frac{C_y}{C_s \cdot A_s} + 1 \right), \quad (I)$$

где  $K_{y\phi}$  — коэффициент удорожания;  
 $C_s$  — стоимость исходного фермента;  
 $A_s$  — количество исходного фермента;  
 $C_y$  — расходы на иммобилизацию, включая материалы и т.д.

Коэффициент выявления активности  $\gamma$ , который выражается как  $\gamma = \frac{A_0}{A_s}$ , может быть рассмотрен как произведение двух других характеристик,  $\alpha$  и  $\beta$ :

$$\gamma = \alpha \cdot \beta, \quad (2)$$

где  $\alpha$  — коэффициент связывания;  
 $\beta$  — коэффициент выявления активности.

Коэффициент  $\alpha$  вычисляется как

$$\alpha = \frac{A_s + A_p}{A_s}, \quad (3)$$

где  $A_s$  — активность исходных ферментов в растворе;  
 $A_p$  — активность реакционной смеси после иммобилизации и активность промывных вод.

При этом предполагается, что в растворе не протекает значительной инактивации. В противном случае при расчете необходимо заменить ферментативную активность содержанием ферментного белка без учета их активности. Хотя низкие значения  $\alpha$  непосредственно не приводят к потерям ферментативной активности, выделение и концентрирование фермента из реакционной смеси и промывных растворов довольно трудоемко и, как правило, нецелесообразно. Поэтому потери активности в результате неполного связывания практически равноценны другим потерям ферментативной активности.

Что касается коэффициента выявления активности  $\beta$ , то его условно можно рассмотреть как произведение двух коэффициентов

$$\beta = \beta' \cdot \eta, \quad (4)$$

где  $\beta'$  — истинный коэффициент сохранения активности;  
 $\eta$  — коэффициент выявления активности.

Истинный коэффициент сохранения активности  $\beta'$  характеризует степень инактивации фермента в ходе иммобилизации. Значение  $\beta'$  полностью зависит от химизма и условий иммобилизации и свойств белковой макромолекулы фермента. При проведении процесса иммобилизации в подходящих условиях по всей вероятности может быть достигнуто значение  $\beta' = 0,95$ . В случае иммобилизации ферментов активация, т.е.  $\beta > 1$ , наблюдается очень редко.

Коэффициент  $\eta$  характеризует влияние диффузионного сопротивления на выявляемую активность фермента. Влияние диффузионного сопротивления на видимые свойства ИФ хорошо известно по литературе. Очень многими авторами показано, что диффузионное сопротивление вызывает увеличение видимого значения константы Михаэлиса  $K_m$  [2]. Наши работы по математическому моделированию ферментной кинетики при наличии диффузионного сопротивления показывают, что диффузия субстрата может только увеличить значение  $K_m$  и не может непосредственно действовать на абсолютную максимальную активность препарата [3]. Это верно только тогда, когда мы можем до бесконечности увеличить концентрацию субстрата в обрабатываемом растворе. В реальных условиях это далеко не так. Учитывая растворимость типических органических соединений, их молекулярный вес, а также реальные тех-

нологические условия, выявляется, что обычно концентрация субстрата не может быть выше 1-2 моль/л, а нередко мы должны иметь дело с еще более низкими значениями. При ограниченных концентрациях субстрата диффузионное сопротивление уже имеет непосредственное влияние на эффективность связывания. Посмотрим это более детально для случая внутриматричной диффузионной кинетики.

В этих условиях видимое значение константы Михаэлиса характеризуется уравнением

$$K'_m = K_m \left( 1 + 0,018 \frac{R^2}{D \cdot K_m} \cdot V \right), \quad (5)$$

где  $K_m$  - для фермента молекул в матрице;

0,018 - эмпирический коэффициент;

R - радиус зерна;

D - коэффициент диффузии субстрата в матрице;

V - максимальная активность ИФ при бесконечном дроблении материала, т.е.  $V = k_{+2} [E]$ .

Здесь удобно определить характеристику

$$L = 0,018 \frac{R^2}{D}, \quad (6)$$

которая имеет размерность времени и характеризует диффузионное сопротивление матрицы для данного субстрата. Коэффициент  $\eta$  для определенной концентрации субстрата определяется соотношением

$$\eta = \frac{A_0}{A'_0} = \frac{V \cdot S (K_m + S)}{(S + K_m + L \cdot V) \cdot V \cdot S} = \frac{K_m + S}{K_m + S + L \cdot V}, \quad (7)$$

где S - концентрация субстрата.

Для простоты введем понятие величины M, что равняется

$$M = S + K_m \quad (8)$$

и получим

$$\eta = \frac{M}{M + L \cdot V}. \quad (9)$$

Допуская, что при увеличении концентрации исходного раствора  $\alpha$  и  $\beta'$  не изменятся, можно выразить V через

$$V = V_s \cdot \alpha \cdot \beta', \quad (10)$$

где  $V_s$  - приведенная концентрация фермента в растворе.

Учитывая, что

$$A_s = \frac{V_s \cdot S}{M}, \quad (11)$$

получим активность препарата

$$A_0 = A_s \cdot \alpha \cdot \beta \cdot \eta = \frac{A_s \cdot \frac{S}{L}}{\frac{S}{L} \frac{1}{\alpha \cdot \beta} + A_s} \quad (12)$$

Это уравнение описывает гиперболу с асимптотой

$$A_m = \frac{S}{L} \quad (13)$$

и параметром, подобным константе Михаэлиса

$$A_c = \frac{S}{L} \frac{1}{\alpha \cdot \beta} \quad (14)$$

Следовательно, активность получаемого препарата равняется

$$A_0 = \frac{A_m \cdot A_s}{A_c + A_s} \quad (15)$$

К примеру, можно оценить эти показатели для пенициллинацилазы при обычной рабочей концентрации 0,16 М. Принимаем диаметр зерна равным 0,1 см, а коэффициент диффузии бензилпенициллина в полиакриламидном чехе примерно равным  $D = 1 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$  и  $K_m = 3 \cdot 10^{-6}$ . В этих условиях  $L = 180 \text{ с}$  и  $A_m = \frac{0,16}{180} = 0,9$ , что выражается в практически применяемых величинах 3200 мк-моль/ч.мл. Применяемые  $\alpha = 0,8$  и  $\beta' = 0,9$ , получаем  $A_c = 4444 \text{ ед/мл}$ . Таким образом, применяя  $A_s = 10000$ , получим  $A_0 = 2215$  и  $\gamma = 0,69$ , что довольно хорошо согласуется с нашими экспериментальными данными. Конечно, уменьшая средний радиус зерен ИФ, можно значительно повышать значение  $A_m$  и  $A_c$ .

#### Л и т е р а т у р а

1. К ё с т н е р А.И. См. наст. сб., с. 9.
2. G o l d s t e i n, L. Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. Meth. Enzymol. Vol. 34, p.397, 1976.
3. К ё с т н е р А.И. Математическое моделирование кинетики иммобилизованных ферментов I. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 331, 1973.

On the Immobilized Enzymes Activity Limit

## Summary

Taking into consideration the relationship between the apparent  $K_m$  and internal diffusion, an equation for calculating immobilized enzyme operational activity  $A_o$  at determined substrate concentration has been proposed:

$$A_o = \frac{A_m A_s}{A_c + A_s};$$

$A_s$  - initial enzyme activity,

$A_m$  - maximal activity,

$A_c$  - characteristics, depending on immobilization conditions.

$A_m$  can be calculated as

$$A_m = \frac{S D}{0,018 R^2};$$

S - substrate concentration,

D - diffusivity,

R - particle radius.



УДК 575.15.04.001

А.И. Кёстнер

ФУНКЦИЯ ОПТИМИЗАЦИИ ДЛЯ ПРОЦЕССА ИММОБИЛИЗАЦИИ  
 ФЕРМЕНТОВ

При оптимизации технологического процесса иммобилизации ферментов необходимо иметь единый критерий эффективности иммобилизации. Исходя из экономических соображений, этот критерий может быть определен через количество продукта, полученного с применением данного количества иммобилизованного фермента.

$$E_t = \frac{P_t}{C_t}, \quad (1)$$

где  $E_t$  - эффективность процесса;

$C_t$  - расходы на фермент и эксплуатацию установки;

$P_t$  - количество продукта.

Расходы  $C_t$  равняются

$$C_t = C_E \cdot t + A_S \cdot C_S + C_Y, \quad (2)$$

где  $t$  - длительность применения катализатора;

$C_E$  - расходы эксплуатации установки за единицу времени;

$A_S$  - количество исходного растворимого фермента;

$C_S$  - стоимость единицы растворимого фермента;

$C_Y$  - расходы на иммобилизацию.

Имея исходную активность  $I_0$ , равную  $A_0$  и принимая, что препарат инактивируется реакцией первого порядка, получим для  $P_t$

$$P_t = A_0 \int_0^t e^{-kt} dt = A_0 \frac{1}{k} (1 - e^{-kt}), \quad (3)$$

где  $k$  - константа скорости инактивации.

Выражая соотношение  $\frac{A_0}{A_S}$  через  $\gamma$ , получим для уравнения (1)

$$E_t = \frac{A_S \cdot \gamma \frac{1}{k} (1 - e^{-kt})}{C_E \cdot t + A_S \cdot C_S + C_Y}. \quad (4)$$

Для простейшего случая, когда между коэффициентом выявления активности  $\gamma$  и  $A_s$  не обнаружено четкой зависимости, оптимизацию можно провести по критерию  $E'_j$

$$E'_j = A_0 \cdot \frac{1}{k} \approx A_0 \cdot \tau_{1/2}, \quad (5)$$

где  $\tau_{1/2}$  - период полуинактивации препарата.

$$\tau_{1/2} = 0,693 \frac{1}{k}. \quad (6)$$

Такой подход требует достижения максимальной активности  $A_0$ , что, как правило, ведет к снижению  $\gamma$ . Как правило, в зависимости произведения  $A_0 \cdot \gamma$  от  $A_s$  имеется максимум и поэтому для оптимизации можно рекомендовать критерий

$$E''_j = A_0 \cdot \gamma \cdot \tau_{1/2}. \quad (7)$$

Для определения более обобщенного критерия эффективности принимаем, что  $A_0$  зависит от  $A_s$  уравнением (8) (см. [1])

$$A_0 = \frac{A_m \cdot A_s}{A_c + A_s}, \quad (8)$$

что приводит уравнение (4) в форму

$$E_A = \frac{A_s \cdot A_m \cdot \frac{1}{k} (1 - e^{-kt})}{(A_s + A_c)(C_E \cdot t + A_s \cdot C_s + C_y)}. \quad (9)$$

Определяя соотношение

$$A_y = \frac{A_c}{A_s} \quad (10)$$

и вычисляя необходимые для нахождения экспериментов частные производные  $\frac{\partial E_A}{\partial t}$  и  $\frac{\partial E_A}{\partial A_s}$ , получим систему уравнений

$$A_s \cdot C_s = A_y (C_E \cdot t + C_y), \quad (11)$$

$$A_s \cdot C_s = \frac{C_E}{k} (e^{-kt} - 1 - kt) - C_y. \quad (12)$$

Из этой системы можно найти оптимальное время использования фермента, решая уравнение (13)

$$e^{kt} = kt(1 + A_y) + k \frac{C_y}{C_E} (1 + A_y) + 1. \quad (13)$$

Можно показать, что оптимальное значение  $A_y$  близко к единице, чему соответствует  $\gamma \approx 0,5$ .

В таком случае уравнение (13) принимает вид

$$e^{kt} = 2kt + 2k \frac{C_y}{C_E} + 1. \quad (14)$$

Величина  $\frac{C_y}{C_E}$  имеет размерность времени и выражает соотношение расходов на иммобилизацию и эксплуатацию. При

дешевом способе иммобилизации и достижении высоких стабильностей ИФ  $2k \frac{C_y}{C_E} < 1$  и уравнение (I4) принимает еще более простой вид

$$e^{kt} = 2kt + 1. \quad (I5)$$

Решение этого уравнения дает

$$kt = 1,2564 \text{ и } t/\tau_{1/2} = 1,813.$$

Этим условиям соответствует коэффициент использования ферментной активности  $R_A$  в реакторе:

$$R_A = 1 - e^{-kt} = 0,715. \quad (I6)$$

т.е. необходимо работать до активности  $0,285 A_0$ .

В большинстве реальных случаев целесообразно еще более полное использование ферментативной активности.

К примеру, принимаем, что имеем ИФ с коэффициентом ин-активации  $k = 0,01 \text{ ч}^{-1}$ , что эксплуатация 1 кг ИФ требует 1 руб/ч, а расходы на получение того же количества препарата (без стоимости исходного фермента) составляют 75 руб.

В таком случае решение уравнение (I4) дает  $kt = 1,8$ , чему соответствует  $R_A = 0,835$  и  $t/\tau_{1/2} = 2,60$ . Из уравнений (II) и (I2) вытекает, что для иммобилизации следует брать исходного фермента на 250-255 руб.

Вышеприведенные уравнения не учитывали вторичные лимитирующие условия, например, минимальную допустимую скорость реакции в реакторе, практически возможное количество исходного фермента и т.д. Автор сознает, что такие лимитирующие условия могут в ряде случаев привести к оптимальным параметрам, существенно отличающимся от вычисляемых по предложенным простейшим критериям оптимизации. Однако учет всех возможных предельных случаев приведет к неразумно сложным уравнениям оптимизации и поэтому можно рекомендовать для этих случаев составлять конкретные уравнения, применяя вышеизложенные принципы и подходы.

#### Л и т е р а т у р а

И. К ё с т н е р А.И. О пределах активности иммобилизованных ферментов. См. наст. сб., с.3.

An Effectiveness Function for Optimizing  
Enzyme Immobilization Processes

Summary

An equation for describing the immobilized enzyme effectiveness has been proposed

$$E_t = \frac{P_t}{C_t} = \frac{A_S A_M k (1 - e^{-kt})}{(A_S + A_C)(C_E t + A_S C_S + C_I)}$$

where

- $E_t$  - operational effectiveness,
- $P_t$  - amount of product during the enzyme lifetime,
- $A_S$  - activity, used for immobilization,
- $A_M$  - maximum activity,
- $A_C$  - characteristics, depending on operational conditions,
- $k$  - inactivation constant,
- $t$  - enzyme lifetime,
- $C_E$  - cost of reactor exploitation per hour,
- $C_S$  - initial enzyme unit price,
- $C_I$  - cost for immobilization and carrier.

Partial derivatives of this function lead to an equation

$$e^{kt} = 2kt + \frac{2k C_I}{C_E} + 1.$$

This equation can be solved numerically to find the optimal duration for enzyme exploitation.

For any case a function

$$E_I = A_O \cdot \gamma \cdot \frac{1}{k}$$

can be suggested for optimizing enzyme immobilization conditions.

УДК 577.151:541.127.2+518.62

Э. Х. Сиймер, К. Э. Пашпель, А. И. Кёстнер

### НОВЫЙ МЕТОД ОПИСАНИЯ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

В связи с быстрым развитием инженерной энзимологии описание кинетики ферментативных реакций, проводимых до глубокой конверсии субстратов в установках различного типа, приобретает важное значение. Для очень многих ферментативных реакций характерно ингибирование продуктами реакции и субстратом. Кинетические уравнения, описывающие подобные процессы в случае гомогенных или иммобилизованных ферментов, часто сложны и неудобны для практического применения, так как требуют предварительного определения значений констант равновесия между всеми компонентами. Следует подчеркнуть, что для иммобилизованных ферментов эффективные значения констант ингибирования могут зависеть от способа иммобилизации и условий проведения процесса. Известен ряд методов применения интегральных форм уравнений скорости для кинетического анализа ферментативных реакций, хорошо описанных в монографиях [1, 2]. Математическая модель гидролиза бензилпенициллина предложена Нис и др. [3]. Мы считаем целесообразным для описания кинетики ферментативных реакций в конкретных процессах применять более упрощенные и обобщенные уравнения, характерные коэффициенты которых должны быть определены непосредственно из интегральных кривых реакций, т.е. по зависимостям концентрации субстрата от продолжительности реакции).

Нами ранее показано, что для многих (в частности, гидролитических) ферментативных реакций, в которых диффузионные процессы не имеют преобладающего значения на скорость превращения субстрата, скорость реакции описывается обобщенным уравнением (I). Это уравнение с успехом использова-

но для описания действия иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы на лактазу [4]:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{v_0(1-X)}{1+K_1X+K_2X^2}, \quad (I)$$

в котором  $v$  - скорость реакции;

$v_0$  - начальная скорость реакции при данной концентрации субстрата в отсутствии продуктов реакции в растворе;

$X$  - степень конверсии субстрата;

$K_1$  и  $K_2$  - коэффициенты, зависящие от констант равновесия и начальной концентрации субстрата  $[S]_0$ .

Уравнение (I) можно превратить в следующий вид:

$$\frac{v_0}{v} \cdot \frac{(1-X)}{X} - \frac{1}{X} = K_1 + K_2X \quad (2)$$

или

$$Z = K_1 + K_2X, \quad (3)$$

где

$$Z = \frac{v_0}{v} \cdot \frac{(1-X)}{X} - \frac{1}{X}. \quad (4)$$

Вычисляя по экспериментальным данным значения величины  $Z$  при разных степенях конверсии, нетрудно найти значения коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$  методом линейной регрессии. Для нахождения  $K_1$  и  $K_2$  необходимо знать значение  $v_0$  и при разных продолжительностях реакции (степенях конверсии субстрата) определить скорость реакции  $v$ .

Для определения величин  $v$  довольно хорошо применимо графическое дифференцирование экспериментальных кривых накопления продукта, но для определения начальной скорости этот метод в общем неэффективен. Среди большого количества известных методов определения начальной скорости надо обратить внимание на несложный и надежный метод Кониша-Баудена [5]. Можно рекомендовать также разработанный нами метод определения  $v_0$ , который заключается в следующем. При условии, что в исходном растворе отсутствуют продукты (кривая зависимости концентрации продукта от времени проходит через начало координат), начальный участок кривой (например, до степени конверсии субстрата 0,3-0,4) можно приближенно описать уравнением

$$[P] = bt + ct^2, \quad (5)$$

где  $[P]$  – концентрация продукта;  
 $t$  – продолжительность реакции;  
 $b, c$  – эмпирические коэффициенты.

Начальная скорость реакции  $v_0$ , очевидно, равна  $b$ , что вытекает из дифференциальной формы уравнения (5)

$$\frac{d[P]}{dt} = b + 2ct \quad (6)$$

при условии  $t = 0$ .

Величину  $b$  целесообразно найти линейной регрессией экспериментальных данных, представленных в виде зависимости величины  $\frac{[P]}{t}$  от времени  $t$ :

$$\frac{[P]}{t} = b + ct. \quad (7)$$

Итак, после определения начальной скорости  $v_0$  и значений скорости реакции  $v$  в зависимости от степени конверсии  $X$ , вычисляют значения величины  $Z$  по уравнению (4), после чего методом линейной регрессии определяют величины коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$ . Кинетика ферментативной реакции, таким образом, во всем интервале степени конверсии, описывается уравнением (I). Кроме эмпирических величин  $K_1$  и  $K_2$  для этого надо знать величину  $v_0$ , которая уже неизбежно определена ранее.

Следует подчеркнуть, что коэффициенты  $K_1$  и  $K_2$ , несмотря на свой эмпирический характер, имеют определенный физический смысл и являются функциями от констант равновесия (ингибирования) и начальной концентрации субстрата. Это позволяет на основе исследования зависимости величин  $K_1$  и  $K_2$  от  $[S]_0$  получить информацию о механизме реакции или даже вычислить эффективные значения отдельных констант ингибирования или их соотношений. Так, например, при отсутствии ингибирования субстратом при концентрациях субстрата  $[S]_0$ , значительно превышающих  $K_m, K_1$  и  $K_2$  по теоретическим соображениям должны линейно зависеть от начальной концентрации  $[S]_0$ . Следовательно, определением величин  $K_1$  и  $K_2$  при двух-трех значениях  $[S]_0$ , кинетическое уравнение (I) можно применять для описания кинетики реакции при любых концентрациях субстрата.

В настоящем сборнике приведены практические результаты обработки кинетических данных гидролиза лактозы с иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазой вышеизложенным методом.

## Л и т е р а т у р а

1. Березин И.В., Клёсов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М., изд-во МГУ, 1976.

2. Под ред. Березина И.В. и др. Имобилизованные ферменты. Том 2, М., изд-во МГУ, 1976.

3. Нис П.С., Кольцова Э.В., Карпов В.Я., Митрофанов В.Б., Левитов М.М. Ферментативный гидролиз бензилпенициллина. Биорг.химия, 1976, т.2. № 9, 1259.

4. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И., Летунова Е.В., Тихомирова А.С. Гидролиз лактозы иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазой. Прикл. биохимия и микробиология 1976, т. 12, вып. 2, 217.

5. Cornish-Bowden, A. The use of the direct linear plot for determining initial velocities. Biochem. J. 1976, 149, 305.

6. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И., Тихомирова А.С. Количественная характеристика гидролиза лактозы иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазой. См. наст. сб., с. 19.

New Method for Describing the Kinetics of  
Enzymatic Reactions

Summary

An equation

$$V = \frac{V_0 (1 - X)}{1 + K_1 X + K_2 X^2}, \quad (1)$$

where

- V - reaction rate,
- $V_0$  - initial reaction rate,
- $K_1, K_2$  - characteristic coefficients,
- X - degree of substrate conversion,

has been suggested to describe the integral kinetics of enzymatic reactions. The coefficients  $K_1$  and  $K_2$  can be found empirically. For this, the eq. (1) can be linearized through  $Z = K_1 + K_2 X$  ( $Z = \frac{V_0}{V} \frac{(1-X)}{X} \frac{1}{X}$ ) and  $K_1$  and  $K_2$  found by linear regression. To obtain correct results care must be paid to determine  $V_0$  properly, for instance fitting the initial part of integral curve by appropriate empiric equation. The coefficients  $K_1$  and  $K_2$  are linear to initial concentration of substrate  $[S]_0$  if  $[S]_0 \gg K_m$ , what permits to use the equation for any initial substrate concentration.



УДК 577.154.04:547.458.22

К. Э. Пашпель, Э. Х. Сиймер, А. И. Кёстнер  
А. К. Куликова, А. С. Тихомирова

### КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ $\beta$ -ГАЛАКТОЗИДАЗОЙ

В нашей ранней работе [1] показано, что грибную  $\beta$ -галактозидазу можно успешно иммобилизовать на силихроме. Полученные препараты пригодны для гидролиза лактозы в буферных растворах и в молочных продуктах. Для целесообразного выбора условий работы препаратов в технологических процессах необходимо иметь количественную характеристику глубокого гидролиза растворов лактозы. Нами ранее детально изучена кинетика реакции гидролиза лактозы, катализируемой иммобилизованной в полиакриламидном геле лактазой [2] и показано, что ферментативный гидролиз лактозы характеризуется сложной совокупностью равновесных реакций и ингибируется обеими продуктами реакции. Так как кроме способа иммобилизации на кинетические свойства иммобилизованных препаратов влияют также условия массопередачи вне и внутри зерен катализатора, целесообразно исследовать и характеризовать кинетику гидролиза лактозы в рабочих условиях.

В данной статье приводятся результаты количественной характеристики ферментативного гидролиза лактозы в разных системах на основе предложенного в настоящем сборнике метода описания кинетики [3]. Определены значения коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$ , входящих в обобщенное кинетическое уравнение и обсуждается надежность данного метода для описания кинетики гидролиза лактозы в реакторах различного типа.

#### Материалы и методы

Исходный фермент  $\beta$ -галактозидаза (КФ 3.2.1.23) выделена из культуры гриба *Curvularia inaequalis* в Институте биохимии им. А. Н. Баха АН СССР и имела активность 250 Е/г.

Иммобилизацию на модифицированном силихроме проводили по ранее нами описанной методике [1]. Для гидролиза применялись растворы лактозы в 0,2 М ацетатном буфере (ФН 4,5) и творожная сыворотка, полученная из Таллинского комбината молочных продуктов со средним содержанием лактозы 4,2% и рН 4,3-4,6.

Опыты проведены в реакторах различного типа при 50°C.

Два периодических реактора с перемешиванием имели рабочий объем 120 и 1000 мл, скорость вращения мешалок 1000-1200 об/мин. В реакторы вводили 2,8-8,6 г и 35-40 г иммобилизованной лактозы (ИЛ) соответственно.

Колонка, используемая в режимах псевдоожиженного слоя (ввод субстрата снизу), имела внутренний диаметр 16 мм и содержала 25-30 г ИЛ. Объемная скорость подачи раствора составляла 1,5-56 мл/мин. Та же колонка также испытывалась в пульсационном режиме (частота пульсации 200 мин<sup>-1</sup>, амплитуда движения частиц в нижней части колонки около 2 мм. Насадочная колонка с диаметром 10,5 мм, содержащая 5 г ИЛ, применялась в рециркуляционном режиме.

За скоростью процесса наблюдали по освобождению глюкозы, концентрацию которой определяли глюкозооксидазным методом. По полученным данным вычисляли степень конверсии субстрата.

Скорость гидролиза  $v$  определялась графическим дифференцированием зависимости концентрации глюкозы от продолжительности реакции. Начальную скорость  $v_0$  вычисляли по описанному нами в настоящем сборнике методу [3].

Скорость реакции  $v$  выражали как функцию от степени конверсии субстрата  $X$ , как нами описано в [3]:

$$v = \frac{v_0(1-X)}{1 + K_1X + K_2X^2} \quad (1)$$

или использовалась зависимость относительной скорости

$$v_{\text{отн}} = \frac{v}{v_0} \quad (2)$$

от степени конверсии  $X$ :

$$v_{\text{отн}} = \frac{1-X}{1 + K_1X + K_2X^2} \quad (3)$$

Для вычисления значений  $K_1$  и  $K_2$  применялся метод линейной регрессии видоизмененного уравнения (1), как показано в предыдущей статье [3].

## Результаты и обсуждение

Исследовался гидролиз лактозы в реакторе с перемешиванием как с иммобилизованной на силихроме, так и нативной лактазой. Как видно из фиг. 1, для реакции с иммобилизованной на силихроме лактазой характерно резкое уменьшение скорости реакции с увеличением степени конверсии лактозы. Качественно аналогичная зависимость была ранее получена для иммобилизованной в полиакриламидном геле лактазы, свидетельствующая о сильном ингибировании реакции образующимися продуктами [2].

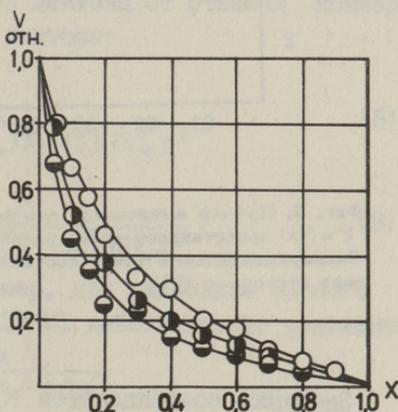
Найдены значения коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$  для нативной лактазы и ИЛ методом линейной регрессии. В качестве иллюстрации на фиг. 2 показана зависимость величины

$$Z = \frac{v_0}{v} \cdot \frac{1-X}{X} - \frac{1}{X}$$

от степени конверсии  $X$ . Как видно из фиг. 2, экспериментальные точки довольно хорошо ложатся на прямую (коэффициент регрессии  $r$

равен 0,968), что доказывает приемлемость уравнения (I) для описания кинетики гидролиза лактозы. Точка пересечения прямой с ординатом соответствует величине  $K_1$  (8,87), наклон прямой - величине  $K_2$  (-8,70). Найденные аналогичные величины  $K_1$  и  $K_2$  для опытов с различными начальными концентрациями субстрата в 0,12 л реакторе с перемешиванием приведены в таблице I.

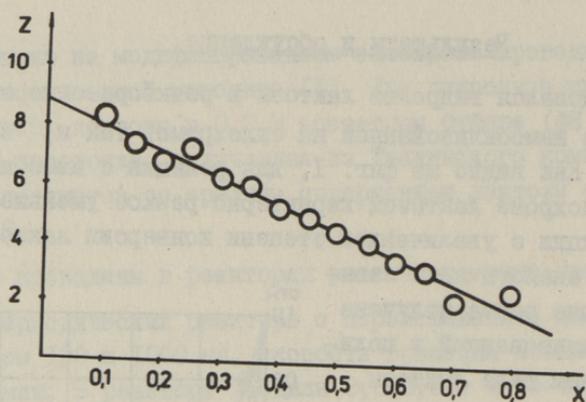
Считая по теоретическим соображениям и экспериментальным данным зависимость коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$  от  $[S]_0$  линейной и имея в виду, что при  $[S]_0 = 0$   $K_2 = 0$ , на основе данных таблицы I найдены следующие уравнения для  $K_1$  и  $K_2$ :



Фиг. 1. Зависимость относительной скорости гидролиза лактозы, катализируемой иммобилизованной на силихроме лактазой, от степени конверсии в 0,12 л реакторе перемешивания при 50°С.

Начальная концентрация субстрата

- 5% (0,137 М)
- 10% (0,273 М)
- ◐—◐ 15% (0,395 М)..



Фиг. 2. Пример вычисления коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$  уравнения (1),  $Z = f(X)$  представляет собой линейную зависимость  $Z = K_1 + K_2 X$ . Экспериментальные точки соответствуют гидролизу 5%-ного раствора лактозы с ИЛ.

Таблица I

Значения коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$  для нативной и иммобилизованной лактазы

Начальная концентрация лактозы $[S]_0, M$	Значения коэффициентов		Коэффициент регрессии $r$
	$K_1$	$K_2$	
Нативная лактаза			
0,057	5,08	-4,47	0,900
0,132	9,00	-7,92	0,948
0,257	12,58	-11,73	0,986
0,385	17,80	-16,62	0,964
Иммобилизованная лактаза			
0,135	4,55	-4,47	0,916
0,261	8,87	-8,70	0,968
0,379	11,64	-11,46	0,978

а) для нативной лактазы

$$K_1 = 3,35 + 37,6 [S]_0 \quad (r = 0,995) \quad (4)$$

$$K_2 = -45,6 [S]_0 \quad (r = 0,998) \quad (5)$$

б) для иммобилизованной лактазы

$$K_1 = 0,84 + 29,1 [S]_0 \quad (r = 0,994) \quad (6)$$

$$K_2 = -31,4 [S]_0 \quad (r = 0,995) \quad (7)$$

Заменяя величины  $K_1$  и  $K_2$  в уравнении (3) их значениями в уравнениях (4-7), получаем следующие зависимости относительной скорости гидролиза лактозы от степени конверсии и начальной концентрации лактозы:

а) для нативной лактазы

$$v_{\text{отн}} = \frac{1 - X}{1 + (3,35 + 37,6 [S]_0) X - 45,6 [S]_0 X^2} \quad (8)$$

б) для ИЛ

$$v_{\text{отн}} = \frac{1 - X}{1 + (0,84 + 29,1 [S]_0) X - 31,4 [S]_0 X^2} \quad (9)$$

В последнем случае, например, для гидролиза 5%-ного раствора лактозы ( $[S]_0 = 0,137$  М) действительно уравнение

$$v_{\text{отн}} = \frac{1 - X}{1 + 4,83 X - 4,3 X^2}$$

Уравнение (9) хорошо описывает ферментативный гидролиз лактозы с ИЛ при любых концентрациях субстрата  $[S]_0 \geq 0,05$  М в периодическом реакторе перемешивания. Об этом свидетельствует вышеприведенная фиг. I, на которой сплошные линии соответствуют уравнению (9). Однако уравнение применимо также для установок колоночного типа. Проведены опыты гидролиза 5%-ного (0,137 М) раствора лактозы в колонке с псевдоожиженным слоем, в пульсационном режиме, в начадочной рециркуляционной колонке. Так как в этих установках создается градиент степени конверсии субстрата, средняя степень конверсии в колонке вычислялась по уравнению (II):

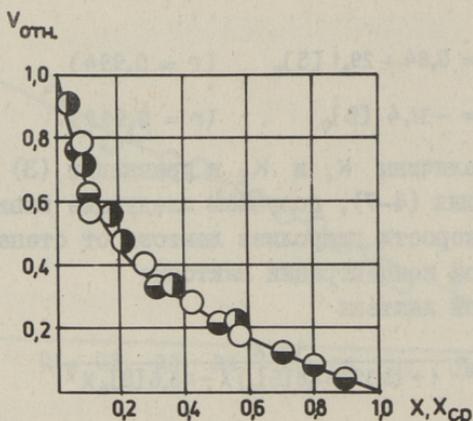
$$X_{\text{ср}} = 1 + \frac{X_k - X_0}{\ln \frac{1 - X_k}{1 - X_0}} \quad (II)$$

в котором  $X_{\text{ср}}$ ,  $X_0$  и  $X_k$  являются средней, начальной и конечной степенью конверсии субстрата, соответственно.

Естественно, при  $X_0 = 0$

$$X_{\text{ср}} = 1 + \frac{X_k}{\ln(1 - X_k)} \quad (I2)$$

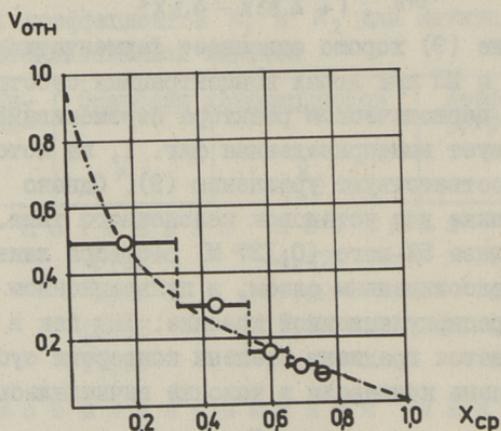
Как видно из фиг. 3 и 4, уравнение (I0) удовлетворительно описывает кинетику реакции гидролиза в реакторах



Фиг. 3. Зависимость относительной скорости гидролиза от степени конверсии при гидролизе 5%-ного раствора лактозы с ИЛ в различных реакторах.

- колонка с псевдооживленным слоем
- ◐—◐ колонка в пульсационном режиме
- периодический реактор с перемешиванием

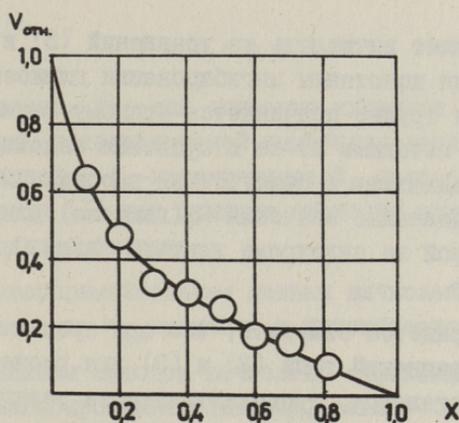
Сплошная линия соответствует уравнению (10).



Фиг. 4. Зависимость относительной скорости гидролиза от средней степени конверсии при гидролизе 5%-ного раствора лактозы в насадочной колонке с рециркуляцией.

Пунктирная линия соответствует уравнению (10).

любого типа и может быть рекомендовано для практического использования при описании кинетики лабораторных или пилотных опытов гидролиза. Гидролиз лактозы в сыворотке молока в 1-литровом реакторе с перемешиванием также хорошо описывается уравнением (9). Так как сыворотка содержала в среднем 4,2% лактозы, что соответствует молярной концент-



Фиг. 5. Характеристика гидролиза лактозы с ИЛ в сыворотке молока в 1 л реакторе с перемешиванием. Сплошная линия соответствует уравнению (13).

рации 0,122 М, можно из уравнения (9) получить следующую зависимость относительной скорости гидролиза лактозы в сыворотке молока от степени конверсии:

$$V_{отн} = \frac{1-X}{1 + 4,39X - 3,83X^2} \quad (13)$$

На фиг. 5 приведена зависимость (13) и экспериментальные данные гидролиза лактозы в сыворотке молока, хорошо подчиняющиеся найденной закономерности.

Как указано в нашей предыдущей статье [3], коэффициенты уравнений  $K_1, K_2 = f[S]_0$  могут дать важную информацию о типе ингибирования продуктами и позволяют вычислить некоторые характеризующие величины. Имея в виду, что при ферментативном гидролизе лактозы отсутствует ингибирование субстратом (о чем, кстати, свидетельствует линейная зависимость  $K_1$  и  $K_2$  от  $[S]_0$ ) и для данной реакции приемлема представленная нами ранее схема [2], согласно которой из продуктов реакции галактоза является полным конкурентным и глюкоза — полным неконкурентным ингибитором, при условии  $[S]_0 \gg K_m$  коэффициент  $K_2$  должен выражаться следующим уравнением:

$$K_2 = - \frac{[S]_0}{K_i(\text{глюкоза})} \quad (14)$$

Это позволяет вычислять из уравнений (5) и (7) эффективные значения константы ингибирования глюкозой  $K_i$  (глюкоза), которая трудно подчиняется прямому определению классическими методами из-за отсутствия надежного метода определения галактозы в присутствии высоких концентраций глюкозы. Определенные значения  $K_i$  (глюкоза) для нативной и иммобилизованной на силохроме лактазы равны 0,022 и 0,032M соответственно.

Наконец придется отметить, что при практическом использовании уравнений типа (8) и (9) для расчета производительности установок, продолжительности реакции в выбранных условиях и т. д., часто надо предпочитать интегральную форму уравнений. Так, например, можно уравнение (I) переписать в виде:

$$dt = - \frac{1 + K_1 X + K_2 X^2}{v_0(1-X)} d[S]. \quad (I5)$$

Имея в виду, что

$$[S] = [S]_0(1-X) \quad (I6)$$

и принимая

$$Y = 1 - X, \quad (I7)$$

можно уравнение (I5) представить в виде

$$dt = - \frac{[S]_0}{v_0} \cdot \frac{1 + K_1(1-Y) + K_2(1-Y)^2}{Y} dY. \quad (I8)$$

Интегрирование уравнения (I8) при начальных условиях  $t=0$   $Y=1$  ( $X=0$ ) приводит к следующей зависимости:

$$t = \frac{[S]_0}{v_0} \left[ -K_1 - \frac{3}{2}K_2 + (K_1 + 2K_2) \cdot Y - \frac{K_2 \cdot Y^2}{2} - (1 + K_1 + K_2) \ln Y \right] \quad (I9)$$

или

$$t = \frac{[S]_0}{v_0} \left[ -(K_1 + K_2)X - \frac{K_2 X^2}{2} - (1 + K_1 + K_2) \cdot \ln(1-X) \right]. \quad (20)$$

В качестве примера вычисляем продолжительность гидролиза лактозы с ИЛ в сыворотке молока ( $[S]_0 = 0,121$  M) для достижения степени конверсии  $X = 0,5$  в реакторе перемешивания при начальной скорости гидролиза (определяемой количеством введенной ИЛ)  $v_0 = 7,04 \cdot 10^{-4}$  M/мин. Так как в данном случае (см. уравнение (I3))  $K_1 + K_2 = 0,56$ , на совершение реакции согласно уравнению (20) идет 220 мин. Практически в реакторе перемешивания для достижения заданной конверсии требовалось 225 мин.

## В ы в о д н ы

1. Показано, что для описания кинетики реакции гидролиза лактозы, катализируемой иммобилизованной на силихроме или нативной  $\beta$ -галактозидазой, целесообразно применять уравнение (I) как функцию скорости гидролиза от степени конверсии субстрата.

2. По экспериментальным данным вычислены значения коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$ , входящих в кинетическое уравнение.

3. Косвенным методом вычислено эффективное значение константы ингибирования глюкозой, равное 0,032 и 0,022 М для иммобилизованной и нативной  $\beta$ -галактозидазы соответственно.

4. Доказана применимость найденного полуэмпирического кинетического уравнения для описания реакции гидролиза лактозы в водном растворе и в сыворотке молока в установках различных типов.

Авторы выражают свою благодарность Вескус Т. за добросовестную помощь при выполнении экспериментальной работы.

## Л и т е р а т у р а

1. Паппель К.Э., Кёстнер А.И., Летунова Е.В., Тихомирова А.С. Иммобилизация  $\beta$ -галактозидазы на силихроме. Прикл. биохим., микробиол. 1976, т. 12, № 3, с. 411.

2. Паппель К.Э., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И., Летунова Е.В., Тихомирова А.С. Гидролиз лактозы иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазой. Прикл. биохим. микробиол., 1976, т. 12, № 12, с. 217.

3. Сиймер Э.Х., Паппель К.Э., Кёстнер А.И. Новый метод описания кинетики ферментативных реакций. См. наст. сб., с. 13.

K. Pappel, E. Siimer, A. Köstner, A. Kulikova,  
A. Tikhomirova

Quantitative Characteristic of Lactose  
Hydrolysis with Immobilized  $\beta$ -galacto-  
sidase

Summary

$\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) from *Curvularia inaequalis* has been immobilized by covalent binding to modified porous siliceous carrier Silochrom. Lactose hydrolysis kinetics by this preparation has been investigated at 50°C in laboratory scale batch, fixed bed, fluidized bed and recirculating reactors. The suggested method for treatment of integral kinetic curves has been used to find the empiric coefficients  $K_1$  and  $K_2$  in generalized equation

$$V_R = \frac{1 - X}{1 + K_1 X + K_2 X^2}, \quad (1)$$

where  $V_R$  is the relative reaction rate and  $X$  - degree of substrate conversion.

The values of  $K_1$  and  $K_2$  linearly depend on substrate initial concentration and may give information of the type of inhibition by products and substrate. From the  $K_2$  substrate concentration dependence the values of inhibition constant of glucose as completely noncompetitive inhibitor have been calculated and are equal to 0,032 and 0,022 M for immobilized and native  $\beta$ -galactosidase respectively.

The equation (1) is valid for each investigated reactor and is also adequate for describing lactose hydrolysis in whey. In many cases the integral form of equation must be favored, e.g. for calculating the reaction time and reactors' productivity.

УДК 577.1504.668

Х. Р. Егоров, К. А. Кивисилла,  
Х. Я. Киппер, А. Э. Эрин,  
А. И. Кёстнер

### ИЗУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ ПРОТЕАЗ НА КРЕМНЕЗЕМНЫХ МАТЕРИАЛАХ

При получении иммобилизованных ферментных препаратов в качестве носителей часто используют макропористые кремнеземные материалы. Однако, эти материалы могут оказывать заметное инактивирующее действие на ферменты, в частности, и на протеазы. Для предотвращения неблагоприятного влияния матрицы и повышения её реакционной способности модифицируют поверхность этих материалов разными реагентами, в том числе полимерными покрытиями [1,2]. В результате такой обработки носителя может быть повышена также и операционная стабильность получаемых препаратов.

В нашей экспериментальной работе исследована модификация хорошо известного пористого кремнеземного носителя силохрома. В качестве модификатора использована реакционно-способная поликарбамидная смола, которая практически не растворима в воде, растворяется в феноле и может быть легко активирована диизоцианатными или альдегидными агентами.

#### Материалы и методы

В работе использовались макропористые силохромы производства Горьковского опытного завода ВНИИ НП марки Сх-1,5 и Сх-3, охарактеризованные в нашей предыдущей работе [2].

В качестве исходных ферментов были использованы панкреатин фирмы "Спофа" (удельная протеолитическая активность 1000 Е/г), трипсин фирмы "Спофа" (протеолитическая активность 2500 Е/г) и химотрипсин Олайнского завода химреактивов (удельная протеолитическая активность 5000 Е/г).

Диизоцианат адипиновой кислоты (ДИЦА) синтезирован в нашей лаборатории по схеме, описанной в нашей работе [2]. Поликарбамид синтезирован из растворов ДИЦА и 1,6-гексаметилендиамина при 60°C в соотношении эквивалентов 1:1,5 [4].

Определение протеолитической активности протеаз проводилось по модифицированному методу Ансона на 2%-ном растворе казеина при pH 8,0 и температуре 30°C. Для оценки операционной стабильности иммобилизованных препаратов проводили контрольный гидролиз в стандартизованных условиях [2]. Для ускоренной оценки операционной стабильности часть препаратов была промыта в колонке в течение 24 часов 2%-ным раствором казеина. Такая промывка часто удаляет значительную часть недостаточно прочно связанного фермента и сохранение активности в таких условиях может быть рассмотрено как предварительный критерий операционной стабильности.

Оптимизация условий иммобилизации проведена методом планирования экспериментов, применяя ортогональные дробно-факторные планы 2<sup>3</sup> [3].

#### Модифицирование носителя

С целью активации поверхности силохрома нами была проведена ее предварительная обработка. Силохром нагревали в 0,1 н соляной кислоте, промывали водой и высушивали. Предполагалось, что при такой обработке на носителе происходит образование активного гидратизированного слоя кремневой кислоты.

Покрытие поверхности обработанного таким путем носителя осуществлялось следующим способом. Поликарбамид, содержащий активные аминокгруппы в количестве 800–1000 мкэкв/г, растворяли в феноле. Поликарбамид брался в количестве 5% от веса носителя и объем растворителя выбирался таким, чтобы обеспечить пропитку носителя минимальным количеством. Фенол выпаривали из носителя в вакууме при 110°C. На поверхности пор обработанного таким образом носителя образуется слой поликарбамида, содержащий активные аминокгруппы, наличие которых дает возможность привязывать фер-

мент бифункциональными реагентами, образующими ковалентную связь с амином. В качестве швивателя использованы ДИЦА и глутаровый альдегид (ГА). В первом случае носитель кипятили под обратным холодильником в течение 1 часа в растворе ДИЦА в толуоле, препарат промывали ацетоном и сушили. Во втором случае к носителю добавляли 2%-ный раствор ГА и выдерживали при комнатной температуре в течение двух часов. После этого материал отмывали дистиллированной водой от непрореагированного глутарового альдегида и использовали для иммобилизации ферментов.

Иммобилизацию проводили по способу, описанному в нашей ранней работе [2]. При связывании трипсина в раствор фермента добавляли белковый ингибитор из сои в количестве 4% от веса фермента.

### Результаты и обсуждение

Характерные результаты иммобилизации протеаз на модифицированных нами носителях приведены в табл. I. Как видно из таблицы, более высокие показатели достигнуты в случае иммобилизации панкреатина. При этом препараты имели сравнительно хорошую стабильность. Этому способствуют достигнутые после покрытия уменьшение механической растираемости материала, о чем свидетельствуют результаты ее определения [5]. При покрытии силохрома Сх-1,5 поликарбамидом после соответствующей обработки по сравнению с непокрытым силохромом исходной фракции сохранилось примерно на 10% больше.

Результаты иммобилизации во многом зависят от условий ее проведения. Для выяснения оптимальных условий иммобилизации изученных протеаз были проведены серии опытов по ортогональному мелко-факторному плану  $2^3$ . В качестве носителя использовали силохромы Сх-1,5 и Сх-3, на поверхности которых был нанесен поликарбамид, растворенный в феноле (вышеописанным способом). Критерием эффективности иммобилизации была выбрана активность иммобилизованного препарата. Варьируемые факторы и данные математической обработки результатов опытов приведены в таблице 2.

Существенными считали те эффекты (при уровне достоверности 95%), при которых суммарная вариабельность отклика

Т а б л и ц а    I  
 Результаты иммобилизации протеаз на модифицированных  
 носителях

№ п/п	Фермент	Содержание ак- тивных групп на носителе		Актив- ность иммо- билизо- ванного препара- та, Е/Г	γ, %	Активность препарата после контроль- ного гидро- лиза, % от исходной
		актив- ная группа	мкэкв/Г			
1.	Панкреатин	-NCO	80	25,6	47,8	20,2
2.	"	"	75	20,6	38,6	33,7
3.	"	"	70	17,3	35,0	36,0
4.	"	"	25	10,9	30,9	45,0
5.	Трипсин	"	70	8,4	17,7	41,0
6.	"	"	25	6,3	12,4	41,0
7.	"	-NH <sub>2</sub>	75	7,0	15,3	39,5
8.	Химотрипсин	"	43	9,4	7,6	43,0 <sup>x</sup>
9.	"	"	75	7,5	6,0	7,0 <sup>x</sup>
10	"	-NCO	80	14,8	6,8	23,0

<sup>x</sup> Препараты промыты в колонке в течение 24 часов  
 2%-ным раствором казеина.

$$Q_i > s^2 F,$$

где  $s^2$  обозначает дисперсию  $\sigma^2$  и  $F$  — величина соответствующего  $F$ -распределения. В случае панкреатина  $s^2 F = 169$  и трипсина — 129. Как видно из таблицы 2, из варьированных факторов количество фермента на единицу носителя значительно влияет на активность иммобилизованного препарата. Значения остальных выбранных факторов являются близкими к оптимальным. На основе результатов проведенных опытов можно рекомендовать следующие условия иммобилизации панкреатина: количество фермента 90 мг на г носителя, температура 25°C, pH 7,9, время 20 мин, радиус пор носителя 1000 Å и диаметр зерна 0,3 мм. При иммобилизации трипсина рекомендуются следующие условия: количество фермента 90 мг на г носителя, температура 30°C, pH 8,0, время 40 мин, радиус пор носителя 750 Å, диаметр зерна 0,6 мм и количество ингибитора 3% от количества фермента.

Т а б л и ц а 2

Варьируемые факторы и данные математической обработки результатов опытов по оптимизации условий иммобилизации протеаз

Факторы	Уровни		Главный эффект фактора $\frac{2}{N}(\sum x_{ij} y_j)$	Вариабельность отклика $Q_i = \frac{1}{N}(\sum x_{ij} y_j)^2$
	ниж- ний	верх- ний		

## ПАНКРЕАТИН

Количество фермента на носитель, мг/г	30	60	12,18	296,5
Температура, °С	20	40	-2,23	9,9
pH	6,2	8,0	3,73	27,8
Время, мин	15	45	2,88	16,5
Радиус пор. носителя, А	330	1000	4,33	37,4
Диаметр зерна, мм	0,3	0,8	4,28	36,6

## ТРИПСИН

Количество фермента на носитель, мг/г	15	45	88,0	158,4
Температура, °С	20	40	0,36	0,3
pH	6,2	8,0	3,57	2,6
Время, мин	15	45	0,10	2,2
Радиус пор. носителя, А	330	1000	0,55	0,6
Диаметр зерна, мм	0,3	0,8	0,39	0,3
Количество ингибитора, % от количества фермента	0	4	0,39	2,0

Полученные нами результаты по различным способам иммобилизации протеаз подтверждают перспективность применения разных полимеров, в том числе и поликарбамидных смол, для модифицирования носителей при иммобилизации панкреатических протеаз. В дальнейшем следует изучать возможности повышения операционной стабильности препаратов, являющейся до сих пор не совсем удовлетворительной.

### Л и т е р а т у р а

1. N o r v a t h, C. Pellicular immobilized enzymes. *Biochem. et Biophys. Acta*, 1974, 358, p. 164-177.
  2. К и п п е р Х.Я., Э р и н А.Э., Е г о р о в Х.Р. К и в и с и л л а К.А., К ё с т н е р А.И. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 402, 1976, с. 21-28.
  3. P e t e r s e n, I. *Katsete planeerimine*. Tallinn, 1966, 90 lk.
  4. С а у н д е р с Дж. Х., Ф р и ш К.К. Химия полуретанов М., 1968, 470 с.
  5. К ё с т н е р А.И., К и п п е р Х.Я., Э р и н А.Э., П е д а к М. Определение механической растираемости неорганических носителей. См. наст. сб., с. 51.
- Н. Yegorov, K. Kivisilla, H. Kipper, A. Erin, A. Köstner

### Covalent Fixation of Proteases on Siliceous Carriers

#### Summary

The modification of porous siliceous carriers silochrome and silicogel with polyurea resins and the binding of pancreatic proteases to the modified matrix have been investigated. Using glutar aldehyde and adipic diisocyanate as crosslinking agents several immobilized preparations have been produced. The best results have been obtained immobilizing the pancreatic protease complex. The enzyme linking procedure has been optimized by means of planned experiments.

УДК 577.15.08

Х.Р.Егоров, А.Э.Эрин, А.И.Кёстнер,  
Л.Г.Логинова, И.Г.Головина

ПОЛУЧЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ПРОТЕАЗЫ ИЗ  
ACTINOMYCES VULGARIS РА-II-4 И ИЗУЧЕНИЕ  
НЕКОТОРЫХ ЕЕ СВОЙСТВ

Применение иммобилизованных протеолитических ферментов представляет значительный теоретический и практический интерес, в связи с чем понятно, почему иммобилизации протеолитических ферментов уделяется большое внимание. Однако в настоящее время в основном исследована иммобилизация панкреатических протеаз и других протеолитических ферментов, которые характеризуются относительной термостабильностью.

Применение иммобилизованных термостабильных протеаз может значительно повысить скорость реакции и дать возможность вести реакцию при температурах, неблагоприятных для развития посторонней микрофлоры. В Институте микробиологии АН СССР разработан способ получения протеазы из термофильного актиномицета *Actinomyces vulgaris* РА-II-4 [1] и метод её очистки.

В Таллинском политехническом институте разработаны различные методы иммобилизации протеолитических ферментов, в частности на макропористых кремнеземных материалах [2] Иммобилизация протеолитических ферментов на макропористых кремнеземных материалах целесообразна благодаря химической стойкости носителя и доступности для макромолекулярных белковых субстратов для фермента. В настоящей работе описаны предварительные результаты по иммобилизации вышеуказанной микробной термофильной протеазы ковалентным связыванием с неорганическим носителем и по изучению возможности применения полученных препаратов для гидролиза казеина.

## Материалы и методы

Протеаза получена из термофильного актиномицета *Actinomyces vulgaris* PA-II-4 при выращивании в 100 л ферментере на стеновой установке ИНИИ АН СССР на среды следующего состава: кукурузная мука - 2; дрожжи кормовые (сухие) - 0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 0,1;  $\text{CaCO}_3$  - 0,4-0,5; вода водопроводная; pH среда 7,0-7,2. Температура культивирования  $45^\circ$ , продолжительность - 48 час. Засев среды проводили суспензией спор актиномицета. Протеаза выделена из культуральной жидкости сорбционным методом на катионите и лиофильно высушенная.

Протеолитическая активность препарата, используемого для иммобилизации, составляла  $3,1 \cdot 10^{-3}$  ПЕ/мл (определение активности протеазы проведено при следующих условиях:  $70^\circ\text{C}$ ; время гидролиза 2%-ного раствора казеина - 10 мин; фосфатный буфер 1/15 М, pH 7,0).

В качестве носителя при иммобилизации изучаемой протеазы использовали неорганический кремнеземный материал силорхром СХ-1,5 с диаметром зерен 0,40-0,63 мм, с удельной поверхностью  $35 \text{ м}^2/\text{г}$  и радиусом пор 1000 Å (Горьковский опытный завод ВНИИ НП).

Поверхность носителя модифицировали двумя способами: 1) покрытием поликарбамидом с последующей активацией диизоцианатом адипиновой кислоты (3); 2) покрытием полиамидом с вышеуказанным способом активации.

В основе вышеуказанных способов модификации поверхности носителя лежит реакционная способность изоцианатов с первичными и вторичными аминогруппами, с гидроксильными и другими соединениями [3].

Для иммобилизации использовали препарат протеазы, растворенный в 1/15 М фосфатном буфере (pH 7,5).

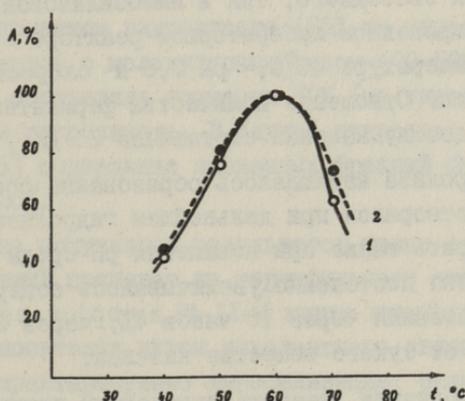
Ферментативную активность определяли при использовании в качестве субстрата 2%-ного раствора казеина (pH 7,5) по модифицированному методу Ансона. Белок определяли по модифицированному методу Лоури [4]. В гидролизатах казеина определяли белок, неосаждаемый ТХУ и аминный азот методом формольного титрования. Состав гидролизата изучали методом хроматографического анализа на сефадексах Г-10 и Г-25.

Иммобилизацию фермента проводили следующим способом. К активированному носителю после пропитки фосфатным буфером добавляли забуференный раствор фермента (20 мг/мл), перемешивали и выдерживали под вакуумом в течение 1 часа. Препарат промывали многократно фосфатным буфером и для удаления адсорбционно связанного белка 1 н раствором хлористого натрия.

### Результаты и обсуждение

При определении зависимости активности как свободной, так и иммобилизованной на силохроме протеазы от температуры выяснилось, что в условиях эксперимента оптимальной температурой действия является  $60^{\circ}\text{C}$  (фиг. 1). Однако при температурах  $40^{\circ}\text{C}$  и выше как свободный, так и иммобилизованный фермент оказались термически малостабильными. Так, через 17 часов активность иммобилизованного препарата при  $40^{\circ}\text{C}$  составляла 45%, а при  $50^{\circ}\text{C}$  — только 5% от исходной активности. В результате иммобилизации увеличения термостабильности фермента не наблюдалось.

Исходя из вышесказанного, определение активности иммобилизованных препаратов проводили при 60 и  $30^{\circ}\text{C}$ . Результаты иммобилизации приведены в таблице I.



Фиг. 1. Температурная зависимость активности свободной и иммобилизованной протеазы из *Actinomyces vulgaris* PA-11-4  
1 — свободная протеаза  
2 — иммобилизованная протеаза.

Т а б л и ц а I

Результаты иммобилизации протеазы из *Actinomyces vulgaris* PA-II-4 на модифицированном силохроме

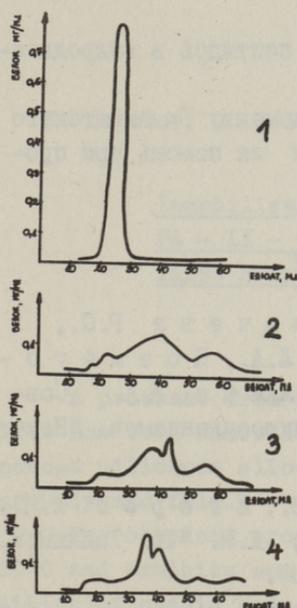
№ пп	Способ модифицирования носителя	Температура определения активности, °С	Результаты иммобилизации	
			активность иммобилизованного препарата, Е/г	%, %
1.	Поликарбамидом	60	20,5	15,5
2.	Поликарбамидом	30	3,5	11,7
3.	Полиамидом	60	24,2	18,6
4.	Полиамидом	30	2,7	12,6

Как видно, полученные препараты имели при 60°C значительную активность. Коэффициент сохранения активности  $\gamma$  существенно не зависел от температуры определения активности и равнялся 12-19%. Можно предположить, что в ходе иммобилизации фермент частично инактивируется, поскольку выявленная активность составляла только 40% от исходной.

Гидролиз 2%-ного раствора казеина был проведен при использовании как свободного, так и иммобилизованного фермента в термостатированном лабораторном реакторе с активным ротором при температуре 40°C, pH 7,5 и скорости вращения ротора 60 об/мин. Отношение количества ферментного препарата к сухому веществу казеина составляло 25 Е/г.

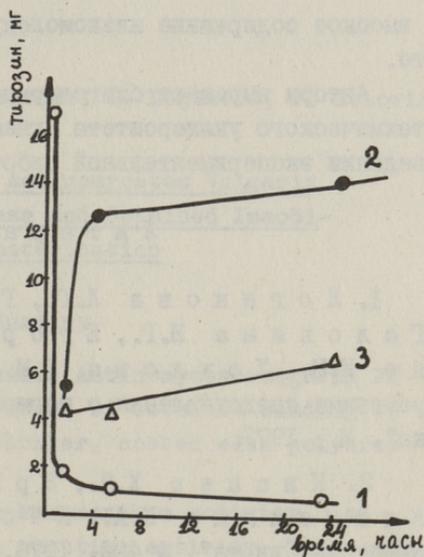
В ходе гидролиза наблюдалось образование осадка казеина, который растворялся при дальнейшем гидролизе. Осадок удалось растворить также при повышении pH среды до 11,0. При гидролизе казеина постепенно увеличивалось содержание аминного азота, составляя через 10 часов 4%, через 24 часа 6% аминного азота от сухого вещества казеина.

Состав гидролизата казеина определяли хроматографически на колонках, заполненных сефадексом. На фиг. 2 приведены хроматограммы гидролизатов на разных этапах гидролиза, а на фиг. 3 - изменение содержания белка по фракциям в ходе гидролиза. Обнаружено быстрое понижение концентрации макромолекулярной фракции белка.



Фиг. 2. Хроматограммы гидролизата казеина

- 1 - исходный казеин
- 2 - 1,5 часа гидролиза
- 3 - 4,5 часов гидролиза
- 4 - 22,5 часа гидролиза.



Фиг. 3. Изменение содержания белка по фракциям в ходе гидролиза

- 1 - фракция негидролизованного казеина
- 2 - фракция пептидов
- 3 - фракция аминокислот.

Главным компонентом гидролизата (65% по тирозину) являлась фракция пептидов с молекулярным весом 400-500. Фракция аминокислот составляла примерно 30% (по тирозину) от количества его в гидролизате. В случае гидролиза казеина панкреатином [5] содержание названных фракций было соответственно 40 и 30%.

На основе полученных результатов можно сделать вывод, что исследуемый препарат из термофильного актиномицета *Actinomyces vulgaris* PA-II-4 можно иммобилизовать на неорганических носителях путем ковалентного связывания. Коэффициенты, характеризующие иммобилизацию, оказались близкими к коэффициентам, достигнутым к настоящему времени для панкреатических протеаз. Также доказана возможность применения полученных препаратов иммобилизованной протеазы для гидролиза казеина. При этом отмечена специфичность изучаемой протеазы, отличающая ее от панкреатических протеаз - образование осадка в первом этапе гидролиза казеина и более

высокое содержание низкомолекулярных пептидов в гидролизате.

Авторы выражают благодарность дипломанту Будапештского технического университета Агнеш Чарньи за помощь при проведении экспериментальной работы.

### Л и т е р а т у р а

1. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Головина И.Г., Егорова Л.А., Позмогова И.Н., Хохлова Ю.М., Цаплина И.А. Современные представления о термофилии микроорганизмов. "Наука", М., 1973.

2. Киппер Х.Я., Эрин А.Э., Егоров Х.Я., Кивисилла К.А., Кёстнер А.И. "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", № 402, 1976, с. 21-27.

3. Higuchi, M., Takeshita, K., Senju, R. The reaction of chlorocarbamoylethyl starch with amines in an aqueous alkaline medium. Reactions of an Isocyanate Group. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 47, 6, 1451 - 1454, 1974.

4. Методы в биохимии. Материалы по II съезду биохимиков Литовской ССР, Вильнюс, 1975, с. 5.

5. Киппер Х.Я., Егоров Х.Р., Кивисилла К.А., Креэн М.И., Эрин А.Э. Кёстнер А.И. Иммунизация протеаз на неорганических носителях. Материалы У биохимической конференции Прибалтийских республик и Белорусской ССР. Таллин, 1976, т. 2. с. 72-73.

H. Yegorov, A. Erin, A. Köstner, L. Loginova, I. Golovina

Immobilization of Actinomycetes Vulgaris  
PA - II - 4 Protease and Obtained Immobi-  
lized Enzyme Characterisation

Summary

A protease from thermophilic *Actinomyces vulgaris* PA II-4 has been immobilized by means of covalent binding to porous siliceous silochrome carrier, coated with polyurea or polyamid film.

The obtained preparation has maximum activity at 60°C and exhibits some casein clotting activity. The composition of casein hydrolysates has been investigated by the help of gel filtration.



УДК 577.156.6:547.963.2

А. Э. Эрин, М. Р. Педак, А. И. Кёстнер

### ГИДРОЛИЗ КАЗЕИНА ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ПАНКРЕАТИНОМ

Ферментативные гидролизаты казеина применяются для производства питательных сред, в бытовой химии и в медицине. Внедрение в технологический процесс гидролиза казеина иммобилизованными ферментами вместо их растворимых форм обещает дать значительный технологический эффект.

В настоящей работе исследован гидролиз казеина иммобилизованным панкреатическим комплексом. Учитывая большой молекулярный вес казеина, иммобилизацию проводили ковалентным привязыванием к макропористым неорганическим носителям.

#### Материалы и методы

Использовались макропористые кремнеземные аэросило-гели (силохромы) марки СХ-1,5 и силикагели марки МСА-2 производства Горьковского опытного завода Всесоюзного научно-исследовательского института нефтяной промышленности (ГОЗ ВНИИ НП), поверхность которых была модифицирована поликарбамидом и активирована диизоцианатом адипиновой кислоты [1].

Использовались очищенные препараты панкреатина фирмы "Спофа". В качестве субстрата использовался 2%-ный раствор казеина по Гаммерстену при pH 8,0. Остальные реактивы были продажные препараты обычного качества.

Протеолитическую активность определяли по модифицированному методу Ансона на 2%-ном растворе казеина при температуре +30°C. Скорость гидролиза казеина определяли по скорости образования пептидов, которую вычисляли по приросту белка, неосаждаемого под действием трихлоруксус-

ной кислоты (ТХУ), измеряемого при 280 нм, и по приросту аминного азота, определяемого по методу формального титрования.

Для проведения гидролиза казеина использовали два типа реакторов перемешивания периодического действия:

- 1) реактор перемешивания с активным ротором,
- 2) реактор перемешивания с якорной мешалкой,

Для обоих типов реакторов выяснили оптимальные технологические параметры гидролиза казеина по ортогональному дробному факторному плану [2] и сравнивали эффективность применения этих реактивов при оптимальных параметрах. Критерием эффективности процесса выбрали коэффициент  $\eta$  [3], который выражается отношением:

$$\eta = \frac{P}{\Delta E},$$

где  $P$  - количество продукта;

$\Delta E$  - количество израсходованного фермента.

В данном случае количество продукта измеряли приростом аминного азота в гидролизате в мг, а расход фермента вычисляли по разнице активности препарата до и после гидролиза, умноженного на вес препарата.

По каждому ортогональному дробно-факториальному плану проводили 8 опытов, причем, при каждом опыте проводили одним образцом иммобилизованного панкреатина три последовательного 5-часового цикла гидролиза казеина.

План опыта для гидролиза казеина в реакторе с активным ротором приведен в таблице I. По данным таблицы I вычисляли величину дисперсии по формуле:

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2, \quad (2)$$

а из таблицы F-критерия (2) нашли величину F по пяти степеням свободы. Учитывали влияние тех факторов, для которых

$$Q_i < S^2 F.$$

На основе вышеприведенного скорость перемешивания и температуру гидролиза считали близкими к оптимальным с вероятностью 95%, соответственно 275 об/мин и +35°C. Увеличение размера зерен носителя оказалось невозможным ввиду

Таблица I

	$X_0$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1 \cdot X_2$	$X_4$	$X_1 \cdot X_3$	$X_5$	$\eta$
		ско- рость пере- мешива- ния, $\frac{\text{об}}{\text{мин}}$	диаметр зерна носите- ля, мм	концент- рация субст- рата, мг/мл		темпе- рату- ра, $^{\circ}\text{C}$		кон- цент- рация фермен- та на 1 г казеи- на, Е	$\eta$
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	+	+	+	+	+	+	+	+	4,42
	+	-	+	+	-	+	-	-	8,60
	+	+	-	+	-	-	+	-	6,0
	+	-	-	+	+	-	-	+	2,65
	+	+	+	-	+	-	-	-	14,40
	+	-	+	-	-	-	+	+	6,51
	+	+	-	-	-	+	-	+	3,45
	+	-	-	-	+	+	+	-	9,68
Основной уровень		275	0,5	30		35		5	
Единица варьиро- вания		125	0,3	10		5		2	
Нижний уровень		150	0,2	20		30		3	
Высший уровень		400	0,8	40		40		7	
$\sum x_{ij}y_j$	52,71	-2,17	+9,15	-9,37	+3,59	-0,41	+0,51	-18,65	

$$Q_v = \frac{1}{N} \sum (x_{ij}y_j)^2 \quad 0,577 \quad 10,4 \quad 11,0 \quad 1,61 \quad 0,021 \quad 0,0324 \quad 43,5$$

$$S^2 = 8,4; \quad F = 5,3; \quad S^2 F = 44,3.$$

отсутствия соответственного материала. Для нахождения новых численных значений, более близких к оптимальным, для остальных технологических параметров провели новую серию опытов, уменьшая концентрацию субстрата и, исходя из требо-

вания достижения 4% аминокислотного азота в гидролизате, увеличивая концентрацию фермента. В результате проведенных опытов с вероятностью 95% считали оптимальными следующие технологические параметры гидролиза казеина в реакторе с активным ротором:

скорость вращения ротора	275 об/мин
температура гидролиза	+35°C
концентрация субстрата	20 мг/мл
концентрация фермента на 1 г казеина	4 Е
диаметр зерна носителя	0,8 мм.

План опыта для гидролиза казеина в реакторе с якорной мешалкой приведен в таблице 2. Учитывая результаты первой серии опытов, провели вторую серию опытов, увеличивая размеры зерен носителя, скорость вращения мешалки и концентрацию фермента, а концентрацию субстрата уменьшали. В результате второй серии опытов считали оптимальными с вероятностью 95% следующие технологические параметры гидролиза казеина в реакторе с якорной мешалкой:

скорость вращения мешалки	220 об/мин
температура гидролиза	+35°C
концентрация субстрата	20 мг/мл
концентрация фермента на 1 г казеина	6 Е.

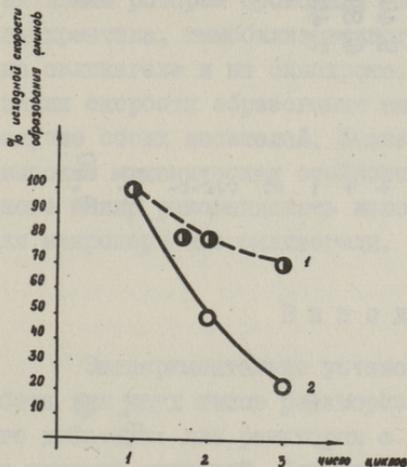
При оптимальных условиях работы обоих типов реакторов численное значение коэффициента  $\eta$  для реактора с активным ротором в 1,4 раза превышало значение  $\eta$  для реактора с якорной мешалкой.

В реакторе с активным ротором препараты иммобилизованного панкреатина оказались более стабильными. На фиг. 1 изображено изменение скорости образования аминов в обоих типах реактора при оптимальных условиях.

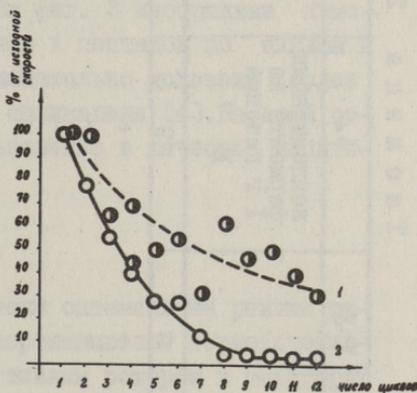
В реакторе с якорной мешалкой скорость гидролиза падает значительно быстрее за счет механического растривания носителя.

В реакторе с активным ротором при вышеуказанных оптимальных условиях одним образцом иммобилизованного на силихроме панкреатина было проведено 12 последовательных цик-

лов гидролиза. Несмотря на некоторое снижение активности препарата иммобилизованного панкреатина даже в гидролизате 12-го цикла содержание аминокислотного азота превышало 80 мг %.

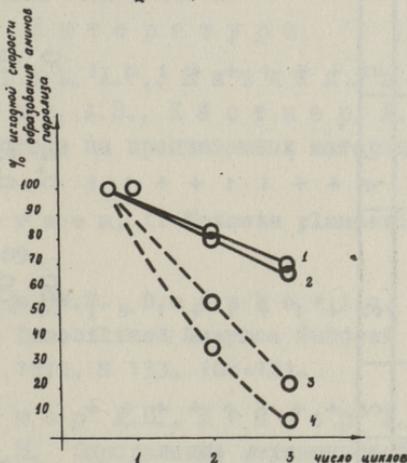


Фиг. 1. Изменение скорости образования аминокислот по циклам гидролиза  
1 - реактор с активным ротором,  
2 - реактор с якорной мешалкой.



Фиг. 2. Изменение скорости образования аминокислот и скорости образования пептидов по циклам гидролиза  
1 - скорость образования аминокислот,  
2 - скорость образования пептидов.

При этом следует отметить значительную разницу в изменении скорости образования пептидов и скорости накопления аминокислот по циклам гидролиза (см. Фиг. 2).



Фиг. 3. Изменение скорости образования аминокислот и скорости образования пептидов по циклам гидролиза  
1 - скорость образования аминокислот, фермент иммобилизован на силикагеле;  
2 - скорость образования аминокислот, фермент иммобилизован на силикохроме;  
3 - скорость образования пептидов, фермент иммобилизован на силикагеле;  
4 - скорость образования пептидов, фермент иммобилизован на силикохроме.

Таблица 2

	X <sub>0</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	η
		скорость перемеще- вания, об/мин	диаметр зерна носи- теля, мм	концент- рация раствя субстра- та, мг/мл	X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	концентрация фермента на I Г казеина Е	η
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	+	+	+	+	+	+	+	+	8,20
	+	-	+	+	-	+	-	-	9,40
	+	+	-	+	-	-	+	-	7,50
	+	-	-	+	+	-	-	+	5,00
	+	+	+	-	+	-	+	-	II,4
	+	-	+	-	-	-	+	+	9,40
	+	+	-	-	-	+	-	+	6,80
	+	-	-	-	+	+	+	-	7,40
		250	0,5	30				5	
		100	0,3	10				2	
		150	0,2	20				7	
		350	0,8	40				7	
		+6,0	+15,0	-8,2	+2,2	-4,8	-3,4	-9,6	
		4,50	28,10	8,40	0,6I	2,88	I,45	9,20	

$S^2 = 1,65; F = 10,13; S^2F = 17,0.$

Основной  
уровень  
Единица  
Верхний уровень  
Нижний уровень  
Верхний уровень

$\sum x_{ij} \cdot y_j$

$Q_i = \frac{1}{N} \sum (x_{ij} \cdot y_j)^2$

При вышеуказанных оптимальных условиях в реакторе с активным ротором проводили гидролиз казеина препаратами панкреатина, иммобилизованного на двух разных носителях — на силикагеле и на силихроме. На фиг. 3 изображены изменения скорости образования аминов и пептидов по циклам в случае обоих носителей. Экспериментально доказана более высокая механическая стойкость силикагеля [4]. На этой основе можно рекомендовать использование в качестве носителя макропористые силикагели.

### В ы в о д и

Экспериментально установлены оптимальные режимы работы для двух типов реакторов перемешивания периодического действия: для реакторов с активным ротором и реакторов с якорной мешалкой. Установлено преимущество реактора с активным ротором перед реактором с якорной мешалкой.

Результаты гидролиза зависят от механических свойств носителя и стабильности иммобилизованного ферментного препарата. Обосновано применение макропористых силикагелей в качестве носителя.

### Л и т е р а т у р а

1. Б г о р о в, Х.Р., К и в и с и л л а, К.А., К и п п е р, Х.Я., Э р и н, А.Э., К ё с т н е р, А.И. Изучение иммобилизации протеаз на крепнеземных материалах. См. наст. сб., с. 29.

2. Р е т е р г с е н, I. Katsete planeerimine. Tallinn, "Valgus", 1966, 89.

3. L a m b a, H.S., D u d u k o v i c, M.P. Analysis of Reactors with Immobilized Enzymes Subject to Deactivation. Adv. Chem. Ser., 1974, N 133, 106-121.

4. К ё с т н е р А.И., К и п п е р Х.Я., Э р и н А.Э., П е д а к М. Определение механической растираемости неорганических носителей. См. наст. сб., с. 51.

Casein Hydrolysis by the Help of  
Immobilized Pancreatin

Summary

Pancreatic protease complex has been immobilized by covalent binding through isocyanate groups to porous siliceous carrier silochrome. The hydrolysis of casein solution to produce hydrolyzates with 4 p.c. amine nitrogen in batch reactors has been optimized according to planned experiments. As criterion for optimization, coefficient  $\eta$  was used.

$$\eta = \frac{P}{\Delta E},$$

where

P - product (amin nitrogen) amount,  
 $\Delta E$  - activity decay.

The optimal values for impeller speed, temperature, casein concentration, amount and mean diameter of catalyst have been evaluated. The reactor with enzyme loaded into rotor proved to be more effective than reactor with suspended catalyst.

УДК 66.097.5·539.378.6:620.168.32

А.И. Кёстнер, Х.Я. Киппер,  
А.Э. Эрин, М.Р. Педак

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЧЕСКОЙ РАСТИРАЕМОСТИ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НОСИТЕЛЕЙ

Одним существенным фактором, который вызывает инактивацию иммобилизованных ферментов в ходе их применения, является их растирание, износ и вызванное этим вымывание ферментативно активного материала из реакционной зоны. Это явление особенно существенно для крупных, например, кремнеземных носителей в случае применения их в реакторах перемешивания. Несмотря на то, что на существенное значение истираемости обратили внимание многие авторы, например, Витол [1], в литературе нами не найдено описания методики определения механической стойкости, в частности, растираемости иммобилизованных ферментов или их носителей. Учитывая значение растираемости как показателя качества иммобилизованных ферментов и их носителей, в нижеследующем нами сделана попытка разработать простой метод для определения этого важного показателя. Мы считаем, что разработанный нами метод может быть рекомендован в качестве прототипа для официальной методики.

При разработке методики нами учтены следующие соображения. Для обработки носителя выбраны условия, которые приближаются к условиям применения иммобилизованных ферментов в реакторах перемешивания. Интенсивность обработки обеспечивает заметное, но не слишком глубокое растирание носителя. Для фракционирования исходного и обработанного носителя выбран метод мокрого просеивания, которое обеспечивает разделение отдельных фракций без дополнительного износа и без потерь мельчайших фракций в виде пыли. В нижеследующем приводится описание методики и некоторые примеры его применения.

Разработанная вышеописанная методика испытана в нашей лаборатории для сравнения механической прочности некоторых кремнеземных материалов производства Горьковского опытного завода Всесоюзного научно-исследовательского института нефтяной промышленности (ГОЗ ВНИИ НП).

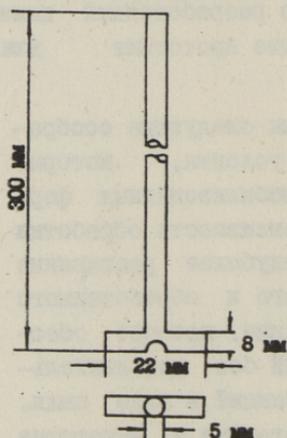
### Описание методики

#### Материалы и оборудование

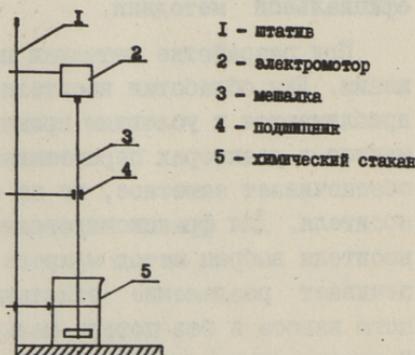
Для определения механической растриваемости носителей использовалось следующее оборудование:

1. Электромотор I420 об/мин, мощностью не менее 6 Вт.
2. Штатив.
3. Химический стакан емкостью 100 мл, диаметром 50 мм.
4. Сита аналитические стандартного комплекта № 0,16 до 1,0, выбирают в соответствии с исходными размерами зерен носителя.
5. Мешалка стеклянная турбинная, изготовляют по схеме, приведенной на фиг. 1.
6. Аналитические весы.
7. Сушильный шкаф.
8. Дистиллированная вода.

Схема установки изображена на фиг. 2. К штативу (1) прикрепляют электромотор (2) с вертикальным валом, к которому присоединяют стеклянную турбинную мешалку (3) с подшипником (4). К штативу прикрепляют химический стакан (5) так, чтобы расстояние от мешалки до дна стакана было 3-5 мм.



Фиг. 1. Схема стеклянной турбинной мешалки.



Фиг. 2. Схема установки определения механической растриваемости носителя.

### Проведение определения

Изучаемый носитель рассеивают через аналитические сита мокрым просеиванием для определения точного размера частиц и высушивают в сушильном шкафу при температуре  $105^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса. Взвешивают  $5 \pm 0,5$  г носителя с точностью 0,1 мл определенной фракции и помещают в химический стакан. Добавляют 30 мл дистиллированной воды. Стакан помещают на место, прикрепляют к штативу и включают электромотор. Суспензию перемешивают в течение 1 часа. Обработанный носитель тщательно вымывают из стакана и с поверхности мешалки на верхнее сито комплекта и после этого рассеивают мокрым просеиванием. При этом частицы носителя просеивают через отверстия сита, струей воды из промывной бутылки. Фракции собирают на чашки Петри и высушивают при температуре  $105^{\circ}\text{C}$  до постоянного веса. Высушенные фракции взвешивают на аналитических весах с точностью 0,1 мг.

### Расчет результатов определения

Механическую **растираемость** носителя характеризуют по коэффициентам  $\rho$  и  $\varepsilon$ . Первый из них вычисляют по формуле

$$\rho = \frac{a}{z},$$

где  $a$  — вес сохранившейся исходной фракции в граммах после обработки носителя;

$z$  — вес исходной фракции, взятой для определения, в граммах.

Коэффициент  $\varepsilon$  вычисляют по формуле

$$\varepsilon = \frac{\delta}{z},$$

где  $\delta$  — вес фракции образовавшейся пыли в граммах, прошедший через сито с диаметром отверстий 0,16 мм;

$z$  — вес исходной фракции, взятой для определения, в граммах.

Чем выше коэффициент  $\rho$  и меньше коэффициент  $\varepsilon$ , тем меньше растираемость носителя.

### Испытание методики и обсуждение

Результаты определения **растираемости** некоторых носителей приведены в таблице I. Анализ данных, приведенных в таблице I, показывает, что разработанная методика явля-

## Результаты определения механической растраваемости носителей

Носитель	Исходная фракция		Фракции, полученные после обработки								Σ	
	вес Г	%	1,0-0,6 мм	0,63-0,4 мм	0,4-0,16 мм	меньше 0,16 мм	вес Г	%	0,4-0,16 мм	вес Г		%
Силохром СХ-1,5	4,700	100	4,2609	90,5	0,4212	8,9	0,0222	0,47	0,0061	0,13	0,905	0,0013
Силохром СХ-1,5, покрытый поликарбамидом	4,8141	100	4,5265	97,5	0,1253	2,6	0,5231	1,1	0,0440	0,91	0,975	0,0091
Силохром СХ-3	4,6061	100	4,0546	88,0	0,4924	10,7	0,0255	0,5	0,0414	0,80	0,880	0,0080
Сликагель МСА-2	5,0013	100	4,9474	98,9	0,0446	0,9	0,0103	0,2	0,0051	0,11	0,989	0,0010

ется эффективной, т.е. позволяет четко выявить различия в свойствах испытываемых материалов. На основе приведенных опытов выявляется, что из испытываемых материалов силикагель отличается гораздо более высокой механической прочностью. Весьма интересным является также факт, что механическую прочность силихрома можно повысить путём покрытия его внутренней структуры полимером, в данном случае поликарбамидом.

## Л и т е р а т у р а

1. W e e t a l l, H.H. Preparation, characterisation and application of enzymes immobilized on inorganic supports. Affinity Chromatography. Advance in Experimental Medicine and Biology, 1974, 42, 191-212.

A. Köstner, H. Kipper, A. Erin, M. Pedak

### The Determination of Mechanical Properties of Siliceous Carriers

#### Summary

A laboratory method of determination of mechanical properties of siliceous carriers for immobilization of enzymes has been described. The material is mechanically desintegrated under certain conditions. The degree of destruction is determined by means of wet seaving.



УДК 577.156.4.002.237

Н. Д. Лукошявичене, П. Б. Садаускас,  
Т. К. Чирлис, М. И. Креэн,  
А. И. Кёстнер

### ИММОБИЛИЗАЦИЯ ПЕПСИНА НА КРЕМНЕЗЕМНЫХ МАТЕРИАЛАХ

Кислые протеиназы, в том числе пепсин, широко применяются в технологических процессах пищевой, фармацевтической и легкой промышленности. Во многих случаях более целесообразно было бы использование иммобилизованных форм этих ферментов. Однако из-за быстрой инактивации кислых протеиназ при нейтральных и щелочных значениях рН, выбор подходящих методов для их иммобилизации представляет значительную трудность. Нам известны препараты пепсина, иммобилизованного на органических материалах [1-3], но по условиям применения иммобилизованного фермента часто более целесообразно привязывать фермент к неорганическим носителям. В литературе описаны также нерастворимые производные пепсина, полученные иммобилизацией фермента на аминированном стекле с помощью 1-циклогексил-3/2-морфолиноэтил/карбодимида при рН 4,0 [4] и глутарового альдегида при рН 5,8 [5]. Наряду с иммобилизацией кристаллических препаратов пепсина были сделаны попытки использовать также малоочищенный фермент, которые приводят к менее удовлетворительным результатам [4].

Целью настоящей работы являлось изучение возможности иммобилизации пепсина как кристаллического, так и малоочищенного, на модифицированных аминогруппами кремнеземных материалах глутаральдегидным методом при низких значениях рН, а также исследование некоторых свойств полученных препаратов.

## Материалы и методы

Пепсин — кристаллический препарат Олайнского завода химреактивов с удельной активностью 11760 ПА/мг и частично очищенный препарат Московского мясокомбината с удельной активностью 5 690 ПА/мг.

Силохромы марок СХ 1, СХ 2, СХ 3 и мелкосферические силикагели МСА-248-1, МСА-248-3, МСА-248-6 производства Горьковского опытного завода ВНИИП.

Глутаровый альдегид фирмы "Реанал", 25%-ный раствор.  $\gamma$ -аминопропилтриэтоксилан (АПТЭС) — отечественный препарат АГМ — 9.

Активность свободного и иммобилизованного пепсина определяли на гемоглобине в качестве субстрата по модифицированному методу Ансона в термостатируемой при 30°C ячейке, снабженной магнитной мешалкой. Активность выражалась в единицах ПА, т.е. по изменению оптической плотности при 280 нм неосаждаемых в трихлоруксусной кислоте продуктов, образовавшихся в течение 1 мин. при рН 8,0 и 30°C.

Белок определяли по методу Лоури в модификации Гартри [6].

Активирование носителей проводили раствором АПТЭС (1 мл на 75,7 мл воды) в соотношении 3,5 мл на 1 г носителя в течение 1 часа при комнатной температуре с последующей сушкой при 105°C. Далее следовала обработка материала 2,5%-ным водным раствором глутарового альдегида в расчете 3,5 мл на 1 г носителя в течение 30 минут при комнатной температуре. Свободный альдегид из носителя тщательно вымывали и материал высушивали на воздухе.

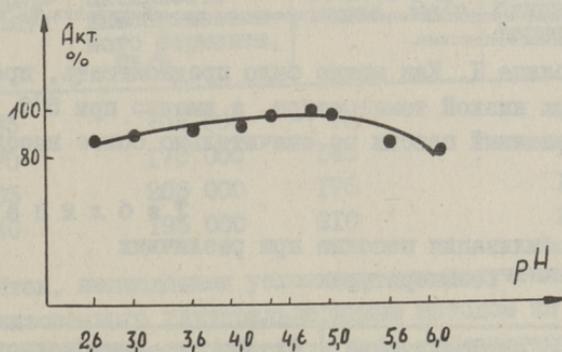
Иммобилизация пепсина осуществлялась путем пропитывания 1 г активированного носителя 3,5 мл ферментного раствора. После тщательного перемешивания реакционную смесь оставляли в холодильнике на определенное время, потом многократно промывали буферным раствором и хранили в виде суспензии в буфере.

## Результаты и обсуждение

Для каждого метода иммобилизации необходимо выяснить оптимальное значение рН среды, температуру и продолжитель-

ность реакции иммобилизации, а также соотношение фермент: носитель. Носителем в этих опытах служил силехром СХ 2, фракция 0,5–1,0 мм.

С целью выяснения оптимального значения рН среды была проведена серия опытов с растворами кристаллического пепсина (20 мг/мл) в 0,1 М ацетатном буфере с различными значениями рН. После приготовления ферментных растворов проверялось значение рН и в случае необходимости корректировалось добавлением NaOH или кислоты. Иммобилизация проводилась в течение 2 часов при 5°C. Результаты этих опытов приведены на фиг. 1.

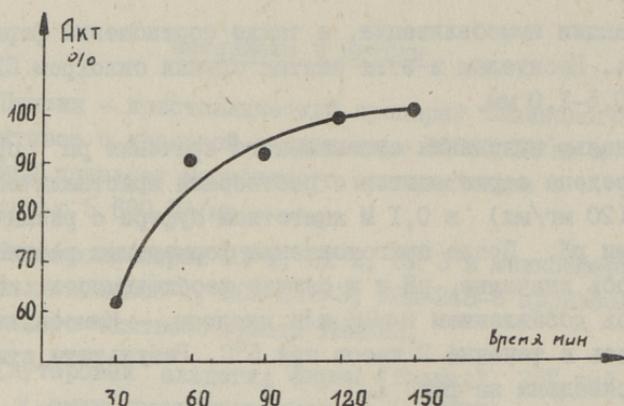


Фиг. 1. Влияние рН среды иммобилизации на активность иммобилизованного пепсина.

Результаты показали, что степень связывания пепсина умеренно возрастает по мере повышения значений рН, однако при рН выше 5,0 на результаты иммобилизации уже сказывается инактивация пепсина. Руководствуясь этим значение рН 4,6 было выбрано в качестве оптимального. Все последующие опыты были проведены при этом значении рН.

В последующей серии опытов изучалась зависимость активности иммобилизованного пепсина от продолжительности контакта носителя с ферментом. Из результатов этих опытов, приведенных на фиг. 2, следует, что иммобилизация пепсина в наших условиях осуществляется в течение двух часов. Это время соблюдалось и в последующих опытах.

Активности препаратов иммобилизованного пепсина, полученных при различных температурах иммобилизации, приве-



Фиг. 2. Влияние продолжительности процесса иммобилизации на активность иммобилизованного пепсина.

дены в таблице I. Как можно было предполагать, проведение реакции при низкой температуре, а именно при  $5^{\circ}\text{C}$ , дало иммобилизованный пепсин со значительно более высокой активностью.

Т а б л и ц а I  
Иммобилизация пепсина при различных температурах

Температура иммобилизации $^{\circ}\text{C}$	Активность иммобилизованного пепсина, ПА/г
5	175 000
23	137 000
30	134 000

С целью повышения активности препаратов иммобилизованного пепсина нами варьировалось количество нативного кристаллического пепсина, взятого на 1 г носителя. Параллельно проводилась серия опытов с частично очищенным пепсином. Из полученных данных, представленных в таблице 2, видно, что для получения высокоактивных препаратов иммобилизованного пепсина достаточно использовать 70 мг кристаллического фермента на 1 г носителя. Дальнейшее увеличение количества фермента не приводит к значительному возрастанию активности препарата иммобилизованного пепсина. При концентрации пепсина 140 мг/г даже наблюдается уменьшение активности иммобилизованного фермента. Такое явление отмечается при иммобилизации протеолитических фермен-

тов и другими авторами [7]. Иммуобилизация частично очищенного препарата пепсина дала очень хорошие результаты. При использовании 140–175 мг фермента на 1 г носителя были получены препараты, активность которых достигала максимальных величин, получаемых при иммуобилизации кристаллического фермента.

Т а б л и ц а 2

Активность иммуобилизованного пепсина при изменении соотношения фермент:носитель

Кристаллический пепсин		Частично очищенный пепсин	
Расход фермента, мг/г	Активность иммуобилизованного фермента, ПА/г	Расход фермента, мг/г	Активность иммуобилизованного фермента, ПА/г
35	108 000	70	96 000
70	170 000	140	175 000
105	205 000	175	195 000
140	195 000	210	200 000

Итак, подходящими условиями для получения пепсина, иммуобилизованного глутаральдегидным методом на аминсилохроме, можно считать рН среды 4,6, температуру 5°C, продолжительность реакции 2 часа и 70 мг фермента на 1 г носителя в случае кристаллического или 140–175 мг в случае частично очищенного препарата.

По уточненной методике нами проводилась иммуобилизация пепсина на различных марках сиохрома и силикагеля. Данные этих опытов приведены в таблице 3.

При сравнении результатов иммуобилизации на вышеуказанных носителях выявляется, что активность препаратов пепсина, иммуобилизованного на сиохроме, значительно превышает активность препаратов, полученных на силикагеле. Однако на обоих носителях наблюдается возрастание активности иммуобилизованного фермента по мере увеличения удельной поверхности носителя.

Можно было предполагать, что активность иммуобилизованного фермента будет зависеть от размеров частиц носителя. Для выявления этой зависимости пепсин иммуобилизовался на более однородных по размеру фракциях сиохрома СХ-2.

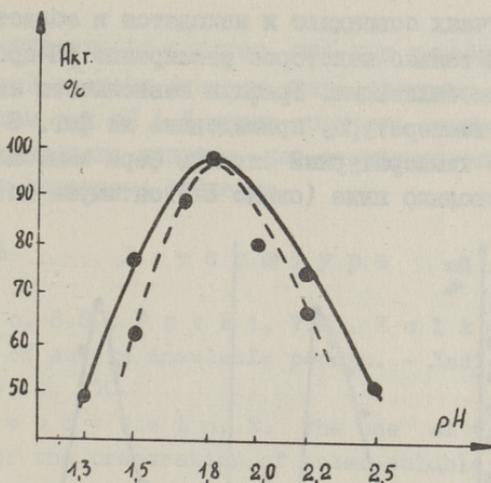
Т а б л и ц а 3  
Иммобилизация пепсина на различных  
кремнеземных носителях

№ п.п.	Носитель	Размер частиц, мм	Средний радиус пор, А°	Удельная поверхность, м <sup>2</sup> /г	Активность иммобилизованного фермента, ПА/г
1	Силохром СХ-1-388 тов.	0,5-1,0	1172	29	90 000
2	Силохром СХ 2-388 тов.	"	582	51	170 000
3	Силохром СХ 3-391 тов.	"	405	79	219 000
4	Силикагель МСА 248 - 3	0,15-1,0	1350	14	28 000
5	Силикагель МСА 248 - 6	"	690	24	40 000
6	Силикагель МСА 248 - 1	"	380	58	60 000

Т а б л и ц а 4  
Иммобилизация пепсина на различных фракциях  
силохрома СХ-2

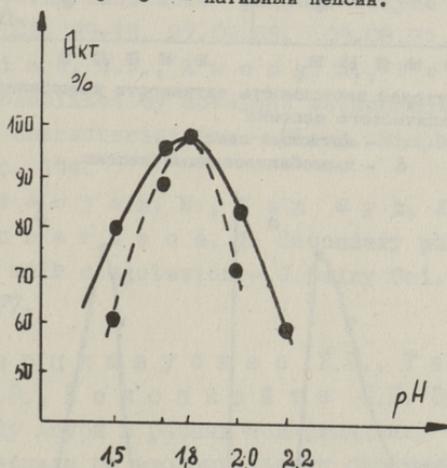
Фракция, мм	Активность иммобилизованного фермента ПА/г
> 1,0	76 000
0,63 - 1,0	88 000
0,43 - 0,63	160 000
0,20 - 0,43	170 000
0,10 - 0,20	180 000

Продажный препарат СХ-2 разделяли на 5 фракций. Результаты иммобилизации пепсина на различных фракциях силохрома СХ-2, приведенные в таблице 4, показывают, что самым подходящим можно считать размер частиц носителя 0,5 мм. Применение более мелких фракций силохрома не оправдывает себя в связи с ухудшением гидродинамики.



Фиг. 3. Зависимость активности иммобилизованного и нативного кристаллического пепсина от pH среды

—●—●— — иммобилизованный пепсин  
 -●- - - - - нативный пепсин.



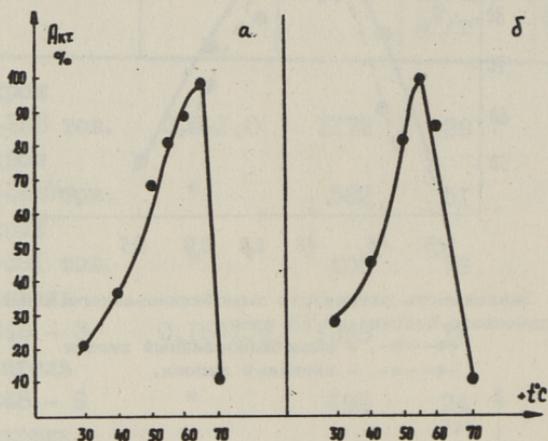
Фиг. 4. pH-профиль активности иммобилизованного и нативного частично очищенного пепсина на гемоглобине

—●—●— — иммобилизованный пепсин  
 -●- - - - - нативный пепсин.

Нами проведено сравнительное изучение некоторых свойств нативного пепсина и препаратов иммобилизованного фермента, полученных из препаратов различной степени очистки.

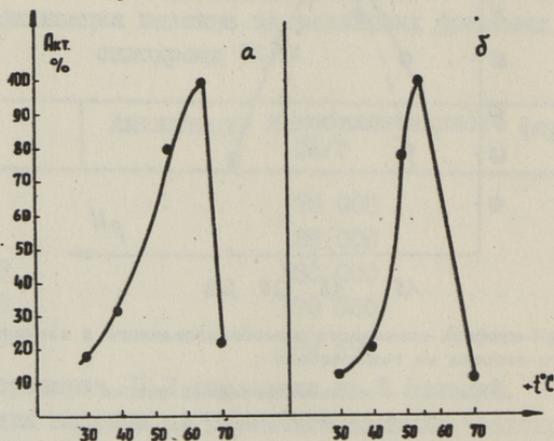
Значительных изменений свойств в ходе иммобилизации нами не обнаружено. Как видно из фиг. 3 и 4, оптимумы pH

В обоих случаях совпадают и находятся в области рН 1,8. Наблюдается только некоторое расширение рН-профиля в результате иммобилизации. Графики зависимости активности пепсина от температуры, приведенные на фиг. 5 и 6 показывают, что температурный оптимум форм иммобилизованного пепсина несколько ниже (около 5°) оптимума нативных ферментов.



Фиг. 5. Температурная зависимость активности иммобилизованного и нативного кристаллического пепсина

а - нативный пепсин  
б - иммобилизованный пепсин.



Фиг. 6. Температурная зависимость активности иммобилизованного и нативного частично очищенного пепсина

а - нативный пепсин  
б - иммобилизованный пепсин.

Различий не обнаружено и в субстратной специфичности свободного и иммобилизованного пепсина.

Из вышесказанного следует, что при иммобилизации пепсина различной степени очистки аминоксилохрому глутаральдегидным методом при pH 4,6 можно получить активные препараты иммобилизованного пепсина, не отличающиеся по основным свойствам от нативного фермента.

#### Л и т е р а т у р а

1. R a o, S.S., P a t k i, V.M., K u l k a r n i, A.D. Preparation of active insoluble pepsin. - Indian J. Biochem., 1970, vol. 7, p. 210.

2. L o w e n s t e i n, E. The use of thylene maleic anhydride for the preparation of water-soluble polyanionic derivative of pepsin. Preparation and properties. - Acta Chem. Scand., 1974, vol. 28 B, N 9, p. 1098.

3. W i l d i, B.S., B o u s e, D.C. Chillproofing of beverages using insoluble polymer-enzyme product. - US pat. N 3597219, Cl. 99-48, 27.09.68, 03.08.71.

4. L i m e, W.F., K w o n g, A., W e e t a l l, H.H. Pepsin insolubilized by covalent attachment to glass: Preparation and characterization.- Bioch. Bioph. Acta, 1971, vol. 242, N 1, p. 194.

5. C h e r y a n, M., V a n W y k, J.P., O l s o n, N.F., R i c h a r d s o n, T. Secondary phase and mechanism of enzymic milk coagulation.- J.Dairy Sci., 1975, vol. 58, N. 4, p. 477.

6. М а р ц и ш а у с к а с Р.П., Т а р а с я в и ч е н е Л.Э., К а н о п к а й т е С.И. Определение белка по методу Лоури в разных модификациях. - Методы в биохимии. Материалы по второму съезду биохимиков Лит. ССР. Вильнюс, 1975. с. 5.

7. M e l r o s e, G.J.H. Insolubilized enzymes. Biochemical application of synthetic polymers.- Rev. Pure Appl. Chem., 1971, vol. 21, p. 83.

N. Lukoševičienė, P. Sadauskas, T. Čiurlis, M. Kreen,  
A. Köstner

Immobilization of Pepsin on Siliceous  
Materials

Summary

The immobilization of different pepsin preparations on porous siliceous carriers - silochrome and silica gel by the help of glutaric aldehyde has been investigated. The best results have been obtained with silochrome SH-2 at the following conditions - pH = 4,6, temperature 5°C, duration 2 h, using 70 mg/g crystalline or 140-170 mg/g partially purified enzyme. No significant differences in enzymatic properties due to immobilization have been observed.

УДК 577.153.002.237

Х.Я.Кальюла, А.И.Кёстнер

### СВОЙСТВА ВКЛЮЧЕННОЙ В ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ АМИНОАЦИЛАЗЫ

Иммобилизация **аминоацилазы** (КФ 3.5.1.14) представляет значительный практический интерес для получения катализаторов разделения рацемических смесей аминокислот [1, 2]. **Аминоацилаза** иммобилизована на разных носителях, применяя разные способы. Хорошие результаты достигнуты адсорбцией на ДЭАЭ-целлюлозе [3] и ДЭАЭ-сефадексе [4]. Учитывая, что **аминоацилаза** действует на **низкомолекулярные** субстраты, для ее **иммобилизации** рекомендовано включение в полиакриламидный гель [5]. Активный центр **аминоацилазы** содержит **сульфгидрильные** группы, которые легко окисляются под действием **окислительно-восстановительных** инициаторов полимеризации акриламида [6]. Поэтому для ее **иммобилизации** можно рекомендовать применение более нежного метода радиационного **иницирования** полимеризации. Этот метод рекомендован для получения ряда **иммобилизованных** ферментов [7-9]. В нашей ранней работе [10] выявлены оптимальные условия для **иммобилизации** **аминоацилазы** радиационной полимеризацией.

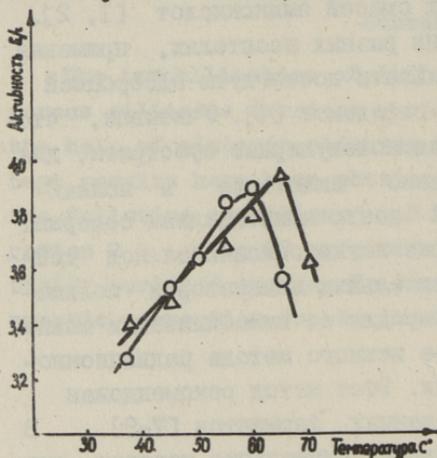
В случае **включения** ферментов в гелевые системы можно ожидать изменения их **видимых** свойств ввиду конформационного воздействия матрицы, изменения концентрации субстрата, продуктов и водородных ионов в матрице. Задачей настоящей работы было **исследование** некоторых свойств **включенной** в ПААГ **аминоацилазы** по разработанной нами методике.

#### Материалы и методы

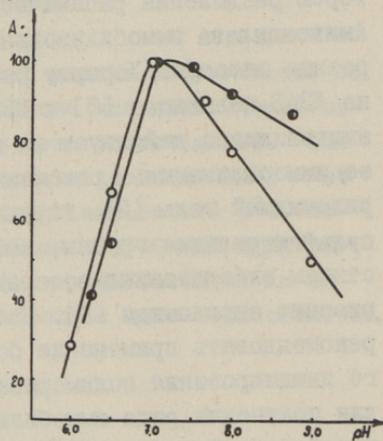
Применяли препарат **аминоацилазы** из свиных почек производства Олайнского завода с активностью 1000 Е/г. Ферментативная активность определялась на 0,1 М растворе N-D, L-ацетилметионина в 0,1 М фосфатном буфере с pH=7,0

при температуре 37°C. Активность геляцилазы определялась в реакторе перемешивания. Концентрация образующего метионина и других аминокислот определялась ингидринным реактивным и спектрофотометрированием при 570 нм. Активность вычислялась в микромолях в минуту. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе аминокислот типа ААА-881.

Субстраты N-D, L-ацетилметионин, N-D, L-ацетилвалин и смесь N-D, L-ацетиламино кислот были синтезированы в нашей лаборатории ацелированием с помощью уксусного ангидрида. В ПААГ иммобилизованная аминокислота (геляцилаза) приготовлена в нашей лаборатории. Аминокислоту иммобилизовали в ПААГ радиационной полимеризацией [10]. Активность используемой геляцилазы 14-16 Е/г.



Фиг. 1. Температурная зависимость геляцилазы  
 -○-○- иммобилизованная аминокислота  
 -△-△- свободная аминокислота.

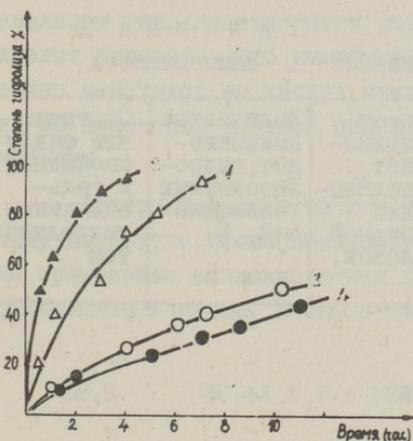


Фиг. 2. pH зависимость геляцилазы  
 -○-○- иммобилизованная аминокислота  
 -△-△- свободная аминокислота.

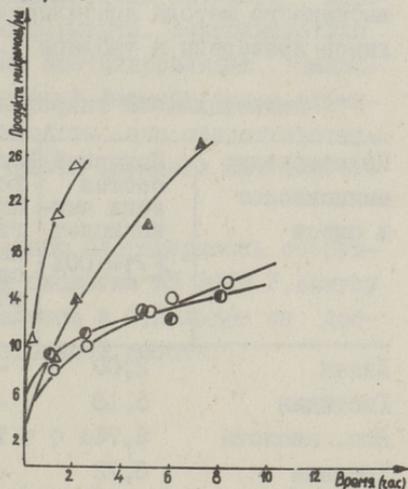
### Результаты и обсуждение

Основные свойства полученной нами геляцилазы исследовались на типичном субстрате N-D, L-ацетилметионине. В первую очередь рассматривалась зависимость её активности от температуры и pH. Полученные результаты изображены на фиг. 1 и 2. По этим данным видно, что иммобилизация мало влияет на исследованную зависимость. Ход кривых для свободного и иммобилизованного фермента между собой мало отличается. Можно отметить только небольшое понижение темпе-

ратурного оптимума до 60°C и сдвиг рН оптимума до 0,4 единиц рН. Для улучшения влияния иммобилизации на интегральную кинетику гидролиза рацемических смесей аминокислот исследовали гидролиз типичных субстратов N-D, L-ацетилметионина и N-D, L-ацетилвалина свободного и иммобилизованного ферментов. Полученные результаты изображены на фиг. 3, по которой видно, что интегральные кривые гидролиза для каждой аминокислоты мало отличаются друг от друга, что свидетельствует о незначительном изменении основных кинетических характеристик при иммобилизации.



Фиг. 3. Гидролиз разных субстратов  
 -Δ-Δ- 1 гидролиз ацетил-D, L-метионина  
 имм. ацилазой  
 своб. ацилазой  
 -▲-▲- 2 гидролиз ацетил-D, L-метионина  
 -○-○- 3 гидролиз ацетил-D, L-валина  
 своб. ацилазой  
 имм. ацилазой  
 -●-●- 4 гидролиз ацетил-D, L-валина.



Фиг. 4. Гидролиз смешанного субстрата  
 -○-○- гидролиз своб. ацилазой  
 -●-●- гидролиз имм. ацилазой  
 -Δ-Δ- гидролиз ацетил-D, L-метионина  
 -▲-▲- гидролиз ацетил-D, L-валина.

Для выяснения возможного изменения специфичности относительно различных аминокислот был проведен глубокий гидролиз смеси ацетилированных аминокислот с помощью свободной иммобилизованной ацилазы. Ход гидролиза смешанного субстрата, а также типичных субстратов D, L-ацетилвалина и метионина изображены на фигуре 4. Ход этих кривых показывает, что, естественно, гидролиз смешанного субстрата

протекает значительно медленнее, чем гидролиз типичных субстратов. Но в конечном гидролизате содержание свободных аминокислот превышает содержание метионина и валина в исходной смеси. Для оценки специфичности обеих форм ацилазы был проведен аминокислотный анализ исходной смеси аминокислот, ацетилированной реакционной смеси и гидролизатов, полученных с помощью иммобилизованного и свободного фермента. Результаты анализа ацетилированной смеси показали почти полное отсутствие свободных аминокислот, что показывает правильность выбранного метода ацетилирования. Результаты остальных анализов приведены в таблице I.

Т а б л и ц а I

Аминоацилазой гидролизованные L-аминокислоты

Наименование аминокислот в смеси	Молярный состав этих аминокислот $\Sigma M=100\%$	Количество аминокислот, гидролизованных свободной ацилазой, %	Количество аминокислот, гидролизованных геляцилазой, %	Соотношение между свободной и геляцилазным гидролизатом
Лизин	2,00	-	-	-
Гистидин	5,18	-	-	-
Асп. кислота	6,74	1,68	4,35	2,58
Треонин	6,72	-	-	-
Серин	9,48	-	-	-
Глут. кислота	6,00	6,3	8,1	1,28
Пролин	10,8	10,1	-	-
Аланин	10,8	14,1	12,2	0,86
Цистин	4,26	3,5	2,5	0,71
Валин	5,08	25,0	16,9	0,67
Метионин	6,80	25,8	25,1	0,97
Изолейцин	7,44	3,9	5,5	1,41
Лейцин	7,54	21,2	15,8	0,75
Норлейцин	7,88	26,1	18,4	0,71

Рассмотрение данных, приведенных в таблице I, показывает, что для большинства аминокислот получены довольно сходные результаты в случае обеих форм. Некоторую разницу можно отметить в случае валина, лейцина и норлейцина, которые гидролизуются иммобилизованной ацилазой медленнее, чем

свободным ферментом и для кислых аминокислот аспарагиновой и глутаминовой кислоты, относительно которых геллацилаза является более эффективным катализатором. Особенно заметна разница в случае аспарагиновой кислоты. Эти результаты представляют с нашей точки зрения значительный интерес, так как они создают условия для изменения видимой специфичности фермента с помощью включения его в полиакриламидный гель. В результате проведенной работы показано, что включением аминоксиллазы в полиакриламидный гель с помощью радиационной полимеризации можно получить иммобилизованный препарат, основные кинетические показатели которого мало отличаются от свойств свободного фермента. Аминокислотным анализом гидролизата смеси разных ацетилированных аминокислот показано, что иммобилизованный фермент более эффективно действует на кислые аминокислоты, что свидетельствует об изменении видимой специфичности фермента при иммобилизации.

Авторы выражают свою искреннюю благодарность сотруднику Института экспериментальной биологии АН ЭССР У. Аннусу за проведение аминокислотных анализов и Э. Пылдре за добросовестную помощь в экспериментальной работе.

#### Л и т е р а т у р а

1. T o s a , T . , C h i b a t a , I . , S a t o , T .  
Preparation and industrial application of immobilized aminoacylase. - Fourth Int. Ferment. Symp. Kyoto, 1972, 73-74.
2. C h i b a t a , I . , T o s a , T . , S a t o , T . ,  
Y a m a m o t o , K . Continuous enzyme reactions by immobilized cells. - Enz. Eng. 2 , N 4, London, 1974, 303.
3. T o s a , T . , M o r i , T . , F u s e , N . Studies on continuous enzymes reactions. III. - "Enzymologia" 1967, 32 , 153.
4. T o s a , T . , M o r i , T . , C h i b a t a , I . Studies on continuous enzyme reactions VI. - "Agr. Biol. Chem.", 1969, 33 , 7.
5. M o r i , T . , S a t o , T . , T o s a , T . Studies on immobilized enzymes X. - "Enzymologia" 1972, 43 , 4.
6. K o e r d e l , W . , S c h n e i d e r , F . Chemical investigation of pig kidney aminoacylase. - "Biochim. et Bioph. Acta", 1976, 445 , 2.

7. Kawashima, K., Umeda, K. Immobilization of enzymes by radiopolymerization of monomers. - Biotechnol. Bioeng., 1975, 17, 4.

8. Kawashima, K., Umeda, K. A Method for preparing bead shaped immobilized enzyme. - Agr. Biol. Chem., 1976, 40, 6, 1149.

9. Kawashima, K., Umeda, K. Preparation of membranous immobilized invertase and its characteristics. - Agr. Biol. Chem., 1976, 40, 6, 1151.

10. Кальюла Х., Кёстнер А. Включение аминоксилызы в полиакриламидный гель радиополимеризацией. - "Тр. Таллинск. политехн. ин-та", 1976, № 402.

H. Kaljula, A. Köstner

Properties of Immobilized Aminoacylase  
in Polyacrylamide Gel

Summary

A simple method for aminoacylase immobilization by radiopolymerization of acrylamide has been used. Enzymatic properties of the immobilized aminoacylase were investigated and compared with those of the native aminoacylase. The optimum pH of the immobilized aminoacylase was shifted by 0,4 pH units to the basic side in comparison with that of the native enzyme. The immobilized aminoacylase showed an optimum activity at 60°. The kinetics of hydrolysis of etyl-D,L - metionine, acetyl - D,L - valine with enzyme preparation was studied.

The difference of substrate specificity between native and insoluble aminoacylase was observed.

УДК 547.391.1:398.1:543.063

М.К.Фриедентхаль, Л.А.Иосуа,  
Э.Х.Сиймер, А.И.Кёстнер

САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ  
ИММОБИЛИЗОВАННЫХ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ  
ФЕРМЕНТОВ В ПИЩЕВОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Метод иммобилизации ферментов в гелях является весьма распространенным и отличается несложностью и высокой эффективностью фиксации белков в матрице геля. Больше всего до сих пор применялся полиакриламидный гель, легко образующийся при радикальной полимеризации мономеров в присутствии окислительно-восстановительных инициаторов при комнатной температуре. На кафедре технологии пищевых продуктов Таллинского политехнического института доказана эффективность применения иммобилизованных в геле ферментов (инвертазы, лактазы, глюкоамидазы, глюкозооксидазы и др.) для катализа реакций низкомолекулярных субстратов. Хорошая стабильность препаратов открывает возможность их внедрения в пищевой промышленности. Однако внедрение новых технологических процессов с применением нерастворимых препаратов допускается лишь после доказательства неврежденности препаратов при контакте с пищевыми продуктами.

Полиакриламид и полиакриламидный гель сами широко применяются в различных отраслях народного хозяйства, в том числе для обработки питьевой воды, для осветления вин и т.д. [1,2]; запатентован метод о применении полиакриламида в качестве заменителя крови [3].

Безвредность акриловых полимеров доказана убедительно в [4, 5], но отсутствуют данные о действии олигомеров акриламида на живые организмы. С большой вероятностью можно их считать маловредными веществами, однако акриламид сам является токсичным веществом с  $LD_{50} = 150 - 180$  мг/кг,

действующим на нервную систему, [5]. Поэтому содержание акриламида в питьевой воде и в пищевых продуктах должно быть строго регламентировано, допускаемая его концентрация находится в пределах 50–100 мкг/кг. В СССР до сих пор предельная допустимая концентрация акриламида не установлена. В США принята допустимая концентрация в воздухе 0,3 мг/м<sup>3</sup> [5].

При иммобилизации ферментов в полиакриламидном геле до 2% из исходных мономеров могут остаться непрореагировавшими, следовательно, свежеприготовленный 7–10%-ный гель содержит до 2 г/кг акриламида и последующая промывка геля должна обеспечить снижение его концентрации не менее чем на четыре порядка. Несмотря на то, что коэффициенты распределения низкомолекулярных веществ между полиакриламидным гелем и водой равны 0,3 – 6,0, т.е. близки к единице [6], промывка препаратов иммобилизованных ферментов должна, очевидно, проводиться очень тщательно. Надо также иметь в виду, что коэффициенты распределения существенно зависят от концентрации вещества и до сих пор отсутствуют данные о распределении органических веществ между полиакриламидным гелем и водой при очень низких концентрациях веществ. Поэтому исследование основных закономерностей уменьшения концентрации акриламида в геле в ходе его многоступенчатой экстракции является неизбежным.

В настоящей статье приводятся основные результаты исследования процесса промывки полиакриламидного геля, применяя многоступенчатую периодическую экстракцию дистиллированной водой и определяя в промывной воде (в экстрактах) содержание связанного азота методом Несслера и содержание акриламида газохроматографическим методом.

#### Исходные вещества и методика определений

7%-ный полиакриламидный гель с применением в качестве модификатора ангидрида итаконовой кислоты синтезировался по ранее разработанной методике [7].

Промывка геля проводилась в конических колбах на встряхивающей машине в течение 15 минут с определенным соотношением воды (бидистиллята) к гелю (от 1:1 до 10:1).

Предварительно доказывалось быстрое установление равновесного состояния в течение 2–3 минут. После промывки гель отфильтровывался на воронке Бюхнера, отщепивался и применялся для следующей промывки. Фильтрат отщепивали и анализировали.

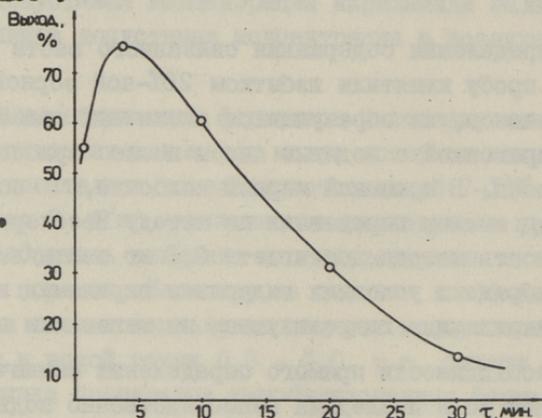
Для определения содержания связанного азота в промывной воде пробу кипятили избытком 20%-ной серной кислоты в течение 2 часов, из образующихся аммиачных солей выделяли аммиак перегонкой с водяным паром после прибавления к раствору щелочи. В приемной мерной колбочке, содержащей 0,1 н  $H_2SO_4$ , аммиак определяли по методу Несслера [8]. Чувствительность метода достигает 0,1 мг азота/л. Показано, что в выбранных условиях гидролиза акриламид и N,N'-метилен-бисакриламид гидролизуются не менее чем на 95%.

При необходимости прямого определения аммиачного азота в промывной воде последняя непосредственно подвергалась анализу методом Несслера.

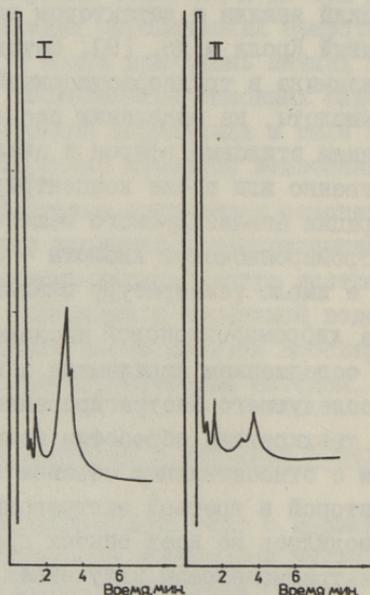
Для определения акриламида в растворах применялся газохроматографический анализ с детектором электронного захвата, разработанный Кролл и др. [9]. Метод основывается на бромировании акриламида в труднорастворимый в воде амид дибромпропионовой кислоты, на выделении последнего многократным экстрагированием этиловым эфиром и анализе эфирного экстракта непосредственно или после концентрирования в зависимости от концентрации анализируемого вещества. Эталонное вещество – амид дибромпропионовой кислоты – синтезировалось аналогично [9] и имело температуру плавления  $132^{\circ}$ .

Выход амида дибромпропионовой кислоты при анализе растворов с низким содержанием акриламида зависит от условий бромирования и последующего экстрагирования. Для экстракции нами применялась трехкратная обработка водного раствора с диэтиловым эфиром с относительным объемом эфира 0,4, 1,0 и 0,4 для первой, второй и третьей экстракции соответственно. Бромирование проводилось во всех опытах при одинаковом освещении колб с ультрафиолетовым излучением (расстояние ламп ДРТ 375 от колб составляло 15 см). Как видно из фиг. 1, максимальный выход целевого продукта достигается после 3-минутного бромирования, что и было выбрано продолжительностью освещения во всех опытах.

Газохроматографический анализ проводится на хроматографе Perkin Elmer 3920 В на стеклянной колонке с диаметром 1 мм и длиной 2 м, заполненной носителем Gaschrom Q, содержащим 5% жидкой фазы ДС-200. Температура опытов - 120°.



Фиг. 1. Выход амида дибромпропионовой кислоты после трехкратной экстракции водных растворов диэтиловым эфиром в зависимости от продолжительности бромирования водных растворов акриламида УФ излучением.



Фиг. 2. Хроматограммы амида дибромпропионовой кислоты. I - эталонный раствор концентрацией 256 мкг/л (соответствующая концентрация акриламида 105 мкг/л); II - раствор, полученный при обработке промывной воды полиакриламидного геля после тщательной промывки последнего. Концентрация амида дибромпропионовой кислоты - 39,0 мкг/л (соответствующая концентрация акриламида 16,0 мкг/л).

При выбранных условиях удерживаемый объем амида дибромпропионовой кислоты составляет 165 см<sup>3</sup>, продолжительность анализа 3 минуты. Для расчета результатов анализа применяли калибровочные данные, полученные в виде линейной зависимости площади пика от концентрации амида дибромпропионовой кислоты в эфирном растворе. В качестве примера на фиг. 2 приведены хроматограммы двух растворов, снятых при одинаковой чувствительности (1:16) детектора.

### Результаты опытов

В первой серии опытов к промывке бидистиллятом подвергались 7%-ные полиакриламидные гели с относительным содержанием акриламида к N,N'-метилён-бис-акриlamиду 95:5. Два геля готовились без фермента с относительным количеством воды 1:5 и 1:10, соответственно третий - с иммобилизацией  $\beta$ -фруктофуранозидазой с относительным количеством воды 1:5. Проведено 7 циклов промывки, в промывной воде после каждого цикла определяли содержание аммиачного азота после гидролиза с серной кислотой. Результаты опытов приведены в таблице I.

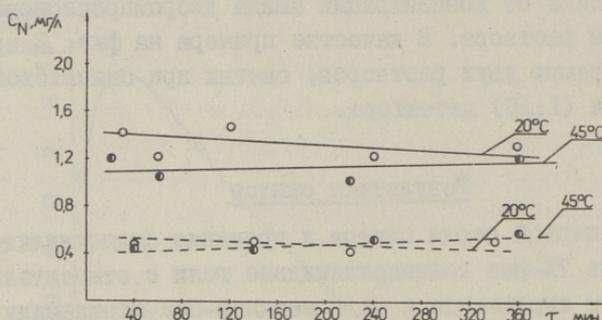
Как видно из таблицы I, содержание азота в ходе промывки полиакриламидных гелей вначале быстро уменьшается, но после многократной промывки приближается к некоторой постоянной величине порядка 1 мг/кг.

Т а б л и ц а I

Остаточное содержание общего азота в промывных водах

№ № циклов промывки	Гель без фермента	Гель без фермента	Гель с $\beta$ -фруктофуранозидазой
	Содержание общего азота в промывной воде, мг/л		
1.	200,90	107,30	240,24
2.	31,50	8,50	39,20
3.	10,00	1,56	7,84
4.	1,90	0,88	2,81
5.	1,25	0,78	1,79
6.	0,88	0,73	1,14
7.	0,78		1,00

При этом характерно, что рассчитанные видимые коэффициенты распределения азота между гелем и водой вначале близки единице, а после снижения концентрации ниже 5 мг/л будут быстро увеличиваться.



Фиг. 3. Зависимость содержания общего (—) и аммиачного азота (— — —) в растворе от продолжительности контакта с полиакриламидным гелем.

При длительном контакте гелей с водой при умеренных температурах содержание азотистых веществ в растворе практически не изменяется. Как видно из фиг. 3, при этом не наблюдается также гидролиза амидных групп, о чем свидетельствует постоянство концентрации аммиачного азота в промывной воде (определяемой непосредственно из растворов методом Несслера).

Во второй серии опытов 7%-ный полиакриламидный гель подвергался 15-разовой периодической промывке с относительным количеством дистиллированной воды к гелю в каждом цикле 10:1. Пробы подвергались бромированию и экстрагированию диэтиловым эфиром по вышеизложенной методике. Экстракты проанализировались на содержание 2,3-дибромпропионового амида газохроматографическим методом. В таблице 2 приведены результаты анализа промывной воды начиная с шестого цикла, пересчитанные на содержание акриламида.

Результаты анализа свидетельствуют о том, что применение эффективной промывки полиакриламидного геля позволяет снизить содержание акриламида в геле в значительной степени. (Промывная вода первого цикла содержала 120 000 мкг/л акриламида, что можно также считать приблизительно содержанием его в геле после первой промывки). В контактируемой с промытым гелем воде содержание акрилами-

да равно 3 мкг/л, что по всей вероятности является вполне допустимой концентрацией его также в пищевых продуктах, обрабатываемых препаратами иммобилизованных в полиакриламидном геле ферментов.

Т а б л и ц а 2

Содержание акриламида в промывной воде  
полиакриламидного геля

Содержание акриламида, мкг/л в зависимости от количества циклов промывки									
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
7,9	6,5	6,0	5,4	4,9	3,8	3,1	2,9	2,8	2,8

Интересно отметить, что распределение акриламида и других азотистых веществ между гелем и водой при низких концентрациях должно быть сильно сдвинуто в сторону геля, что с одной стороны препятствует вымыванию этих веществ из геля, а с другой стороны гарантирует очень низкое их содержание в воде или в других водных растворах, контактируемых с гелем.

Итак, для ходатайствования разрешения использования препаратов иммобилизованных в геле ферментов в пищевой промышленности от Министерства здравоохранения СССР имеются достаточные обоснования. При внедрении препаратов, по нашему мнению, внимание надо обратить на разработку эффективных непрерывных процессов промывки и экспресс-методов определения акриламида для непосредственного технологического контроля процесса промывки и обезвреживания отходов производства.

#### Л и т е р а т у р а

1. Общесоюзный перечень № РМ - 2 - 1967 г. материалов и веществ, разрешенных Минздравом СССР к применению в винодельной промышленности. Ялта, 1976.

2. A s v a n y, A., M o l n a r, I. Influence du traitement par des polymers insolubles sur les composants et la qualité du vin: polyacrylamide. -Bull.O.I.V., 1973, vol. 46, N. 514, p. 1111.

3. L i m, D., S p r i n c a l, L., К о р е с е к, I., V a c i k, I. Improvements in blood plasma substitutes, Brit. pat. N 1330225, A 5 B 351, A 61K 27/10 08.07. 1970, 12.09. 1973.

4. P u n t i g a m, H.R., V ö l k e r, T. Acryl- und Methacrylverbindungen, 1967. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 147.

5. Вредные вещества в промышленности II, изд-во "Химия", Л., 1976, с. 42 и 532.

6. Под ред. Березина И.В. Имобилизованные ферменты, т. I, изд-во МГУ, 1976, с. 143.

7. К е с т н е р А.И., К р е з н М.И., К а л у - н я н ц К.А. Свойства связанной в гель инвертазы. Реф. сб. "Микробиологическая промышленность", 1973, 3 (99), с. II.

8. Б у р ш т е й н А.И. Методы исследования пищевых продуктов. Гос. мед. изд. Укр. ССР, Киев, 1963, с. 290.

9. C r o l l, B.T., S i m k i n s, G.M. The determination of acrylamide in water by using electron capture gas chromatography. - Analyst, April, 1972, vol. 97, p. 281.

M. Friedenthal, L. Josua, E. Siimer, A. Köstner

Medical-Hygienic Aspects of Application of Poly-  
acrylamide Gel Entrapped Enzymes in Food  
Industries

Summary

The preparations of polyacrylamide gel entrapped enzymes contain after their production up to 2 g unreacted toxic monomers per kg that must be removed by washing. The content of acrylamide in liquids treated with immobilized enzymes must be lower than 50 - 100  $\mu$ g per liter.

In this work the extraction of gels with distilled water has been investigated. Acrylamide in samples was treated by bromine and the formed 2,3 - dibromopropionic acid amide in ethyl ether extracts was quantitatively determined by gas-liquid chromatography. It has been shown that during the washing the content of acrylamide in water decreases from 120 000 to 3  $\mu$ g per liter that permits to recommend washed gel preparations as suitable for using in food industry.

УДК 541.127.2;547.441

А. Я. Озолиньш, А. И. Кёстнер

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕАКЦИЙ ГЛУТАРОВОГО АЛЬДЕГИДА  
С ДИПЕПТИДОМ ГЛИЦИЛ-ФЕНИЛАЛАНИНОМ

Опубликованы многочисленные работы, касающиеся реакций между альдегидами и соединениями, содержащими свободные амино-, имино-, окси- и тиольные группы [1-7]. Так как целью большинства этих работ является выяснение и установление природы и возможных механизмов реакций альдегидов с веществами, обладающими биологической важностью, основное внимание сосредоточено на реакциях альдегидов с аминокислотами.

Целью настоящей работы является установление природы взаимодействия glutарового альдегида (ГА) с модельным веществом глицилфенилаланином.

Материалы и методы

Глицил-фенилаланин (ГФА) - препарат фирмы "Reanal".  
Глутаровый альдегид (ГА) - 25%-ный раствор (Япония).  
Все остальные использованные реактивы марки ЧДА.

Во всех экспериментах в качестве растворителя использована дистиллированная вода.

Определения концентрации glutарового альдегида

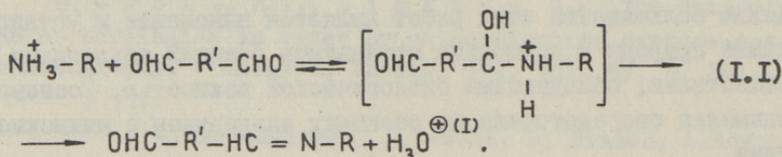
Концентрация растворов glutарового альдегида определена гидроксилламинным методом [8].

pH статирование

Титрование освобожденных протонов в режиме pH статирования осуществлена на pH стате. TTT-I Radiometer (Copenhagen) с использованием самописца (S BR 2b) и автобирета (АВЦ-12).

## Результаты и обсуждение

Данные, полученные титрованием освобожденных протонов в режиме рН статирования, для реакций дипептида глицил-фенилаланина с ГА указывают (см. табл. I) на то, что реакция протекает двухстадийно, в первой стадии присоединение ГА к дипептиду ГФА приводит к быстрому освобождению протонов. Скорость освобождения не зависит от концентрации реагентов и реакция в этой стадии, следовательно, является реакцией нулевого порядка. Образовавшееся промежуточное соединение, вероятно, карбиноламин (I), во второй стадии реакции, протекающей более медленно, превращается в конечный продукт. Реакцию, вероятно, можно изобразить схемой I.I.



Надо отметить, что подобные результаты были получены и другими исследователями [9], изучавшими реакцию ГА с полилизинном. Приведенная схема I.I. изображает только основной из возможных путей протекания реакции. Ввиду весьма высокой реакционной способности ГА, основная реакция, возможно, сопровождается некоторыми побочными реакциями, например, присоединением ГА к гидроксильной группе или азоту карбиноламина (I), что приводит к сложной смеси продуктов, не поддающихся идентификации средствами физико-химического и элементарного анализа.

Для относительной оценки влияния концентрации ГА, ГФА и рН среды на скорость освобождения протонов в реакции ГА с ГФА, нами рассчитаны начальные скорости второй стадии ( $V_H$ ) реакции. Расчеты проведены по методике, используемой в работе [9]. Результаты сведены в таблицу I.

### Выводы

1. Титрованием освобожденных протонов реакции ГА с ГФА установлено, что реакция является двухстадийной.

2. Установлено, что скорость первой стадии не зависит от концентрации ГА и ГФА.

3. Определены начальные скорости второй стадии, как функции рН и концентрации ГА и ГФА.

Т а б л и ц а I

Начальные скорости взаимодействия между

ГА и ГФА в режиме рН статирования

( $t = 25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , конц.  $\text{NaCl} = 0,5 \text{ M}$ )

рН	Концентрация ГА ( $\text{M} \cdot 10^{-2}$ )	Концентрация ГФА ( $\text{M} \cdot 10^{-3}$ )	$V_n$ ( $\frac{\text{МОЛИ} \cdot \text{МЛ}^{-1}}{\text{МИН}^{-1}} \cdot 10^{-6}$ )
5.0	2.3	3.33	3.4
5.0	2.9	3.33	4.4
-----			
6.0	0.31		2.0
6.0	0.62		4.0
6.0	1.3	3.33	5.6
6.0	1.9		6.5
6.0	2.5		6.2
6.0	3.1		6.4
-----			
6.0		1.30	2.6
6.0		1.60	3.2
6.0	3.1	2.60	4.0
6.0		2.60	5.6
6.0		3.33	6.5
-----			
7.0	0.65		9.5
7.0	1.3		12.2
7.0	2.0	3.33	13.1
7.0	2.6		13.2
7.0	3.2		13.6
-----			
7.0		0.66	2.9
7.0		1.33	5.9
7.0	3.2	2.00	8.4
7.0		2.66	11.3
7.0		3.33	14.1
-----			
8.0		2.00	6.4
8.0	3.1	2.66	8.5
8.0		3.33	10.7

## Выводы

1. Титрованием освобожденных протонов реакции ГА с ГФА установлено, что реакция является двухстадийной.
2. Установлено, что скорость первой стадии не зависит от концентрации ГА и ГФА.
3. Определены начальные скорости второй стадии, как функции рН и концентрации ГА и ГФА.

## Литература

1. French, D., Edsall, F.T. - *Advan. Protein Chem.*, 1945, 2, 278.
2. Fraenkel-Courat, H., Oldcott, H.S. - *F.Am.Chem.Soc.*, 1946, 68, 34.
3. Fraenkel-Courat, H., Oldcott, H.S. - *F.Am.Chem.Soc.*, 1948, 26, 73.
4. Milch, R.A., *Gerontologia*, 1963, 7, 129.
5. Bowes, F.H., Carter, C.W. - *Biochim.Biophys.Acta*, 1968, 168, 341.
6. Hopwood, D. - *Histochemie*, 1967, 11, 289.
7. Habeeb, A.F.S.A., Hiramoto, R. - *Arch. Biochim. Biophys.*, 1968, 126, 16.
8. Hesse, G. - *Acta Histochem.*, 1973, 46 (2), 253-266.
9. Blauser, G., et al. - *Biopolymers*, 1975, 14, 2585-1598.

Investigation of the Reaction between  
Dipeptide Glycylphenylalanine and  
Glutaraldehyde

Summary

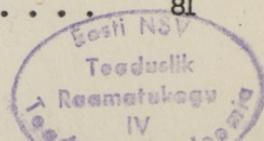
The interaction between glycylphenylalanine and glutaraldehyde was investigated in dilute aqueous solution by measurement of the kinetics of proton release at constant pH and temperature and at various concentrations of the reaction components.

Under various conditions, the release of protons at constant pH appeared kinetically to be composed of at least two steps: an initial zero-order reaction, followed by a slower reaction.

Initial rates of proton release for the second step as a function of pH and concentration of reactants have been determined.

## С о д е р ж а н и е

I.	А. И. Кёстнер. О пределах активности иммобилизованных ферментов. . . . .	3
2.	А. И. Кёстнер. Функция оптимизации для процесса иммобилизации ферментов. . . . .	9
3.	Э. Х. Сиймер, К. Э. Папшель А. И. Кёстнер. Новый метод описания кинетики ферментативных реакций. . . . .	13
4.	К. Э. Папшель, Э. Х. Сиймер, А. И. Кёстнер, А. К. Куликова, А. С. Тихомирова. Количественная характеристика гидролиза лактозы иммобилизованной $\beta$ -галактозидазой. . . . .	19
5.	Х. Р. Егоров, К. А. Кивисилла, Х. Я. Киппер, А. Э. Эрин, А. И. Кёстнер. Изучение иммобилизации протеаз на кремнеземных материалах. . .	29
6.	Х. Р. Егоров, А. Э. Эрин, А. И. Кёстнер, Л. Г. Логинова, И. Г. Головина. Получение иммобилизованной протеазы из <i>Actinomyces vulgaris</i> PA-II-4 и изучение некоторых ее свойств. . . . .	35
7.	А. Э. Эрин, М. Р. Педак, А. И. Кёстнер. Гидролиз казеина иммобилизованным панкреатином. . .	43
8.	А. И. Кёстнер, Х. Я. Киппер, А. Э. Эрин, М. Р. Педак. Определение механической растираемости неорганических носителей. . . . .	51
9.	Н. Ю. Лукошявичене, П. Б. Садаускас, Т. К. Чурлис, М. И. Креэн, А. И. Кёстнер. Иммобилизация пепсина на кремнеземных материалах. . . . .	57
10.	Х. Я. Кальюла, А. И. Кёстнер. Свойства включенной в полиакриламидный гель аминоксилы. . . . .	67
11.	М. К. Фриедентхаль, Л. А. Иосуа, Э. Х. Сиймер, А. И. Кёстнер. Санитарно-гигиенические аспекты применения иммобилизованных в полиакриламидном геле ферментов в пищевой промышленности. . . . .	73
12.	А. Я. Озолиньш, А. И. Кёстнер. Исследование реакции глутарового альдегида с дипептидом глицил-фенилаланином. . . . .	81





Таллинский политехнический институт. Труды ТПИ № 424  
Получение и применение иммобилизованных ферментов  
Сборник статей по химии и химической технологии XLV  
Редактор А. Канн. Техн. редактор В. Ранник  
Сборник утвержден коллегией Трудов ТПИ 15 мая 1977 года  
Подписано к печати 30 авг. 1977 года  
Бумага 60x90/16. Печ. л. 5,5+0,5 приложение. Уч.-изд.л. 4,53  
Тираж 300. МВ-06223  
Ротапринт ТПИ, Таллин, ул. Коскла, 2/8. Зак. № 927  
Цена 67 коп.

© ТПИ 1977, Таллин

ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ  
ФЕРМЕНТОВ

(Химия и химическая технология)

УДК 575.15.04.001

О пределах активности иммобилизованных ферментов.

Кёстнер А.И. "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 3-7.

На основе зависимости видимого значения  $K_M$  от внутренней диффузии показано, что при определенной концентрации субстрата рабочая активность препарата иммобилизованного фермента выражается

$$A_0 = \frac{A_M \cdot A_S}{A_C + A_S},$$

где  $A_S$  - активность фермента до взятия препарата для иммобилизации;

$A_M$  - максимальная активность;

$A_C$  - параметр, определяемый условиями связывания.

$A_M$  выражается

$$A_M = \frac{S \cdot D}{0,018 \cdot R^2},$$

где  $S$  - концентрация субстрата;

$D$  - коэффициент диффузии;

$R$  - радиус зерна.

Библ. наименований - 3.

Функция оптимизации для процесса иммобилизации ферментов. Кёстнер А.И. "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 9-12.

Предложено уравнение для определения эффективности иммобилизованного фермента

$$E_t = \frac{P_t}{C_t} = \frac{A_s A_m \frac{1}{k} (1 - e^{-kt})}{(A_s + A_c)(C_E t + A_s C_s + C_I)}$$

где  $E_t$  - эффективность процесса;

$P_t$  - количество продукта;

$A_s$  - количество исходного растворимого фермента;

$A_m$  - максимальная активность препарата;

$A_c$  - показатель, зависящий от процесса иммобилизации;

$k$  - константа реакции инактивации в рабочих условиях;

$t$  - время использования фермента;

$C_E$  - расходы на эксплуатацию реактора;

$C_s$  - стоимость исходного фермента;

$C_I$  - расходы на иммобилизацию и носитель.

Цифровым решением данного уравнения можно найти оптимальную длительность применения иммобилизованного фермента.

В любом случае можно рекомендовать функцию

$$E_I = A_0 \cdot \gamma \cdot \frac{1}{k}$$

для оптимизации условий иммобилизации.

Библ. наименований - 1.

УДК 577.151:541.127.2+518.62

Новый метод описания кинетики ферментативных реакций. Слимэр Э.Х., Пашель К.Э., Кёстнер А.И. "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 13-16.

Для описания кинетики ферментативных реакций, в частности, с глубокой конверсией субстрата и ингибируемых продуктами реакции целесообразно применять уравнение

$$v = v_0 \frac{(1-X)}{1 + K_1 X + K_2 X^2}, \quad (I)$$

в котором  $v$  - скорость реакции;

$v_0$  - начальная скорость реакции;

$X$  - степень конверсии субстрата;

$K_1, K_2$  - эмпирические коэффициенты.

Значения коэффициентов  $K_1$  и  $K_2$  можно вычислять непосредственно из интегральных кривых реакции. Для этого дифференцированием зависимости концентрации продукта от времени вычисляют значения скорости реакции и рассматривают скорость как функцию от  $X$ .  $K_1$  и  $K_2$  находят линейной регрессией видоизмененного уравнения (I)

$$Z = K_1 + K_2 X, \quad (2)$$

где

$$Z = \frac{v_0}{v} \cdot \frac{1-X}{X} - \frac{1}{X}. \quad (3)$$

При этом важное значение следует уделять выбору надежного метода определения  $v_0$ .

По теоретическим соображениям в условиях  $[S]_0 \gg K_m$  ( $[S]_0$  - начальная концентрация субстрата) и при отсутствии ингибирования субстратом  $K_1$  и  $K_2$  должны линейно зависеть от  $[S]_0$ , что позволяет применять уравнение (I) для описания кинетики реакции при любых концентрациях субстрата. На основе зависимостей  $K_1$  и  $K_2$  от  $[S]_0$  возможно также получить важную информацию о типе ингибирования продуктами и вычислить некоторые характерные величины.

Библ. наименований - 6.

УДК 577.154.04:547.458.22

Количественная характеристика гидролиза лактозы  
иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазой. Пашпель К.Э.,  
Слимер Э.Х., Кестнер А.И., Куликова А.К., Тихомирова А.С.  
"Труды Таллинского политехнического института",  
№ 424, 1977, с. 19-28.

Исследована кинетика гидролиза лактозы в водных растворах (рН 4,5) и в сыворотке молока при 50°C в реакторах различного типа с нативной  $\beta$ -галактозидазой (3.2.1.23) из культуры гриба *Curvularia inaequalis* и иммобилизованной на модифицированном силикросорбе  $\beta$ -галактозидазой. Для

описания кинетики реакции использовано уравнение

$$v = \frac{v_0(1-X)}{1 + K_1X + K_2X^2}, \quad (I)$$

в котором  $v$  — скорость реакции;  $v_0$  — начальная скорость реакции;  $X$  — степень конверсии субстрата;  $K_1$  и  $K_2$  — эмпирические коэффициенты.

Вычислены значения  $K_1$  и  $K_2$  для опытов с различными начальными концентрациями субстрата  $[S]_0$  и показано, что  $K_1$  и  $K_2$  линейно зависят от  $[S]_0$ . На основе зависимости  $K_2$  от  $[S]_0$  вычислены эффективные значения константы ингибирования глюкозой как полным неконкурентным ингибитором, равны 0,032 и 0,022 М для иммобилизованной и нативной  $\beta$ -галактозидазы соответственно.

Уравнение (I) пригодено для описания ферментативного гидролиза лактозы в реакторах любого типа как в водных растворах, так и в сыворотке молока. Для расчетов продолжительности реакции, производительности реакторов и т.д. рекомендуется использовать интегральную форму уравнения (I).

Таблиц — I, фигур 5, библиографических наименований — 3.

УДК 577.1504.668

Изучение иммобилизации протеаз на кремнеземных

материалах. Егорев Х.Р., Кивисилла К.А.,

Киппер Х.Я., Эрин А.Э., Кёстнер А.И. "Труды

Таллинского политехнического института", № 424,

1977, с. 29-34.

Изучалось модифицирование пористого кремнеземного носителя силохрома поликарбамидной смолой и ковалентное связывание панкреатических протеаз на обработанном носителе с помощью бифункциональных реагентов глутарового альдегида и диизоцианата адипиновой кислоты. Более высокие показатели были достигнуты при иммобилизации панкреатина. Проведением серий опытов по ортогональному факторному плану были выяснены оптимальные условия иммобилизации панкреатина и трипсина.

Таблиц — 2, библиографических наименований — 5.

Получение иммобилизованной протеазы из *Actinomyces vulgaris* РА-II-4 и изучение некоторых ее свойств.

Х.Р.Егоров., Эрин А.Э., Кёстнер А.И., Легинова Л.Г., Головина И.Г. "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 35-41.

Исследована иммобилизация протеазы из термофильного актиномицета *Actinomyces vulgaris* РА-II-4 путем ковалентного связывания на кремнеземном носителе - силхrome, поверхность которого модифицирована покрытием пеликарбамидом или полиамидом. Изучены некоторые свойства как свободной, так и иммобилизованной протеазы. Оптимальной температурой действия фермента являлось 60°C. Препараты иммобилизованной протеазы применимы для гидролиза казеина. При этом отмечена специфичность, отличающая её от панкреатических протеаз.

Фигур - 3, таблиц - 1, библиографических наименований - 6.

УДК 577.156.6:547.963.2

Гидролиз казеина иммобилизованным панкреатином.

Эрин А.Э., Педак М.Р., Кёстнер А.И. "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 43-50.

Изучен гидролиз казеина иммобилизованными на кремнеземных носителях протеазами панкреатического комплекса. Найдены оптимальные условия гидролиза в реакторах перемешивания периодического действия с активным ротором и с якорной мешалкой. Показана более высокая рабочая стабильность препаратов на силкатеде по сравнению с препаратами на силхrome.

Таблиц - 2, фигур - 3, библиографических наименований - 4.

Определение механической растрескиваемости неорганических носителей. Кёстнер А.И., Киппер Х.Я., Эрин А.Э., Педак М.Р., "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 51-55.

Описывается лабораторная методика определения механических свойств кремнеземных носителей для иммобилизации ферментов. Изучаемый материал подвергают механической обработке при определенных условиях. Степень измельчения определяют мокрым просеиванием.

Таблиц - 1, фигур - 2, библиографических наименований - 1.

УДК 577.156.4.002.237

Иммобилизация пепсина на кремнеземных материалах. Лукошвичене Н.Ю., Садаускас П.Б., Чюрлис Т.К., Креан М.И., Кёстнер А.И. "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 57-66.

Изучалась возможность иммобилизации пепсина различной степени очистки на силихроме и силикагеле глутаральдегидным методом. Наилучшие результаты получены при фиксации пепсина на силихроме СХ 2 при рН 4,6, 5°C, продолжительности процесса 2 часа и расходе фермента 70 мг на 1 г носителя в случае кристаллического или 140-170 мг на 1 г носителя в случае малоочищенного. Не обнаружено значительных различий в основных свойствах свободного и иммобилизованного фермента.

Таблиц - 4, фигур - 6, библиографических наименований - 7.

Свойства включенной в полиакриламидный гель  
аминоацилазы. Кальвилья Х.Я., Кёстнер А.И.

"Труды Таллинского политехнического института",  
№ 424, 1977, с. 67-72.

Аминоацилаза (КФ.3.5.1.14) включена в полиакриламидный гель радиополимеризацией. Исследовали свойства полученной иммобилизованной аминоацилазы. По результатам опытов иммобилизации мало влияет на pH и температурный оптимум. Температурный оптимум иммобилизованной аминоацилазы 60°C и оптимум pH сдвинуть на 0,4 единиц pH на щелочную сторону. Исследовали кинетику гидролиза рацемических смесей.

Для выяснения возможного изменения специфичности относительно различных аминокислот был проведен глубокий гидролиз смеси ацетилированных D,L-аминокислот с помощью свободной и иммобилизованной аминоацилазы.

Таблиц - I, фигур - 4, библиографических наименований - 10.

УДК 547.391.1: 398.1:543.063

Санитарно-гигиенические аспекты применения  
иммобилизованных в полиакриламидном геле ферментов

в пищевой промышленности. Фриедентхаль М.К.,  
Иосуа Л.А., Сиймер Э.Х., Кёстнер А.И. "Труды  
Таллинского политехнического института", № 424,  
1977, с. 73-80.

После изготовления могут препараты иммобилизованных в полиакриламидном геле ферментов содержать до 2 г/кг непрореагировавших мономеров, в основном токсичного акриламида ( $\Delta A_{50} = 150 - 180$  мг/кг). Хотя точная предельная концентрация акриламида в жидких пищевых продуктах в СССР не установлена, ее можно оценить 50-100 мкг/кг. Следовательно, для применения иммобилизованных ферментов в пищевой пре-

мышленности надо значительно снизить содержание акриламида в гелях.

Исследованы закономерности вымывания акриламида и других азотистых веществ из гелей в процессе экстракции водой. Показано, что в ходе промывки геля содержание акриламида в промывной воде уменьшается от 120 000 до 3 мкг/л. Следовательно, тщательно промывные препараты иммобилизованных в полиакриламидном геле ферментов могут быть рекомендованы как не вредные для обработки пищевых продуктов.

Таблиц - 2, фигур - 3, библиографических наименований - 9.

УДК 541.127.2; 547.441

Исследование реакций глутарового альдегида с дипептидом глицил-фенилаланином. Озолиньш А.Я., Кёстнер А.И. "Труды Таллинского политехнического института", № 424, 1977, с. 81-84.

Титрованием освобожденных протенов в режиме рН статирования исследована кинетика реакции глутарового альдегида с дипептидом глицил-фенилаланином. Установлено, что реакция является двухстадийной, включающей начальную реакцию нулевого порядка с последующей более медленной реакцией. Определены начальные скорости освобождения протонов для второй стадии реакции.

Таблиц - 1, библиографических наименований - 9.



**Цена 67 коп.**